

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 581**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2015 PCT/AU2015/050662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16065410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2015 E 15855121 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3212202**

54 Título: **Inhibidores de Mcl-1 para su uso en el tratamiento de enfermedades provocadas por neovascularización patológica**

30 Prioridad:

29.10.2014 AU 2014904330

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

28.01.2021

73 Titular/es:

**THE WALTER AND ELIZA HALL INSTITUTE OF
MEDICAL RESEARCH (100.0%)
1G Royal Parade, Parkville
Melbourne, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**COULTAS, LEIGH;
DEWSON, GRANT y
WATSON, EMMA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 803 581 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

Inhibidores de Mcl-1 para su uso en el tratamiento de enfermedades provocadas por neovascularización patológica

5 Campo

La memoria descriptiva se refiere de manera general al campo de los agentes terapéuticos. Más en particular, la memoria descriptiva se refiere a métodos para modular la angiogénesis empleando agentes terapéuticos.

10 Antecedentes

Los detalles bibliográficos de las referencias en la memoria descriptiva del tema también se enumeran al final de la memoria descriptiva.

15 La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debería tomarse como, reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

20 La red de vasos sanguíneos es el conducto por el cual los nutrientes y las señales hormonales se distribuyen por todo el cuerpo. A medida que los animales crecen, las redes de vasos sanguíneos se deben expandir para satisfacer las demandas metabólicas de los órganos y tejidos en crecimiento a los que sirven. Para conseguir esto, las células endoteliales vasculares que recubren los vasos preexistentes experimentan una serie de eventos coordinados de proliferación, diferenciación, maduración y reordenamiento para generar nuevos vasos sanguíneos funcionales. Esta colección de cambios morfológicos se denomina angiogénesis. La angiogénesis es principalmente activa en tejidos
25 en crecimiento, por lo tanto, ocurre principalmente durante la etapa fetal de la vida y, salvo algunas excepciones, está en gran parte ausente de los adultos. En respuesta a estímulos proangiogénicos, las células endoteliales se pueden despertar de la latencia para reanudar un estado angiogénico. La activación inapropiada de la angiogénesis puede ocurrir en condiciones patológicas, donde a menudo se le denomina "neovascularización". La neovascularización puede causar o contribuir a una variedad de cuadros patológicos, cuyos ejemplos incluyen cáncer, afecciones
30 inflamatorias crónicas y oftalmopatías neovasculares tales como la degeneración macular asociada con la edad, la retinopatía diabética y la retinopatía de la prematuridad.

35 La apoptosis, o muerte celular programada, es un medio genéticamente codificado por el cual las células redundantes y potencialmente dañinas se eliminan del cuerpo. Dos vías detectan y transducen señales apoptóticas: la vía intrínseca dependiente de la familia BCL2, y la vía extrínseca dependiente del receptor de muerte. La familia BCL2 de reguladores de muerte celular consta de miembros de prosupervivencia y proapoptóticos. Los estímulos apoptóticos que incluyen tensiones celulares tales como la retirada del factor de crecimiento, la pérdida de contacto con matrices de soporte ('anoikis') y daño en el ADN, activan la subclase de proteínas proapoptóticas 'solo BH3' (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, noxa y PUMA), que luego suprime a los miembros prosupervivencia de la familia (BCL2, BCLX, BCLW, MCL1 y A1) y activa BAK y BAX. Una vez liberados, BAK y BAX causan la liberación de factores apoptogénicos, tales como el citocromo C, de las mitocondrias, dando como resultado en última instancia la activación de las proteasas de caspasa que escinden los componentes celulares vitales y activan las desoxirribonucleasas, por lo tanto, destruyendo la célula.

45 Se han desarrollado inhibidores con afinidad selectiva por distintas proteínas Bcl-2 prosupervivencia y se ha demostrado que desencadenan la activación de la respuesta apoptótica en tipos celulares específicos.

Existe la necesidad en la técnica de identificar protocolos para modular la angiogénesis mientras se mantiene una función fisiológica saludable de células y tejidos endoteliales adultos.

50 Sumario

En toda la presente memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprende" o variaciones tales como "comprende" o "comprender", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo
55 de elementos o números enteros.

Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen aspectos plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una composición" incluye una composición única, así como dos o más composiciones; la referencia a "un agente" incluye un agente, así como dos o más agentes; la referencia a "la divulgación" incluye aspectos únicos y múltiples de la divulgación, etc.
60

Usando un enfoque genético, se ha demostrado en el presente documento que la proteína de prosupervivencia, Mcl-1, es crítica para la supervivencia de células endoteliales angiogénicas, pero no angiogénicas (quiescentes) de la retina. La memoria descriptiva permite el uso de inhibidores de Mcl-1 para promover la apoptosis en las células endoteliales que sufren angiogénesis y, por lo tanto, disminuir la vasculatura angiogénica patológica. En particular, la memoria descriptiva permite el uso de inhibidores de Mcl-1 para promover la apoptosis en células endoteliales
65

vasculares que sufren neovascularización en cuadros patológicos, en particular, el de la oftalmopatía neovascular.

Tal como se determina en el presente documento, las células endoteliales retinianas no angiogénicas (quiescentes), tales como las que forman las arterias y venas (vasculatura) de la retina adulta sana son resistentes a la apoptosis inducida por la pérdida de Mcl-1 y las células endoteliales retinianas angiogénicas son selectivamente sensibles a la apoptosis inducida por la pérdida de Mcl-1. Por lo tanto, en una realización, la presencia o distribución de células endoteliales retinianas angiogénicas asociadas a la enfermedad se puede reducir de manera selectiva por la pérdida de la actividad del polipéptido Mcl-1.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica, en donde la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

También se describe en el presente documento un método para reducir la neovascularización patológica en un sujeto. En un ejemplo, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un agente que suprima la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1. En un ejemplo, de este modo, el agente reduce el número de células endoteliales angiogénicas a la vez que evita sustancialmente las células endoteliales inactivas en el sujeto.

También se describe en el presente documento un método para reducir la neovascularización ocular patológica en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 y en el que el agente reduce de ese modo el número de células endoteliales angiogénicas mientras que evita sustancialmente las células endoteliales inactivas en el ojo.

Diversas enfermedades y afecciones están asociadas con la neovascularización ocular como es conocido por el experto en la materia. Las enfermedades o afecciones del ojo humano y sus modelos animales se describen en, por ejemplo, Miller *et al* Ophthalmology, 120 (1), 2013 y Stahl *et al* Invest. Ophthalmology & Visual Science, 51 (6) 2010. En una realización, la neovascularización ocular se asocia con una o más de las siguientes: retinopatía, retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

En una realización, el agente se une selectivamente al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1.

En consecuencia, en algunas realizaciones, el agente comprende una molécula pequeña inhibidora, o un péptido o polipéptido. En una realización, los agentes penetran en la membrana para facilitar la unión al ácido nucleico de Mcl-1 y al polipéptido de Mcl-1. Convenientemente, los agentes están aislados o no se producen de forma natural, se pueden producir de forma sintética o recombinante. En una realización, el agente se coadministra conjuntamente con otros agentes activos tales como un agente antiangiogénico adicional.

En otra realización, el agente se une selectivamente al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión de Mcl-1.

En este caso, dichos agentes típicamente comprenden o codifican un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido. Como antes, dichos agentes son típicamente aislados o de origen no natural y se fabrican de manera sintética o recombinante. Los agentes pueden ser conjugados o moléculas quiméricas que comprenden mezclas de las moléculas descritas en el presente documento.

Adecuadamente, el agente está la forma de una composición o kit. En el presente documento se describen composiciones farmacéuticas o fisiológicas que comprenden vehículos y kits adecuados que comprenden las mismas.

En una realización, el agente está en la forma de una composición farmacéutica o fisiológica.

En algunas realizaciones, para su uso en los métodos descritos en el presente documento, el agente está en forma de una composición farmacéutica o fisiológica adecuada para la administración tópica u ocular del agente a la región del ojo, tal como a la retina y/o la coroides.

La referencia a un sujeto incluye en donde el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado de una enfermedad o afección del ojo seleccionada del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

También se describe en el presente documento el uso de un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 en, o en la fabricación de un medicamento para, tratar una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica.

5 Tal como se conoce para aquellos expertos en la materia, una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

10 Tal como se analiza en el presente documento, en una realización, el agente se une selectivamente al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1. Los agentes ilustrativos comprenden moléculas pequeñas inhibitoras, péptidos o polipéptidos que penetran las membranas de las células endoteliales y suprimen la actividad de Mcl-1. En otra realización, el agente se une selectivamente al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión de Mcl-1. Los agentes ilustrativos incluyen moléculas que comprenden o codifican un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido aislada o no natural.

15 Las composiciones farmacéuticas o fisiológicas para su uso en los métodos objeto se describen en el presente documento. En una realización, la composición comprende además un vehículo y/o diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

20 En una realización, las composiciones son adecuadas para la administración tópica u ocular del agente a la región del ojo (retina y/o coroides).

25 En otra expresión, la descripción permite un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica en la que el agente reduce el número de células endoteliales angiogénicas mientras evita sustancialmente las células endoteliales quiescentes (que son relativamente o esencialmente quiescentes) en el ojo. Como se ha indicado, en algunas realizaciones, el agente es un inhibidor de molécula pequeña que penetra en la membrana, péptido, polipéptido o molécula de ácido nucleico.

30 En una realización, el agente suprime completamente la actividad de Mcl-1 en las células endoteliales.

35 Los kits que comprenden las composiciones y agentes objeto se contemplan en el presente documento.

También se describe en el presente documento un método para reducir la neovascularización patológica en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 y en el que el agente reduce de ese modo el número de células endoteliales angiogénicas mientras que evita sustancialmente las células endoteliales inactivas en el tejido.

40 Además, se describe en el presente documento un método para reducir un trastorno de mal funcionamiento vascular en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 y en el que el agente reduce de ese modo el número de células endoteliales angiogénicas mientras que evita sustancialmente las células endoteliales inactivas en el tejido.

45 En una realización, la neovascularización patológica se asocia con un trastorno de mal funcionamiento vascular.

50 En una realización, el trastorno de mal funcionamiento vascular se selecciona de la lista que consiste en malformación arteriovenosa, malformación capilar, telangiectasia hemorrágica hereditaria, síndrome de Sturge-Weber, malformación cavernosa cerebral, malformación venosa, múltiples malformaciones venosas cutáneas y mucosales, síndrome de nevus azul, malformación glomuvenosa, síndrome de CLOVE, síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber, síndrome de Proteus y síndrome de tumor hamartoma PTEN.

55 También se describe en el presente documento un método para reducir selectivamente el número de células endoteliales angiogénicas o proliferativas mientras se ahorran células endoteliales inactivas en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1.

60 En una realización, al sujeto se le ha diagnosticado de un tumor.

En otra realización, las células endoteliales son angiogénicas.

En una realización, al sujeto se le ha diagnosticado de un tumor de origen de células endoteliales.

