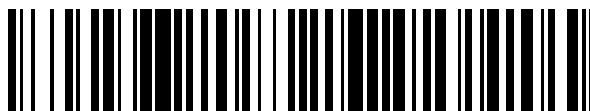


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 005**

51 Int. Cl.:

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07874182 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2120913**

54 Título: **Formulaciones de nanopartículas y de polímeros para análogos, antagonistas y formulaciones de la hormona tiroidea, y usos de los mismos**

30 Prioridad:

22.12.2006 US 876770 P 05.04.2007 US 922113 P
18.06.2007 US 936223 P 09.07.2007 US 959006 P
30.08.2007 US 967016 P 21.09.2007 US 994895 P
23.10.2007 US 262 20.11.2007 US 3935

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2015

73 Titular/es:

NANOPHARMACEUTICALS LLC (100.0%)
1 Discovery Drive
Rensselaer, NY 12144 , US

72 Inventor/es:

DAVIS, PAUL, J. y
MOUSA, SHAKER, A.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 005 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

Formulaciones de nanopartículas y de polímeros para análogos, antagonistas y formulaciones de la hormona tiroidea, y usos de los mismos

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/876.770, presentada el 22 de diciembre de 2006, la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/936.223, presentada el 18 de junio de 2007, la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/959.006, presentada el 9 de julio de 2007, la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/967.016, presentada el 30 de agosto de 2007, la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/994.895, presentada el 21 de septiembre de 2007, la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/995.416, presentada el 25 de septiembre 2007, la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/000.262, presentada el 23 de octubre de 2007, y la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/003.935, presentada el 20 de noviembre de 2007.

Campo de la invención y divulgación

La presente invención se refiere a TETRAC, TRIAC o conjugados de nanopartículas de los mismos para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer resistente al tratamiento farmacológico mediante el aumento de la quimiosensibilidad de células cancerosas y/o la inhibición del nivel de resistencia a fármacos en el cáncer. También se desvelan métodos de uso de dichos compuestos y composiciones farmacéuticas que contienen los mismos. La divulgación también se refiere a métodos de preparación de dichos compuestos y a una formulación oftálmica de liberación sostenida y de largo tiempo de residencia, y al proceso de preparación de la misma.

Antecedentes de la invención

Las hormonas tiroideas, tales como L-tiroxina (T_4) y 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T_3), y sus análogos tales como GC-1, DITPA, TETRAC y TRIAC, regulan muchos procesos fisiológicos diferentes en diferentes tejidos de vertebrados. Se sabía con anterioridad que muchas de las acciones de las hormonas tiroideas están mediadas por el receptor de la hormona tiroidea ("TR"). Se ha descrito un nuevo receptor de la superficie celular para la hormona tiroidea (L-tiroxina, T_4 ; T_3) en la integrina $\alpha V\beta 3$. El receptor se encuentra en o cerca del sitio de reconocimiento Arg-Gly-Asp (RGD) en la integrina. El receptor $\alpha V\beta 3$ no es un homólogo del receptor de la hormona tiroidea nuclear (TR), pero la activación del receptor de la superficie celular se traduce en una serie de eventos mediados por el núcleo, incluyendo la recientemente informada acción proangiogénica de la hormona y la migración de fibroblastos *in vitro* en el modelo de monocapa de fibroblastos dérmicos humanos de la curación de heridas.

El ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) es un análogo desaminado de T_4 que no tiene actividad agonista en la integrina, pero que inhibe la unión de T_4 y T_3 mediante la integrina y la acción proangiogénica de análogos de la hormona tiroidea agonistas en $\alpha V\beta 3$. La inhibición de la acción angiogénica de la hormona tiroidea se ha demostrado en el modelo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) y en el modelo de crecimiento en recipiente que incluye células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC). En ausencia de la hormona tiroidea, TETRAC bloquea la actividad angiogénica del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, FGF2), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y otros péptidos proangiogénicos. El TETRAC es eficaz en los modelos CAM y HDMEC. Se cree que esta acción inhibidora del TETRAC refleja su influencia en el sitio de reconocimiento RGD que es relevante para la acción del péptido proangiogénico.

La evidencia de que la hormona tiroidea puede actuar principalmente fuera del núcleo celular procede de estudios de respuestas mitocondriales hacia T_3 o T_2 , de los efectos de aparición repentina de la hormona en la membrana celular y de las acciones en las proteínas citoplasmáticas. La reciente descripción de un receptor de la membrana plasmática de la hormona tiroidea en la integrina $\alpha V\beta 3$ ha proporcionado alguna información sobre los efectos de la hormona en las bombas de iones de la membrana, tales como al antiportador de Na^+/H^+ , y ha conducido a la descripción de interfaces entre el receptor de la hormona tiroidea de la membrana y los eventos nucleares que subyacen bajo importantes procesos celulares o tisulares, tales como la angiogénesis y la proliferación de ciertas células tumorales.

Los niveles en circulación de la hormona tiroidea son relativamente estables. Por lo tanto, cabe suponer que las acciones iniciadas en la membrana de la hormona tiroidea sobre la neovascularización o sobre la proliferación celular o sobre los canales iónicos de la membrana (también, por supuesto, como efectos de la expresión de genes de la hormona mediada por el TR mencionado anteriormente) contribuyen a la "actividad basal" o puntos de referencia de estos procesos en organismos intactos. La posible utilidad clínica de los eventos celulares que están mediados por el receptor de la membrana para la hormona tiroidea puede residir en la inhibición de dicho/s efecto/s en los contextos de la neovascularización o el crecimiento de las células tumorales. De hecho, los presentes inventores han demostrado que el bloqueo del receptor de la membrana para las yodotironinas con ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), un análogo inhibidor de la unión a hormonas que no tiene actividad agonista hacia el receptor, puede detener el crecimiento de las células del glioma y células de cáncer de mama humanas *in vitro*. TETRAC es una sonda útil para la detección de la participación del receptor de integrina en las acciones de la

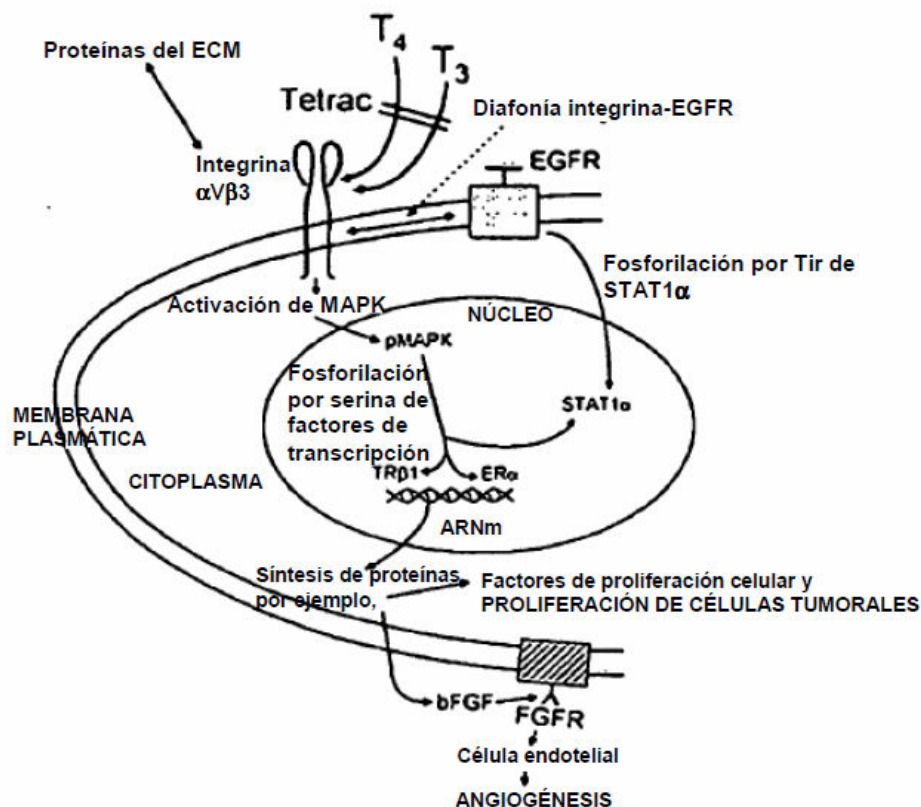
hormona tiroidea.

La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se une a la hormona tiroidea cerca del sitio de reconocimiento Arg-Gly-Asp (RGD) de la proteína; el sitio RGD está implicado en las interacciones de proteína-proteína que unen la integrina a las proteínas de la matriz extracelular (ECM), tales como la vitronectina, fibronectina y laminina. También se inicia en el receptor de la integrina de la superficie celular el complejo proceso de la angiogénesis, monitorizado, ya sea en un ensayo convencional de vasos sanguíneos de pollo o con células endoteliales humanas en un ensayo de crecimiento. Este proceso dependiente de la hormona requiere la activación de MAPK y la elaboración del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF; FGF2) que es el mediador corriente abajo del efecto de la hormona tiroidea sobre la angiogénesis. El TETRAC bloquea esta acción de T_4 y T_3 , como lo hace el péptido RGD y pequeñas moléculas que imitan al péptido RGD. Es posible potenciar la neovascularización deseable con la aplicación local de análogos de la hormona tiroidea, por ejemplo, en la curación de heridas, o que la angiogénesis no deseada, tal como la que mantiene el crecimiento tumoral, se pueda antagonizar en parte con TETRAC.

La hormona tiroidea también puede estimular la proliferación *in vitro* de ciertas líneas de células tumorales. Se ha observado que las líneas de células del glioma murinas proliferan en respuesta a concentraciones fisiológicas de T_4 por un mecanismo iniciado en el receptor de la integrina y que depende de MAPK. En lo que podría ser un corolario clínico, un estudio prospectivo de pacientes con glioblastoma multiforme muy avanzado (GBM) en los que se indujo el hipotiroidismo leve mediante propiltiouracilo mostraron un importante beneficio de supervivencia frente a pacientes de control eutiroides. En 2004, los presentes inventores informaron que las células MCF-7 de cáncer de mama humano proliferaron en respuesta a T_4 mediante un mecanismo que fue inhibido por TETRAC. Un reciente análisis clínico retrospectivo realizado por Cristofanilli *et al.* demostraron que las mujeres con hipotiroidismo que desarrollaron cáncer de mama lo hicieron a una edad más tardía que los controles eutiroides apareados, y tuvieron lesiones menos agresivas y menores en el momento del diagnóstico que los controles. Por lo tanto, la acción trófica de la hormona tiroidea en los modelos *in vitro* tanto de tumor cerebral como de cáncer de mama parece tener apoyo clínico.

A continuación, se resumen las acciones celulares o tisulares de la hormona tiroidea que se sabe que se inician en la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ y que requieren la transducción de la señal de la hormona a través de MAPK. La integrina es una proteína de transducción de señales que conecta las señales procedentes de las proteínas de la matriz extracelular (ECM) con el interior de la célula (de fuera hacia dentro) o del citoplasma y de los orgánulos intracelulares hacia la ECM (de dentro hacia afuera). La unión de L-tiroxina (T_4) o la 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T_3) a la $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ heterodimérica se traduce en la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK ERK1/2). La MAPK activada (fosfoMAPK, pMAPK) se transloca hacia el núcleo de la célula donde fosforila proteínas transactivadoras tales como el receptor- β1 de la hormona tiroidea (TR β1), el receptor- α de estrógenos (ER α) o el transductor y activador de señales de la transcripción-1 α (STAT1 α). Por consiguiente, entre los genes transcritos están el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), que media la angiogénesis inducida por la hormona tiroidea y otros factores de proliferación importantes para la división celular de las células tumorales.

A continuación, se representa la capacidad del ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) para inhibir la acción de T_4 y T_3 en la integrina; el TETRAC bloquea la unión de las yodotironinas al receptor de la integrina. También se muestra la diafonía entre la integrina y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). En el presente documento, la presencia de la hormona tiroidea en la superficie celular altera la función de EGFR para permitir que este último distinga EGF de TGF- α , otro factor de crecimiento que se une a EGFR.



Los documentos WO 2006/031922 y WO02005/027895 desvelan métodos de tratamiento de sujetos que tienen afecciones relacionadas con la angiogénesis que incluyen administrar una cantidad eficaz de una forma polimérica de la hormona tiroidea, o un antagonista de la misma, para potenciar o inhibir la angiogénesis en el sujeto. También se desvelan composiciones de las formas poliméricas de la hormona tiroidea, o análogos de la hormona tiroidea.

Existe, por tanto, la necesidad en la técnica de análogos de la hormona tiroidea que se puedan unir al receptor de la superficie celular, pero que no sean capaces de entrar en la célula. Dichos análogos de la hormona reformulados no expresarían acciones intracelulares de la hormona y, por lo tanto, si se absorbieran en la circulación no tendrían las acciones sistémicas de los análogos de la hormona tiroidea.

Sumario de la invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la hormona tiroidea, los análogos de la hormona tiroidea, sus formas poliméricas y de nanopartícula, actúan a nivel de la membrana celular y tienen propiedades proangiogénicas que son independientes de los efectos de la hormona tiroidea nuclear. Por consiguiente, estos análogos, formas poliméricas y nanopartícula de la hormona tiroidea se pueden usar para tratar varios trastornos. Del mismo modo, la invención también se basa en el descubrimiento de que los antagonistas de los análogos de la hormona tiroidea inhiben el efecto proangiogénico de dichos análogos, y también se pueden usar para tratar varios trastornos.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación presenta métodos para tratar una afección susceptible de tratamiento mediante la potenciación de la angiogénesis.

En el presente documento, se proporcionan ejemplos de dichas afecciones susceptibles de tratamiento mediante la potenciación de la angiogénesis, y pueden incluir la enfermedad vascular oclusiva, enfermedad coronaria, disfunción eréctil, infarto de miocardio, isquemia, apoplejía, trastornos vasculares de la arteria periférica, trastornos cerebrovasculares, isquemia de las extremidades y heridas.

También se proporcionan en el presente documento ejemplos de análogos de la hormona tiroidea, y pueden incluir triyodotironina (T_3), levotiroxina (T_4), T_4 o T_3 N-metilo, T_4 o T_3 N-etilo, T_4 o T_3 N-trifenilo, T_4 o T_3 *n*-propilo, T_4 o T_3 *N*-isopropilo, T_4 o T_3 *N*-*tert*-butilo, ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)fenoxi-acético (OC-1) o ácido 3,5-diiodotiropropiónico (DITPA), ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) y ácido triyodotiroacético (TRIAC). En las tablas A-D de la Figura 20, hay análogos adicionales. Estos análogos se pueden conjugar con alcohol polivinílico, copolímero de etileno y ácido acrílico, ácido poliláctico o agarosa. La conjugación es a través de enlaces covalentes

o no covalentes, dependiendo del polímero usado.

En una realización, la hormona tiroidea, los análogos de la hormona tiroidea o las formas poliméricas de los mismos se administran por vía parenteral, oral, rectal, o por medios tópicos, o combinaciones de los mismos. Los modos de administración parenterales incluyen, por ejemplo, los modos subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular o intravenoso, tales como por catéter. Los modos tópicos de administración pueden incluir, por ejemplo, una tirita.

En otra realización, la hormona tiroidea, los análogos de la hormona tiroidea o sus formas poliméricas se pueden encapsular o incorporar en una micropartícula, un liposoma o un polímero. El polímero puede incluir, por ejemplo, poliglicólido, poliláctico o copolímeros de los mismos. El liposoma o la micropartícula tienen un tamaño de aproximadamente menos de 250 nanómetros, y se puede administrar a través de una o más vías parenterales u otro modo de administración. En otra realización, el liposoma o la micropartícula se pueden presentar en los lechos capilares que rodean el tejido isquémico, o aplicarse en el interior de un vaso sanguíneo a través de un catéter.

La hormona tiroidea, los análogos de la hormona tiroidea o sus formas poliméricas de acuerdo con la invención también se pueden administrar junto con una o más sustancias biológicamente activas que pueden incluir, por ejemplo, factores de crecimiento, vasodilatadores, anticoagulantes, antivirales, anti-inflamatorios, inmunosupresores, analgésicos, agentes vascularizantes o moléculas de adhesión celular, o combinaciones de los mismos. En una realización, el análogo de la hormona tiroidea o la forma polimérica se administran como una inyección en bolo antes o después de la administración de una o más sustancias biológicamente activas.

Los factores de crecimiento pueden incluir, por ejemplo, factor de crecimiento transformante α ("TGF α "), factor de crecimiento transformante β ("TGF β "), factor de crecimiento básico de fibroblastos, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de permeabilidad vascular. Los vasodilatadores pueden incluir, por ejemplo, adenosina, derivados de adenosina o combinaciones de los mismos. Los anticoagulantes incluyen heparina, derivados de heparina, antifactor Xa, antitrombina, aspirina, clopidogrel o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos para potenciar la angiogénesis a lo largo o alrededor de un dispositivo médico mediante el recubrimiento del dispositivo con una hormona tiroidea, análogo de la hormona tiroidea o forma polimérica del mismo de acuerdo con la divulgación antes de insertar el dispositivo en un paciente. La etapa de recubrimiento puede incluir además el recubrimiento del dispositivo con una o más sustancias biológicamente activas tales como un factor de crecimiento, un vasodilatador, un anticoagulante o combinaciones de los mismos. Los ejemplos de dispositivos médicos que se pueden recubrir con análogos de la hormona tiroidea o formas poliméricas de acuerdo con la divulgación incluyen endoprótesis vasculares, catéteres, cánulas o electrodos.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de una afección susceptible de tratamiento mediante la inhibición de la angiogénesis mediante la administración a un sujeto en necesidad de ello de una cantidad de un agente antiangiogénico eficaz para inhibir la angiogénesis. Los ejemplos de las afecciones susceptibles de tratamiento mediante la inhibición de la angiogénesis incluyen tumores primarios o metastásicos, retinopatía diabética y las afecciones relacionadas. La divulgación también proporciona ejemplos de los agentes antiangiogénicos usados para inhibir la angiogénesis, e incluyen ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), ácido triyodotiroacético (TRIAC), anticuerpo monoclonal LM609, XT 199 o combinaciones de los mismos. Dichos agentes antiangiogénicos pueden actuar en la superficie celular para inhibir los agentes proangiogénicos.

En otro aspecto, la divulgación proporciona el tratamiento antiproliferativo primario o adyuvante de ciertos cánceres. Los ejemplos de las afecciones cancerosas susceptibles de este tratamiento incluyen glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello no tiroideo, cáncer de tiroides, cáncer de mama y cáncer de ovario. La invención proporciona ejemplos de los agentes usados para la acción antiproliferativa, e incluyen ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), ácido triyodotiroacético (TRIAC), anticuerpo monoclonal LM609, XT 1999 o combinaciones de los mismos. Estos agentes actúan en el receptor de integrina de la superficie celular para la hormona tiroidea para inhibir la proliferación de células cancerosas.

En una realización, el agente antiangiogénico se administra por una vía parenteral, oral, rectal o tópica, o una combinación de las mismas. En otra realización, el agente antiangiogénico se puede administrar junto con una o más terapias antiangiogénicas o agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto más, la divulgación proporciona composiciones (es decir, agentes angiogénicos) que incluyen hormona tiroidea y análogos conjugados con un polímero. La conjugación puede ser a través de un enlace covalente o no covalente, dependiendo del polímero. Un enlace covalente se puede producir a través de un enlace éster o anhídrido, por ejemplo. La divulgación también proporciona ejemplos de los análogos de la hormona tiroidea, e incluyen levotiroxina (T_4), triyodotironina (T_3), ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)-fenoxiacético (GC-1) o ácido 3,5-diiodotiropropiónico (DITPA). En una realización, el polímero puede incluir alcohol polivinílico, copolímero de etileno y ácido acrílico, ácido poliláctico o agarosa.

En otro aspecto, la divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que incluyen los agentes angiogénicos de acuerdo con la presente divulgación en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, las formulaciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación se pueden encapsular o incorporar en un liposoma, una micropartícula o un polímero. El liposoma o la micropartícula tienen un tamaño de menos de aproximadamente 250 nanómetros. Cualquiera de las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación se puede administrar por medios parenterales, orales, rectales o tópicos, o combinaciones de los mismos. En otra realización, las formulaciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto en necesidad de las mismas junto con una o más sustancias biológicamente activas incluyendo, pero sin limitación, factores de crecimiento, vasodilatadores, anticoagulantes o combinaciones de los mismos.

En otros aspectos, la divulgación se refiere al uso de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea y a formulaciones farmacéuticas que contienen dicha hormona para el restablecimiento de las funciones neuronales y la potenciación de la supervivencia de las células neuronales. A los efectos de la divulgación, la función neuronal pretende significar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y anatómicos colectivos que permiten el desarrollo del sistema nervioso durante los períodos embrionario y postnatal y que, en el animal adulto, es la base de los mecanismos regenerativos para las neuronas dañadas y de la capacidad de adaptación del sistema nervioso central cuando algunas partes del mismo se degeneran y no pueden regenerarse.

Por lo tanto, los siguientes procesos ocurren para lograr la función neuronal: denervación, reinervación, sinaptogénesis, represión sináptica, expansión sináptica, surgimiento de los axones, regeneración neuronal, desarrollo y organización de rutas y los circuitos neuronales para reemplazar a los dañados. Por lo tanto, los pacientes adecuados para ser tratados con los análogos poliméricos de la hormona tiroidea o combinaciones de los mismos de acuerdo con la divulgación son los pacientes afectados por patologías degenerativas del sistema nervioso central (demencia senil como la enfermedad de Alzheimer, Parkinsonismo, corea de Huntington, adrenoleucodistrofia cerebelosa espinal), traumatismo e isquemia cerebral.

En una realización preferida, los métodos de la divulgación para el tratamiento de los defectos de las neuronas motoras, incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple y la lesión de la médula espinal comprenden administrar un análogo polimérico de la hormona tiroidea, o combinaciones de los mismos, y en combinación con factores de crecimiento, factores de crecimiento nervioso u otros factores proangiogénicos o de neurogénesis. Las lesiones de la médula espinal incluyen lesiones derivadas de un tumor, traumatismo mecánico y traumatismo químico. Se contemplan métodos iguales o similares para restablecer la función motora en un mamífero que tiene esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple o una lesión de la médula espinal. La administración de uno de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea mencionados anteriormente, solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, también proporciona una función profiláctica. Dicha administración tiene el efecto de preservar la función motora en un mamífero que tiene o está en riesgo de tener esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple o una lesión de la médula espinal. También de acuerdo con la divulgación, la administración de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos preserva la integridad de la vía nigroestriatal.