65 Tal como saben los expertos en la materia, el tumor de origen endotelial se selecciona del grupo que comprende hemangioma capilar, hemangioma sinovial, hemangioma venoso, hemangioma arteriovenoso, hemangioma

epitelioide, hemangioendotelioma kaposiforme, hemangioendotelioma retiforme, angioendotelioma papilar intralifático, angioendotelioma compuesto, angioendotelioma pseudomiogénico (similar al sarcoma epitelioide), sarcoma de Kaposi, hemangioendotelioma epitelioide y angiosarcoma.

5 En una realización, el tumor no sobreexpresa Mcl-1.

Tal como se analiza en el presente documento, en una realización, el agente se une al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1.

10 Los agentes ilustrativos comprenden moléculas pequeñas inhibitoras, péptidos basados en anticuerpos (tales como péptidos de revestimiento, monocíclicos o bicíclicos, péptidos grapa o estructuralmente restringidos tal como se conoce en la técnica) o polipéptidos que penetran en las membranas celulares endoteliales y suprimen la actividad de Mcl-1.

15 En otra realización, el agente se une selectivamente al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión de Mcl-1.

En una realización, la apoptosis aumenta en las regiones venosas y de brotación que comprenden células endoteliales vasculares proliferativas (angiogénicas).

20 En una realización, la apoptosis no aumenta sustancialmente en las células endoteliales vasculares no angiogénicas (células preservadas).

Los agentes ilustrativos incluyen moléculas que comprenden o codifican un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido aislada o no natural.

25 Las composiciones farmacéuticas o fisiológicas para su uso en los métodos objeto se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

30 En algunas realizaciones, la supresión de la actividad de Mcl-1 incluye al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %, 97 %, 98 % o el 99 % o el 100 % proporcionalmente menos de actividad en una célula tratada en comparación con un control adecuado, o al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 1000 veces o 10000 veces o más de supresión en una célula tratada en comparación con un control adecuado.

35 En algunas realizaciones, La supresión del polipéptido Mcl-1 por una molécula pequeña, peptidomimética o un agente peptídico restringido es selectiva de modo que el agente se une al polipéptido Mcl-1 con una afinidad de al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 1000 o 10000 veces o más que la afinidad del agente por dominios no Mcl-1, o polipéptidos Bcl-2 no Mcl-1 (tales como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W y A1). Los presentes métodos y usos son adecuados para su uso con cualquier supresor (antagonista) de Mcl-1 adecuado.

45 El papel de Mcl-1 en la protección de algunas células tumorales de la apoptosis ha impulsado los esfuerzos para identificar inhibidores de Mcl-1 y se han identificado antagonistas de alta afinidad. Los inhibidores ilustrativos de Mcl-1 comprenden dominios de Mcl-1 BH3 (véase Sattler *et al.* Science 275, 983-986, 1997), pequeños ARN interferentes (Lin *et al.*, Oncogene 26: 2972, 2007).101 Véase el documento WO 2008/131000 en el nombre de Abbott Laboratories para inhibidores de Indol Mcl-1 sustituidos en 7. Véase el documento WO 2008/130970 a nombre de Abbott Laboratories para los inhibidores de Indol Mcl-1 no sustituidos en 7. Véase los documentos WO2015097123 y US2015175623 a nombre de Servier Laboratories y Vernalis R&D Ltd para derivados de tienopirimidina que son inhibidores de Mcl-1 y donde también se describen métodos para su producción.

50 Véase también el documento WO 2006/135985 describe la proteína solo BH3 derivada de Bim humano que se dirige selectivamente a Mcl-1, tal como se muestra con el Mcl-1 de ratón como diana. La Tabla 4a del documento WO 2006/135985 muestra mutaciones del péptido Bim BH3 que muestran la selectividad de Mcl-1 sobre otros miembros de la familia Bcl2, por ejemplo, A9E, L12A, G16E y D17A. El Ejemplo 4, el último párrafo describe mutantes de Bim BH3 que son específicos para Mcl-1 y la Tabla 6 muestra que la doble mutación de L12A y F19A en la secuencia del dominio Bim BH3 hace que el péptido sea selectivo para Mcl-1. Véase también el documento WO 2007008627 que describe promotores de apoptosis en nombre de Abbott Laboratories, véase también Bajwa Expert Opin. Ther. Pat. 22, 37-55, 2012.

60 Cualquier realización en este documento se tomará para aplicar *mutatis mutandis* a cualquier otra realización a menos que se indique específicamente lo contrario.

65 El sumario anterior no es y no debe verse de ninguna manera como una recitación exhaustiva de todas las realizaciones de la presente divulgación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Reducción de la densidad vascular y aumento de la apoptosis en vasos sanguíneos retinianos angiogénicos deficientes en *Mcl1*.

5 (A) Imágenes representativas de retinas de neonatos de control de 5 días y de neonatos deficientes en *Mcl1* (*Mcl1^{EC/EC}*) teñidas para la membrana basal vascular de la proteína del colágeno IV. Los círculos delimitan el límite entre la zona de brotación (externa) y la zona de remodelación (interna). Barra de escala = 500 mm. (B) Cuantificación del área vascular total en retinas de neonatos de camada de control de 5 días (barra negra, n = 3) y de neonatos *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 6). (C) Total de células endoteliales apoptóticas (caspasa activa 3⁺) por mm² del área vascular total en neonatos de control de 5 días (barra negra, n = 3) y *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 6). (D) Número de células endoteliales apoptóticas (caspasa activa 3⁺) asociadas con la remodelación de arterias en neonatos de 5 días de vida *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 6), presentado como múltiplo de variación en relación con el control (barra negra, n = 3) y normalizado al área vascular en la zona de remodelación. (E) Número de células endoteliales apoptóticas (caspasa activa 3⁺) asociadas con la remodelación de venas en neonatos de 5 días de vida *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 6), presentado como múltiplo de variación en relación con el control (barra negra, n = 3) y normalizado al área vascular en la zona de remodelación. (F) Número de células endoteliales apoptóticas (caspasa activa 3⁺) en la zona de brotación de neonatos de 5 días de vida *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 6), presentado como múltiplo de variación en relación con el control (barra negra, n = 3) y normalizado al área vascular en la zona de brotación. Todos los datos se presentan como media 6 EEM. ns = no significativo, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Prueba t de Student de dos colas.

Figura 2. MCL1 no es necesario para la supervivencia de la vasculatura retiniana quiescente.

25 (A) Imágenes representativas de la vasculatura arterial de retinas de control y *Mcl1^{EC/EC}* teñidas para el marcador endotelial PECAM1. Barra de escala = 200 mm. (B) Cuantificación del área vascular total en retinas adultas alrededor de las arterias de control (barra negra, n = 3) y de *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 3). Las tres capas de vasculatura retiniana del adulto se cuantificaron individualmente. Los datos que se muestran son la suma de las tres capas, presentadas en relación con el área total analizada. (C) Imágenes representativas de la vasculatura venosa retinas del control y de *Mcl1^{EC/EC}* teñidas para PECAM1. Barra de escala = 200 mm. (D) Cuantificación del área vascular total en retinas adultas alrededor de las venas de control (barra negra, n = 3) y de *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 4). Las tres capas de vasculatura retiniana del adulto se cuantificaron individualmente. Los datos que se muestran son la suma de las tres capas, presentadas en relación con el área total analizada. (E) Número de células endoteliales apoptóticas (caspasa activa 3⁺) por retina en ratones adultos de control (barra negra, n = 2) y *Mcl1^{EC/EC}* (barra gris, n = 3). Todos los datos se presentan como media 6 EEM. ns = no significativo, Prueba t de Student de dos colas.

Figura 3. La neovascularización patológica depende de la actividad de MCL1.

40 *Mcl1^{ECl+}* y los controles de camada se expusieron al 75 % de oxígeno continuamente entre los días postnatales 7-12, luego volvieron al aire ambiental. El área neovascular en la retina se cuantificó el día postnatal 17. El área neovascular en animales de genotipo control (*control*, n = 5) se normaliza al 100 %. El área neovascular en ratones *Mcl1^{ECl+}* (n = 7) se muestra como un porcentaje de eso en los controles de camada. Los datos se presentan como la media 6 EEM. ** p < 0,01, Prueba t de Student de dos colas.

Discusión detallada de realizaciones

45 La divulgación del tema no se limita a procedimientos o agentes particulares, formulaciones específicas de agentes y diversas metodologías médicas, ya que éstas pueden variar.

La presente invención se refiere a un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica.

50 También se describe aquí un método para reducir la neovascularización ocular en un sujeto. En un ejemplo, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un agente que suprima la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1. En un ejemplo, de este modo, el agente reduce el número de células endoteliales angiogénicas a la vez que evita sustancialmente las células endoteliales quiescentes (no angiogénicas) en el ojo.

55 La neovascularización se refiere a la producción patológica de nuevos vasos sanguíneos y está asociada con una variedad de enfermedades y afecciones conocidas por el destinatario experto. Está provocada por la activación inapropiada de la angiogénesis por estímulos proangiogénicos que estimulan las células endoteliales no replicantes o no angiogénicas (denominadas en el presente documento como células quiescentes) para experimentar una serie de eventos proliferativos, de diferenciación, maduración y reordenamiento para generar nuevos vasos sanguíneos funcionales, típicamente de los vasos sanguíneos existentes.

60 El término "angiogénico" o "angiogénesis" se refiere a la expansión de los lechos de vasos sanguíneos existentes. La angiogénesis tiene lugar durante el desarrollo, la cicatrización de heridas y en ciertas afecciones patológicas, incluidas las descritas en el presente documento.

La referencia en el presente documento a células "endoteliales" se refiere en una realización a endotelios vasculares, es decir, esencialmente a la monocapa de células que recubren los vasos sanguíneos que son importantes para modular la función vascular, el crecimiento, la estabilidad (junto con células parietales) y la permeabilidad. Tal como saben los expertos en la materia, los tumores de origen endotelial se seleccionan del grupo que comprende hemangioma capilar, hemangioma sinovial, hemangioma venoso, hemangioma arteriovenoso, hemangioma epiteliode, hemangioendotelioma kaposiforme, hemangioendotelioma retiforme, angioendotelioma papilar intralifático, angioendotelioma compuesto, angioendotelioma pseudomiogénico (similar al sarcoma epiteliode), sarcoma de Kaposi, hemangioendotelioma epiteliode y angiosarcoma.

En una realización, las células endoteliales son células endoteliales vasculares.

La referencia a "tumor" incluye todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Cáncer, por supuesto, se refiere a la afección fisiológica en mamíferos asociada con el crecimiento no regulado.