En concreto, los métodos de la divulgación para el tratamiento (pre- o post-sintomáticamente) de la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple o una lesión de la médula espinal comprenden la administración de un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. En una realización particularmente preferida, el análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos es un complejo soluble que comprende al menos un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos.

En un aspecto, la divulgación presenta composiciones y métodos de tratamiento terapéutico que comprenden la administración a un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína morfogénica ("análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos"), como se define en el presente documento, después de la lesión a una vía neuronal, o en previsión de dicha lesión, durante un tiempo y a una concentración suficientes para mantener la vía neuronal, incluyendo la reparación de las vías dañadas o la inhibición del daño adicional a las mismas.

En otro aspecto, la divulgación presenta composiciones y métodos de tratamiento terapéuticos para mantener las vías neuronales. Dichos métodos de tratamiento incluyen la administración al mamífero, tras la lesión de una vía neuronal o en previsión de dicha lesión, de un compuesto que estimula una concentración terapéuticamente eficaz de un análogo polimérico de la hormona tiroidea endógeno. Estos compuestos se denominan en el presente documento análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso o de otros agentes estimulantes de factores neurogénicos, y se entiende que incluyen sustancias que, cuando se administran a un mamífero, actúan en el/los tejido/s u órgano/s que normalmente es/son responsable/s de, o capaces, de producir un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos y/o secretar un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o

en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, y que causan un nivel endógeno de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con el factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos que se van a modificar.

En particular, la divulgación proporciona métodos de protección de las neuronas de los efectos destructivos de los tejidos asociados con la respuesta inmune e inflamatoria del organismo a la lesión nerviosa. La divulgación también proporciona métodos de estimulación de las neuronas para mantener su fenotipo diferenciado, incluyendo la inducción de la rediferenciación de células de origen neuronal transformadas en una morfología característica de las neuronas no transformadas. En una realización, la divulgación proporciona medios para estimular la producción de moléculas de adhesión celular, en particular de moléculas de adhesión de células nerviosas ("N-CAM"). La divulgación también proporciona métodos, composiciones y dispositivos para estimular la reparación celular de neuronas y vías neuronales dañadas, incluyendo la regeneración de dendritas o axones dañados. Además, la divulgación también proporciona medios para la evaluación del estado del tejido nervioso, y para la detección y el seguimiento de neuropatías mediante la monitorización de las fluctuaciones en los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con niveles de factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos.

En un aspecto de la divulgación, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son útiles en la reparación de las vías neuronales dañadas del sistema nervioso periférico. En particular, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos son útiles para reparar vías neuronales dañadas, incluyendo fibras nerviosas seccionadas o dañadas de otro modo. En concreto, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con el factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son capaces de estimular la regeneración completa del nervio axonal, incluyendo la vascularización y la reformación de la vaina de mielina. Preferentemente, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se proporcionan en el sitio de la lesión en un vehículo biocompatible, bioabsorbible, capaz de mantener los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos en el sitio y, en caso necesario, medios para dirigir el crecimiento axonal desde el extremo proximal al extremo distal de una neurona seccionada. Por ejemplo, se pueden requerir medios para dirigir el crecimiento axonal, donde se va a inducir la regeneración del nervio en una distancia ampliada, tal como superior a 10 mm. Se contemplan muchos vehículos capaces de proporcionar estas funciones. Por ejemplo, los vehículos útiles incluyen materiales sustancialmente insolubles o soluciones viscosas preparadas como se desvela en el presente documento que comprenden laminina, ácido hialurónico o colágeno, u otros materiales poliméricos biocompatibles sintéticos adecuados, tales como ácidos poliláctico, poliglicólico o polibutírico y/o copolímeros de los mismos. Un vehículo preferido comprende una composición de matriz extracelular derivada, por ejemplo, de células de sarcoma de ratón.

En una realización particularmente preferida, un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos está dispuesto en un canal de guía del nervio que abarca la distancia de la vía dañada. El canal actúa como una cubierta protectora y como un medio físico para guiar el crecimiento de una neurita. Los canales útiles comprenden una membrana biocompatible, que puede ser de estructura tubular, que tiene una dimensión suficiente para abarcar el espacio del nervio que se va a reparar y que tiene aberturas adaptadas para recibir terminaciones nerviosas seccionadas. La membrana puede estar hecha de cualquier material biocompatible, no irritante, tal como silicona o un polímero biocompatible, tal como polietileno o acetato de polietilenvinilo. La carcasa también puede estar compuesta de polímeros biorreabsorbibles, biocompatibles, incluyendo, por ejemplo, colágeno, ácido hialurónico, y ácidos poliláctico, polibutírico y glicólico. En una realización preferida, la superficie externa del canal es sustancialmente impermeable.

Los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se pueden disponer en el canal en asociación con un material de soporte biocompatible, o pueden ser adsorbidos o asociados de otra manera con la superficie interior de la carcasa, tal como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.011486, siempre que los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos sean accesibles a las terminaciones nerviosas seccionadas.

En otro aspecto de la divulgación, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son útiles para proteger contra el daño asociado con la respuesta inmune/inflamatoria del organismo hacia una lesión inicial del tejido nervioso. Dicha respuesta puede deberse a un traumatismo del tejido nervioso causado, por ejemplo, por una disfunción autoinmune, lesión neoplásica, infección, traumatismo químico o mecánico, enfermedad, por la interrupción del flujo sanguíneo hacia las neuronas o las células gliales, o por otro traumatismo del nervio o material circundante. Por ejemplo, se cree que el daño primario producido como consecuencia de hipoxia o isquemia-reperusión después de la oclusión de un aporte de sangre neuronal, como en una apoplejía embólica, está relacionado inmunológicamente. Además, al menos parte del daño asociado con un número de tumores cerebrales primarios también parece estar relacionado inmunológicamente. La aplicación de un análogo polimérico de la

hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, ya sea directa o sistémicamente, alivia y/o inhibe la respuesta inmunológicamente relacionada con una lesión neuronal. Como alternativa, también se puede usar la administración de un agente capaz de estimular la expresión y/o secreción *in vivo* de análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con la expresión de factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, preferentemente en el sitio de la lesión. Cuando se va a inducir la lesión, como durante la cirugía u otro tratamiento clínico agresivo, se pueden proporcionar análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o agentes antes de la inducción de la lesión para proporcionar un efecto neuroprotector al tejido nervioso en riesgo.

En general, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos útiles en los métodos y las composiciones de la divulgación son proteínas diméricas que inducen la morfogénesis de una o más células eucariotas (por ejemplo, de mamífero), tejidos u órganos. La morfogénesis de tejidos incluye la formación de tejido *de novo* o regenerativa, tal como ocurre en un embrión de vertebrado durante su desarrollo. Son de particular interés los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso y otros factores neurogénicos que inducen morfogénesis específica de tejido, al menos de hueso o tejido neuronal. Como se define en el presente documento, un análogo polimérico de la hormona tiroidea, solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, comprende un par de polipéptidos que, cuando se pliegan, forman una proteína dimérica que provoca respuestas morfogenéticas en células y tejidos que presentan receptores tiroideos. Es decir, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, en general, inducen una cascada de eventos que incluyen todos los siguientes en un entorno morfogénicamente permisivo: estimulación de la proliferación de células progenitoras; estimulación de la diferenciación de células progenitoras; estimulación de la proliferación de células diferenciadas; y soporte del crecimiento y mantenimiento de células diferenciadas. Las células "progenitoras" son células no comprometidas que son competentes para diferenciarse en uno o más tipos específicos de células diferenciadas, dependiendo de su repertorio genómico y de la especificidad tisular del entorno permisivo en el que se induce la morfogénesis. Un ejemplo de célula progenitora es una célula madre hemopoyética, una célula madre mesenquimal, una célula del epitelio basal, una célula de la cresta neuronal o similares. Además, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden retrasar o mitigar la aparición de la pérdida asociada a la senescencia o quiescencia de fenotipo y/o la función tisular. Es más, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden estimular la expresión fenotípica de un tipo de célula diferenciada, incluyendo la expresión de propiedades metabólicas y/o funcionales, por ejemplo, secretoras, de la misma. Además, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con el factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden inducir la rediferenciación de células comprometidas (por ejemplo, osteoblastos, neuroblastos, o similares) en condiciones apropiadas. Como se ha señalado anteriormente, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos que inducen la proliferación y/o diferenciación de al menos hueso o tejido neuronal, y/o soportan el crecimiento, el mantenimiento y/o propiedades funcionales del tejido neuronal, son de particular interés en el presente documento.

Son de particular interés los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos que, cuando se proporcionan a un tejido específico de un mamífero, inducen morfogénesis específica del tejido o mantienen el estado normal de diferenciación y crecimiento de dicho tejido. En realizaciones preferidas, el presente análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos inducen la formación de tejidos del cuerpo de vertebrados (por ejemplo, aves o mamíferos), tales como nervios, ojos, hueso, cartílago, médula ósea, ligamento, dentina dental, periodontio, hígado, riñón, pulmón, corazón o revestimiento gastrointestinal. Los métodos preferidos se pueden llevar a cabo en el contexto del desarrollo de tejido embrionario, o en un sitio de herida sin cicatrizar, aséptico, de tejido postembrionario.

Otros aspectos de la divulgación incluyen composiciones y métodos de uso de análogos de la hormona tiroidea y sus polímeros para la formación de imágenes y el diagnóstico de trastornos neurodegenerativos tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, en un aspecto, la invención presenta análogos de T₄ que tienen una alta especificidad hacia sitios diana cuando se administran a un sujeto *in vivo*. Los análogos de T₄ preferidos muestran una proporción de la diana con respecto a la no diana de al menos 4:1, son estables *in vivo* y se ubican sustancialmente en la diana en 1 hora después de la administración. En otro aspecto, la invención presenta composiciones farmacéuticas que comprenden un enlazador unido a los análogos de T₄ para tecnecio, indio para la formación de imágenes y usando la emisión de un solo fotón ("SPECT") y con agentes de contraste para la formación de imágenes MRI. Además, los análogos halogenados que se unen a TTR pueden inhibir la formación de fibrillas amiloides y, por lo tanto, se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dichos compuestos también se pueden usar con métodos de formación de imágenes de tomografía por emisión de positrones ("PET").

En otros aspectos, la divulgación también incluye composiciones y métodos de modulación de las acciones de los factores de crecimiento y otros polipéptidos cuyos receptores de la superficie celular están agrupados alrededor de

la integrina $\alpha V\beta 3$ u otros receptores de la superficie celular que contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp ("RGD"). Los polipéptidos que se pueden modular incluyen, por ejemplo, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina, factores de crecimiento epidérmico e interferón- γ .

En otro aspecto, la divulgación incluye métodos de supresión del crecimiento de células cancerosas que son resistentes a la terapia con fármacos, que comprenden administrar a un sujeto en necesidad de ello una cantidad de TETRAC, nanopartícula de TETRAC o análogos de los mismos, eficaz para suprimir el crecimiento. En ciertas realizaciones, las células cancerosas resistentes a la terapia se seleccionan del grupo que consiste en, pero sin limitación, un tumor primario o metastásico, cáncer de mama, cáncer de tiroides, neuroblastoma, glioma y glioblastoma multiforme y otros cánceres de cerebro, cáncer de colon, cánceres de cabeza y cuello, carcinomas de células basales y células escamosas y melanomas de la piel, sarcoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de riñón y hepatoma, cáncer de pulmón y cáncer de estómago. En otras realizaciones, la terapia con fármacos comprende la administración de fármacos quimioterapéuticos convencionales y novedosos, que se pueden seleccionar del grupo que consiste en doxorrubicina, etopósido, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, cisplatino, tricotostatina A, paclitaxel, gemcitabina, taxotere, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán, adriamicina, bortezomib y atoposida o derivados novedosos de los agentes anteriores.

Para el método de supresión del crecimiento de células cancerosas que son resistentes a la terapia con fármacos, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello una cantidad de TETRAC, nanopartícula de TETRAC o análogos de los mismos, el TETRAC o análogo de TETRAC puede ser un conjugado de nanopartícula que comprende una nanopartícula conjugada a una pluralidad de partículas de TETRAC con un tamaño de partícula de entre 10 y 1000 nm, donde las partículas de TETRAC están unidas a la nanopartícula por un enlace de éter (-O-) o azufre (-S-) que porta el resto de alcohol de las partículas de TETRAC y la conjugación de nanopartículas. En ciertas realizaciones, el TETRAC, la nanopartícula de TETRAC o el análogo de los mismos se conjuga a un miembro seleccionado del grupo que consiste en alcohol polivinílico, copolímero de etileno y ácido acrílico, polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico, poliglicólido, poliláctido, agarosa, PEO, m-PEG, PVA, PLLA, PGA, poli-L-lisina, albúmina de suero humano, derivado de celulosa, carbometoxi/etil/hidroxipropilo, ácido hialurónico, ciclodextrina/dextrano ligado a folato, polímero espaciado de sarcosina/aminoácidos, alginato/carragenina, pectina/quitosano, dextrano, colágeno, poliamina, polianilina, polialanina, politriptófano y politirosina.

El TETRAC o los conjugados de nanopartículas de la presente invención se pueden usar en un método de aumento de la quimiosensibilidad de las células cancerosas mediante la administración a las células de TETRAC, TRIAC o conjugados de nanopartículas de los mismos en una cantidad suficiente para mejorar la quimiosensibilidad y un método de tratamiento de un paciente que tiene un tumor, que comprende administrar a dicho paciente TETRAC, TRIAC o conjugados de nanopartículas de los mismos en una cantidad eficaz para aumentar la quimiosensibilidad de las células cancerosas y/o inhibir el desarrollo de la resistencia a fármacos en el cáncer.

Se han expuesto los detalles de una o más realizaciones de la invención en la descripción adjunta que se presenta a continuación. Aunque, en la práctica o el ensayo de la presente invención, se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones. En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efectos de L-T₄ y L-T₃ sobre la angiogénesis cuantificada en el ensayo de CAM de pollo. A, se expusieron muestras de control a PBS y muestras adicionales a T₃ 1 nM o 0,1 μ mol/l de T₄ durante 3 días. Ambas hormonas causaron un aumento de la ramificación de los vasos sanguíneos en estas imágenes representativas de 3 experimentos. B, tabulación de la media $\pm$ ETM de nuevas ramificaciones formadas a partir de vasos sanguíneos existentes durante el período experimental extraído de 3 experimentos, cada uno de los cuales incluyó 9 ensayos de CAM. A las concentraciones mostradas, T₃ y T₄ causaron efectos similares (aumentos de 1,9 veces y de 2,5 veces, respectivamente, en la formación de las ramificaciones). **P < 0,001 por ANOVA de 1 vía, comparando las muestras de CAM tratadas con hormonas con las tratadas con PBS.

Figura 2. El TETRAC inhibe la estimulación de la angiogénesis por T₄ y T₄ ligada a agarosa (T₄-ag). A, se observa un aumento de 2,5 veces en la formación de ramificaciones de los vasos sanguíneos en una preparación de CAM representativa expuesta a 0,1 μ mol/l de T₄ durante 3 días. En 3 experimentos similares, hubo un aumento de 2,3 veces. Este efecto de la hormona es inhibido por TETRAC (0,1 μ mol/l), un análogo de T₄ del que se había demostrado previamente que inhibía las acciones de la membrana plasmática de T₄. TETRAC solo no estimula la angiogénesis (C). B, T₄-ag (0,1 μ mol/l) estimula la angiogénesis 2,3 veces (2,9 veces en 3 experimentos), un efecto también bloqueado por TETRAC. C, resumen de los resultados de 3 experimentos que examinan las acciones de TETRAC, T₄-ag y T₄ en el ensayo de CAM. Se obtuvieron datos (media $\pm$ ETM) de 10 imágenes para cada condición experimental en cada uno de 3 experimentos. **P < 0,001

por ANOVA, comparando muestras tratadas con T_4 y tratadas con T_4 -agarosa con muestras de control tratadas con PBS.

Figura 3. Comparación de los efectos proangiogénicos de FGF2 y T_4 . A, los efectos en tándem de T_4 (0,05 $\mu\text{mol/l}$) y FGF2 (0,5 $\mu\text{mol/l}$) en concentraciones submáximas son aditivos en el ensayo de CAM y equivalen al nivel de la angiogénesis observado con FGF2 (1 $\mu\text{mol/l}$ en ausencia de T_4). B, resumen de los resultados de 3 experimentos que examinaron las acciones de FGF2 y T_4 en el ensayo de CAM (media $\pm$ ETM) como en A. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$, comparando los resultados de las muestras tratadas con los de las muestras de control tratados con PBS en 3 experimentos.

Figura 4. Efecto de anti-FGF2 sobre la angiogénesis provocada por T_4 o FGF2 exógeno. A, FGF2 provocó un aumento del doble en la angiogénesis en el modelo de CAM en 3 experimentos, un efecto inhibido por el anticuerpo (ab) contra FGF2 (8 μg). T_4 también estimuló la angiogénesis 1,5 veces, y este efecto también fue bloqueado por el anticuerpo FGF2, lo que indica que la acción de la hormona tiroidea en el modelo de CAM está mediada por un efecto autocrino/paracrino de FGF2, porque T_4 y T_3 provocan la liberación de FGF2 de células en el modelo de CAM (Tabla 1). Los presentes inventores han demostrado previamente que un anticuerpo IgG inespecífico no tiene ningún efecto sobre la angiogénesis en el ensayo de CAM. B, resumen de los resultados de 3 experimentos de CAM que estudiaron la acción de FGF2-ab en presencia de FGF2 o T_4 . * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$, lo que indica efectos significativos en 3 experimentos que estudian los efectos de la hormona tiroidea y FGF2 sobre la angiogénesis y la pérdida de estos efectos en presencia de anticuerpo contra FGF2.

Figura 5. Efecto de PD 98059, un inhibidor de la transducción de señales en cascada de MAPK (ERK1/2), sobre la angiogénesis inducida por T_4 , T_3 y FGF2. A, la angiogénesis estimulada conjuntamente por T_4 (0,1 $\mu\text{mol/l}$) y T_3 (1 nmol/l) es completamente inhibida por PD 98059 (3 $\mu\text{mol/l}$). B, la angiogénesis inducida por FGF2 (1 $\mu\text{g/ml}$) también es inhibida por PD 98059, lo que indica que la acción del factor de crecimiento también depende de la activación de la vía de ERK1/2. En el contexto de los experimentos con T_4 -agarosa (T_4 -ag) y TETRAC (Figura 2), que indican que T_4 inicia su efecto proangiogénico en la membrana celular, los resultados mostrados en A y B coinciden con 2 papeles desempeñados por MAPK en la acción proangiogénica de la hormona tiroidea: ERK1/2 transduce la señal temprana de la hormona que conduce a la elaboración de FGF2 y transduce la acción posterior de FGF2 sobre la angiogénesis. C, resumen de los resultados de 3 experimentos, representados por A y B, que muestran el efecto de PD98059 sobre las acciones de T_4 y FGF2 en el modelo de CAM. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$, que indican resultados de ANOVA sobre los datos de 3 experimentos.

Figura 6. T_4 y FGF2 activan MAPK en células endoteliales ECV304. Se prepararon las células en medio M199 con suero con hormona agotada al 0,25 % y se trataron con T_4 (0,1 $\mu\text{mol/l}$) durante de 15 minutos a 6 horas. Se recogieron las células y se prepararon las fracciones nucleares como se ha descrito anteriormente. Se inmunotransfirieron las nucleoproteínas, separadas por electroforesis en gel, con el anticuerpo contra MAPK fosforilada (pERK1 y pERK2, 44 y 42 kDa, respectivamente), seguido de un segundo anticuerpo unido a un sistema de detección de luminiscencia. Una inmunotransferencia de actina- β de las fracciones nucleares sirve como control para la carga de gel en cada parte de esta figura. Cada inmunotransferencia es representativa de 3 experimentos. A, T_4 genera un aumento de la fosforilación y la translocación nuclear de ERK1/2 en células ECV304. El efecto es máximo en 30 minutos, aunque se mantiene durante ≥ 6 horas. B, se trataron las células ECV304 con el inhibidor de la activación de ERK1/2 PD 98059 (PD; 30 $\mu\text{mol/l}$) o el inhibidor de PKC CGP41251 (CGP; 100 nmol/l) durante 30 minutos, tras lo que se añadió T_4 10^{-7} M durante 15 minutos a muestras de células como se muestra. Se recogieron los núcleos, y este experimento representativo muestra un aumento de la fosforilación (activación) de ERK1/2 por T_4 (carril 4), que es bloqueado por ambos inhibidores (carriles 5 y 6), lo que sugiere que la actividad de PKC es un requisito para la activación de MAPK por T_4 en las células endoteliales. C, se trataron las células ECV304 bien con T_4 (10^{-7} mol/l), FGF2 (10 ng/ml), o ambos agentes durante 15 minutos. La figura muestra la acumulación de pERK1/2 en los núcleos bien con hormona o tratamiento con factores de crecimiento, y una mayor acumulación nuclear de pERK1/2 con ambos agentes juntos.

Figura 7. T_4 aumenta la acumulación de ADNc de FGF2 en células endoteliales ECV304. Se trataron las células durante 6 a 48 horas con T_4 (10^{-7} mol/l), y ADNc de FGF2 y de GAPDH aislados de cada parte alícuota de células. Se corrigieron los niveles de ADNc de FGF2, mostrados en la transferencia superior, en cuanto a las variaciones en el contenido de ADNc de GAPDH, mostrado en la transferencia inferior, y los niveles corregidos de FGF2 se ilustran abajo en el gráfico (media $\pm$ EE de la media; $n = 2$ experimentos). Hubo una mayor abundancia de transcripción de FGF2 en el ARN extraído de las células tratadas con T_4 en todos los puntos temporales. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, lo que indica la comparación por ANOVA de los valores en cada punto temporal para controlar el valor.

Figura 8. Modelo de crecimiento tumoral en embrión de pollo durante 7 días. Ilustración del modelo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) de implantación de tumores.

Figura 9. T_4 estimula la curación de heridas tridimensional. Fotografías de células de fibroblastos dérmicos humanos expuestos a T_4 y control, de acuerdo con el ensayo de curación de heridas tridimensional descrito en el presente documento.

Figura 10. T_4 aumenta la curación de heridas de manera dependiente de la dosis, día 3. Como se indica en el gráfico, T_4 aumenta la curación de la herida (medida por las células que migran hacia afuera) de una manera dependiente de la dosis entre las concentraciones de 0,1 μM y 1,0 μM . Este mismo aumento no se observa a las concentraciones de T_4 de entre 1,0 μM y 3,0 μM .