En una realización, las células "quiescentes" son células maduras que no están emprendiendo un programa de crecimiento regulado o no regulado. Por tanto, es probable que se diferencien en forma terminal y tengan marcadores de superficie celular asociados con un crecimiento regulado negativamente. En una realización, las células endoteliales quiescentes están asociadas con la vasculatura madura que no está experimentando crecimiento vascular y angiogénesis. El crecimiento vascular está asociado con el crecimiento de nuevos vasos, la poda de nuevos vasos y un proceso de maduración. Por tanto, la angiogénesis y las células endoteliales activas (no quiescentes) están asociadas con mayores niveles de proliferación y apoptosis. Los niveles de apoptosis se pueden determinar por los expertos en la materia, tal como determinando el número de células caspasa 3⁺.

El crecimiento vascular incluye el brote temprano de vasos angiogénicos y un crecimiento más diferenciado de arterias y venas.

En una realización, las venas en crecimiento y las regiones de brotación del lecho vascular neonatal son particularmente sensibles al bloqueo de Mcl-1. Por lo tanto, en una realización, La inhibición de Mcl-1 proporciona un mayor efecto inhibitorio sobre la angiogénesis venosa.

La referencia a "Mcl-1" en el presente documento incluye isoformas de mamíferos, mutantes, variantes y homólogos u ortólogos de varias especies, incluyendo, sin limitación, formas murinas y humanas. Las secuencias de proteína Mcl-1 de ratón y humano muestran un 76 % de identidad (82 % de similitud) según lo determinado por el BLAST del NCBI basándose en las siguientes secuencias ilustrativas de longitud completa:

> Secuencia de MCL1 humana (longitud completa):

```
MFGLKRNAVIGLNLYCGGAGLGAGSGGATRPGGRLATEKEASARREIGGGE
AGAVIGGSAGASPPSTLTPDSRRVARPPPIGAEPDVTATPARLLFFAPTRRAAP
LEEMEAPAADAIMSPPEELDGYEPEPLGKRPAVLPLELVGESGNNTSTDGSLP
STPPPAEEEEDELRYQSLEIISRYLREQATGAKDTKPMGRSGATSRKALETLR
VGDGVQRNHETAFQGMLRKLDIKNEDDVKSLSRVMIHVFSDBGVTNWGRIVTL
ISFGAFVAKHLKTINQESCIEPLAESITDVLVRTKRDWLVKQRGWDGFVEFFHV
EDLEGGIRNVLLAFAGVAGVGAGLAYLIR (SEQ ID NO:1)
```

> Secuencia de MCL1 de ratón (longitud completa):

MFGLRRNAVIGLNLYCGGASLGAGGGSPAGARLVAAEEAKARREGGGEAALLP
 GARVVARPPPVGAEKDPVDTASAERRLHKSPGLLAVPPEEMAASAAAIVSPEE
 ELDGCEPEAIGKRPAVLPLLERVSEAAKSSGADGSLPSTPPPPEEEEDDLRQSL
 EIISRYLREQATGSKDSKPLGEAGAAGRRALETLRVGDGVQRNHETAFQGML
 RKLDIKNEGDVKSFSRVMVHVFKDGVNTNWGRIVTLISFGAFVAKHLKSVNQES
 FIEPLAETITDVLVRTKRDWLVKQRGWDGFVEFFHVQDLEGGIRNVLLAFAGV
 AGVGAGLAYLIR (SEQ ID NO:2).

5 Una variante biológicamente activa de un polipéptido Mcl-1 puede diferir de ese polipéptido generalmente en tanto 100, 50 o 20 restos de aminoácidos o adecuadamente en tan solo 1-15 restos de aminoácidos, tan solo 1-10, tal como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido. Las variantes se pueden producir de forma natural o se producen utilizando tecnología conocida en la técnica.

10 Los agentes a los que se hace referencia en el presente documento para su uso en los métodos objeto son moduladores o supresores de Mcl-1 que cambian la actividad del polipéptido Mcl-1 reduciendo la formación de Mcl-1 o reduciendo la actividad funcional de Mcl-1, es decir, suprimiendo eficazmente la apoptosis. Los agentes a los que se hace referencia en el presente documento interactúan o se unen a un ácido nucleico de Mcl-1 o a una proteína Mcl-1. Los inhibidores de Mcl-1 particulares son derivados de tienopirimidina tales como los descritos en los documentos WO2015097123 y US2015175623 donde también se describen métodos para su producción. Los inhibidores preferidos de Mcl-1 son altamente específicos para Mcl-1, de modo que inhiben a Mcl-1 en mayor medida de lo que
 15 inhiben a otros miembros de la familia Bcl-2 antiapoptóticos.

20 Diversas enfermedades y afecciones están asociadas con la neovascularización ocular como es conocido por el experto en la materia. En una realización, la neovascularización ocular se asocia con una o más de las siguientes: retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

En una realización, el agente se une selectivamente al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1.

25 En consecuencia, en algunas realizaciones, el agente comprende una molécula pequeña inhibidora, o un péptido o polipéptido. En una realización, los agentes penetran en la membrana para unirse al ácido nucleico Mcl-1 y al polipéptido Mcl-1. Convenientemente, los agentes están aislados o no se producen de forma natural, se pueden producir de forma sintética o recombinante.

30 Se entiende que las moléculas pequeñas se refieren a compuestos químicos o moléculas que tienen un peso molecular inferior a 2000 daltons.

En otra realización, el agente se une selectivamente al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión de Mcl-1.

35 En este caso, dichos agentes típicamente comprenden o codifican un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido. Como antes, dichos agentes son típicamente aislados o de origen no natural y se fabrican de manera sintética o recombinante. Los agentes pueden ser conjugados o moléculas quiméricas que comprenden mezclas de las moléculas descritas en el presente documento.

40 Adecuadamente, el agente está la forma de una composición o kit. La composición farmacéutica o fisiológica y los kits que los comprenden se describen en el presente documento.

45 Para su uso en los métodos descritos en el presente documento, el agente está en forma de una composición farmacéutica o fisiológica adecuada para la administración tópica u ocular del agente a la región del ojo, tal como a la retina y/o la coroides.

La referencia a un sujeto incluye en donde el sujeto es un humano.

50 En algunas realizaciones, al sujeto se le ha diagnosticado de una enfermedad o afección del ojo seleccionada del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

También se describe en el presente documento el uso de un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 en, o en la fabricación de un medicamento para, tratar una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica.

Tal como se conoce para aquellos expertos en la materia, una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.

Tal como se analiza en el presente documento, en una realización, el agente se une selectivamente al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1. Los agentes ilustrativos comprenden moléculas pequeñas inhibidoras, péptidos o polipéptidos que penetran las membranas de las células endoteliales y suprimen la actividad de Mcl-1. En otra realización, el agente se une selectivamente al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión de Mcl-1. Los agentes ilustrativos incluyen moléculas que comprenden o codifican un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido aislada o no natural.

Las composiciones farmacéuticas o fisiológicas para su uso en los métodos objeto se describen en el presente documento. En una realización, la composición comprende además un vehículo y/o diluyente farmacéutica o fisiológicamente aceptable.

En una realización, las composiciones son adecuadas para la administración tópica u ocular del agente a la región del ojo (en particular, retina y/o coroides).

En otra expresión, la descripción permite un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica en la que el agente reduce el número de células endoteliales angiogénicas mientras evita sustancialmente las células endoteliales quiescentes en el ojo. Como se ha indicado, en alguna realización, el agente es un inhibidor de molécula pequeña, péptido, polipéptido o molécula de ácido nucleico que penetra en la membrana. Se puede medir una reducción en el número de células endoteliales vasculares de varias maneras diferentes, como sería evidente para los expertos en la materia. Por lo tanto, se puede medir o evaluar el número de vasos sanguíneos nuevos o el tamaño del lecho vascular, o la tasa de crecimiento o contracción del lecho vascular en un tejido determinado. En una realización, el agente suprime completamente la actividad de Mcl-1 en las células endoteliales vasculares. Como alternativa o adicionalmente, se puede evaluar el nivel de ARNm o polipéptido Mcl-1.

Los kits que comprenden las composiciones y agentes objeto se contemplan en el presente documento.

También se describe en el presente documento un método para reducir la neovascularización patológica en un tejido o un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesite un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 y en el que el agente reduce de ese modo el número de células endoteliales angiogénicas mientras que evita sustancialmente las células endoteliales inactivas en el tejido.

Adicionalmente se describe en el presente documento un método para reducir selectivamente el número de células endoteliales vasculares angiogénicas o proliferativas mientras se ahorran células endoteliales inactivas en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1.

En una realización, al sujeto se le ha diagnosticado de un tumor.

En otra realización, las células endoteliales son angiogénicas.

En una realización, al sujeto se le ha diagnosticado de un tumor de origen de células endoteliales.

En una realización, el tumor de origen endotelial se selecciona del grupo que comprende hemangioma capilar, hemangioma sinovial, hemangioma venoso, hemangioma arteriovenoso, hemangioma epiteliode, hemangioendotelioma kaposiforme, hemangioendotelioma retiforme, angioendotelioma papilar intralifático, angioendotelioma compuesto, angioendotelioma pseudomiogénico (similar al sarcoma epiteliode), sarcoma de Kaposi, hemangioendotelioma epiteliode y angiosarcoma.

Tal como se analiza en el presente documento, en una realización, el agente se une selectivamente al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1.

Los agentes ilustrativos comprenden moléculas pequeñas inhibidoras, péptidos basados en anticuerpos (como revestimiento, monocíclico o bicíclico, péptidos grapa como se conoce en la técnica) o polipéptidos que suprimen la actividad de Mcl-1. En algunas realizaciones, los agentes penetran las membranas de las células endoteliales. En una

realización alternativa, los agentes se expresan dentro de una célula endotelial.

En otra realización, el agente se une selectivamente al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión de Mcl-1.

5 Los agentes ilustrativos incluyen moléculas que comprenden o codifican un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido aislada o no natural.

Las composiciones farmacéuticas o fisiológicas para su uso en los métodos objeto se describen en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, la supresión de la actividad de Mcl-1 incluye al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %, 97 %, 98 % o el 99 % proporcionalmente menos de actividad en una célula tratada en comparación con un control adecuado, o al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 1000 veces o 10000 veces de supresión o más en una célula tratada en comparación con una muestra de referencia de control adecuada.

20 En algunas realizaciones, la supresión del polipéptido Mcl-1 por una molécula pequeña o un agente peptídico restringido es selectiva de modo que el agente se une al polipéptido Mcl-1 con una afinidad de al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 1000 o 10000 veces o más que la afinidad del agente por dominios no Mcl-1, o polipéptidos Bcl-2 no Mcl-1 (tales como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W y A1). Los presentes métodos y usos son adecuados para usar con cualquier antagonista de Mcl-1 adecuado.

25 Los términos "modular", "inhibir" o "regular negativamente", "suprimir" y similares incluyen antagonizar, disminuir, reducir e inhibir de forma parcial la formación, expresión, el nivel o la actividad de Mcl-1 en relación con la reducción de la angiogénesis endotelial en un sujeto.

Los agentes sujetos se aíslan o purifican, lo que significa que los agentes pueden ser de origen natural pero retirados de su entorno fisiológico normal. Como alternativa, los agentes son de origen no natural.