Figura 11. Efecto de T_4 y T_3 sin marcar sobre la unión de T_4 marcada con I^{125} a integrina purificada. Se

añadieron T_4 sin marcar (10^{-4} M a 10^{-11} M) o T_3 (10^{-4} M a 10^{-8} M) a integrina $\alpha V\beta 3$ purificada (2 μ g/muestra) y se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron dos microcuris de T_4 marcada con I^{-125} a cada muestra. Se incubaron las muestras durante 20 min a temperatura ambiente, se mezclaron con colorante de carga y se procesaron en un gel nativo al 5 % durante 24 horas a 4 °C a 45 mA. Después de la electroforesis, se envolvieron los geles en papel de plástico y se expusieron a la película. La unión de T_4 marcada con I^{-125} a $\alpha V\beta 3$ purificada no se ve afectada por T_4 sin marcar en el intervalo de 10^{-11} M a 10^{-7} M, pero se compite de una manera dependiente de la dosis por T_4 sin marcar a una concentración de 10^{-6} M. La unión de T_4 en caliente a la integrina es desplazada casi completamente por T_4 sin marcar 10^{-4} M. T_3 es menos eficaz en competir por la unión de T_4 a $\alpha V\beta 3$, reduciendo la señal en un 11 %, 16 % y 28 % a T_3 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M, respectivamente.

Figura 12. TETRAC y un péptido que contiene RGD, pero no un péptido que contiene RGE compiten por la unión de T_4 a $\alpha V\beta 3$ purificada. A) La adición de TETRAC a $\alpha V\beta 3$ purificada reduce la unión de T_4 marcada con I^{-125} a la integrina de una manera dependiente de la dosis. TETRAC 10^{-8} M es ineficaz en la competición de la unión de T_4 en caliente a la integrina. La asociación de T_4 y $\alpha V\beta 3$ se redujo en un 38 % en presencia de TETRAC 10^{-7} M y en un 90 % con TETRAC 10^{-5} M. La adición de un péptido RGD a 10^{-5} M compite por la unión de T_4 a $\alpha V\beta 3$. La aplicación de péptido RGE 10^{-5} M y 10^{-4} M, como un control para el péptido RGD, fue incapaz de disminuir la unión de T_4 en caliente a $\alpha V\beta 3$ purificada. B) Representación gráfica de los datos de TETRAC y RGD del panel A. Los puntos de datos se muestran como la media $\pm$ DE de 3 experimentos independientes.

Figura 13. Efectos del anticuerpo monoclonal LM609 en la unión de T_4 a $\alpha V\beta 3$. A) Se añadió LM609 a $\alpha V\beta 3$ a las concentraciones indicadas. Un μ g de LM609 por muestra reduce la unión de T_4 marcada con I^{-125} a la integrina en un 52 %. La inhibición máxima de la unión de T_4 a la integrina se alcanza cuando las concentraciones de LM609 son de 2 μ g por muestra y se mantiene con concentraciones de anticuerpo de hasta 8 μ g. Como control para la especificidad del anticuerpo, se añadieron 10 μ g/muestra de anticuerpo monoclonal Cox-2 y 10 μ g/muestra de IgG de ratón a $\alpha V\beta 3$ antes de la incubación con T_4 . B) Representación gráfica de los datos del panel A. Los puntos de datos se muestran como la media $\pm$ DE de 3 experimentos independientes.

Figura 14. Efecto de RGD, RGE, TETRAC y el anticuerpo monoclonal LM609 en la activación de MAPK inducida T_4 . A) Se trataron células CV-1 (confluencia del 50-70 %) durante 30 min con T_4 10^{-7} M (concentración total de 10^{-7} M, concentración libre de 10^{-10} M. Se trataron las muestras seleccionadas durante 16 horas con las concentraciones indicadas bien de un péptido que contenía RGD, un péptido que contenía RGE, TETRAC o LM609 antes de la adición de T_4 . Se separan las proteínas nucleares mediante SDS-PAGE y se inmunotransfieren con anticuerpo contra MAPK fosforilada (pERK1/2). Se reduce la acumulación nuclear de pERK1/2 en las muestras tratadas con péptido RGD 10^{-6} M o superior, pero no se modifica significativamente en las muestras tratadas con RGE 10^{-4} M. La acumulación de pERK1/2 se reduce en un 76 % en las células CV1 tratadas con TETRAC 10^{-6} M, mientras que a concentraciones 10^{-5} M o más altas de TETRAC reducen la acumulación nuclear de pERK1/2 a niveles similares a las muestras de control no tratadas. El anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$ LM609 reduce la acumulación de MAPK activada en el núcleo cuando se aplica a las cultivos de CV1 a una concentración de 1 μ g/ml. B) Representación gráfica de los datos de RGD, RGE y TETRAC mostrada en el panel A. Los puntos de datos se muestran como la media $\pm$ DE de 3 experimentos independientes.

Figura 15. Efectos de ARNip contra αV y $\beta 3$ sobre la activación de MAPK inducida por T_4 . Se transfirieron células CV1 con ARNip (concentración final de 100 nM) contra αV , $\beta 3$, o αV y $\beta 3$ juntos. Dos días después de la transfección, se trataron las células con T_4 10^{-7} M. A) Se realizó una RT-PCR en ARN aislado de cada grupo de transfección para verificar la especificidad y funcionalidad de cada ARNip. B) Se aislaron y se sometieron a SDS-PAGE las proteínas nucleares de cada transfección.

Figura 16. Efecto inhibitor de anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$ (LM609) sobre la angiogénesis estimulada por T_4 en el modelo de CAM. A) Se expusieron las muestras a PBS, T_4 (0,1 μ M) o T_4 más 10 mg/ml de LM609 durante 3 días. La angiogénesis estimulada por T_4 es inhibida sustancialmente por la adición del anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$ LM609. B) Tabulación de la media $\pm$ ETM de nuevas ramificaciones formadas en los vasos sanguíneos existentes durante el período experimental. Los datos se extraen de 3 experimentos separados, cada uno con 9 muestras en cada grupo de tratamiento. C, D) La angiogénesis estimulada por T_4 o FGF2 también es inhibida por la adición del anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$ LM609 o XT 199.

Figura 17. Composiciones poliméricas de análogos de la hormona tiroidea - Conjugación del polímero a través de un enlace de éster usando alcohol polivinílico. En esta preparación, se puede esterificar alcohol polivinílico disponible en el mercado (o copolímeros relacionados) mediante el tratamiento con el cloruro de ácido de análogos de la hormona tiroidea, a saber, la forma de cloruro de ácido. La sal de clorhidrato se neutraliza mediante la adición de trietilamina, proporcionando clorhidrato de trietilamina que se puede lavar con agua tras la precipitación de la forma polimérica del éster de la hormona tiroidea para diferentes análogos. El enlace éster al polímero se puede someter a hidrólisis *in vivo* para liberar el análogo de la hormona tiroidea proangiogénico activo.

Figura 18. Composiciones poliméricas de análogos de la hormona tiroidea - Conjugación del polímero a través de un enlace de anhídrido usando copolímero de ácido acrílico y etileno. Es similar a la anterior conjugación covalente del polímero, sin embargo esta vez se realiza a través de un enlace de anhídrido que se obtiene de la reacción de un copolímero de ácido acrílico. Este enlace de anhídrido también es susceptible a la hidrólisis *in vivo* para liberar análogo de la hormona tiroidea. La neutralización del ácido clorhídrico se realiza

mediante el tratamiento con trietilamina, y el posterior lavado del polímero de polianhídrido precipitado con agua elimina el subproducto de clorhidrato de trietilamina. Esta reacción conducirá a la formación de copolímero de ácido acrílico y análogo de la hormona tiroidea + trietilamina. Tras la hidrólisis *in vivo*, el análogo de la hormona tiroidea se liberará a lo largo del tiempo, pudiéndose controlar más copolímero de ácido acrílico y etileno.

Figura 19. Composiciones poliméricas de análogos de la hormona tiroidea - atrapamiento en un polímero de ácido poliláctico. Se someten polímeros de poliéster y ácido poliláctico (PLA) a hidrólisis *in vivo* en el monómero de ácido láctico y esto se ha aprovechado como vehículo para los sistemas de administración de fármacos en seres humanos. A diferencia de los dos métodos *covalentes* anteriores, donde el análogo de la hormona tiroidea está unido por un enlace químico con el polímero, este sería un método *no covalente* que encapsularía el análogo de la hormona tiroidea en perlas de polímero de PLA. Esta reacción conducirá a la formación de perlas de PLA que contienen análogo de la hormona tiroidea en agua. La filtración y el lavado darán lugar a la formación de perlas de PLA que contienen análogo de la hormona tiroidea, que, tras la hidrólisis *in vivo*, conducirá a la generación de niveles controlados de hormona tiroidea más ácido láctico.

Figura 20. Análogos de la hormona tiroidea capaces de conjugarse con diversos polímeros. A-D muestran las sustituciones requeridas para lograr que diversos análogos de la hormona tiroidea que se pueden conjugar creen formas poliméricas de análogos de la hormona tiroidea de la invención.

Figura 21. Ensayo de angiogénesis tridimensional *in vitro*. La Figura 21 es un protocolo e ilustración del ensayo de crecimiento *in vitro* tridimensional para el endotelio microvascular humano en perlas recubiertas de fibrina.

Figura 22. Angiogénesis de crecimiento *in vitro* de HOMECE en fibrina tridimensional. La Figura 22 es una ilustración del crecimiento de células endoteliales microvasculares humanas tridimensional bajo diferentes aumentos.

Figuras 23A-E. Liberación de factores de curación de heridas derivados de plaquetas en presencia de bajo nivel de colágeno.

Figuras 24A-B. T₄ y T₃ sin marcar desplazan T₄ marcada con I⁻¹²⁵ de la integrina purificada. Se añadieron T₄ (10⁻¹¹ M a 10⁻⁴ M) o T₃ (10⁻⁸ a 10⁻⁴ M) sin marcar a integrina αVβ3 purificada (2 µg/muestra) antes de la adición de T₄ marcada con I⁻¹²⁵. **(a)** La unión de T₄ marcada con I⁻¹²⁵ a αVβ3 purificada no se vio afectada por T₄ sin marcar en el intervalo de 10⁻¹¹ M a 10⁻⁷ M, pero fue desplazada de manera dependiente de la concentración por T₄ sin marcar a concentraciones ≥ 10⁻⁶ M. T₃ fue menos eficaz en el desplazamiento de la unión de T₄ a αVβ3. **(b)** La presentación gráfica de los datos de T₄ y T₃ muestra la media ± DE de 3 experimentos independientes.

Figuras 25A-B. TETRAC y un péptido que contiene RGD, pero no un péptido que contiene RGE, desplazan la unión de T₄ a αVβ3 purificada. **(a)** La preincubación de αVβ3 purificada con TETRAC o un péptido que contiene RGD reduce la interacción entre la integrina y T₄ marcada con I⁻¹²⁵ de una manera dependiente de la dosis. La aplicación de péptido RGE 10⁻⁵ M y 10⁻⁴ M, como controles para el péptido RGD, no disminuyó la unión de T₄ marcada a αVβ3 purificada. **(b)** La presentación gráfica de los datos de TETRAC y RGD indica la media ± DE de los resultados de 3 experimentos independientes.

Figuras 26A-B. Los anticuerpos de integrina inhiben la unión de T₄ a αVβ3. Los anticuerpos LM609 y SC7312 se añadieron a αVβ3 a las concentraciones indicadas (µg/ml) 30 min antes de la adición de T₄ marcada con I⁻¹²⁵. La inhibición máxima de la unión de T₄ a la integrina se alcanzó cuando la concentración de LM609 fue de 2 µg/ml y se mantuvo con concentraciones de anticuerpo de hasta 8 µg/ml. SC7312 redujo la unión de T₄ a αVβ3 en un 46 % a 2 µg/ml de anticuerpo/muestra y en un 58 % cuando había 8 µg/ml de anticuerpo. Como control para la especificidad del anticuerpo, se añadieron 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal antiαVβ3 (P1F6) y 10 µg/ml de IgG de ratón a αVβ3 antes de la incubación con T₄. El gráfico muestra la media ± DE de los datos de 3 experimentos independientes.

Figuras 27A-B. Efecto de los péptidos RGD y RGE, TETRAC y anticuerpo monoclonal LM609 sobre la activación de MAPK inducida por T₄. **(a)** La acumulación nuclear de pERK1/2 se redujo en las muestras tratadas con péptido RGD 10⁻⁶ M o superior, pero no se modificó significativamente en las muestras tratadas con RGE hasta 10⁻⁴ M. La acumulación de pERK1/2 en células CV-1 tratadas con TETRAC 10⁻⁵ M y T₄ fue similar a los niveles observados en las muestras de control sin tratar. LM609, un anticuerpo monoclonal contra αVβ3, redujeron la acumulación de MAPK activada en el núcleo cuando se aplicó a cultivos de CV-1 en una concentración de 1 µg/ml. **(b)** El gráfico muestra la media ± DE de los datos de 3 experimentos independientes. Las inmunotransferencias con anticuerpo contra α-tubulina se incluyen como controles de carga de gel.

Figuras 28A-B. Efectos de ARNip contra αV y β3 sobre la activación de MAPK inducida por T₄. Se transfirieron células CV-1 con ARNip (concentración final 100 nM) contra αV, β3, o αV y β3 juntos. Dos días después de la transfección, se trataron las células con T₄ 10⁻⁷ M o el control del vehículo durante 30 min. **(a)** Se realizó la RT-PCR con ARN aislado de cada grupo de transfección para verificar la especificidad y funcionalidad de cada ARNip. **(b)** Se aislaron proteínas nucleares de cada conjunto de células transfectadas, se sometieron a SDS-PAGE y se sondearon para pERK1/2 en presencia o ausencia de tratamiento con T₄. En las células parentales y en las tratadas con ARNip mezclados, se hizo evidente la acumulación nuclear de pERK1/2 con T₄. Las células tratadas con ARNip contra αV o β3 mostraron un aumento en pERK1/2 en ausencia de T₄, y una reducción con tratamiento de T₄. Las células que contenían ARNip contra αV y β3 no respondieron al tratamiento con T₄.

Figuras 29A-B. Efecto inhibitorio de anticuerpo monoclonal contra αVβ3 (LM609) sobre la angiogénesis estimulada por T₄ en el modelo de CAM. Se expusieron los CAM a discos filtrantes tratados con PBS, T₄ (10⁻⁷ M) o T₄ más 10 µg/ml de LM609 durante 3 días. **(a)** La angiogénesis estimulada por T₄ fue inhibida sustancialmente

por la adición de anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$ LM609. **(b)** Se muestra la tabulación de la media $\pm$ ETM de las nuevas ramificaciones formadas en los vasos sanguíneos existentes durante el período experimental. *** $P < 0,001$, comparando los resultados de las muestras tratadas con T_4 /LM609 con las muestras tratadas con T_4 en 3 experimentos separados, cada uno con 9 imágenes por grupo de tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de 1 vía.

Figuras 30A-B. Se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de PLGA dopadas con TETRAC recubiertas con PVA. Se examinaron varios conjuntos de nanopartículas para la carga óptima de TETRAC. También se examinaron el tamaño y el potencial zeta de nanopartículas huecas y dopadas con TETRAC. No se encontró ninguna diferencia significativa en el tamaño ni en el potencial zeta entre las nanopartículas huecas y las dopadas con TETRAC recubiertas con Tween-80. El tamaño medio de las nanopartículas aumentó ligeramente (hueco de ~ 193 nm) en el caso de las nanopartículas dopadas con TETRAC. Se determina la cantidad de TETRAC en el interior de las nanopartículas por HPLC. Se encontró que la concentración de TETRAC es de 540 $\mu\text{g/ml}$ de las nanopartículas. **(a)** Potencial zeta. **(b)** Determinación del tamaño por DLS.

Figuras 31A-B. Nanopartículas de PLGA/PVA-TETRAC. Se prepararon nanopartículas de PLGA recubiertas con Tween-80 mediante un único método de emulsión usando alcohol polivinílico (PVA) como estabilizador. Se determinó el tamaño de las nanopartículas mediante el uso de dispersión de luz dinámica. Se determinó la cantidad de TETRAC encapsulado en las nanopartículas mediante el uso de una HPLC. **(a)** Informe de estadísticas del tamaño según la intensidad. **(b)** Informe del potencial Zeta.

La **Figura 32** es una ilustración de nanopartículas de TETRAC del alcance de la presente invención que se muestran más adelante.

Figuras 33A-B. **(a)** Espectros de distribución del tamaño de nanopartículas de PLGA que encapsulan TETRAC sin el uso de estabilizador. **(b)** Espectros de distribución del tamaño de nanopartículas de PLGA que encapsulan TETRAC usando solución de PVA al 1 % como estabilizador.

La **Figura 34** es un gráfico de barras que muestra la antiangiogénesis de TETRAC y nanopartículas de PLGA y TETRAC en el modelo de CAM.

La **Figura 35** es un diagrama esquemático para la preparación de nanopartículas de PLGA que encapsulan conjuntamente TETRAC y temozolomida.

Figuras 36A-B. **(a)** es una ilustración que muestra cómo se pueden preparar nanoesferas de colágeno-hidrocapatita usando un método de emulsión de agua en aceite, a continuación, las nanopartículas pueden ser conjugadas por T_4 mediante el uso de la química de carbodiimida. **(b)** También hay un enorme potencial para la encapsulación de T_4 y su análogo en nanopartículas de PLGA mediante el uso de métodos de emulsión doble. También por experimentos preliminares de cinética de liberación, las nanopartículas biodegradables son capaces de liberar los materiales de encapsulación.

Las **Figuras 37A-B** son cromatogramas y espectros de muestras de nanopartículas de T_4 -colágeno eluidas en una columna C18, DWL: 225 nm. **(a)** Patrón de T_4 50 μM diluido con agua. **(b)** Nanopartícula de T_4 -colágeno diluida con agua y después filtrada a través de una membrana 300 KD.

Las **Figuras 38A-B** son cromatogramas y espectros de muestras de nanopartículas de T_4 -colágeno eluidas en una columna C18, DWL: 225 nm. **(a)** Patrón de T_4 50 μM diluido con NaOH 0,5 M. **(b)** Nanopartículas de T_4 -colágeno incubadas con NaOH 0,5 M durante 2 horas y después filtradas a través de membrana de 300 KD.

La **Figura 39** es un esquema de nanopartículas de PEG-PLGA que encapsulan GC-1.

La **Figura 40** es un esquema de nanopartículas de PEG-PLGA que encapsulan T_3 .

Las **Figuras 41A-B** muestran los resultados de la síntesis de un gran lote de nanopartículas de PLGA que conjugan TETRAC. **(a)** Muestra la distribución del tamaño según la intensidad. **(b)** Muestra el gráfico de estadísticas con 1 medición.

La **Figura 42** muestra que la angiogénesis es estimulada en el ensayo de CAM por la aplicación de concentraciones fisiológicas de FGF2, VEGF y T_3 . FGF2 (1 $\mu\text{g/ml}$) dispuesto en el disco filtrante de CAM indujo la formación de ramificaciones de los vasos sanguíneos con un aumento de 2,4 veces ($P < 0,001$) en comparación con las membranas tratadas con PBS. La adición de TETRAC (75 ng/disco filtrante) inhibió la respuesta proangiogénica hacia FGF2, mientras que TETRAC solo no tuvo ningún efecto sobre la angiogénesis.

La **Figura 43** es un gráfico lineal que muestra la realización de una curva de respuesta a la dosis de TETRAC para encontrar la inhibición máxima de la angiogénesis estimulada por FGF2.

La **Figura 44** es un gráfico de barras que muestra que TETRAC inhibe de manera similar el efecto proangiogénico de VEGF y T_3 en un 52 % y 66 %, respectivamente.

La **Figura 45** es un gráfico lineal que muestra los resultados de las células HMVEC-d cultivadas en Matrigel durante 24 horas y estimuladas con VEGF (50 ng/ml) en presencia o ausencia de cantidades crecientes de TETRAC. TETRAC inhibió la formación de tubos inducida por VEGF como se demuestra por una reducción en el número de uniones y el número de tubos, y una disminución de la longitud total de los túbulos.

La **Figura 46** son fotografías que muestran el efecto de inhibición por TETRAC de la formación de tubos inducida por VEGF.

Las **Figuras 47A-B** es una gráfica de la expresión de ARNm de las integrinas αV y $\beta 3$, y angiopoyetina-2 reducida por TETRAC: se cultivaron células HMVEC-D en Matrigel y se estimularon con VEGF (50 ng/ml) con y sin TETRAC durante 2 horas. Se aisló el ARN mensajero y se realizó una RT-PCR en tiempo real para la integrina αV y la integrina $\beta 3$.

Las **Figuras 48A-B** son gráficos de barras que muestran que se realizó la RT-PCR en tiempo real para la angiopoyetina-1 y angiopoyetina-2, y se encontró que TETRAC inhibió la expresión de ARNm de angiopoyetina-2

de una manera dosis-respuesta y no afectó a los niveles de ARNm de la angiopoyetina-1.

Las **Figuras 49A-C** son gráficos de barras que muestran el análisis de micromatriz realizado usando la matriz U133 Plus 2.0 de ser humano de Affymetrix. Se incubaron células HDMEC con VEGF a 50 ng/ml durante 24 horas con y sin TETRAC (3 μ M). Los resultados del análisis GeneChip de Affymetrix indicaron que tres transcripciones de tipo angiopoyetina diferentes se expresaron diferencialmente en las células HMVEC-d, lo que sugiere que TETRAC puede inhibir la expresión de genes diana que son necesarios para la estimulación de la angiogénesis.

Las **Figuras 50A-D** son gráficos de barras que muestran que TETRAC, de bajo peso molecular, dirigido en el receptor de membrana plasmática de la hormona tiroidea tiene actividad antiangiogénica potente. Aunque el TETRAC es un antagonista de las acciones iniciadas en la superficie celular de la hormona tiroidea, se observa ahora que el TETRAC en *ausencia* de la hormona tiroidea inhibe la actividad angiogénica de VEGF y FGF2 en ensayos de células endoteliales humanas y de pollo.

La **Figura 51** es un esquema que muestra el método de fabricación de nanopartículas de PEG-PLGA conjugadas con T_4 .

La **Figura 52** son fotografías que muestran los resultados de los ensayos de PRIAB1, PRIAB4 y PRIAB5, y el ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) antes de la conjugación, que se traduce en una acción proangiogénica clara realizada por los análogos de T_4 protegidos, mostrando el grupo protector más voluminoso la menor actividad.

Figura 53: Efecto de TETRAC sobre la proliferación de células cancerosas sensibles a fármacos frente a las resistentes a fármacos. Se sometieron células sensibles y resistentes a fármacos SKN-SH, SaOS2 y MCF7 a tratamiento con concentraciones crecientes de TETRAC durante un período de 4 días. A continuación, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Los datos representan la media de 4 determinaciones $\pm$ EE.

Figura 54: Inversión de la resistencia a fármacos por TETRAC. Se sometieron células SKN-SH/R, MCF7/R y SaOS2/R resistentes a doxorubicina a tratamiento con TETRAC bien solo o en combinación con cada uno de doxorubicina (Dox), etopósido (Etop), cisplatino (Cisp) o tricostatina A (TSA) a las concentraciones indicadas. Después de 4 días, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT y los datos se representaron como la media de 3 determinaciones $\pm$ EE.

Figura 55: Efecto de TETRAC sobre la expresión de genes de resistencia a fármacos clásicos y sobre el transporte de fármacos. Panel A. Transferencia Western que muestra la expresión de P-gp, GST y SOD en células MCF7 resistentes a fármacos (R) y sensibles a fármacos de tipo silvestre (W). Panel B. Efecto de TETRAC y doxorubicina (Dox) sobre la expresión de estos genes en células MCF7/R. Se trataron las células durante 24 h con cada fármaco solo o la combinación de ambos, tras lo que se determinó la expresión de moléculas de resistencia a fármacos mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos. Panel C. Efecto de TETRAC sobre la acumulación intracelular de doxorubicina radiomarcada ($[^{14}C]$ Dox) en células MCF7 sensibles a fármacos y células MCF7/R resistentes a fármacos. Se incubaron las células durante 24 horas con doxorubicina en ausencia o presencia de TETRAC, tras lo que se lavaron y luego se disolvieron. Se midió la radiactividad asociada con los lisados celulares y se comparó entre las dos líneas celulares tratadas o no tratadas con TETRAC. Los datos representan una media de 3 determinaciones $\pm$ EE.

Figura 56: TETRAC obliga a las células cancerosas resistentes a fármacos a someterse a la senescencia y la apoptosis. Panel A. Se sometieron células SKN-SH/R a tratamiento de doxorubicina (Dox) sola, TETRAC solo o la combinación de ambos durante 24 h. Se midieron la expresión de p21/WAF1, caspasa-3 escindida (C1-Casp-3) y acción β mediante transferencia Western usando anticuerpos específicos. Panel B. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos y se trataron como se ha mencionado anteriormente, y se ensayó la expresión de la galactosidasa β asociada a la senescencia (SA- β -Gal.) como se describe en el apartado de métodos. Panel C. Se sembraron las células en cubreobjetos y se trataron con los fármacos que se ha explicado anteriormente durante 24 h, tras lo que se fijaron y se tiñeron con Hoechst, y se representó gráficamente el porcentaje de células positivas. Los datos representan la media de 3 determinaciones $\pm$ EE.

Figura 57: Efecto de TETRAC sobre el crecimiento de tumores resistentes a la doxorubicina en ratones atímicos. Se inyectaron a los ratones células MCF7/R resistentes a la doxorubicina (10^6) y, después de 10 días, se distribuyeron en grupos de siete ratones cada uno y se desafiaron con doxorubicina (2 mg/kg) o TETRAC (30 mg/kg) bien solos o en combinación. El volumen del tumor se midió cada 3 días durante un máximo de tres semanas.

Figura 58: Efecto de T_4 o T_3 (100 nM) en la dinámica de coagulación de la sangre humana usando TEG.

Figura 59: Eficacia antiangiogénica de TETRAC frente a nanopartículas de TETRAC sobre la angiogénesis mediada por T_4 en el modelo de CAM.

Descripción detallada de la invención y de la divulgación

En el presente documento, se desvela una nueva clase de moléculas de la hormona tiroidea que actúan sobre la superficie celular, denominadas "moléculas tiro-integrina". Estas moléculas activan selectivamente el receptor en la superficie celular. La hormona tiroidea es proangiogénica, actuando a través de un mecanismo que es dependiente de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK/ERK1/2) y del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2).

Los efectos de la hormona en las células tumorales están mediados por un nuevo receptor de superficie celular en la integrina α V β 3. El reciente descubrimiento de los presentes inventores de que la hormona tiroidea actúa por medio de este receptor situado en la membrana plasmática de las células ha conducido al descubrimiento de que los

análogos de la hormona tiroidea conjugados con polímero y los análogos de la hormona tiroidea en nanopartículas se pueden unir al receptor de la superficie celular, sin ser capaces de entrar en el célula.

El alcance de la divulgación engloba análogos de la hormona tiroidea nanoparticulados y conjugados poliméricos de los mismos que no pueden acceder al interior de la célula y cuyas actividades, por tanto, se deben limitar al receptor de integrina. Los análogos de la hormona nanoparticulados son derivados de ácido poliláctico (PLGA), bien ésteres o formulaciones unidas a éter más estables. Agarosa-T₄ es un modelo de nanopartículas que, según lo demostrado por los presentes inventores, es completamente activo en el receptor de integrina. Los análogos de la hormona reformulados no expresarán acciones intracelulares de la hormona y, por lo tanto, si se absorben en la circulación no tendrán las acciones sistémicas de los análogos de la hormona tiroidea.

Por lo tanto, las moléculas de la divulgación pueden activar selectivamente el receptor. Cuando se activa este receptor, se produce una cascada de cambios en los mediadores de proteínas, que culmina en una señal que puede modificar la actividad de las proteínas transactivadoras nucleares, tales como las proteínas STAT, p53 y los miembros de la superfamilia de los receptores de las hormonas nucleares.

Las acciones no genómicas de la hormona tiroidea son aquellas que son independientes de la unión intranuclear de la hormona por el receptor T₃ nuclear (TR). Estas acciones se inician en gran medida en la superficie celular. Mediante la conjugación de los análogos de la hormona tiroidea conocidos a polímeros sintéticos, se crea una nueva familia de hormonas que actúa exclusivamente en el receptor de la superficie celular, pero que permite que la hormona endógena siga entrando en la célula y actúe sobre las mitocondrias o directamente en el TR nuclear. Dependiendo del análogo de la hormona que se conjuga, se puede mantener la angiogénesis o la curación de heridas, o se pueden antagonizar las acciones sobre el crecimiento de células tumorales y la angiogénesis.

A continuación, se describen detalladamente formulaciones y usos de los conjugados de polímero y hormona tiroidea y nanopartículas en el alcance de la presente invención.

Definiciones

Por comodidad, aquí se recogen algunos términos usados en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente angiogénico" incluye cualquier compuesto o sustancia que promueve o favorece la angiogénesis, ya sea solo o en combinación con otra sustancia. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, T₃, T₄, T₃ o T₄-agarosa, análogos poliméricos de T₃, T₄, ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)fenoxi-acético (GC-1) o DITPA. Por el contrario, las expresiones "agente contra la angiogénesis" o "agente antiangiogénico" se refieren a cualquier compuesto o sustancia que inhibe o desfavorece la angiogénesis, ya sea solo o en combinación con otra sustancia. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, TETRAC, TRIAC, XT 199 y anticuerpo monoclonal LM609.

Como se usa en el presente documento, la expresión "isquemia de miocardio" se define como un suministro insuficiente de sangre al músculo cardíaco causado por una disminución de la capacidad de los vasos del corazón.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad coronaria" se define como enfermedades/trastornos de la función cardíaca debidos a un desequilibrio entre la función miocárdica y la capacidad de los vasos coronarios para suministrar suficiente flujo sanguíneo para la función normal. Las enfermedades/los trastornos coronarios específicos asociados con la enfermedad coronaria que se pueden tratar con las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen la isquemia de miocardio, angina de pecho, aneurisma coronaria, trombosis coronaria, vasoespasma coronario, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad cardíaca coronaria, oclusión coronaria y estenosis coronaria.

Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad vascular periférica oclusiva" (también conocida como trastorno oclusivo arterial periférico) es una obstrucción que implica un trastorno vascular en la carótida o las arterias femorales, incluyendo la arteria ilíaca. La obstrucción en las arterias femorales causa dolor y limita el movimiento. Un trastorno específico asociado con la enfermedad vascular periférica oclusiva es el pie diabético, que afecta a pacientes diabéticos y que, a menudo, da lugar a la amputación del pie.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "regeneración de los vasos sanguíneos", "angiogénesis", "revascularización" y "aumento de la circulación colateral" (o expresiones similares) se consideran sinónimos. La expresión "farmacéuticamente aceptable" cuando se refiere a una sustancia natural o sintética significa que la sustancia tiene un efecto tóxico aceptable en vista de un efecto beneficioso mucho mayor, mientras que la expresión relacionada "fisiológicamente aceptable" significa que la sustancia tiene una toxicidad relativamente baja. El término "coadministrado" significa que se administran dos o más fármacos a un paciente en aproximadamente el mismo momento o en momentos muy próximos entre sí, de modo que sus efectos se ejercen aproximadamente al mismo tiempo o están sustancialmente solapados. Esta expresión incluye la administración secuencial de fármacos, así

como simultánea.

"Sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de los análogos, formas poliméricas y derivados de la hormona tiroidea; sales que se obtienen de varios contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica e incluyen, solamente a modo de ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetra-alquilamonio, y similares; y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, se pueden usar sales de ácidos orgánicos o inorgánicos tales como clorhidrato, bromhidrato, tartrato, mesilato, acetato, maleato, oxalato y similares como la sal farmacéuticamente aceptable. El término también incluye sales tanto de adición de ácido como de adición de base.

"Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres, que no son indeseadas biológicamente ni de otro modo, y que se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares. Las sales particularmente preferidas de los compuestos de la invención son las sales de monocloruro y las sales de dicloruro.

"Sal de adición de base farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia y las propiedades de los ácidos libres, que no son indeseadas biológicamente ni de otra manera. Estas sales se preparan mediante la adición de una base inorgánica o una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen las sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, cinc, aluminio y similares. Las sales inorgánicas preferidas son las sales de amonio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas 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 resinas de isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, *N*-etilpiperidina, poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

"Ureido" se refiere a un radical de la fórmula $--N(H)--C(O)--NH_2$.

A partir de las definiciones anteriores y los ejemplos, se entiende que para los radicales que contienen un grupo alquilo sustituido, cualquier sustitución del mismo se puede producir en cualquier carbono del grupo alquilo. Los compuestos de la invención, o sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden tener átomos de carbono asimétricos en su estructura. Los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden, por lo tanto, existir como enantiómeros individuales, diastereoisómeros, racematos, y mezclas de enantiómeros y diastereómeros. Se pretende que la totalidad de dichos enantiómeros individuales, diastereoisómeros, racematos y mezclas de los mismos esté dentro del alcance de la presente invención. La configuración absoluta de ciertos átomos de carbono dentro de los compuestos, si se conoce, se indica mediante el descriptor *R* o *S* absoluto apropiado.

Se pueden preparar enantiómeros separados mediante el uso de materiales de partida y/o productos intermedios ópticamente activos o mediante el uso de técnicas de resolución convencionales, por ejemplo, resolución enzimática o HPLC quiral.

Como se usa en el presente documento, la expresión "factores de crecimiento" o "factores neurogénicos" se refiere a proteínas, péptidos u otras moléculas que tienen un efecto de crecimiento, proliferativo, diferenciador o trófico sobre las células del SNC o SNP. Dichos factores se pueden usar para la inducción de la proliferación o la diferenciación, y pueden incluir, por ejemplo, cualquier factor trófico que permita a las células del SNC o SNP proliferar, incluyendo cualquier molécula que se una a un receptor en la superficie de la célula para ejercer un efecto inductor del crecimiento trófico sobre la célula. Los factores preferidos incluyen el factor de crecimiento nervioso ("NGF"), factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF"), factor de crecimiento similar a la insulina ("IGF"), factor de crecimiento ácido de fibroblastos ("aFGF" o "FGF-1"), factor de crecimiento básico de fibroblastos ("bFGF" o "FGF-2") y factor de crecimiento transformante α y β ("TGF- α " y "TGF- β ").

"Sujeto" incluye organismos vivos tales como seres humanos, monos, vacas, ovejas, caballos, cerdos, ganado, cabras, perros, gatos, ratones, ratas, células cultivadas de los mismos y especies transgénicas de los mismos. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. La administración de las composiciones de la divulgación a un sujeto que se vaya a tratar se puede llevar a cabo usando procedimientos conocidos, a dosis y durante períodos de tiempo eficaces para tratar la afección en el sujeto. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para lograr un efecto terapéutico puede variar de acuerdo con factores tales como la edad, el sexo y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto terapéutico para tratar los agentes foráneos del sujeto. Es posible ajustar las pautas de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la

situación terapéutica.

"Administrar" incluye las vías de administración que permiten que las composiciones de la invención realicen su función prevista, por ejemplo, la potenciación de la angiogénesis. Es posible varias vías de administración incluyendo la vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular o subcutánea), oral (por ejemplo, en la dieta), tópica, nasal, rectal, o mediante microvehículos de liberación lenta dependiendo de la enfermedad o de la afección que se vaya a tratar. Los modos de administración preferidos son la administración oral, parenteral e intravenosa. La formulación del compuesto que se vaya a administrar variará de acuerdo con la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión, geles, aerosoles, cápsula). Una composición apropiada que comprende el compuesto que se vaya a administrar se puede preparar en un vehículo fisiológicamente aceptable, y adyuvantes y conservantes opcionales. Para las soluciones o emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados, agua estéril, cremas, pomadas, lociones, aceites, pastas y vehículos sólidos. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, lactato de Ringer o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o reponedores de líquidos, nutrientes o electrolitos (véase, en general, "Remington's Pharmaceutical Science", XVI Edición, Mack, Ed. (1980)).

"Cantidad eficaz" incluye aquellas cantidades de compuestos proangiogénicos o antiangiogénicos que les permiten realizar su función prevista, por ejemplo, potenciar o inhibir la angiogénesis en los trastornos relacionados con la angiogénesis como se describe en el presente documento. La cantidad eficaz dependerá de una serie de factores, incluyendo la actividad biológica, la edad, el peso corporal, el sexo, la salud general, la gravedad de la afección que se vaya a tratar, así como las propiedades farmacocinéticas adecuadas. Por ejemplo, las dosis de la sustancia activa pueden ser de aproximadamente 0,01 mg/kg/día a aproximadamente 500 mg/kg/día, ventajosamente de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 100 mg/kg/día. Una cantidad terapéuticamente eficaz de la sustancia activa se puede administrar por una vía apropiada en una o varias dosis. Además, las dosis de la sustancia activa se pueden aumentar o reducir proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son compatibles con la actividad del compuesto y son fisiológicamente aceptables para el sujeto. Un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable es la solución salina normal tamponada (NaCl 0,15 M). El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto terapéutico, se contempla su uso en las composiciones adecuadas para la administración farmacéutica. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios.

Los "ingredientes adicionales" incluyen uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y disolventes acuosos; vehículos y disolventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros "ingredientes adicionales" que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences".

Moléculas de tiro-integrina

Papel de la hormona tiroidea, análogos y conjugaciones poliméricas en la modulación de las acciones de polipéptidos cuyos receptores de la superficie celular están agrupados alrededor de la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ u otros compuestos que contienen RGD

En el presente documento, se desvela una nueva clase de molécula de la hormona tiroidea que funciona sobre la superficie celular, denominadas "moléculas de tiro-integrina". Estas moléculas activan selectivamente el receptor de la superficie celular para la hormona tiroidea (L-tiroxina, T_4 ; T_3) que se ha descrito en la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. El receptor se encuentra en o cerca del sitio de reconocimiento Arg-Gly-Asp (RGD) de la integrina. El receptor de $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ no es un homólogo del receptor de la hormona tiroidea nuclear (TR), pero la activación del receptor de la superficie celular genera una serie de eventos mediados por el núcleo, incluyendo la acción proangiogénica recientemente publicada de la hormona y la migración de fibroblastos *in vitro* en el modelo de monocapa de fibroblastos dérmicos humanos de la curación de heridas.

La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ es una proteína heterodimérica de la membrana plasmática con varios ligandos de proteínas de la matriz extracelular que contiene una secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp ("RGD"). Usando integrina purificada,

los presentes inventores descubrieron que la integrina $\alpha V\beta 3$ se une a T_4 , y que esta interacción es perturbada por los antagonistas de $\alpha V\beta 3$. Estudios de unión de radioligandos revelaron que la $\alpha V\beta 3$ purificada se une con alta afinidad a T_4 (CE_{50} , 371 pM), y parece unirse preferentemente a T_4 más que a T_3 . Esto coincide con informes anteriores que muestran la activación de MAPK y la translocación nuclear, así como la angiogénesis inducida por hormonas, realizadas por T_4 , en comparación con T_3 . Los antagonistas de la integrina $\alpha V\beta 3$ inhiben la unión de T_4 a la integrina y, sobre todo, evitan la activación por T_4 de la cascada de señalización de MAPK. Esta consecuencia funcional, la activación de MAPK, de la unión hormonal a la integrina, junto con la inhibición de la acción proangiogénica dependiente de MAPK de la hormona tiroidea realizada por los antagonistas de la integrina $\alpha V\beta 3$, permite describir el sitio de unión a yodotironina de la integrina como un receptor. Cabe señalar que, recientemente, Scanlan *et al.* han demostrado que la 3-yodotironamina, un derivado de la hormona tiroidea, se une a un receptor de amina minoritario (TAR I), pero curiosamente, las acciones de este análogo son antitéticas a las de T_4 y T_3 .

Los ligandos tradicionales de las integrinas son proteínas. El hecho de que una molécula pequeña, la hormona tiroidea, también sea ligando de una integrina es un hallazgo novedoso. También se desvela que el resveratrol, un polifenol con alguna actividad estrogénica, se une a la integrina $\alpha V\beta 3$ con una consecuencia celular funcional, la apoptosis, diferente de las que se producen como consecuencia de la unión de la hormona tiroidea. El sitio de la integrina al que se une T_4 está en o cerca del surco de unión RGD de la integrina heterodimérica. Es posible, sin embargo, que $\alpha V\beta 3$ se una a T_4 en otra parte de la proteína y que la ocupación del sitio de reconocimiento RGD por TETRAC o por péptidos que contienen RGD bloquee alostéricamente el sitio de unión a T_4 o provoque un cambio conformacional dentro de la integrina que desabilite el sitio de T_4 .

Por consiguiente, la modulación realizada por T_4 de la interacción entre la laminina y la integrina de los astrocitos puede ser una consecuencia de la unión de la hormona a la integrina. Por lo tanto, existe la posibilidad de que en el exterior de la célula, la hormona tiroidea pueda afectar a la unión realizada por la integrina $\alpha V\beta 3$ de proteínas de la matriz extracelular, además de la laminina.

En los últimos años, se han documentado bien las acciones de T_4 que son no genómicas en el mecanismo. Varias de estas actividades están mediadas por MAPK. Los presentes inventores han demostrado que las etapas iniciales en la activación de la cascada de MAPK por la hormona tiroidea, incluyendo la activación de la proteína quinasa C, son sensibles a GTP γ S y a la toxina pertussis, lo que indica que el receptor de la membrana plasmática de la hormona tiroidea es sensible a la proteína G. Cabe señalar que se ha demostrado que ciertas funciones celulares mediadas por la integrina $\alpha V\beta 3$ están moduladas por la proteína G. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida del dominio de unión a RGD suprime la capacidad del receptor de nucleótidos P2Y2 para activar Go, mientras que la activación de Gq, no se vio afectada. Wang *et al.* demostraron que una proteína asociada a integrinas, IAP/CD47, indujo la migración de células del músculo liso a través de la inhibición mediada por G_i de la activación de MAPK.

Además de vincular la unión de T_4 y otros análogos por la integrina $\alpha V\beta 3$ a la activación de una vía específica intracelular de transducción de señales, también se desvela que la vinculación de la hormona por la integrina es fundamental para la inducción por T_4 de la angiogénesis dependiente de MAPK. En el modelo de CAM, el importante crecimiento de los vasos se produce tras 48-72 h de tratamiento con T_4 , lo que indica que los efectos en la membrana plasmática de T_4 pueden producir complejos cambios transcripcionales. Por lo tanto, lo que se inicia como una acción no genómica de la hormona, la transducción de la señal de T_4 en la superficie celular, entra en contacto con los efectos genómicos de la hormona que culminan en la neovascularización. Ya se han descrito previamente las superficies de contacto de las acciones no genómicas y genómicas de la hormona tiroidea, por ejemplo, la fosforilación dependiente de MAPK en Ser-142 de TR β 1, que es iniciada en la superficie celular por T_4 y que produce la supresión de TR de las proteínas correpressoras y el reclutamiento de coactivadores. También se desvela que T_4 estimula el crecimiento de células gliales C-6 mediante un mecanismo dependiente de MAPK que es inhibido por el péptido RGD, y que la hormona tiroidea produce la fosforilación de la serina mediada por MAPK del receptor de estrógeno nuclear (ER α) en células MCF-7 mediante un proceso que ahora los presentes inventores saben que se puede inhibir por un péptido RGD. Todos estos hallazgos en varias líneas celulares apoyan la participación de la integrina en las respuestas funcionales de las células a la hormona tiroidea.

La identificación de $\alpha V\beta 3$ como un receptor de membrana para la hormona tiroidea indica la importancia clínica de la interacción de la integrina y la hormona, y la consecuencia corriente abajo de la angiogénesis. Por ejemplo, $\alpha V\beta 3$ se sobreexpresa en muchos tumores, y esta sobreexpresión parece desempeñar un papel en la invasión y el crecimiento tumoral. Los niveles circulantes relativamente constantes de la hormona tiroidea pueden facilitar la angiogénesis asociada a tumores. Además de demostrar la acción proangiogénica de T_4 en el modelo de CAM, aquí y en cualquier otra parte del presente documento, también se desvela que las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas también forman nuevos vasos sanguíneos cuando se exponen a la hormona tiroidea. La administración local de los antagonistas de $\alpha V\beta 3$ o TETRAC alrededor de las células tumorales podría inhibir la angiogénesis estimulada por la hormona tiroidea. Aunque TETRAC carece de muchas de las actividades biológicas de la hormona tiroidea, accede al interior de ciertas células. El anclaje de TETRAC, o antagonistas específicos de RGD, a sustratos no inmunogénicos (agarosa o polímeros) excluiría la posibilidad de que los compuestos puedan atravesar la membrana plasmática, aunque, como se muestra en el presente documento, conservan la capacidad de prevenir la angiogénesis inducida por T_4 . El complejo agarosa- T_4 usado en los presentes estudios es, por tanto, un

prototipo de una nueva familia de análogos de la hormona tiroidea que tienen efectos celulares específicos, pero que no acceden al interior de la célula.