30 En una realización, los agentes se unen específicamente a su diana, lo que significa que no se unen sustancialmente a otras dianas en una muestra. En una realización, una primera molécula se une específicamente a una segunda molécula cuando se une con al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 1000 veces o 10000 veces de preferencia sobre un miembro de unión no específico (por ejemplo, BSA) o sobre una proteína estructuralmente similar. Los intervalos proporcionados en el presente documento se entienden como una forma abreviada de todos los valores dentro del intervalo.

40 Una "reducción" o "reduce" en relación con las células endoteliales angiogénicas puede ser una reducción en las células endoteliales vasculares, una reducción en nuevos vasos sanguíneos, un lecho vascular reducido (área o densidad de los vasos sanguíneos), un número reducido de venas o arterias o vasos sanguíneos recién brotados. La reducción puede ser del 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o del 99 % en relación con un control adecuado. En algunas realizaciones, la reducción es del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 %, 97 %, 98 %, o el 99 % o el 100 % o más, en relación con un control adecuado.

50 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, en particular, a un mamífero y más en particular a un primate que incluye un primate inferior y aún más particularmente, a un ser humano que se puede beneficiar del protocolo médico de la presente invención. Un sujeto independientemente de si un ser humano o animal no humano puede ser referido como un individuo, sujeto, animal, paciente, hospedador o receptor. La presente invención tiene aplicaciones tanto humanas como veterinarias. Por conveniencia, un "animal" incluye específicamente animales de ganado tales como el ganado, caballos, ovejas, cerdos, camélidos, cabras y burros y animales de ensayos de laboratorio. Con respecto a los caballos, éstos incluyen los caballos utilizados en la industria de las carreras, así como los utilizados recreativamente o en la industria ganadera. Ejemplos de animales de ensayos de laboratorio incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres. Los conejos y los animales roedores, tales como ratas y ratones, proporcionan un sistema de prueba o modelo animal conveniente como lo hacen los primates y los primates inferiores.

60 Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento" es una estrategia para obtener beneficio o resultados clínicos deseados. Estos incluyen una mejora medible o estadísticamente significativa de la enfermedad o afección en al menos algunos sujetos, incluido el alivio de los síntomas, el grado reducido de una enfermedad o afección, la estabilización o la ralentización de la enfermedad o afección. De manera ideal, en relación con el ojo, esto incluirá una visión mejorada o un dolor reducido o una tasa reducida de pérdida de visión, un nivel reducido de ceguera en un sujeto o proporción de pacientes. El tratamiento también se puede referir a niveles reducidos de polipéptido Mcl-1 en células endoteliales que llevan a una vascularización reducida de los tumores o a un modelado vascular mejorado

después del tratamiento o cirugía, incluyendo visión mejorada o una tasa lenta de visión disminuida o visión estabilizada con respecto a la enfermedad ocular neovascular. Dichos resultados pueden ser controlados por el médico tratante.

- 5 En una realización ilustrativa, el agente es una molécula pequeña, una molécula de ácido nucleico o una proteína o péptido, tal como un péptido grapa o un plegómero, o un fragmento de anticuerpo.

En una realización, los agentes que tienen el potencial de actuar como supresores incluyen pequeñas moléculas químicas, péptidos lineales monocíclicos o bicíclicos o restringidos que pueden penetrar una membrana celular o entrar a la célula a través de un canal iónico u otro poro. Ciertos agentes de unión a antígeno que provienen de anticuerpos pueden mostrar transmisión intracelular, tales como los anticuerpos de cartílago que provienen de peces (por ejemplo, anticuerpos de tiburón; véase, por ejemplo, Liu *et al.*, BMC Biotechnol. 7:78, 2007). Un agente de unión a antígeno, o un fragmento funcionalmente activo del mismo, que tiene la capacidad de transmisión intracelular también incluye anticuerpos como los anticuerpos de camélidos y de llama, los anticuerpos scFv, intracuerpos o nanocuerpos, por ejemplo, intracuerpos scFv e intracuerpos VHH. Dichos agentes de unión a antígeno se pueden preparar tal como se describe por Harmsen y De Haard en Appl. Microbiol. Biotechnol. Nov; 77(1): 13-22, 2007; Tibary *et al.*, Soc. Reprod. Fertil. Supl. 64: 297-313, 2007; Muyl-dermans, J. Biotechnol. 74: 277 5 302, 2001; y las referencias citadas en los anteriores. En una realización, se describen intracuerpos scFv que pueden interferir con una interacción proteína-proteína; véase, por ejemplo, Visintin *et al.*, J. Biotechnol. 135: 1-15, 2008 y Visintin *et al.*, J. Immunol. Methods, 290(1-2): 135-53, 2008 para los métodos para su producción. Los agentes pueden comprender una secuencia peptídica adecuada para la penetración celular o una secuencia peptídica de localización nuclear como las descritas en Constantini *et al.*, Cancer Biotherm. Radiopharm., 23(1): 3-24, 2008 o la Publicación Internacional N.º WO 2005/086800. También útil para la administración *in vivo* son los vectores de péptidos Vectocell o Diato tales como los desvelados en De Coupade *et al.*, Biochem J. 390(pt2): 407-418, 2005 y Meyer- Losic *et al.*, J Med Chem. 49(23): 6908-6916, 2006. Los conjugados se pueden producir de forma recombinante o químicamente unidos o sintetizados.

Las moléculas pequeñas, los péptidos, etc. y otros agentes se pueden seleccionar mediante ensayos competitivos de unión a la polarización de fluorescencia y luego progresar a una cuantificación más selectiva de la inhibición de Mcl-1, unión y especificidad. Se pueden realizar estudios de actividad utilizando diluciones de agentes y cribados *in vitro* o *in vivo* de su capacidad para modular la angiogénesis endotelial. Los cribados *in vivo* revisarán la capacidad de los inhibidores de Mcl-1 para modular modelos animales de neovascularización ocular, como la neovascularización inducida por oxígeno (OIR) y la neovascularización coroidea inducida por láser (LICNV). La neovascularización ocular puede estar asociada con uno o más de los siguientes: retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular. Además, el cribado para efectos de agente en el remodelado, la angiogénesis endotelial y los tejidos y líneas celulares afectados por el tumor están habilitados. Tales cribados, identificados en el presente documento o conocidos en la técnica se aplican *in vivo* y se utilizan para probar y desarrollar agentes candidatos y determinar su estabilidad y toxicidad, biodisponibilidad etc. Por lo tanto, el término "en la fabricación de un medicamento" abarca el cribado *in vitro* e *in vivo* y el desarrollo.

Los modelos animales adecuados de enfermedad neovascular útiles para probar agentes incluyen la retinopatía inducida por oxígeno que emplea la exposición de los recién nacidos a una alta tensión de oxígeno para inducir la pérdida de la vasculatura retiniana inmadura (revisado en Stahl *et al.* (citado anteriormente)). Otros modelos adecuados y protocolos de detección se describen en Grossniklaus *et al.* Prog. Retin. Eye Res, 29(6):500-519, 2010. Los modelos adecuados son, en particular, aquellos que incluyen una respuesta neovascular tal como OIR y LICNV. Los productos naturales, los compuestos combinatorios sintéticos orgánicos o inorgánicos, las bibliotecas de fragmentos, péptido/polipéptido/proteína, las moléculas de ácido nucleico y las bibliotecas o fagos u otra tecnología de visualización que los comprende están disponibles para cribar o probar agentes adecuados.

Los productos naturales incluyen los de coral, suelo, planta, o el océano o ambientes antárticos. Las bibliotecas de pequeñas moléculas orgánicas se pueden generar y seleccionar utilizando tecnologías de alto rendimiento conocidas por los expertos en esta técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 5.763.623 y la Solicitud de los Estados Unidos N.º 20060167237. La síntesis combinatoria proporciona un enfoque muy útil en el que se sintetizan muchos compuestos relacionados que tienen diferentes sustituciones de un común o subconjunto de estructuras originales. Dichos compuestos generalmente no son oligoméricos y pueden ser similares en términos de su estructura y función básicas, por ejemplo, variando en longitud de la cadena, tamaño del anillo o número de sustituciones. Las bibliotecas virtuales también se contemplan y se pueden construir y probar compuestos por simulación con ordenador (véase, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 20060040322) o mediante ensayos *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica. Las bibliotecas de moléculas pequeñas adecuadas para la prueba están disponibles en la técnica (véase, por ejemplo, Amezcua *et al.*, Structure (Londres), 10: 1349-1361, 2002). Las bibliotecas de anticuerpos de levadura SPLINT están disponibles para analizar intracuerpos que pueden interrumpir las interacciones proteína-proteína (véase Visintin *et al.*, citado anteriormente). Los ejemplos de métodos adecuados para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrarse en la técnica. Los péptidos bicíclicos se describieron recientemente en Liskamp Nature Chemistry 6, 855-857 2014.

Los agentes pueden ser péptidos con grapas de hidrocarburos o proteínas en miniatura que son alfa-helicoidales y penetran en las células, y son capaces de interrumpir las interacciones proteína-proteína (véase, por ejemplo, Wilder *et al.*, Chem Med Chem. 2(8): 1149-1151, 2007; y para una revisión véase, Henchey *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2(6):692-697, 2008. Véase también la publicación de los Estados Unidos N.º 2005/0250680.

5 Por lo tanto, los agentes se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o de fase en solución paralelas direccionables de forma espacial; métodos de bibliotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de la biblioteca "una perla de un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de biblioteca biológica es adecuada para bibliotecas peptídicas, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables al péptido, oligómero no peptídico o bibliotecas de compuestos de molécula pequeña. Se pueden presentar bibliotecas de compuestos, por ejemplo, en solución, o en perlas, microplacas, bacterias, esporas y plásmidos o fagos tal como se conoce en la técnica.

15 Las moléculas de ácido nucleico, incluidos los oligonucleótidos y los vectores, como los virus que los codifican, se utilizan para suprimir la expresión génica de Mcl-1.

20 Los ácidos nucleicos (incluidos los oligonucleótidos, incluidas las moléculas de ácido nucleico bicatenario o monocatenario) incluyen ADN (ADNg, ADNc), ARN (ARN sentido, ARN antisentido, ARNm, ARNt, ARNr, ARN interferentes pequeños (ARNip), ARN bicatenarios (ARNds, ARN de horquilla corta (ARNhc), ARN de interacción con piwi (ARNpi), microARN (miARN), ARN nucleolar pequeños (ARNSno), ribozimas nucleares pequeñas (ARNSn), aptámeros, ADNzimas u otros complejos de tipo ribonucleasa se emplean convenientemente. Los métodos para producir construcciones quiméricas capaces de inducir interferencia de ARN en células eucariotas se describen en la técnica.

25 Los compuestos de acuerdo con la presente invención comprenden preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleobases (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 80 nucleósidos unidos). Un experto en la materia apreciará que la invención incorpora compuestos de 8 a 80 nucleobases inclusivas de longitud.

30 La secuencia del oligonucleótido o ácido nucleico está diseñada para exhibir características relacionadas con la energía adecuadas importantes para la formación de dúplex, especificidad, función, transporte y resistencia a la nucleasa. Tal como se conoce en la técnica, idealmente, las secuencias presentan propiedades mínimas de autohibridación, a menos que sea necesario. El programa informático, OLIGO, se puede usar para estimar el comportamiento de secuencias antisentido preferidas.

35 El ARN de interferencia (ARNi) incluye el proceso de silenciamiento génico que involucra ARN bicatenario (sentido y antisentido) que conduce a una reducción específica de secuencia en la expresión génica a través de la degradación del ARNm diana. El ARNi suele estar mediado por ARNip cortos de doble cadena o microARN monocatenarios (miARN). En términos generales, el ARNi se inicia cuando una cadena de ARN de cualquiera de estas moléculas forma un complejo denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que se dirige al ARN complementario y suprime la traducción. El proceso ha sido explotado con fines de investigación y para aplicación terapéutica (véase, por ejemplo, Izquierdo *et al.*, Cancer Gene Therapy, 12(3): 217-27, 2005). También se han descrito otros oligonucleótidos que tienen propiedades similares al ARN y se pueden desarrollar muchos más tipos diferentes de ARNi. Se han utilizado estrategias de ARNi y antisentido para inducir la supresión del codón de parada mediante la inhibición de la expresión de eRF1 (Carnes *et al.*, RNA, 9: 648-653, 2003). Los oligonucleótidos antisentido se han usado para alterar el uso de exones y para modular el empalme del pre-ARN.

50 Los compuestos antisentido y ARNi también son adecuados. Pueden ser oligonucleótidos bicatenarios o monocatenarios que son moléculas de ARN o de tipo ARN o de ADN o de tipo ADN que hibridan específicamente con secuencias codificantes de Mcl-1. Los compuestos de ARNi tienen típicamente una longitud de aproximadamente 8 a 80 nucleobases e hibridan específicamente con una región de ácido nucleico que codifica Mcl-1. El ARNip puede tener una primera cadena y una segunda cadena, cada cadena tiene aproximadamente de 20 a 25 nucleobases de longitud siendo las cadenas complementarias en al menos aproximadamente 19 nucleobases y teniendo en cada extremo terminal 3' de cada cadena un dímero de desoxitimidina (dTdT) que en el compuesto bicatenario actúa como un saliente en 3'. Como alternativa, los compuestos antisentido bicatenarios son ARNip de extremos romos. Como alternativa, se contemplan compuestos de ARNi monocatenario (ARNiss) que actúan a través del mecanismo de ARNi antisentido. Se pueden hacer modificaciones adicionales a los compuestos bicatenarios y pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos terminales, posiciones de nucleobase seleccionadas, posiciones de azúcar o uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden estar unidas a través de un resto de ácido nucleico o grupo enlazador. Cuando se forma a partir de una sola cadena, el ARNds puede tomar la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que se duplica sobre sí misma para formar un dúplex. Por lo tanto, los ARNds pueden ser total o parcialmente bicatenarios. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una sola hebra que toma la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria, se duplica sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se emparejan basándose en la forma de Watson-Crick.

Se prefieren los oligonucleótidos antisensibles insensibles a la nucleasa, ya que tienen una tasa de degradación sustancialmente reducida por las nucleasas, tales como ribonucleasas y/o desoxirribonucleasas. Tal como se define en la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la estructura principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal. Los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica también se pueden considerar oligonucleótidos. Los oligonucleótidos modificados ilustrativos incluyen oligonucleótidos tales como los que comprenden anillo de morfolina (anillos aromáticos C40N) en lugar del resto de azúcar ribosa natural. Otros oligonucleótidos modificados favorables incluyen 2-0-metilo, APN, ANB, morfolino o combinaciones de estos en variantes naturales (no modificadas) o análogos. Los compuestos oligoméricos basados en morfolino se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 5.034.506; los documentos WO 00024885 y WO 00045167 y se revisan en Ekker y Landon, *Genesis*, 30:89-93, 2001. Los oligonucleótidos de APN tienen propiedades de hibridación favorables, alta estabilidad biológica y son moléculas electrostáticamente neutras. En compuestos oligoméricos de APN, la estructura principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una estructura principal que contiene amida, en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se unen directa o indirectamente a átomos de aza nitrógeno de la porción de amida de la estructura principal. La preparación de compuestos oligoméricos de APN se desvela, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. También se incluyen variantes que incluyen ácidos nucleicos peptídicos con grupo fosfato (PHONA) o ácido nucleico bloqueado (ANB) o estructuras principales de morfolino o estructuras principales con enlaces alilo o enlaces amino. Diversas estructuras de oligonucleótidos modificados contempladas en el presente documento se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2002/0125287 y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.017.786 mencionadas en el presente documento en su totalidad.

Los términos "antagonista", "modificador", "compuesto", "agente activo", "resto", "agente farmacológicamente activo", "medicamento", "activo" y "fármaco" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una molécula que induce un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado y en particular suprime la actividad, función o formación de Mcl-1. Esto incluye el agente activo *per se* así como sales farmacéuticamente aceptables, farmacológicamente activas, ésteres, amidas, profármacos, metabolitos, análogos, etc. Los términos incluyen combinaciones de dos o más activos, tales como uno o más inhibidores de una actividad diana. Una "combinación" también incluye una composición farmacéutica de dos partes o más tal como una composición farmacéutica de múltiples partes donde los agentes se proporcionan por separado y se administran o dispensan por separado o se mezclan juntos antes de la distribución.

En el presente documento se describe un método para reducir la neovascularización en un sujeto que comprende la etapa de administrar un antagonista adicional de la angiogénesis y un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 de manera concurrente o secuencial. De acuerdo con un ejemplo, la neovascularización está asociada con el ojo o con una malformación vascular.

En una realización, al sujeto a tratar se le puede administrar el antagonista de la angiogénesis inicialmente y luego ser tratado con el inhibidor de Mcl-1. En otra realización, el sujeto se trata con el antagonista de la angiogénesis y el inhibidor de Mcl-1 de manera simultánea. De acuerdo con otra realización, el sujeto se trata con el antagonista de la angiogénesis hasta que no responde al tratamiento con el antagonista de la angiogénesis y luego se trata con un inhibidor de Mcl-1. En otra realización, el sujeto tratado con el inhibidor de Mcl-1 tiene elevados los niveles de ARN o proteína Mcl-1 en un tejido en comparación con el tejido de un sujeto que no padece la enfermedad. En este caso, el método puede incluir además la etapa de detectar ARN o proteína Mcl-1 en el sujeto, por ejemplo, en un tejido enfermo después del tratamiento con otro antagonista de la angiogénesis.

En el presente documento también se describe un método para reducir la neovascularización en un sujeto que comprende la etapa de administrar un antagonista de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 de manera concurrente (de manera simultánea) o secuencial. De acuerdo con un ejemplo, la neovascularización está asociada con el ojo o con una malformación vascular. En un ejemplo, la neovascularización es no neoplásica. Tal como se analiza en el presente documento, los antagonistas pueden ser proteínas o ácidos nucleicos, o moléculas pequeñas, péptidos, anticuerpos, etc., tal como se conocen en la técnica.

En una realización, al sujeto a tratar se le puede administrar un antagonista de VEGF inicialmente y luego ser tratado con el inhibidor de Mcl-1. En otra realización, el sujeto se trata con el antagonista de VEGF y el inhibidor de Mcl-1 de manera simultánea. De acuerdo con otra realización, el sujeto se trata con el antagonista de VEGF hasta que no responde al tratamiento con el antagonista de VEGF y luego se trata con un inhibidor de Mcl-1. En otra realización, el sujeto tratado con el inhibidor de Mcl-1 tiene elevados los niveles de ARN o proteína Mcl-1 en un tejido en comparación con el tejido de un sujeto que no padece la enfermedad. En este caso, el método puede incluir además la etapa de detectar ARN o proteína Mcl-1 en el sujeto, por ejemplo, en un tejido enfermo después del tratamiento con un antagonista de VEGF.

El término "VEGF" o "VEGF" tal como se usa en el presente documento se refiere al factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos y a los factores de crecimiento endotelial vascular humano de 121, 189 y 206 aminoácidos relacionados, según lo descrito por Leung *et al.* *Science*, 246:1306 (1989), y Houck *et al.* *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), junto con sus formas alélicas y procesadas de origen natural. El término "VEGF"

también se refiere a VEGF de especies no humanas tales como ratón, rata o primate. A veces, el VEGF de una especie específica se indica mediante términos como hVEGF para VEGF humano, mVEGF para VEGF murino, y etc. El término "VEGF" también se usa para referirse a formas truncadas del polipéptido que comprende los aminoácidos 8 a 109 o 1 a 109 del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares humanas de 165 aminoácidos.

Un "antagonista de VEGF" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, abrogar, reducir o interferir con las actividades de VEGF incluyendo su unión a VEGF o uno o más receptores de VEGF o el ácido nucleico que los codifica. En una realización, el antagonista de VEGF se une a VEGF o un receptor de VEGF. Los antagonistas de VEGF incluyen anticuerpos anti-VEGF y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, polipéptidos que se unen a VEGF y receptores de VEGF y bloquean la interacción ligando-receptor, anticuerpos anti-receptor de VEGF y antagonistas del receptor de VEGF tales como inhibidores de molécula pequeña de las tirosina quinasas VEGFR, aptámeros que se unen a VEGF y ácidos nucleicos que hibridan en condiciones rigurosas con secuencias de ácido nucleico que codifican VEGF o receptor de VEGF. En una realización, el antagonista de VEGF se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido tal como un anticuerpo, un peptidocuerpo, una inmunoadhesina, una molécula pequeña o un aptámero. Los anticuerpos ilustrativos incluyen el anticuerpo AVASTIN.RTM. Otros ejemplos de antagonistas de VEGF incluyen: VEGF-Trap y Mucagen. Un "anticuerpo anti-VEGF" es un anticuerpo que se une al VEGF con suficiente afinidad y especificidad, por ejemplo, ranibizumab, bevacizumab.

Los agentes sujetos se administran en una cantidad eficaz. Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente tal como se usa en el presente documento significan una cantidad suficiente del agente para proporcionar el efecto terapéutico o fisiológico deseado en al menos un número estadísticamente significativo de sujetos. Los efectos indeseables, por ejemplo, los efectos secundarios, a veces se manifiestan junto con el efecto terapéutico deseado. De esta manera, un profesional equilibra los posibles beneficios con los posibles riesgos para determinar cuál es una "cantidad eficaz" apropiada. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración y similares. Por lo tanto, no puede ser posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una "cantidad eficaz" apropiada en cualquier caso individual se puede determinar por un experto habitual en la materia usando solo la experimentación habitual.