Por consiguiente, los ejemplos del presente documento, identifican la integrina $\alpha V\beta 3$ como un receptor de superficie celular para la hormona tiroidea (L-tiroxina, T_4) y como el sitio de inicio para la activación inducida por T_4 de las cascadas de señalización intracelular. $\alpha V\beta 3$ se une disociablemente a T_4 radiomarcada con alta afinidad; la unión a radioligandos es desplazada por el ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), los anticuerpos $\alpha V\beta 3$ y por un péptido de sitio de reconocimiento RGD de la integrina. Las células CV-1 carecen de receptor de la hormona tiroidea nuclear, pero presentan $\alpha V\beta 3$ de la membrana plasmática; el tratamiento de estas células con concentraciones fisiológicas de T_4 activa la vía de MAPK, un efecto inhibido por TETRAC, péptido RGD y anticuerpos $\alpha V\beta 3$. Los inhibidores de la unión de T_4 a la integrina también bloquean la acción proangiogénica de T_4 mediada por MAPK. La fosforilación inducida por T_4 de MAPK es bloqueada por desactivaciones de ARNip de αV y $\beta 3$. Estos hallazgos indican que T_4 se une a $\alpha V\beta 3$ cerca del sitio de reconocimiento RGD y muestran que la unión de la hormona a $\alpha V\beta 3$ tiene consecuencias fisiológicas.

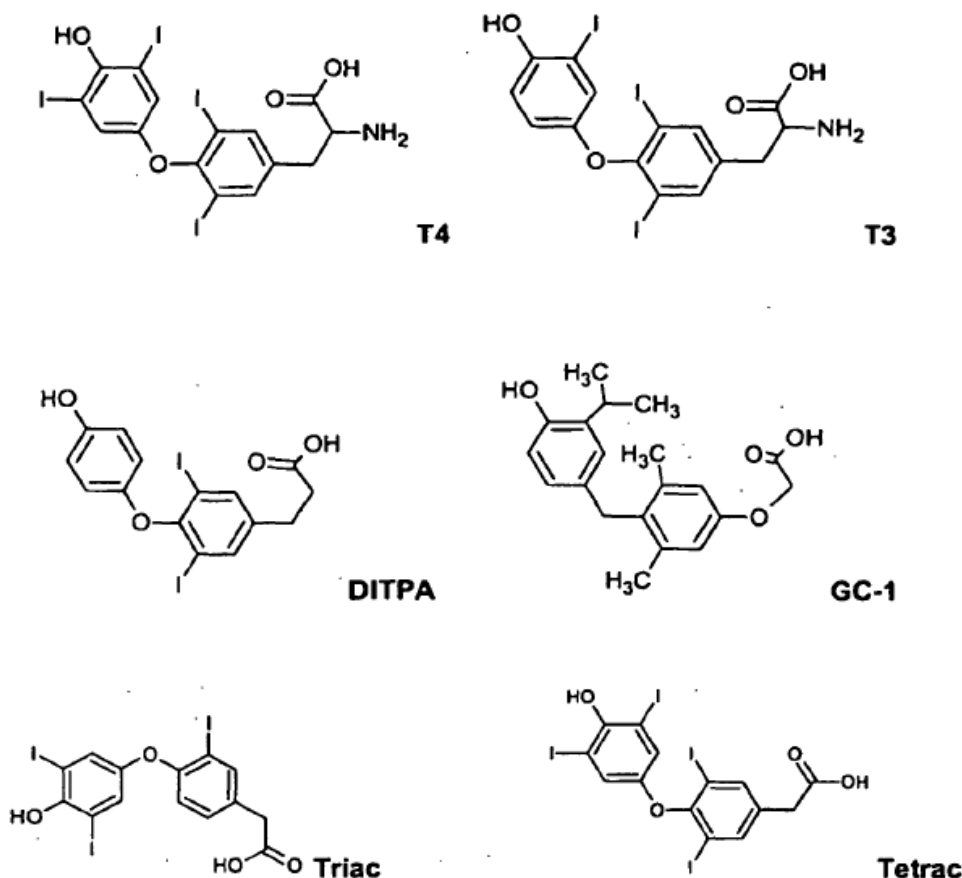
Las composiciones de la divulgación se basan, en parte, en el descubrimiento de que la hormona tiroidea, los análogos de la hormona tiroidea y sus formas poliméricas, actúan a nivel de la membrana celular y tienen propiedades proangiogénicas que son independientes de los efectos de las hormonas tiroideas nucleares. Por consiguiente, estos análogos y formas poliméricas de la hormona tiroidea (es decir, agentes angiogénicos) se pueden usar para tratar varios trastornos. Del mismo modo, la invención también se basa en el descubrimiento de que los antagonistas del análogo de la hormona tiroidea inhiben el efecto proangiogénico de dichos análogos, y también se pueden usar para tratar varios trastornos. Por lo tanto, a continuación, se describen detalladamente estas composiciones y estos métodos de uso.

Composiciones

En el presente documento, se desvelan agentes angiogénicos y antiangiogénicos que comprenden hormonas tiroideas, análogos de las mismas, conjugaciones con polímeros y nanopartículas de las hormonas y sus análogos. Las composiciones desveladas se pueden usar para potenciar la angiogénesis para el tratamiento de trastornos en los que la angiogénesis es beneficiosa. Además, la inhibición de estas hormonas tiroideas, análogos y conjugaciones con polímeros se pueden usar para inhibir la angiogénesis para el tratamiento de trastornos asociados con dicha angiogénesis no deseada. Como se usa en el presente documento, la expresión "agente angiogénico" incluye cualquier compuesto o sustancia que potencie o favorezca la angiogénesis, ya sea solo o en combinación con otra sustancia.

Los agentes proangiogénicos de la divulgación son agonistas de la hormona tiroidea e incluyen la hormona tiroidea, análogos y derivados ya sea solos, o en conjugación covalente o no covalente con polímeros. Los ejemplos incluyen T_3 , T_4 , T_3 o T_4 -agarosa, análogos poliméricos de T_3 , T_4 , ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)fenoxi-acético (GC-1) o DITPA. Los agentes antiangiogénicos de la divulgación incluyen antagonistas de la hormona tiroidea, análogos y derivados, bien solos o en conjugación covalente o no covalente con polímeros. Los ejemplos de dichos antagonistas de la hormona tiroidea antiangiogénicos incluyen TETRAC, TRIAC, XT 199 y anticuerpo monoclonal LM609.

A continuación, se muestran ejemplos representativos de agonistas, antagonistas, análogos y derivados de la hormona tiroidea, y también se muestran en la Figura 20, Tablas A-D. La Tabla A muestra T_2 , T_3 , T_4 y derivados de bromo. La Tabla B muestra modificaciones de la cadena lateral de alanilo. La Tabla C muestra grupos hidroxilo, enlaces de difeniléster y configuraciones D. La Tabla D presenta análogos de tirosina. A continuación, se ilustran las fórmulas de algunos de los compuestos representativos



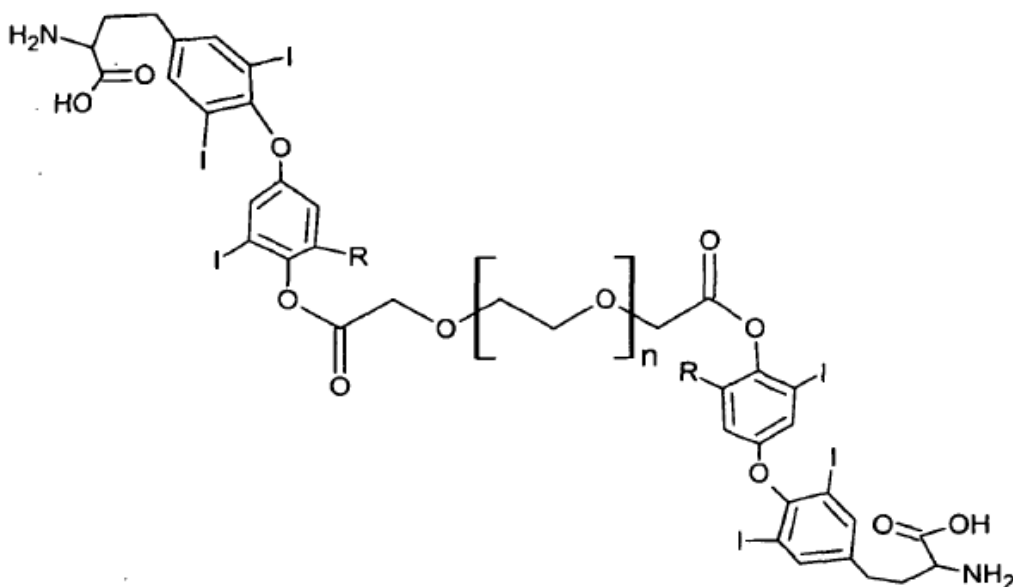
Conjugaciones con polímeros

Las conjugaciones con polímeros se usan para mejorar la viabilidad de los fármacos. Aunque hay muchos agentes terapéuticos nuevos y antiguos que son bien tolerados, muchos compuestos necesitan avanzadas tecnologías de descubrimiento de fármacos para reducir la toxicidad, aumentar el tiempo de circulación o modificar la biodistribución. Una estrategia para mejorar la viabilidad de los fármacos es la utilización de polímeros hidrosolubles. Se ha demostrado que hay varios polímeros hidrosolubles que modifican la biodistribución, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de las barreras fisiológicas y modifican la velocidad de eliminación a través del organismo. Para lograr bien un efecto dirigido o un efecto de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros hidrosolubles que contienen restos de fármaco como grupos terminales, como parte de la estructura principal, o como grupos colgantes sobre la cadena del polímero.

Las composiciones representativas de la divulgación incluyen la hormona tiroidea o los análogos de la misma conjugados con polímeros. La conjugación con polímeros se puede realizar mediante enlaces bien covalentes o no covalentes. En realizaciones preferidas, la conjugación con polímeros se puede producir a través de un enlace de éster o un enlace de anhídrido. En la Figura 17, se muestra un ejemplo de una conjugación polimérica a través de un enlace de éster usando alcohol polivinílico. En esta preparación, el alcohol polivinílico disponible en el mercado (o copolímeros relacionados) se puede esterificar mediante el tratamiento con el cloruro de ácido de análogos de la hormona tiroidea, incluyendo la forma de cloruro de ácido. La sal de clorhidrato se neutraliza mediante la adición de trietilamina, proporcionando clorhidrato de trietilamina que se puede lavar con agua tras la precipitación de la forma polimérica de éster de la hormona tiroidea para diferentes análogos. El enlace de éster con el polímero puede someterse a hidrólisis *in vivo* para liberar el análogo de la hormona tiroidea proangiogénico activo.

En la Figura 18, se muestra un ejemplo de una conjugación con polímero a través de un enlace de anhídrido usando copolímero de ácido acrílico y etileno. Esta es similar a la anterior conjugación covalente con polímero, sin embargo, esta vez es a través de un enlace de anhídrido que se obtiene de la reacción de un copolímero de ácido acrílico. Este enlace de anhídrido también es susceptible a la hidrólisis *in vivo* para liberar análogo de la hormona tiroidea. La neutralización del ácido clorhídrico se realiza mediante el tratamiento con trietilamina, y el posterior lavado del polímero de polianhídrido precipitado con agua elimina el subproducto de clorhidrato de trietilamina. Esta reacción conducirá a la formación de copolímero de ácido acrílico y análogo de la hormona tiroidea + trietilamina. Tras la hidrólisis *in vivo*, el análogo de la hormona tiroidea será liberado a lo largo del tiempo, pudiéndose controlar con más copolímero de ácido acrílico y etileno.

- Otra conjugación con polímero representativa incluye la hormona tiroidea o sus análogos conjugados con polietilenglicol (PEG). La unión de PEG a varios fármacos, proteínas y liposomas ha demostrado mejorar el tiempo de residencia y reducir la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de las cadenas y a través de otros métodos químicos. El propio PEG, sin embargo, se limita a dos agentes activos por molécula. En una metodología diferente, se examinaron copolímeros de PEG y aminoácidos como nuevos biomateriales que podrían conservar las propiedades de biocompatibilidad del PEG, pero que tendrían la ventaja adicional de numerosos puntos de unión por molécula y que se podrían diseñar sintéticamente para adaptarse a varias aplicaciones.
- 5
- 10 Hay varios grupos laterales de origen sintético, natural y biopolimérico con polímeros de estructura principal biodegradables eficaces que se pueden conjugar con análogos de la hormona tiroidea. Para la conjugación, se dispone de polialquilglicoles, poliésteres, polianhídridos, polisacáridos y poliaminoácidos. A continuación, se presentan ejemplos representativos de análogos de la hormona tiroidea conjugados.
- 15 Estructuras de conjugados poliméricos de cadena polimérica natural, sintética y de polipéptido

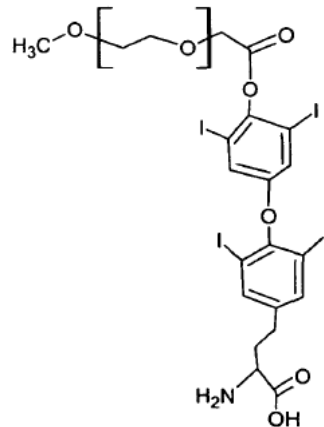


n = longitud de la cadena

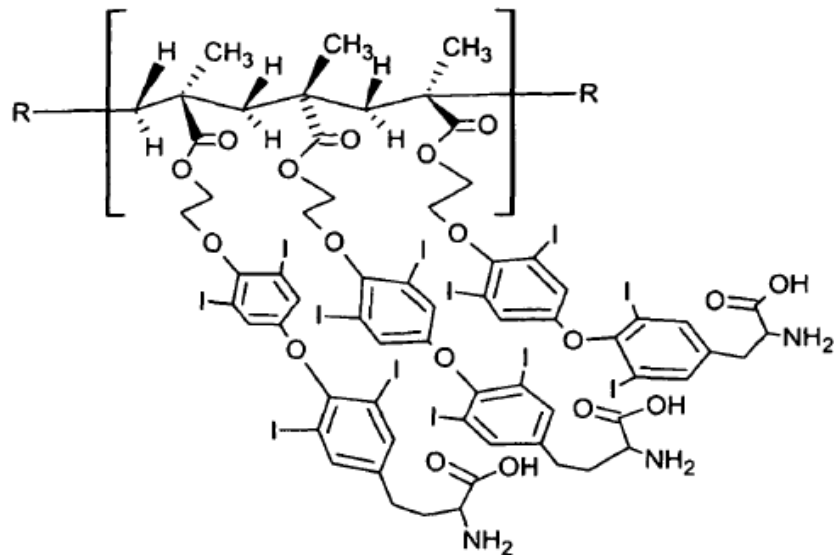
R = H, T₃ ligada a PEG bifuncional

20 R = I, T₄ ligada a PEG bifuncional

Sistemas de administración de conjugación de compuestos tiroideos a base de PEG y polímeros

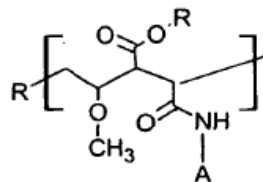


Conjugado polimérico de producto tiroideo de T₄ ligada a metoxi-PEG



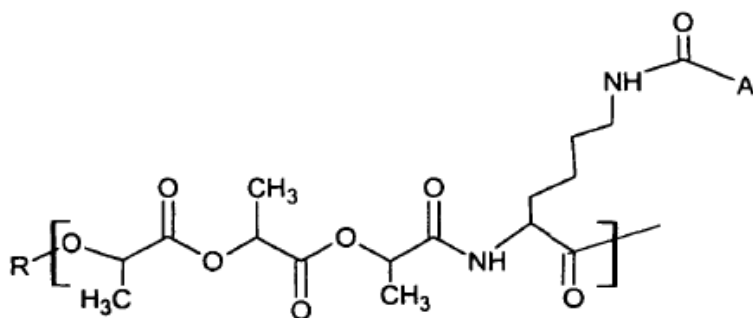
5

R = unidad de repetición de la cadena de HEMA
Conjugado de T₄ ligada a poli-(HEMA)



10

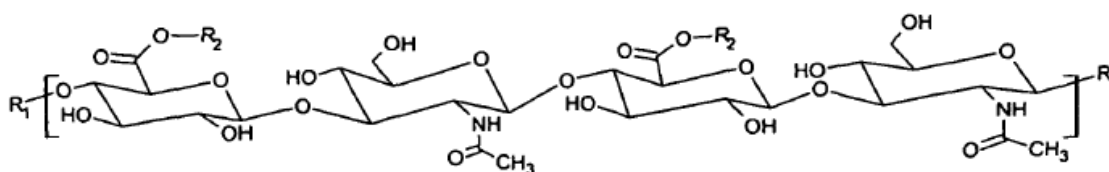
Conjugado inmovilizado de poli-(vinil-co-anhídrido maleico)
A = constituyente tiroideo (conjugado a través del extremo amina)



R = unidad de repetición de cadena

A = constituyente tiroideo (conjugado a través del extremo carboxi)

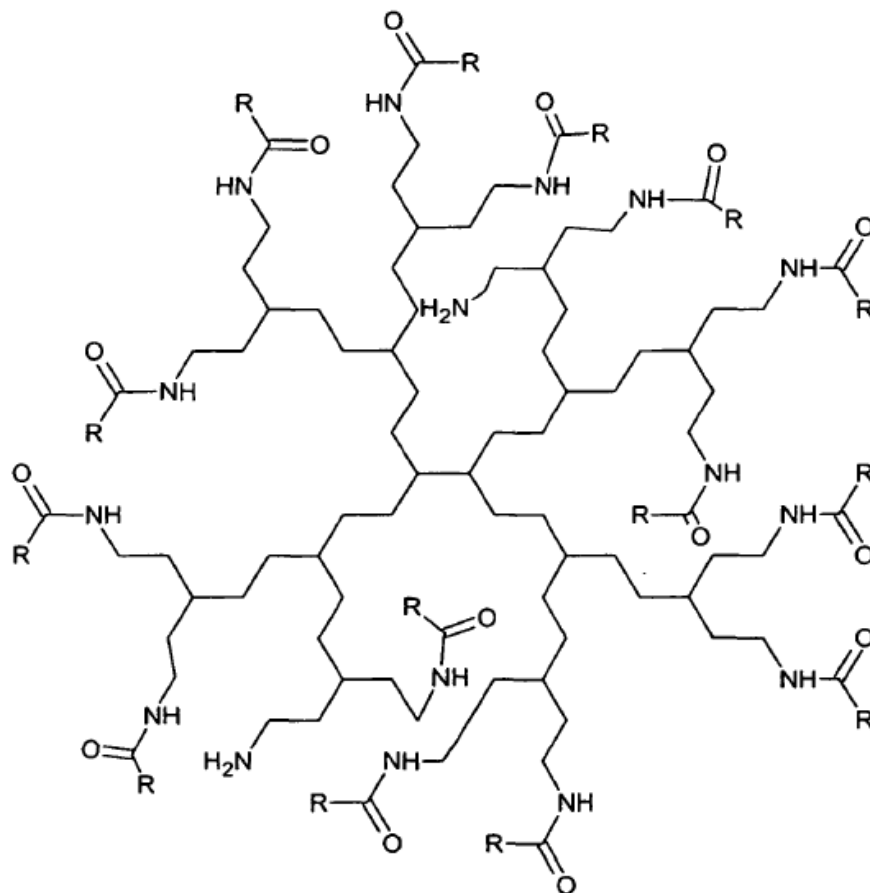
5 Conjugado inmovilizado de poli-(láctido-co-lisina)



R1 = monómeros de cadena de sacárido

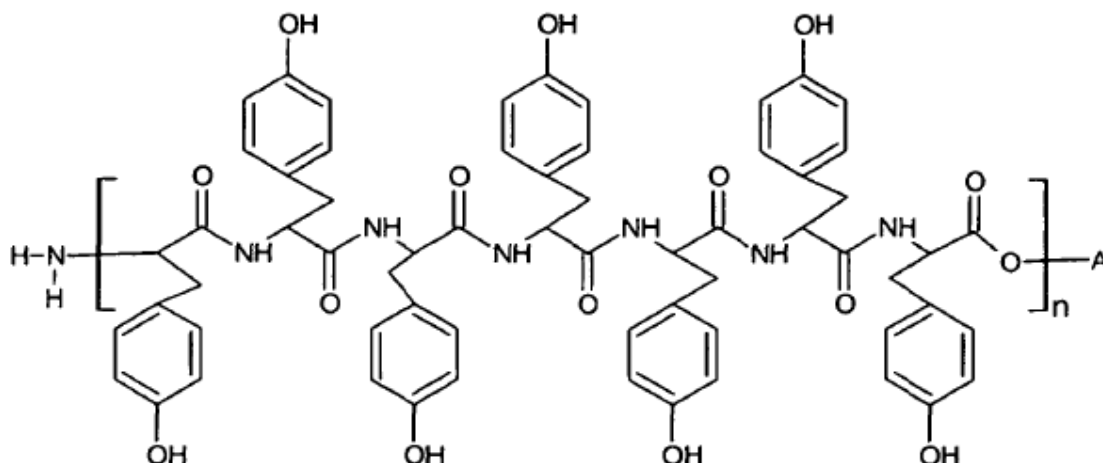
R2 = constituyentes tiroideos

10 Conjugados unidos a ácido hialurónico



R = constituyentes tiroideos

Constituyentes tiroideos inmovilizados T₃/T₄/DITPA/GC-1 en poliamidoamina multifuncional



A = constituyente tiroideo seleccionado conjugado
Conjugado polipeptídico tiroideo movilizado

Se han diseñado polímeros biodegradables y biocompatibles como vehículos probables de larga duración y vehículos de administración de corta duración que incluyen conjugados poliméricos no hidrolizables. Los PEG y PEO son los polímeros con extremo hidroxilo más comunes con una amplia selección de pesos moleculares para elegir a efectos de solubilidad (modo de transporte fácil), tiempos de degradación y facilidad de conjugación. También se emplearán los metoxi-PEG protegidos de un extremo como vehículo de cadena lineal capaz de hincharse y reducir así las posibilidades de obtener la proteína unida o pegada durante el transporte subcelular. Ciertos copolímeros de etileno y acetato de vinilo, es decir, EVAc, que tienen una biocompatibilidad excepcionalmente buena, baja cristalinidad y naturaleza hidrófoba son candidatos ideales como vehículos de administración de fármacos mediados por la encapsulación.

Se crearán polímeros con una alta semivida demostrada y propiedades de retención en sistema a efectos de conjugación. Entre los polímeros biodegradables más comunes y recomendados, se usarán los de ácido láctico y ácido glicólico. Los copolímeros de L-láctido y L-lisina son útiles debido a su disponibilidad de grupos funcionales de amina para la formación de enlaces de amida, y esto sirve como sitio de unión covalente de mayor duración del vehículo y el compuesto tiroideo transportable unidos entre sí a través del resto carboxilo en todo los constituyentes tiroideos.

Los polisacáridos de origen natural procedentes de la celulosa, quitina, dextrano, Ficoll, pectina, carragenina (todos los subtipos) y alginato, y algunos de sus derivados semisintéticos, son vehículos ideales debido a su alta biocompatibilidad, a que son productos de degradación conocidos por los sistemas biológicos (monosacárido de glucosa y fructosa), naturaleza hidrófila, solubilidad y inmovilización/interacción de proteínas para la estabilidad a largo plazo de la matriz polimérica. Esto proporciona una cubierta para la protección adicional de la matriz polimérica de la degradación a lo largo del tiempo y amplía la semivida eficaz del conjugado.

La proteína y el polipéptido de albúmina sérica, colágeno, gelatina y poli-L-lisina, poli-L-alanina, poli-L-serina son vehículos de fármacos a base de aminoácidos naturales con la ventaja de la biodegradación, biocompatibilidad y tiempos de liberación moderados de la molécula transportadora. La poli-L-serina es de mayor interés debido a sus diferentes derivados de cadena, por ejemplo, éster de poliserina, imina de poliserina y estructura polimérica convencional de poliserina con sitios disponibles para la conjugación covalente específica.

Los hidrogeles sintéticos de polímeros derivados de metacrilato se han usado con frecuencia en aplicaciones biomédicas debido a su similitud con los tejidos vivos. Los hidrogeles sintéticos más usados son polímeros de ácido acrílico, acrilamida y metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). Los poli-HEMA son de bajo coste, biocompatibles, con funcionalidad de alargamiento de la cadena lateral de alcohol primario disponible para la conjugación y aptos para aplicaciones oculares, intraoculares y otras aplicaciones oftálmicas que los convierten en materiales perfectos para la administración de fármacos. Los pHEMA son inmunes a la unión celular y proporcionan una motilidad celular nula que les convierte en candidatos ideales para el sistema de administración interna.

Se ha realizado un programa de diseño de librerías de conjugación de DITPA y análogos tiroideos sintéticos con el desarrollo de productos conjugados con DITPA en bruto. El acoplamiento de polímeros hidrófilos de PVA y PEG también puede estar mediado por dicitlohexil-carbodiimida y por otros reactivos de acoplamiento de naturaleza hidrófila e hidrófoba. A continuación, se presenta una lista de conjugados poliméricos que pertenecen al alcance de la presente invención (Tabla 9).

Tabla 9: Librería de conjugados poliméricos diseñados para la posible preparación a base de reactividades de clase química y datos de estabilidad

Nº de serie	Polímero	Propiedades (H: hidrolizable, NH: no hidrolizable, LR: liberación retardada)
1	PEO	H
2	m-PEG	H
3	PVA	Hidrófilo, H
4	PLLA	Hidrófilo, H
5	PGA	Hidrófilo, H
6	Poli-L-lisina	NH
7	Albúmina de suero humana	Proteína, NH
8	Derivado de celulosa (Carbometoxi/etilo/hidroxipropilo)	Polisacárido, LR
9	Ácido hialurónico	Polisacárido, LR
10	Ciclodextrina/Dextrano ligado a folato	LR
11	Polímero espaciado de sarcosina/aminoácidos	LR
12	Alginato/Carragenina	Polisacárido, LR
13	Pectina/quitosano	Polisacárido, LR
14	Dextrano	Polisacárido, LR
15	Colágeno	Proteína, NH
16	Poliamina	Amínica, NH
17	Polianilina	Amínica, NH
18	Polialanina	Peptídica, LR
19	Politriptófano	Peptídico, NH/LR
20	Politirosina	Peptídica, NH/LR

Otra conjugación con polímero representativa incluye la hormona tiroidea o sus análogos en conjugación no covalente con polímeros. Esto se muestra detalladamente en la Figura 19. Una conjugación no covalente preferida es el atrapamiento de la hormona tiroidea o de los análogos de la misma en un polímero de ácido poliláctico. Los polímeros de poliéster y ácido poliláctico (PLA) se someten a hidrólisis *in vivo*, produciendo el monómero de ácido láctico, y este se ha aprovechado como vehículo para los sistemas de administración de fármacos en seres humanos. A diferencia de los dos métodos covalentes anteriores, donde el análogo de la hormona tiroidea se une mediante un enlace químico con el polímero, este sería un método no covalente que encapsularía el análogo de la hormona tiroidea en perlas de polímero de PLA. Esta reacción conducirá a la formación de perlas de PLA que contienen análogo de la hormona tiroidea en agua. La filtración y el lavado darán lugar a la formación de perlas de PLA que contienen análogo de la hormona tiroidea que, tras la hidrólisis *in vivo*, darán lugar a la generación de niveles controlados de hormona tiroidea más ácido láctico.

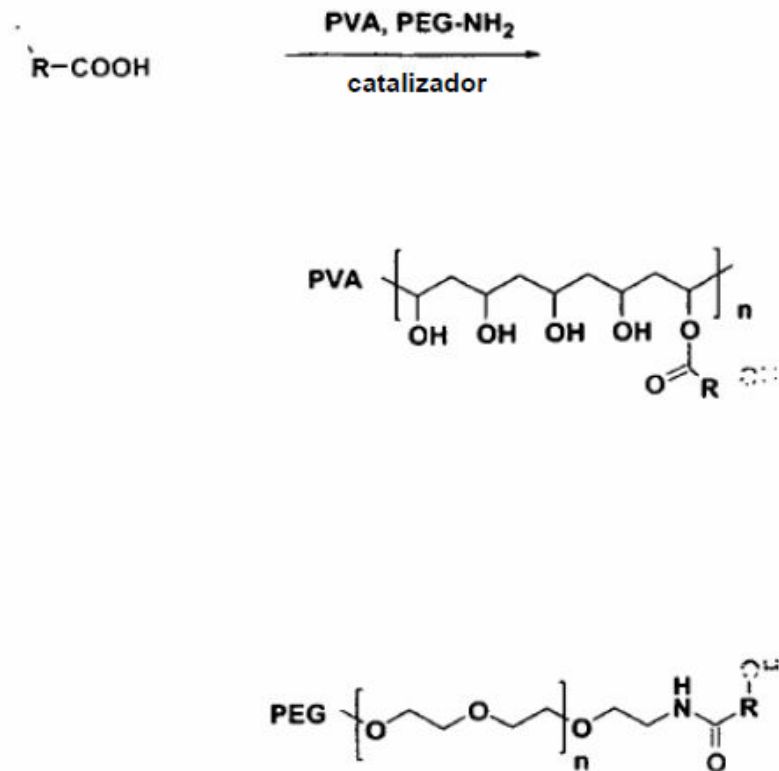
A. Síntesis de conjugados poliméricos de agonista o antagonista de los TR y nanopartículas

Hay dos grupos funcionales en las moléculas agonistas o antagonistas de los TR: un grupo de ácido carboxílico y un grupo hidroxilo. Para sintetizar los conjugados de agonista o antagonista de TR/polímero, el sitio de reacción puede ser cualquiera de los dos. Los posibles agonistas y antagonistas del alcance de la divulgación se muestran en las siguientes tablas. A continuación, se describen dos posibles rutas de síntesis:

- 1) Con el grupo de ácido carboxílico situado en la posición α , β o γ con respecto al anillo de fenilo interior. El grupo ácido se puede activar, y después hacerse reaccionar con los grupos hidroxilo y amino para formar éster y amida. Los polímeros candidatos incluyen PVA, PEG-NH₂, poli(lisina) y polímeros relacionados. La ruta de síntesis esquemática se muestra en el Esquema 1A.

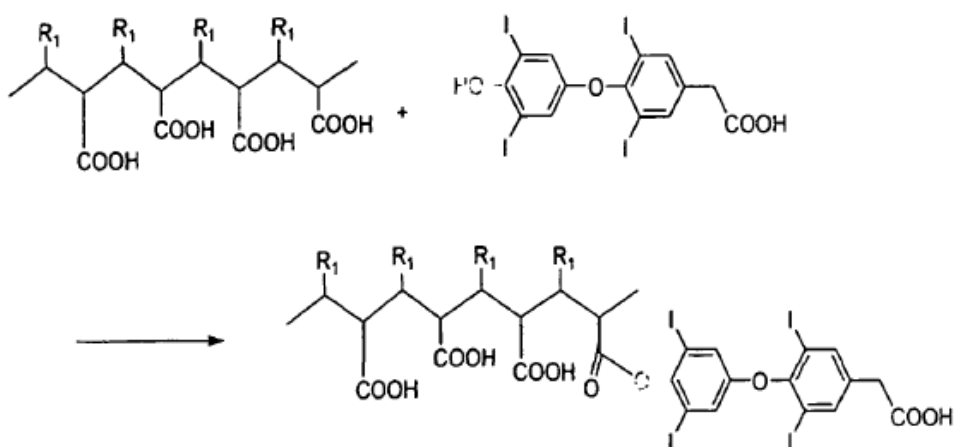
2) El grupo hidroxilo situado en el fenilo exterior se muestra en el Esquema 2A.

Esquema 1A: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de agonista o antagonista de los TR/polímero a través del grupo de ácido carboxílico



Catalizador: CDI (1,1'-carbonildiimidazol)
DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida)

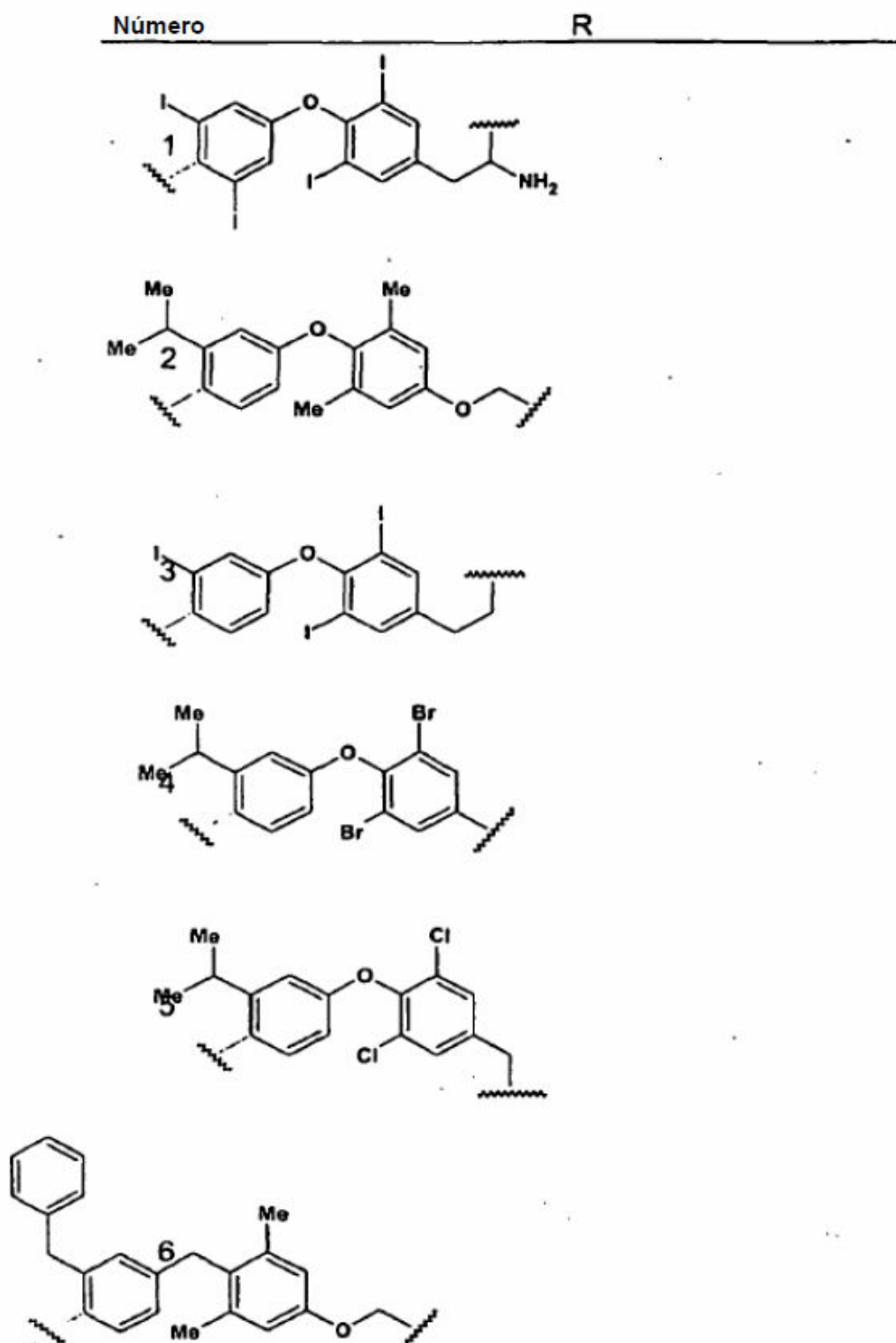
Esquema 2A: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de agonista o antagonista de los TR/polímero a través del grupo hidroxilo



$R_1 = H$ poli(ácido acrílico)
 $R_1 = Me$ poli(ácido metacrílico)

Catalizador: CDI (1,1'-carbonildiimidazol)
DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida)

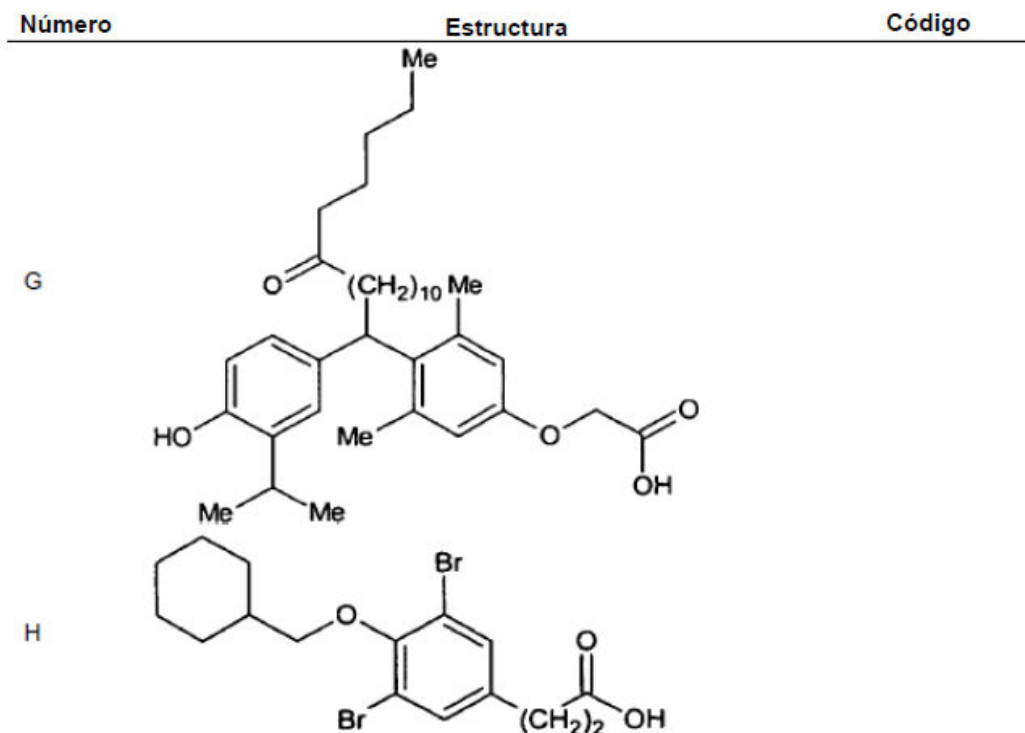
Los agonistas tiroideos representativos (proangiogénicos) del alcance de la divulgación incluyen T₃, T₄, DITPA, GC-1, y análogos y derivados de los mismos. A continuación, se muestran realizaciones ilustrativas.



5

A continuación, se muestran antagonistas tiroideos representativos (antiangiogénicos) englobados por la divulgación.

Número	Estructura	Código
A		Tetrac
B		DIBRT
C		NH-3
D		
E		1-850
F		



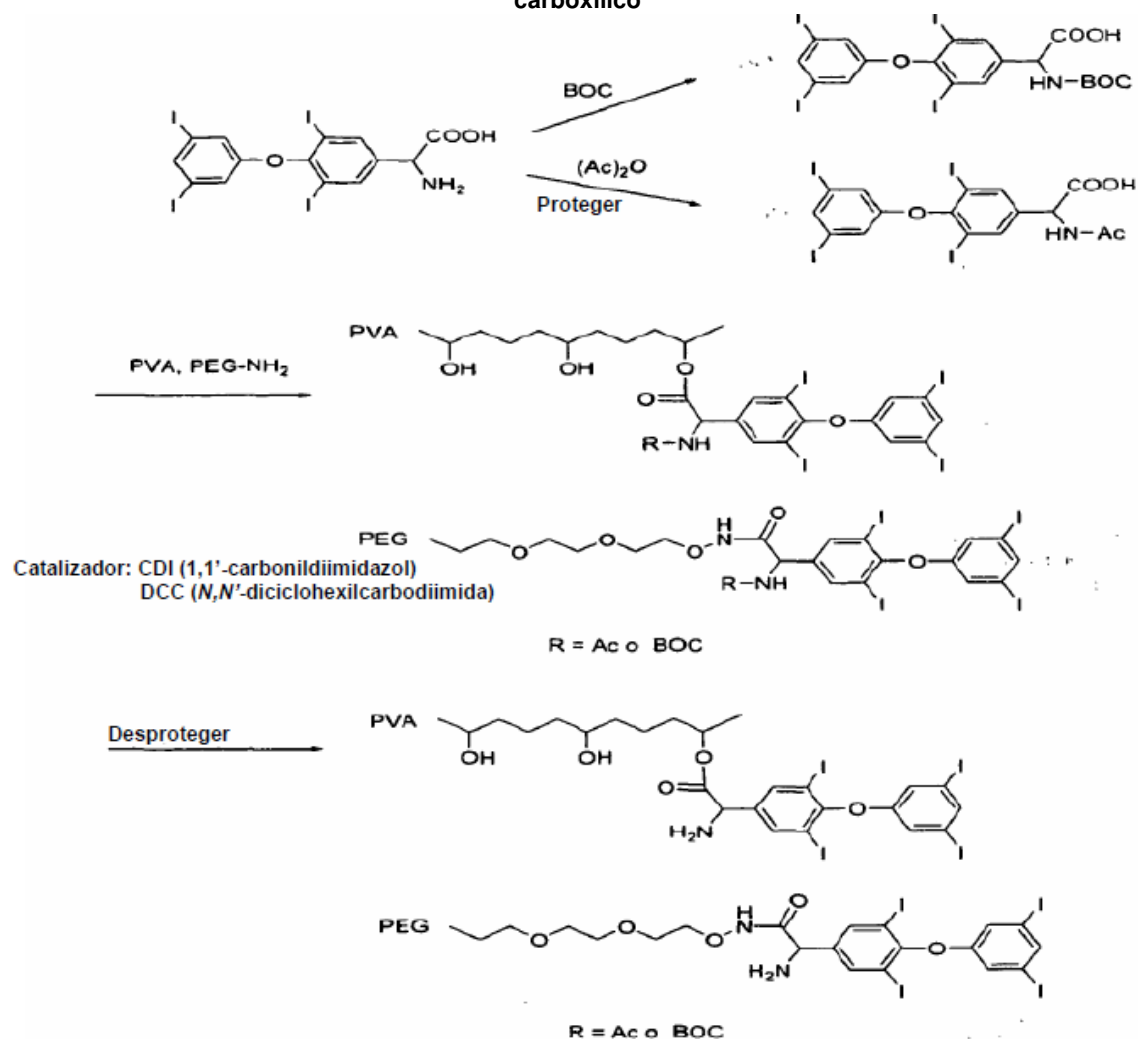
B. Síntesis de conjugados poliméricos de T₄ y nanopartículas de los mismos

5 Hay tres grupos funcionales en moléculas de T₄: un grupo de ácido carboxílico, un grupo amino y un grupo hidroxilo.

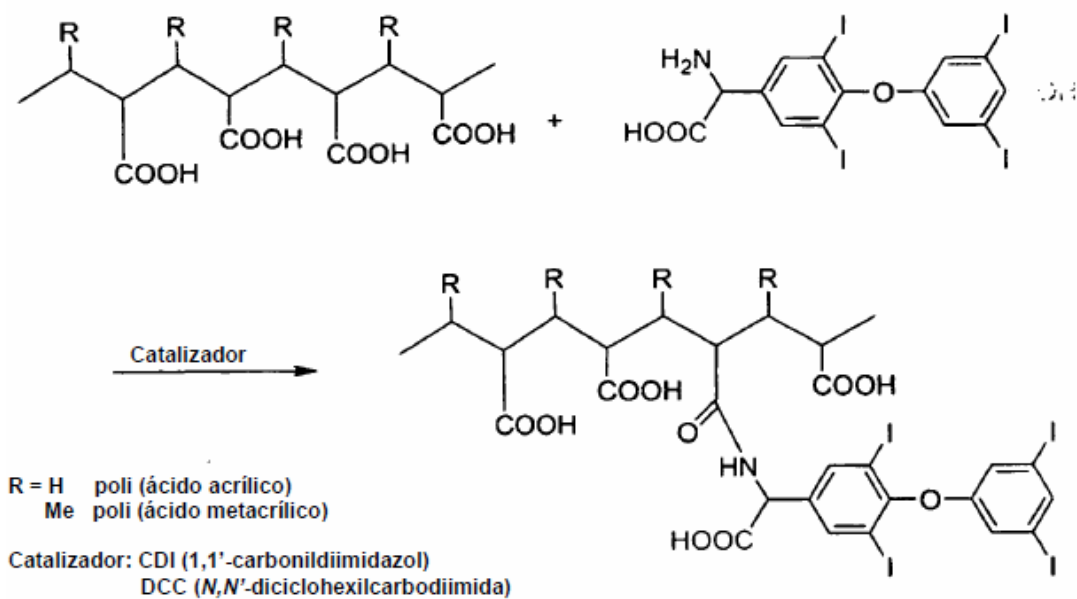
Para sintetizar los conjugados de T₄/polímero, el sitio de reacción puede ser uno cualquiera de los tres.