En una realización, una cantidad eficaz para un sujeto humano se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,1 ng/kg de peso corporal/dosis a 1 g/kg de peso corporal/dosis. En algunas realizaciones, el intervalo es de aproximadamente 1 mg a 1 g, aproximadamente 1 mg a 1 g, 1 mg a 500 mg, 1 mg a 250 mg, 1 mg a 50 mg, o 1 mg a 1 mg/kg de peso corporal/dosis. Los regímenes de dosificación se ajustan a las exigencias de la situación y se pueden ajustar para producir la dosis terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis diariamente, semanalmente, mensualmente u otros intervalos de tiempo apropiados. Por lo tanto, el tiempo y las condiciones suficientes para reducir la angiogénesis en un tejido se pueden determinar por un experto, tal como un médico que puede especificar una cantidad terapéutica o eficaz.

Por vehículo, excipiente o diluyente "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo farmacéutico compuesto de un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto junto con el agente activo seleccionado sin causar ninguna o una reacción adversa sustancial. Los vehículos pueden incluir excipientes y otros aditivos tales como diluyentes, detergentes, agentes colorantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH, conservantes y similares.

De forma similar, una sal "farmacológicamente aceptable", éster, amida, profármaco o derivado de un compuesto tal como se proporciona en el presente documento es una sal, éster, amida, profármaco o derivado que no es biológicamente o de otra manera indeseable.

Para administración oral, los compuestos se pueden formular en preparaciones sólidas o líquidas como cápsulas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar, polvos, suspensiones o emulsiones. En la preparación de las composiciones en la forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes, agentes de suspensión y similares en el caso de preparaciones líquidas orales (tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones); o vehículos tales como almidones, azúcares, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales (tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos). Debido a su facilidad de administración, comprimidos y cápsulas representan la forma unitaria de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden estar recubiertos con azúcar o con recubrimiento entérico mediante técnicas estándar. El agente activo se puede encapsular para hacerlo estable al paso a través del tracto gastrointestinal y al mismo tiempo permitir el paso a través de la barrera hematoencefálica. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 96/11698.

Para administración parenteral, el compuesto se puede disolver en un vehículo farmacéutico y se puede administrar como una solución o una suspensión. Los vehículos adecuados ilustrativos son agua, solución salina, soluciones de dextrosa, soluciones de fructosa, etanol o aceites de origen animal, vegetal o sintético. El vehículo también puede contener otros ingredientes, por ejemplo, conservantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, tampones y

similares. El agente activo se administra preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad real administrada y el índice y el curso temporal de administración dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, el tiempo, etc. está dentro de la responsabilidad de los médicos generales o especialistas y generalmente tiene en cuenta el trastorno a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de administración, el método de administración y otros factores conocidos por los facultativos. Se pueden encontrar ejemplos de técnicas y protocolos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Publishing Company, Easton, PA, Estados Unidos, 1990. La administración puede ser a cualquier tejido que necesite tratamiento. En relación con el ojo, la administración es a la retina y/o a la coroides.

Como alternativa, las terapias dirigidas se pueden usar para administrar el agente activo más específicamente a los tejidos diana mediante el uso de sistemas de direccionamiento tales como fragmentos de anticuerpos o ligandos o vectores específicos de células o penetrantes celulares conocidos en la técnica. En lugar de administrar estos agentes directamente, se podrían producir en la célula diana, por ejemplo, en un vector vírico tal como los descritos anteriormente o en un sistema de suministro basado en células tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 5.550.050 y las Publicaciones de Patentes Internacionales N.º WO 92/19195, WO 94/25503, WO 95/01203, WO 95/05452, WO 96/02286, WO 96/02646, WO 96/40871, WO 96/40959 y WO 97/12635. El vector podría estar dirigido a las células diana o la expresión de productos de expresión podría estar limitada a células específicas, etapas de desarrollo o etapas del ciclo celular. El sistema de administración basado en células puede estar diseñado para ser implantado en el cuerpo de un paciente en el sitio diana deseado y contiene una secuencia codificante para el agente sujeto. Como alternativa, el agente se podría administrar en una forma precursora para la conversión a la forma activa por un agente activador producido en, o dirigido a, las células que se van a tratar. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea N.º 0 425 731A y la Publicación de Patente Internacional N.º WO 90/07936. La terapia génica se llevaría a cabo de acuerdo con los métodos generalmente aceptados.

La administración al ojo puede ser por administración sistémica o por administración tópica. La administración intravítrea o subconjuntiva generalmente se basa en el uso de una aguja y una jeringa para penetrar la pared del ojo o el tejido conjuntivo para administrar agentes acuosos o suspensiones de agentes (por ejemplo, esteroides) para el tratamiento agudo. Las formulaciones oftálmicas se preparan formulando las composiciones tratadas en el presente documento como gel o semigel, gelatina, soluciones, líquidos o suspensiones que comprenden el agente activo capaz de administrarse de manera segura al ojo, incluyendo a la porción posterior del ojo, si fuera necesario.

El diagnóstico de enfermedades y afecciones es conocida por los expertos en la materia. Los cambios en las células endoteliales vasculares angiogénicas pueden monitorizarse midiendo o rastreando el nivel de ARNm o polipéptido Mcl-1.

Las células endoteliales aisladas que comprenden Mcl-1 inactivado se contemplan adicionalmente.

La presente divulgación se describe adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Se requiere MCL1 para la supervivencia de las células endoteliales de la retina durante la angiogénesis:

Para demostrar el papel de MCL1 en la supervivencia de las células endoteliales, se empleó la tecnología inducible *cre/lox* para inactivar el gen *Mcl1* en células endoteliales de ratones de forma regulada temporalmente. Los ratones que carecen de *Mcl1* en las células endoteliales se denotan en lo sucesivo en el presente documento como *Mcl1^{EC/EC}*. La retina se desarrolla inicialmente como un tejido avascular. En ratones, la vascularización de la retina comienza al nacer y se completa después de aproximadamente 21 días. Para determinar el papel de MCL-1 en la supervivencia endotelial durante la angiogénesis, los neonatos *Mcl1^{EC/EC}* se examinaron en el día postnatal (P)5, un período en el que normalmente se observa una angiogénesis extensa en la retina del ratón (Figura 1A). El área vascular total en las retinas de los *Mcl1^{EC/EC}* se redujeron significativamente en comparación con los controles de camada (Figura 1A y B). Esto fue acompañado por un aumento altamente significativo en la muerte de células endoteliales apoptóticas según lo evaluado por tinción de caspasa activa 3 (Figura 1C).

La vasculatura angiogénica de la retina se puede dividir en dos zonas principales: una zona de remodelación (que contiene arterias y venas maduras) y una zona de brotación (donde ocurre la mayor parte del crecimiento vascular) (Figura 1A). La apoptosis estaba ligeramente elevada pero no significativamente alrededor de las arterias en la zona de remodelación de las retinas de los neonatos *Mcl1^{EC/EC}* (Figura 1D). Por el contrario, la apoptosis aumentó significativamente (15 veces) en las células endoteliales alrededor de las venas de remodelación (Figura 1E). Del mismo modo, la apoptosis aumentó significativamente (13 veces) en la zona de brotación de la red de vasos angiogénicos (Figura 1F).

Ejemplo 2

MCL1 no es necesario para la supervivencia de las células endoteliales retinianas quiescentes

Para determinar el papel de MCL1 en la supervivencia de células endoteliales quiescentes, se examinó la vasculatura retiniana después de la delección de *Mcl1* de la vasculatura inactiva de ratones adultos. La vasculatura madura de la retina forma 3 capas distintas. El área vascular total (suma de las 3 capas) de las retinas de control y *Mcl1^{EC/EC}* se determinó tanto alrededor de las arterias (Figura 2A) como de las venas (Figura 2C). No hubo diferencia en la cantidad de vasculatura en las proximidades de las arterias (Figura 2B) o venas (Figura 2D) de los mutantes en relación con los controles. La apoptosis endotelial evaluada mediante tinción para caspasa activa 3, fue rara tanto en las retinas de control como en las de *Mcl1^{EC/EC}*, sin diferencias significativas observadas entre mutantes o controles (Figura 2E).

Ejemplo 3

La pérdida de actividad de MCL1 previene la neovascularización patológica en la retina.

El procedimiento de retinopatía inducida por oxígeno en murino (OIR) (Smith, 1994) replica la neovascularización patológica que ocurre en las enfermedades vasculares retinianas proliferativas humanas como la retinopatía diabética y la retinopatía del prematuro. Para determinar si se requería MCL1 para dicha neovascularización retiniana patológica, los presentes inventores sometieron a ratones que carecían de una sola copia del gen *Mcl1* en sus células endoteliales (*Mcl1^{EC/+}*) al procedimiento OIR de Smith *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 35 (1) 1994. Se descubrió que los ratones *Mcl1^{EC/+}* contenían significativamente menos neovascularización de la retina que sus compañeros de camada genotípicos de control (Figura 3).

Estos resultados demuestran que la actividad de MCL1 es necesaria para la neovascularización patológica del tipo observado en la retinopatía diabética y la retinopatía inducida por oxígeno. Además, demuestran que MCL1 es limitante en este proceso, ya que la pérdida de una sola copia de MCL1 fue suficiente para reducir la neovascularización patológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Amezcuza *et al.*, Structure (Londres), 10: 1349-1361, 2002.
 Ausubel *et al.*, Curr. Prot. in Mol. Biol., Sup. 47, John Wiley & Sons, NY, 1999.
 Bajwa Expert Opin. Ther. Pat. 22, 37-55, 2012.
 Carnes *et al.*, RNA, 9: 648-653, 2003.
 Constantini *et al.*, Cancer Biotherm. Radiopharm., 23(1): 3-24, 2008.
 De Coupade *et al.*, Biochem J. 390(pt2): 407-418, 2005.
 Ehling *et al.*, Development 140, 3051-3061, 2013.
 Ekker and Landon, Genesis, 30:89-93, 2001.
 Grossniklaus *et al.*, Prog. Retin. Eye Res. 29(6):500-519, 2010.
 Harmsen & De Haard in Appl. Microbiol. Biotechnol. Nov; 77(1): 13-22, 2007.
 Henchey *et al.*, Curr Opin Chem Biol., 2(6):692-697, 2008.
 Liu *et al.*, BMC Biotechnol. 7: 78, 2007.
 Lin *et al.*, Oncogene 26: 2972, 2007.
 Liskamp, Nature Chemistry 6: 855-857, 2014.
 Meyer-Losic *et al.*, J Med Chem. 49(23): 6908-6916, 2006.
 Miller *et al.*, Ophthalmology 120 (1) 2013.
 Muyldermans, J. Biotechnol. 74: 277 5 302, 2001.
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Publishing Co., Easton, PA, Estados Unidos, 1990.
 Sattler *et al.*, Science 275: 983-986, 1997.
 Smith *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci. 35(1):101-111, 1994
 Stahl *et al.*, Invest. Ophthalmology & Visual Science 51 (6), 2010.
 Tibary *et al.*, Soc. Reprod. Fertil. Sup. 64: 297-313, 2007.
 Visintin *et al.*, J. Biotechnol, 135:1-15, 2008.
 Visintin *et al.*, J. Immunol. Methods, 290(1-2): 135-53, 2008.
 Wilder *et al.*, Chem Med Chem. 2 (8): 1149-1151, 2007.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The Walter and Eliza hall Institute of Medical Research
 <120> USO DE AGENTES TERAPÉUTICOS
 <130> A/16/289
 <150> AU2014904330
 <151> 29/10/2014
 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 350

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

5

Met Phe Gly Leu Lys Arg Asn Ala Val Ile Gly Leu Asn Leu Tyr Cys
1 5 10 15

Gly Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Pro Gly
20 25 30

Gly Arg Leu Leu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Ser Ala Arg Arg Glu Ile
35 40 45

Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Gly Gly Ser Ala Gly Ala Ser
50 55 60

Pro Pro Ser Thr Leu Thr Pro Asp Ser Arg Arg Val Ala Arg Pro Pro
65 70 75 80

Pro Ile Gly Ala Glu Val Pro Asp Val Thr Ala Thr Pro Ala Arg Leu
85 90 95

Leu Phe Phe Ala Pro Thr Arg Arg Ala Ala Pro Leu Glu Glu Met Glu
100 105 110

Ala Pro Ala Ala Asp Ala Ile Met Ser Pro Glu Glu Glu Leu Asp Gly
115 120 125

Tyr Glu Pro Glu Pro Leu Gly Lys Arg Pro Ala Val Leu Pro Leu Leu
130 135 140

Glu Leu Val Gly Glu Ser Gly Asn Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Leu
145 150 155 160

Pro Ser Thr Pro Pro Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asp Glu Leu Tyr Arg

10

ES 2 803 581 T3

	35					40						45			
Ala	Leu	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Val	Val	Ala	Arg	Pro	Pro	Pro	Val	Gly
	50					55					60				
Ala	Glu	Asp	Pro	Asp	Val	Thr	Ala	Ser	Ala	Glu	Arg	Arg	Leu	His	Lys
	65				70					75					80
Ser	Pro	Gly	Leu	Leu	Ala	Val	Pro	Pro	Glu	Glu	Met	Ala	Ala	Ser	Ala
				85					90					95	
Ala	Ala	Ala	Ile	Val	Ser	Pro	Glu	Glu	Glu	Leu	Asp	Gly	Cys	Glu	Pro
			100					105					110		
Glu	Ala	Ile	Gly	Lys	Arg	Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu	Arg	Val
		115					120					125			
Ser	Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Ser	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Leu	Pro	Ser	Thr
	130					135					140				
Pro	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Leu	Tyr	Arg	Gln	Ser	Leu
	145				150					155					160
Glu	Ile	Ile	Ser	Arg	Tyr	Leu	Arg	Glu	Gln	Ala	Thr	Gly	Ser	Lys	Asp
				165					170					175	
Ser	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ala	Leu	Glu
			180				185						190		
Thr	Leu	Arg	Arg	Val	Gly	Asp	Gly	Val	Gln	Arg	Asn	His	Glu	Thr	Ala
		195					200					205			
Phe	Gln	Gly	Met	Leu	Arg	Lys	Leu	Asp	Ile	Lys	Asn	Glu	Gly	Asp	Val
	210					215					220				
Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Val	Met	Val	His	Val	Phe	Lys	Asp	Gly	Val	Thr
	225				230					235					240
Asn	Trp	Gly	Arg	Ile	Val	Thr	Leu	Ile	Ser	Phe	Gly	Ala	Phe	Val	Ala
				245					250					255	
Lys	His	Leu	Lys	Ser	Val	Asn	Gln	Glu	Ser	Phe	Ile	Glu	Pro	Leu	Ala
			260					265					270		
Glu	Thr	Ile	Thr	Asp	Val	Leu	Val	Arg	Thr	Lys	Arg	Asp	Trp	Leu	Val
		275					280					285			

ES 2 803 581 T3

Lys Gln Arg Gly Trp Asp Gly Phe Val Glu Phe Phe His Val Gln Asp
290 295 300

Leu Glu Gly Gly Ile Arg Asn Val Leu Leu Ala Phe Ala Gly Val Ala
305 310 315 320

Gly Val Gly Ala Gly Leu Ala Tyr Leu Ile Arg
325 330

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente que suprime la expresión de Mcl-1 o la actividad del polipéptido Mcl-1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección del ojo asociada con la neovascularización patológica, en donde la enfermedad o afección se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.
- 10 2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente se une al polipéptido Mcl-1 y suprime la actividad del polipéptido Mcl-1.
- 15 3. El agente para el uso de la reivindicación 2, en donde el agente comprende una molécula pequeña inhibidora, o un péptido, o un péptido penetrante de membrana o un polipéptido.
- 20 4. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente se une al ácido nucleico de Mcl-1 y suprime la expresión del polipéptido Mcl-1.
- 25 5. El agente del uso de la reivindicación 4, en donde el agente comprende o codifica un ARNip, ARNhc, miARN, ribozima, ADNzima u otra molécula de ácido nucleico antisentido.
- 30 6. El agente para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el agente está en forma de una composición farmacéutica o fisiológica adecuada para la administración tópica u ocular del agente a la región del ojo o al ojo, o en donde el agente está en forma de una composición farmacéutica o fisiológica.
- 35 7. El agente para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el sujeto es un ser humano.
- 40 8. El agente para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde al sujeto se le ha diagnosticado de una enfermedad o afección del ojo seleccionada del grupo que consiste en retinopatía diabética, neovascularización patológica coroidea o retiniana, degeneración macular senil, retinopatía de la prematuridad, traumatismo ocular o isquemia, edema o neovascularización inducida por intervención quirúrgica, oclusión de la vena retiniana, enfermedad de Coats, retinopatía de células falciformes y glaucoma neovascular.
9. El agente para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el agente es activo en células endoteliales y suprime completamente la expresión o actividad de Mcl-1 en las mismas.
10. El agente para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde el agente suprime completamente la expresión o actividad de Mcl-1 en células endoteliales.
11. El agente para el uso de cualquier reivindicación anterior, en donde la apoptosis no aumenta sustancialmente en las células endoteliales vasculares no angiogénicas (células preservadas).