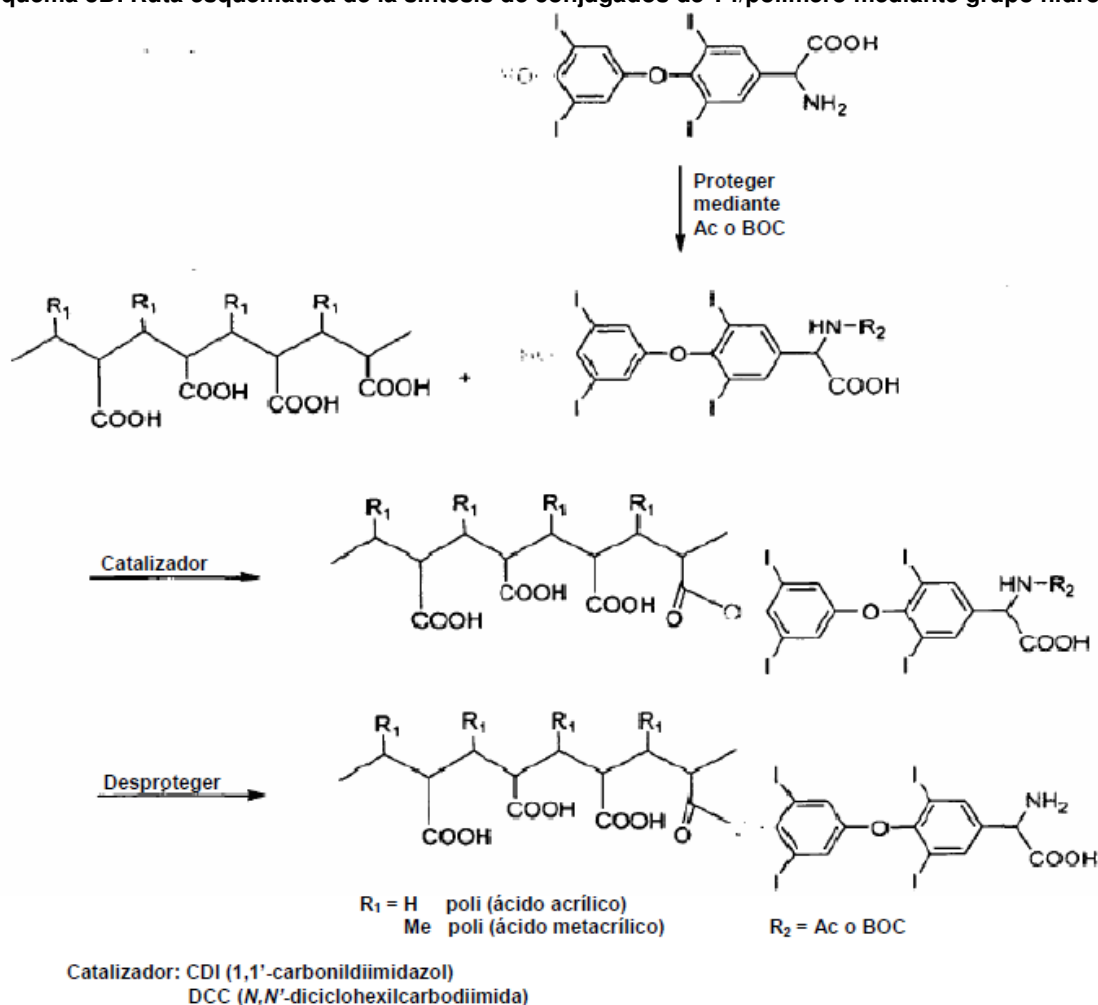
- 10 1) Con el grupo de ácido carboxílico. Se puede activar el grupo ácido y hacerlo reaccionar con el grupo hidroxilo y amino para formar éster y amida. Debido a la alta reactividad del grupo amino en T₄, se debe proteger el grupo amino antes de la reacción de conjugación, y después realizarse la reacción de desprotección. De lo contrario, la autopolimerización formará los oligómeros T₄. Los polímeros candidatos incluyen PVA, PEG-NH₂, poli(lisina) y polímeros relacionados. La ruta de síntesis esquemática se muestra en el Esquema 1B.
- 15 2) Con el grupo amino. El grupo amino puede reaccionar con el polímero con ácido carboxílico activado o con el grupo halógeno. Si el polímero tiene una gran cantidad de exceso de grupo ácido activado, la reacción se puede producir directamente. De este modo, se pueden usar poli(ácido metacrílico) y poli(ácido acrílico). El esquema se muestra en el Esquema 2B.
- 20 3) Con el grupo hidroxilo. Debido a la existencia de un grupo amino reactivo superior, es difícil la reacción directa de T₄ con un polímero con ácido carboxílico. Este grupo amino se debe proteger antes de la reacción y desproteger después de la reacción de conjugación. El grupo protegido común puede ser grupo acetato (Ac) o BOC. El esquema se muestra en el Esquema 3B.

Esquema 1B: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de T4/polímero mediante grupo de ácido carboxílico



5 Esquema 2B: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de T4/polímero mediante grupo amino



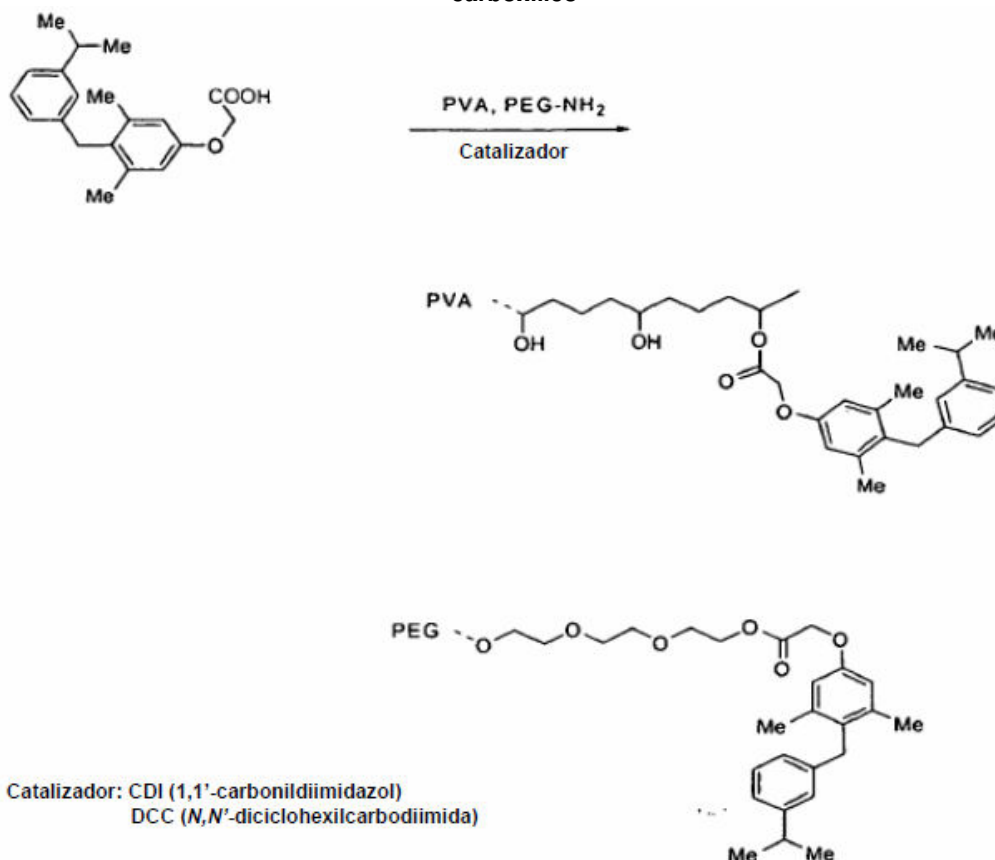
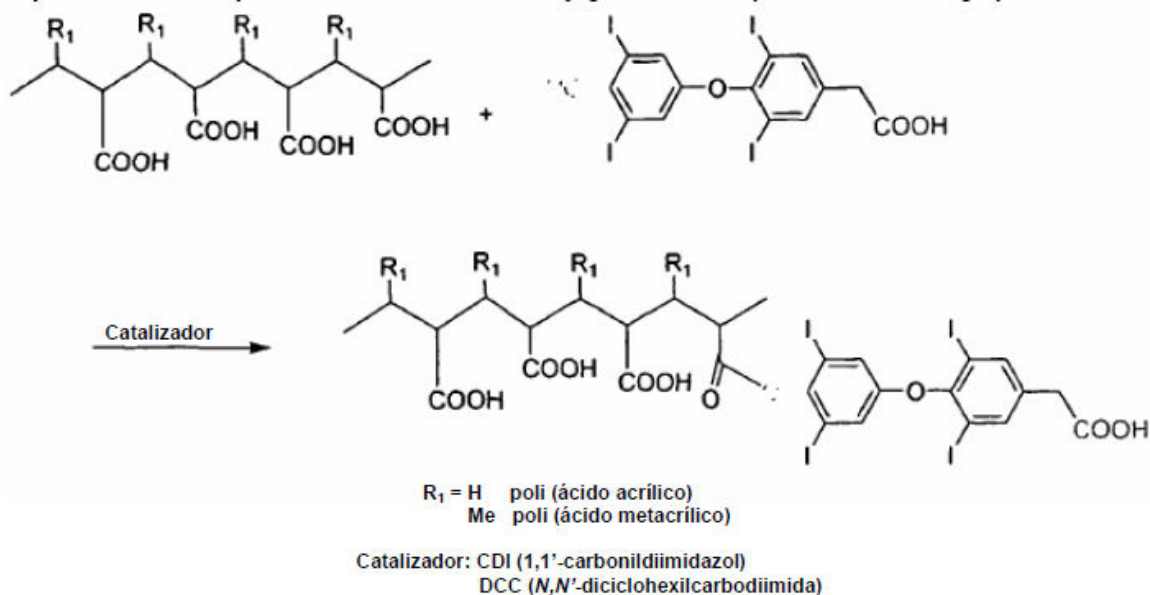
Esquema 3B: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de T4/polímero mediante grupo hidroxilo

Se contempla la posibilidad de usar los conjugados de polímeros y T₄, los nanopolímeros y las nanopartículas descritos en el presente documento en varias indicaciones, incluyendo aneurisma, cirugía (incluyendo cirugía dental, vascular o general), ataque al corazón (por ejemplo, infarto agudo de miocardio) para su administración usando dispositivos tales como un desfibrilador y otros medios, aplicaciones tópicas tales como pomadas, crema, pulverizado o láminas (tales como para aplicaciones cutáneas) o su inmovilización sobre una endoprótesis vascular u otro dispositivo médico y su implantación en el sitio tisular para la administración local sostenida en pacientes con infarto de miocardio, apoplejía o enfermedad de las arterias periféricas para lograr la formación de arterias colaterales durante un período prolongado de tiempo que varía de semanas a meses.

C. Síntesis de conjugados poliméricos de GC-1 y nanopartículas de los mismos

Hay dos grupos funcionales en las moléculas de GC-1: un grupo de ácido carboxílico y un grupo hidroxilo. Para sintetizar los conjugados de GC-1/polímero, el sitio de reacción puede ser uno cualquiera de los dos.

- 1) Con el grupo de ácido carboxílico. Se puede activar el grupo ácido y hacerlo reaccionar con el grupo hidroxilo y amino para formar éster y amida. Los polímeros candidatos incluyen PVA, PEG-NH₂, poli(lisina), poli(arginina) y polímeros relacionados. La ruta de síntesis esquemática se muestra en el Esquema 1C.
- 2) Con el grupo hidroxilo. El esquema se muestra en el Esquema 2C.

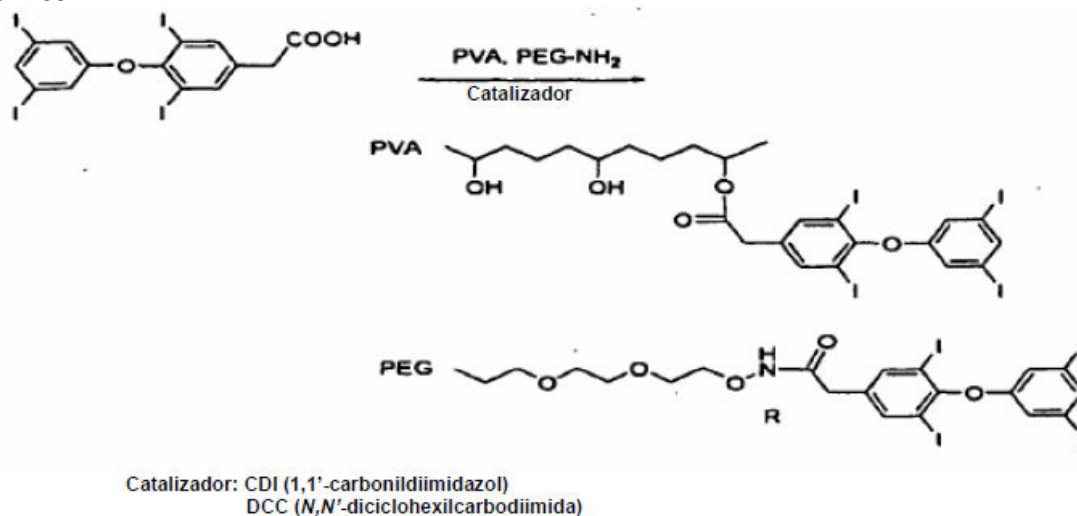
Esquema 1C: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de GC-1/polímero mediante grupo de ácido carboxílico**Esquema 2C: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de GC-1/polímero mediante grupo hidroxilo****D. Síntesis de conjugados poliméricos de TETRAC y nanopartículas de los mismos**

Hay dos grupos funcionales en las moléculas de TETRAC: un grupo de ácido carboxílico y un grupo hidroxilo. Para sintetizar los conjugados de TETRAC/polímero, el sitio de reacción puede ser uno cualquiera de los tres.

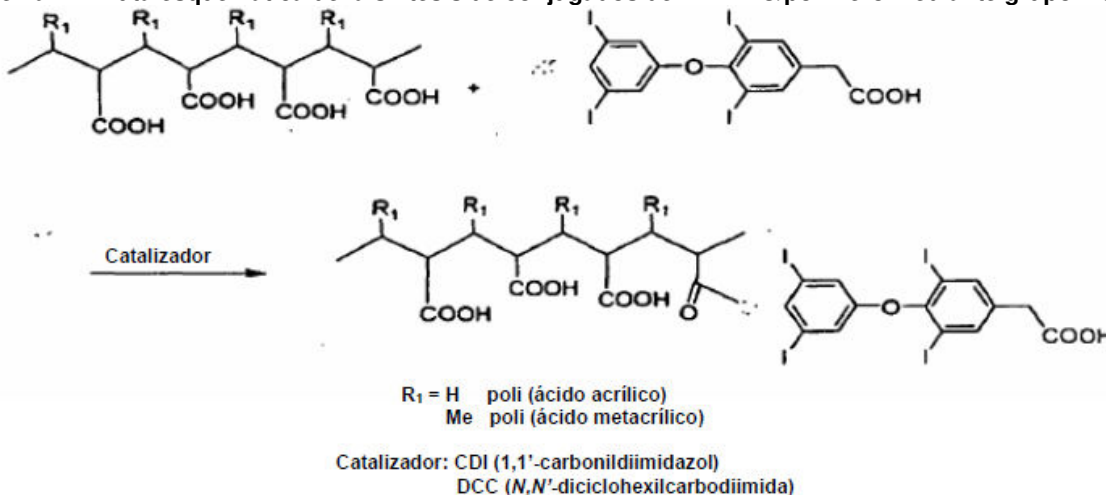
1) Con el grupo de ácido carboxílico. Se puede activar el grupo ácido y hacerlo reaccionar con el grupo hidroxilo y amino para formar éster y amida. Los polímeros candidatos incluyen PVA, PEG- NH_2 , poli(lisina) y polímeros relacionados. La ruta de síntesis esquemática se muestra en el Esquema 1D.

2) El esquema con el grupo hidroxilo se muestra en el Esquema 2D.

Esquema 1D: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de TETRAC/polímero mediante grupo de ácido carboxílico

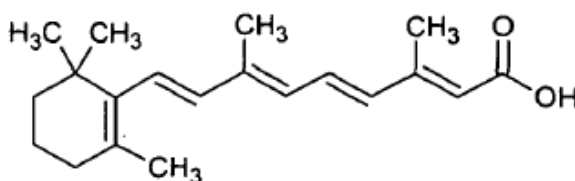


Esquema 2D: Ruta esquemática de la síntesis de conjugados de TETRAC/polímero mediante grupo hidroxilo

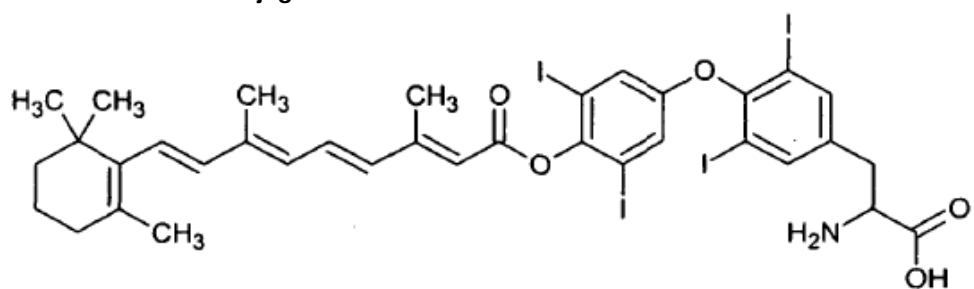


Además, las composiciones de la divulgación incluyen análogos de la hormona tiroidea conjugados con retinoles (por ejemplo, ácido retinoico (es decir, vitamina A), que se unen a la proteína de unión a la hormona tiroidea transtiretina ("TTR") y la proteína de unión retinoica ("RBP"). Los análogos de la hormona tiroidea también se pueden conjugar con estilbesteros halogenados, solos o en combinación con ácido retinoico, para su uso en la detección y supresión de la placa amiloide. Estos análogos combinan las propiedades ventajosas de T₄-TTR, a saber, su rápida captación y retención prolongada en el cerebro y los amiloides, con las propiedades de sustituyentes de halógeno, incluyendo ciertos isótopos de halógeno útiles para la formación de imágenes por PET, incluyendo flúor-18, yodo-123, yodo-124, yodo-131, bromo-75, bromo-76, bromo-77 y bromo-82. A continuación, se presentan ejemplos representativos de análogos de la hormona tiroidea conjugados con retinoles y estilbestros halogenados.

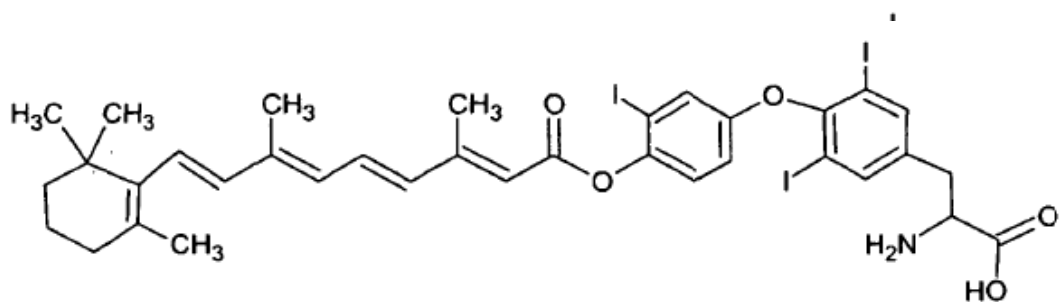
E. Análogos de ácido retinoico



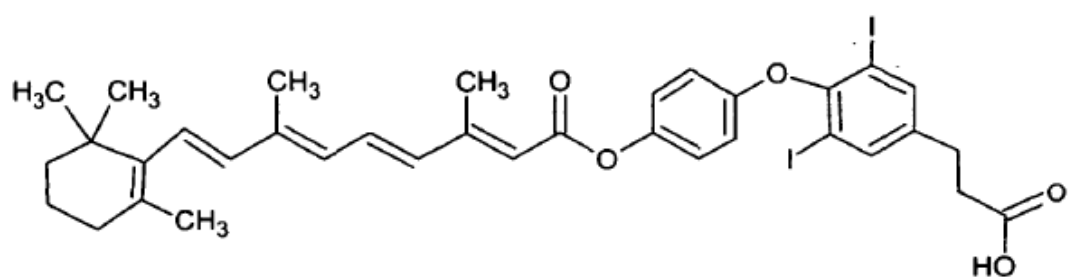
Análogo de la hormona tiroidea conjugado con ácido retinoico