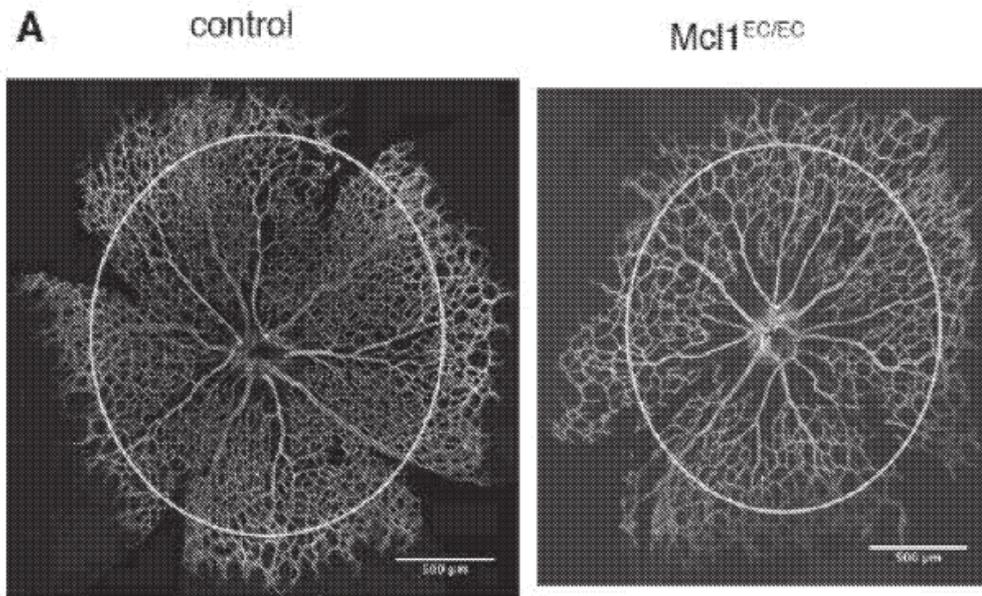


Figura 1A

Área vascular

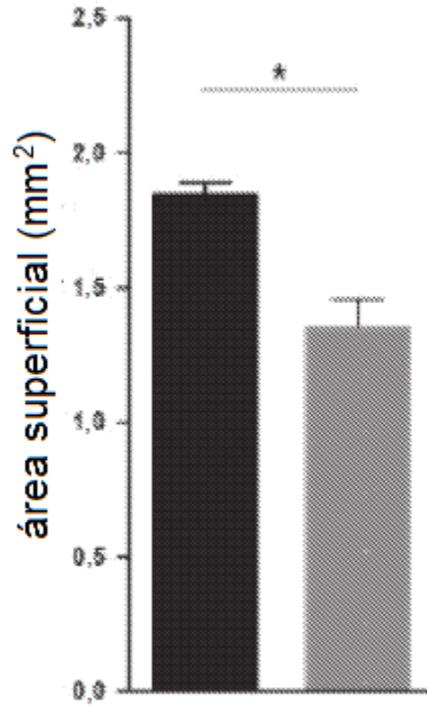


Figura 1B

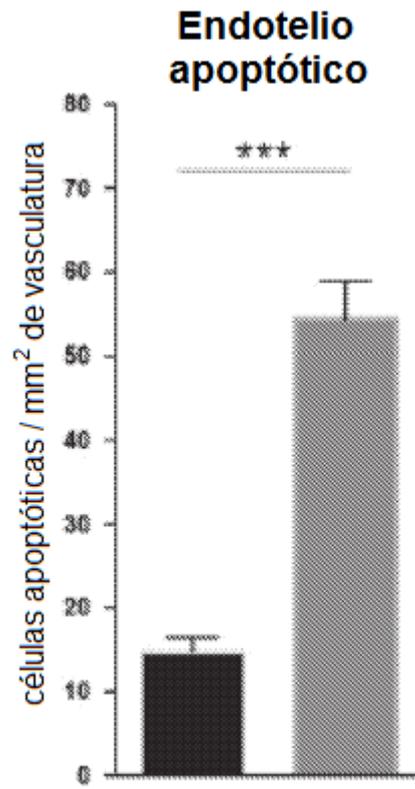


Figura 1C

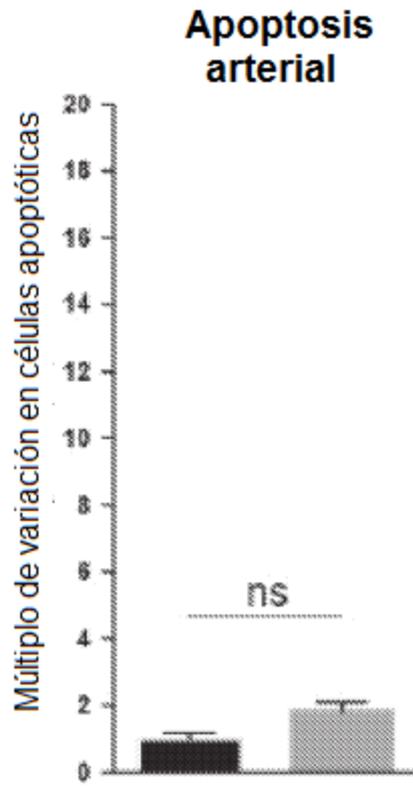


Figura 1D

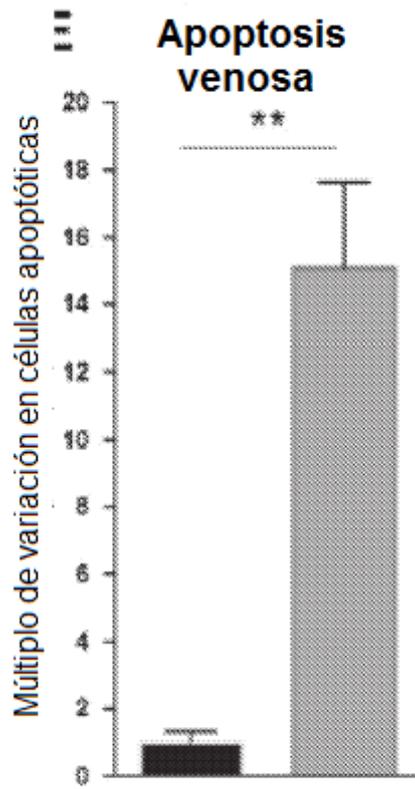


Figura 1E

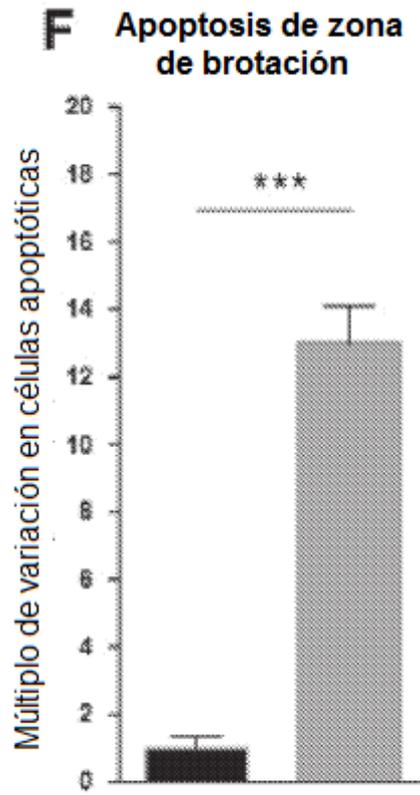


Figura 1F

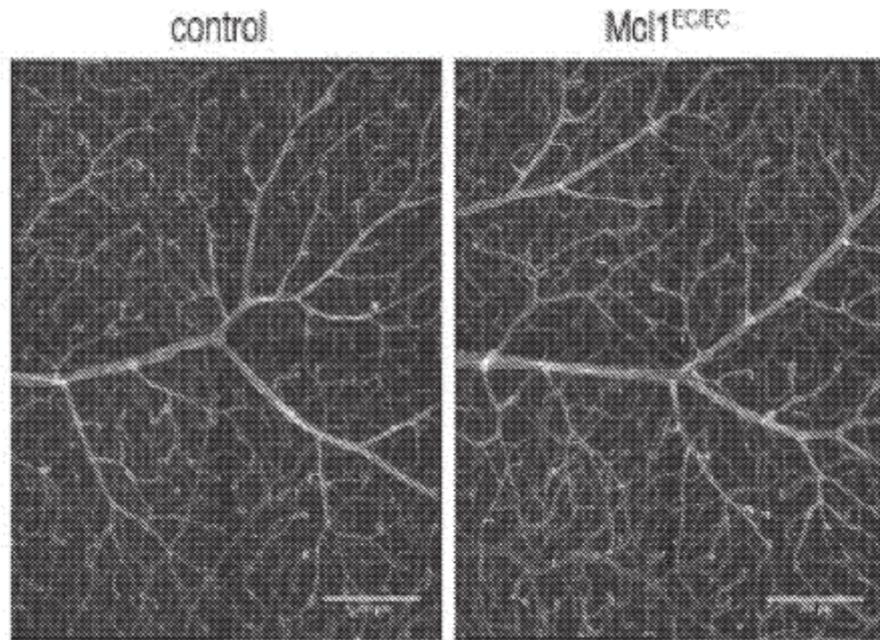


Figura 2A

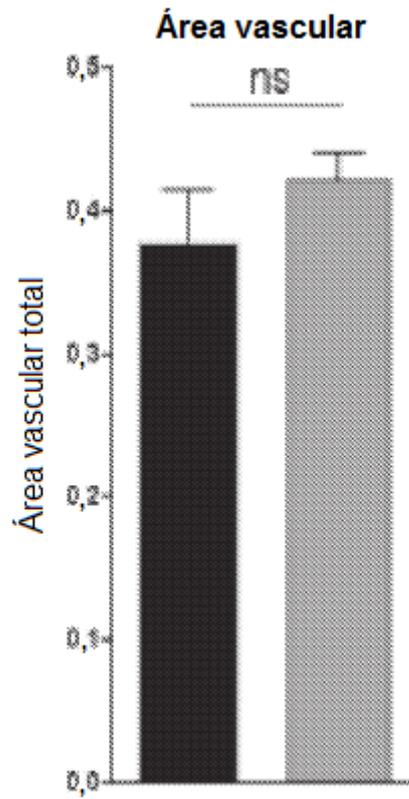


Figura 2B

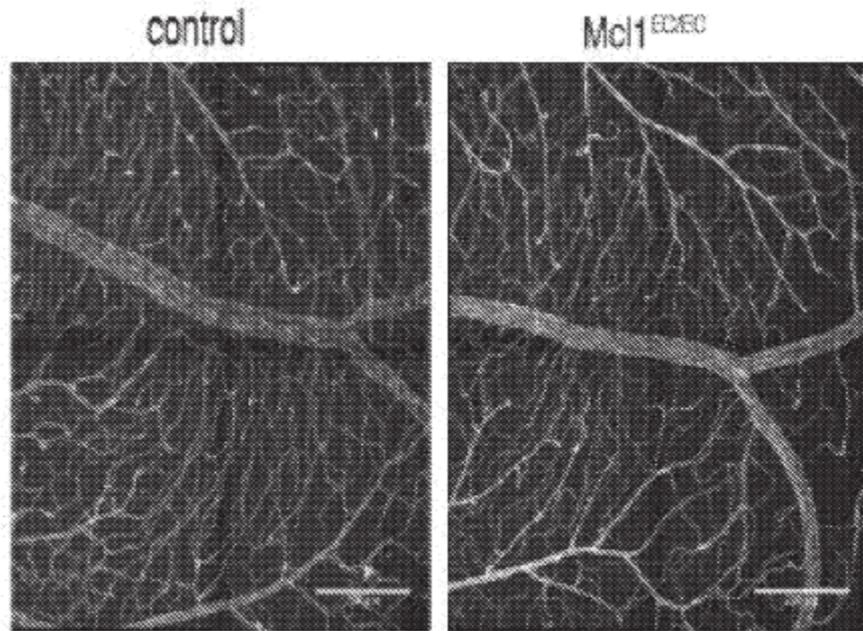


Figura 2C

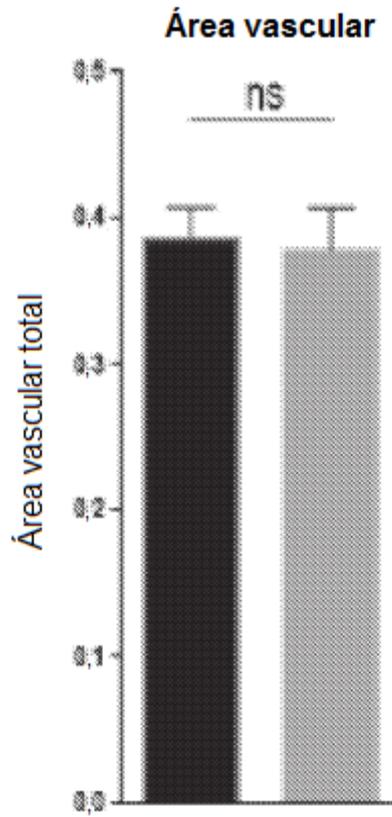


Figura 2D

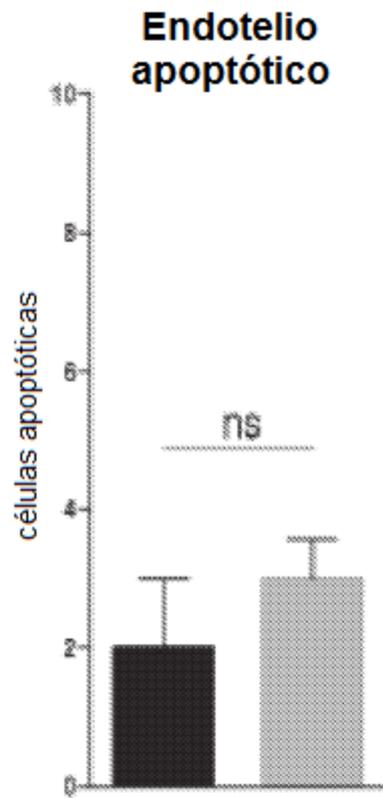


Figura 2E

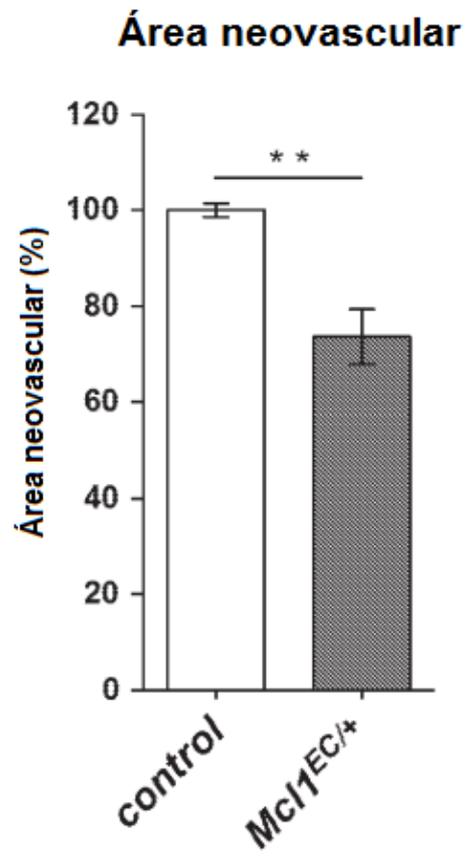


Figura 3