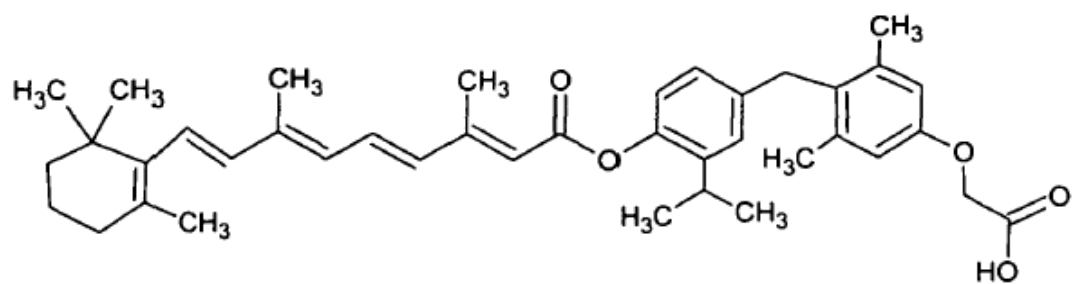
T₄-Ácido retinoico



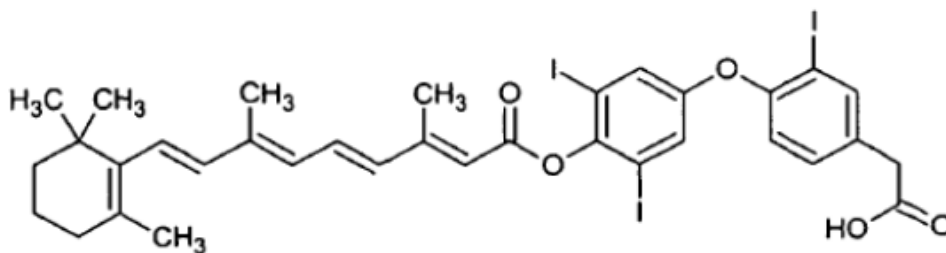
T₃-Ácido retinoico



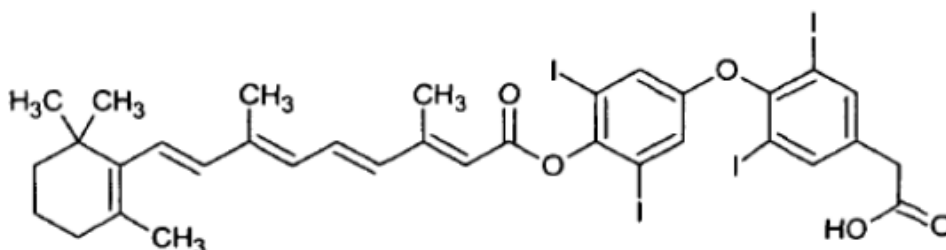
DITPA-Ácido retinoico



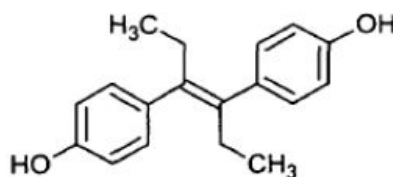
GC-1-Ácido retinoico



TRIAC-Ácido retinoico

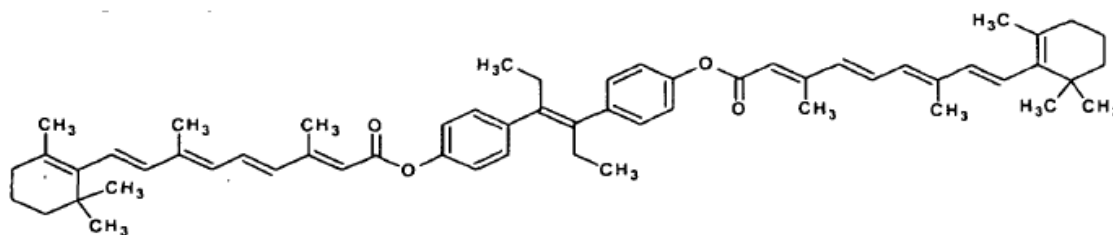


TETRAC-Ácido retinoico

Análogos de estilbestrol halogenados

Dietilestilbestrol

5

Análogos de T4, estilbesteroles halogenados y ácido retinoico

Ácido retinoico-dietilestilbestrol-ácido retinoico

10 Nanopartículas

Además, se puede usar la nanotecnología para la creación de materiales útiles y estructuras de tamaño a escala nanométrica. Un inconveniente de las sustancias biológicamente activas es la fragilidad. Los materiales nanométricos se pueden combinar con dichas sustancias biológicamente activas para mejorar espectacularmente la durabilidad de la sustancia, crear altas concentraciones localizadas de la sustancia y reducir los costes al minimizar las pérdidas. Por lo tanto, las conjugaciones poliméricas adicionales incluyen formulaciones de nanopartículas de hormonas tiroideas y análogos de las mismas. En dicha realización, se pueden usar nanopolímeros y nanopartículas como una matriz para la administración local de la hormona tiroidea y sus análogos. Esto ayudará en la administración controlada en el tiempo a la diana celular y tisular.

La divulgación proporciona formulaciones nanoparticuladas de análogos de la hormona tiroidea que contienen compuestos hidrófobos antioxidantes, antiinflamatorios y antiangiogénicos. La presente invención también proporciona una formulación oftálmica de liberación sostenida y largo tiempo de residencia, de modo que se puede

controlar la liberación del fármaco atrapado y el proceso de preparación de la misma.

En el alcance de la divulgación están los análogos de la hormona tiroidea nanoparticulados (T_4 , T_3 , GC-1, DITPA y TETRAC) que no pueden acceder al interior de la célula y cuyas actividades, por tanto, se deben limitar al receptor de la integrina. Los análogos de la hormona tiroidea nanoparticulados son derivados de ácido poliláctico-glicólico (PLGA), o bien ésteres o las formulaciones unidas a éter más estables. Agarosa- T_4 es un modelo de forma nanoparticulada que los presentes inventores han demostrado que es completamente activa en el receptor de la integrina. Los análogos hormonales reformulados no expresarán acciones intracelulares de la hormona y, por tanto, si se absorben en la circulación, no tendrán las acciones sistémicas de los análogos de la hormona tiroidea.

Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a partículas de entre aproximadamente 1 nm y menos de 1.000 nm de diámetro. En realizaciones adecuadas, el diámetro de las nanopartículas de la presente invención será inferior a 500 nm de diámetro, y más adecuadamente inferior a aproximadamente 250 nm de diámetro. En algunas de dichas realizaciones, las nanopartículas de la presente invención serán de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 200 nm, de entre aproximadamente 30 nm y aproximadamente 100 nm o de entre aproximadamente 40 nm y aproximadamente 80 nm de diámetro. Como se usa en el presente documento, cuando se refiere a cualquier valor numérico, "aproximadamente" significa un valor de $\pm 10\%$ del valor indicado (por ejemplo, "aproximadamente 100 nm" engloba un intervalo de diámetros de 90 nm a 110 nm, ambos inclusive).

De acuerdo con la divulgación, se proporciona un conjugado nanoparticulado que comprende una nanopartícula conjugada con una pluralidad de análogos de la hormona tiroidea o conjugados poliméricos. Los análogos de la hormona tiroidea que pueden ser la base de las nanopartículas incluyen T_3 , T_4 , DITPA, GC-1 y TETRAC. Las realizaciones adicionales de la divulgación incluyen cualquier molécula terapéutica elaborada en una nanopartícula mediante la unión de PLGA al compuesto terapéutico a través del enlace de éter o sulfhidrilo. Los ejemplos de compuestos terapéuticos adecuados incluyen resveratrol, estrógeno, andrógeno y progesterona.

Los análogos de la hormona nanoparticulados son derivados de ácido poliláctico-glicólico (PLGA), bien ésteres o las formulaciones unidas a éter más estables. Un elemento clave en la formación de nanopartículas es el puente de unión entre la hormona tiroidea u otra molécula terapéutica y las nanopartículas. El análogo de la hormona tiroidea u otro compuesto terapéutico se conjuga a la nanopartícula por medio de un enlace de éter (-O-) o un enlace de sulfhidrilo (azufre (-S-)) a través del resto de alcohol del análogo de la hormona tiroidea u otra molécula terapéutica. Las conjugaciones a través del resto de alcohol tienen más actividad que conjugaciones a través del resto COOH del análogo de la hormona tiroidea u otra molécula terapéutica. El grupo NH_2 de los análogos de la hormona tiroidea, tales como T_3 y T_4 , también se puede bloquear con un grupo protector (grupo R). Los grupos R adecuados del alcance de la presente invención incluyen BOC, acetilo, metilo, etilo o isopropilo. Para T_4 sin modificar, $R = H$. Además, cuando la hormona tiroidea es T_4 o T_3 con un grupo protector en el NH_2 , el grupo protector adecuado en el NH_2 de T_4 o T_3 puede incluir *N*-metilo, *N*-etilo, *N*-trifenilo, *N*-propilo, *N*-isopropilo, *N*-butilo terciario y otros grupos funcionales.

La nanopartícula puede tener un diámetro en el intervalo de aproximadamente 1 a < 1.000 nm. Las nanopartículas de la divulgación pueden tener hasta aproximadamente 100 moléculas de análogos de la hormona tiroidea por nanopartícula. La proporción de hormona tiroidea u otras moléculas terapéuticas por nanopartícula a partir varía de una proporción de 1 molécula de la hormona tiroidea por 1 nanopartícula (que se muestra también como 1:1) hasta 100 moléculas de la hormona tiroidea u otras moléculas terapéuticas por nanopartícula (que se muestra también como 100:1). Más preferentemente, el intervalo es de 15:1-30:1 análogo de hormona tiroidea u otras moléculas terapéuticas por nanopartícula, y más preferentemente de 20:1-25:1 de análogo de la hormona tiroidea u otras moléculas terapéuticas por nanopartícula.

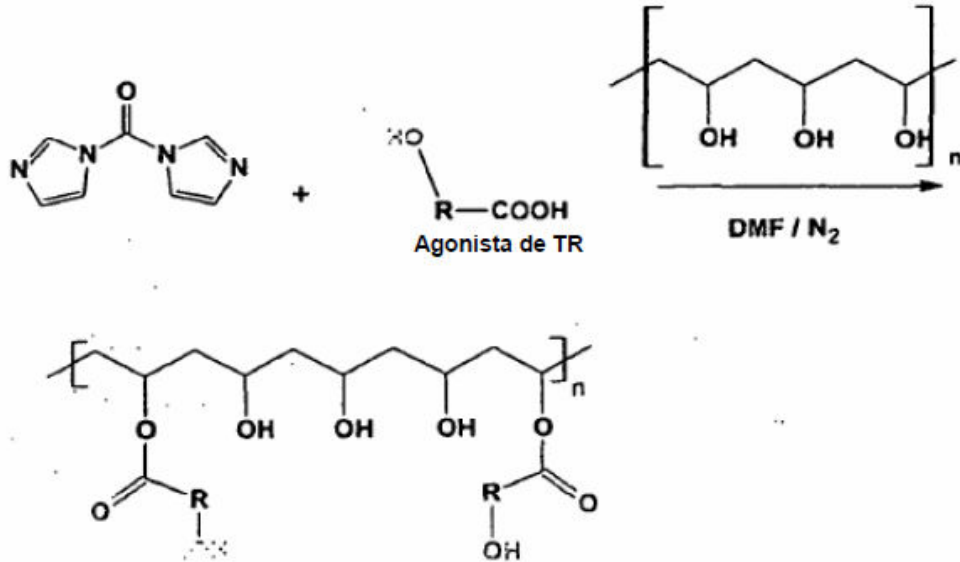
Las nanopartículas adecuadas del alcance de la divulgación incluyen nanopartículas de PEG-PLGA conjugadas con T_4 , T_3 , DITPA, GC-1, TETRAC o con otros compuestos terapéuticos, incluyendo resveratrol, estrógeno, etc. - añadir a la lista. Además, se puede encapsular temozolomida en nanopartículas de PLGA. Una de las principales ventajas de las nanopartículas es su capacidad para coencapsular varios números de materiales encapsulantes en ellas a la vez. Así, estas nanopartículas de PLGA también tienen el enorme potencial de encapsular conjuntamente T_4 , T_3 , DITPA, GC-1, TETRAC u otros compuestos terapéuticos y temozolomida a la vez. Además, debido a la presencia del grupo -COOH libre en la superficie de las nanopartículas, estas nanopartículas se pueden conjugar con diferentes restos de dirección y se pueden administrar en un sitio deseado. En un estudio preliminar, los presentes inventores pudieron dirigirse a algunas líneas celulares mediante el uso de un anticuerpo específico unido a las nanopartículas para la administración dirigida a un sitio específico del tumor. Las realizaciones adicionales de las nanopartículas de la reciente invención incluyen nanopartículas conjugadas a T_4 , T_3 , DITPA, GC-1, TETRAC o colágeno que contienen fosfato de calcio; T_4 , T_3 , DITPA, GC-1 o TETRAC conjugados con mono- o di-PEGOH a través de un enlace de éter estable.

Además, las nanopartículas encapsulan los agonistas, agonistas parciales o antagonistas de la hormona tiroidea dentro de las nanopartículas o los inmovilizan en la superficie celular de las nanopartículas a través de un enlace químico. A continuación, se ilustran las realizaciones representativas de las nanopartículas del alcance de la

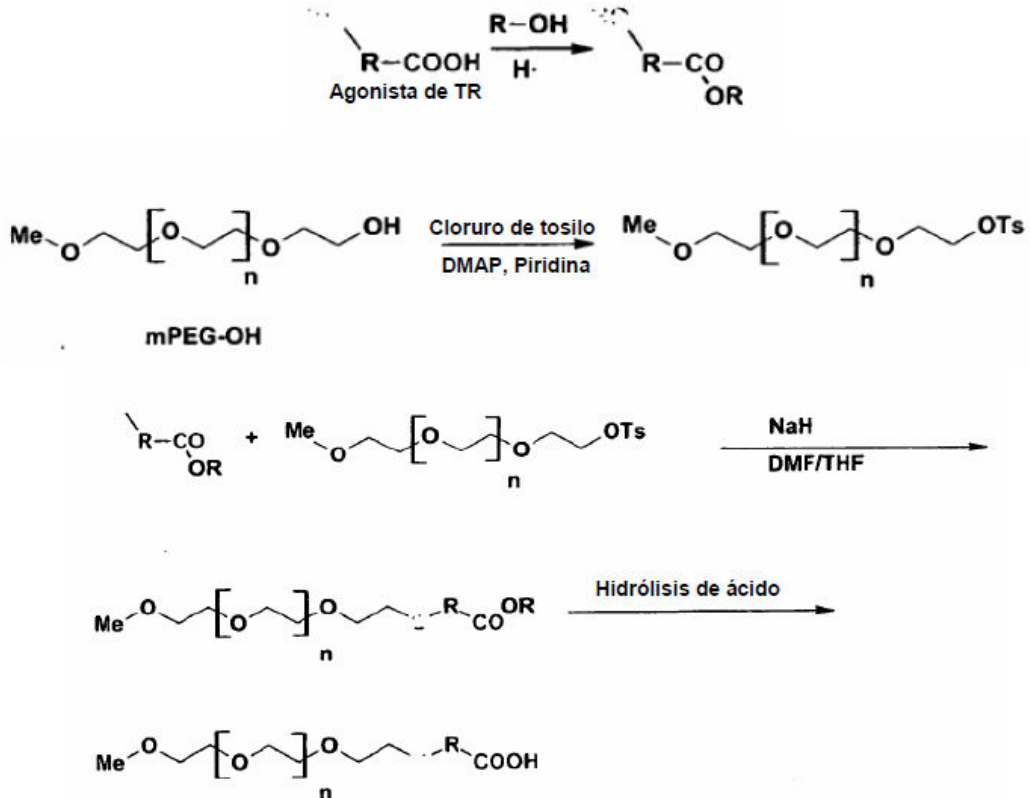
divulgación.

A. Nanopartículas de agonistas y antagonistas de TR

- 5 Nanopolímero conjugado con agonista o antagonista de TR a través de un enlace de éster



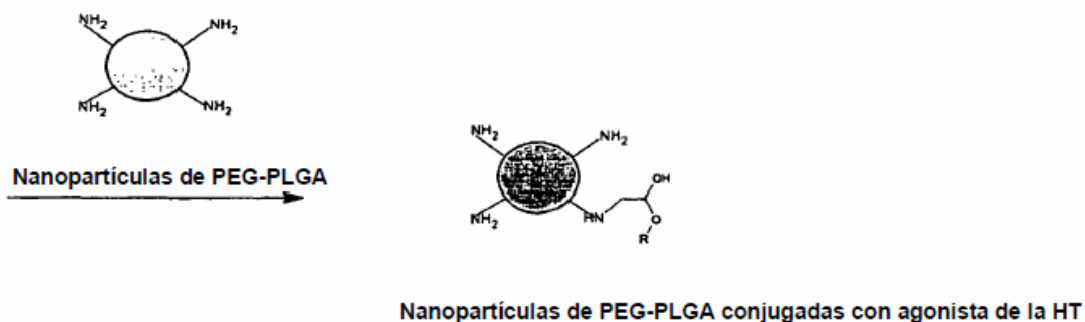
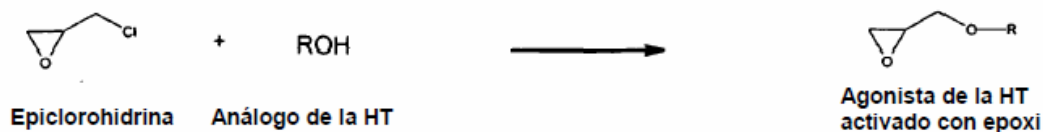
Agonista o antagonista de TR conjugado con mono- o di-PEGOH a través de un enlace de éster estable



- 10 Agonista o antagonista de TR inmovilizado con mono o di-PEG (OH)

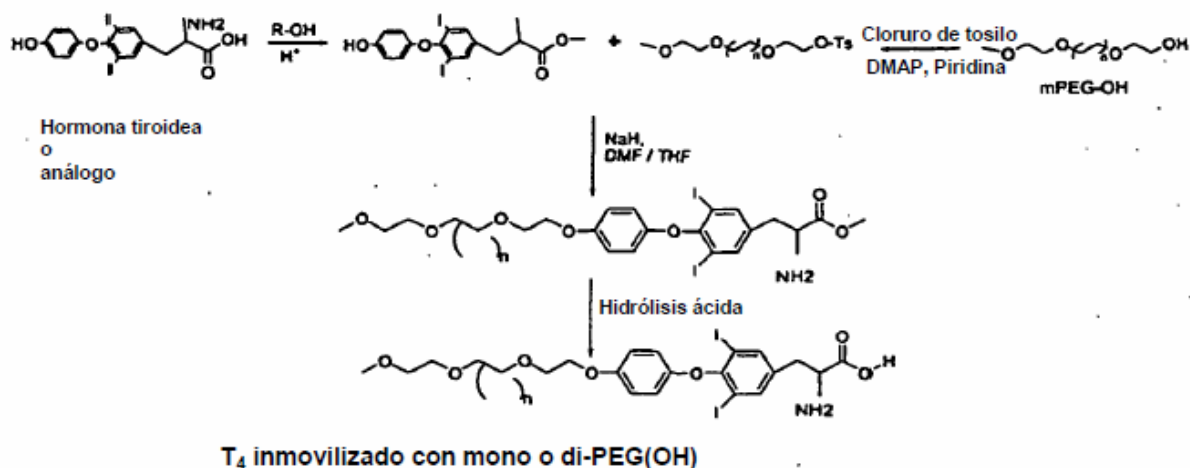
Otra realización de nanopartículas adecuada es la preparación de nanopartículas de PEG-PLGA conjugadas con agonistas de TR. Primero se prepararán nanopartículas huecas. Se seleccionará el polímero de amino-PEG-PLGA para preparar las nanopartículas. El análogo de la HT se activará mediante el uso de epíclorhidrina. Este agonista de la HT activado con epoxi reaccionará fácilmente con nanopartículas de PEG-PLGA con terminación amino.

- 15



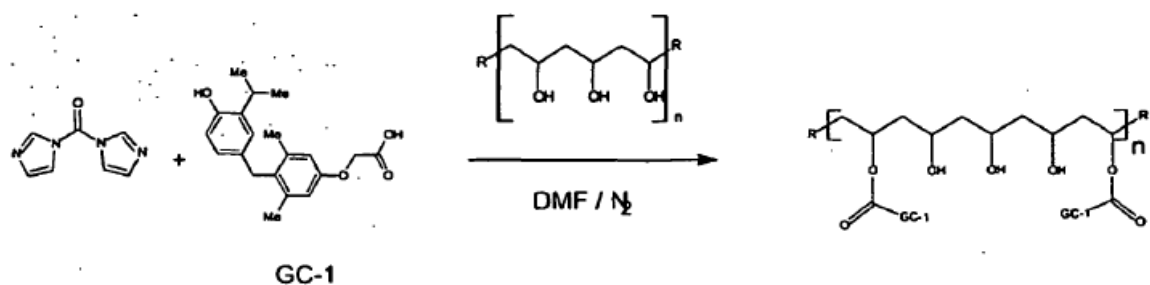
B. Nanopartículas de T₄

- 5 Otra realización adecuada de una nanopartícula de la divulgación incluye T₄ inmovilizada en mono- o di-PEG-OH a través de un enlace de éter estable, como se muestra a continuación.

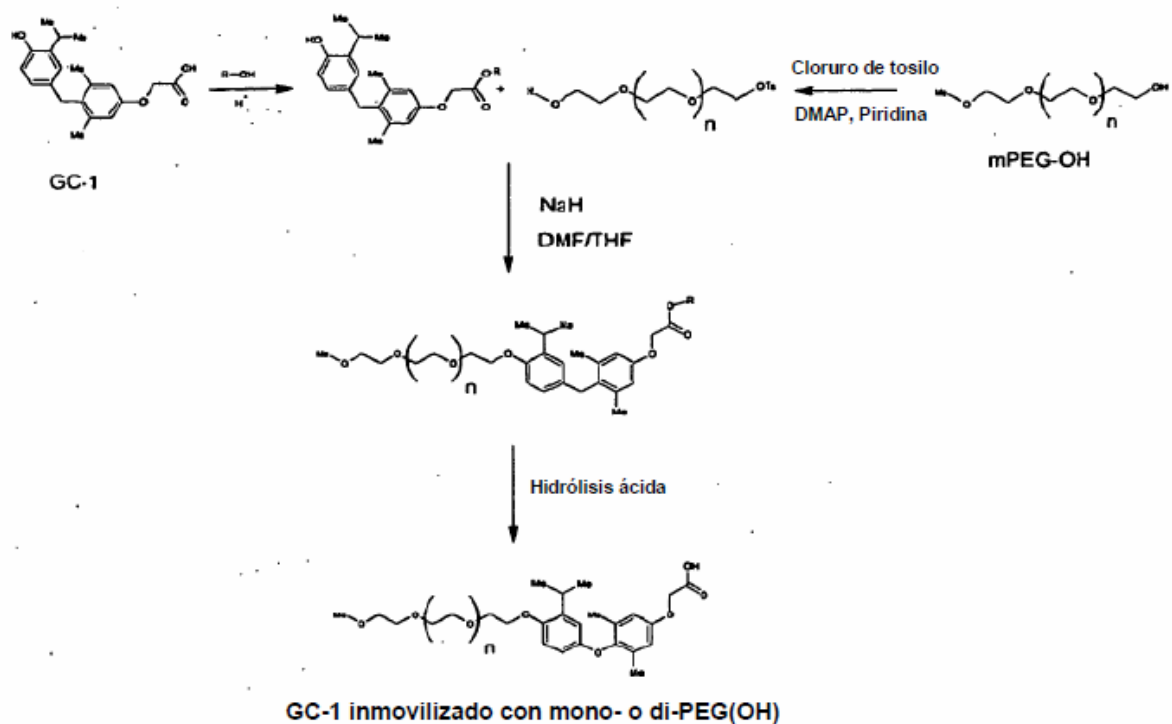


C. Nanopartículas de GC-1

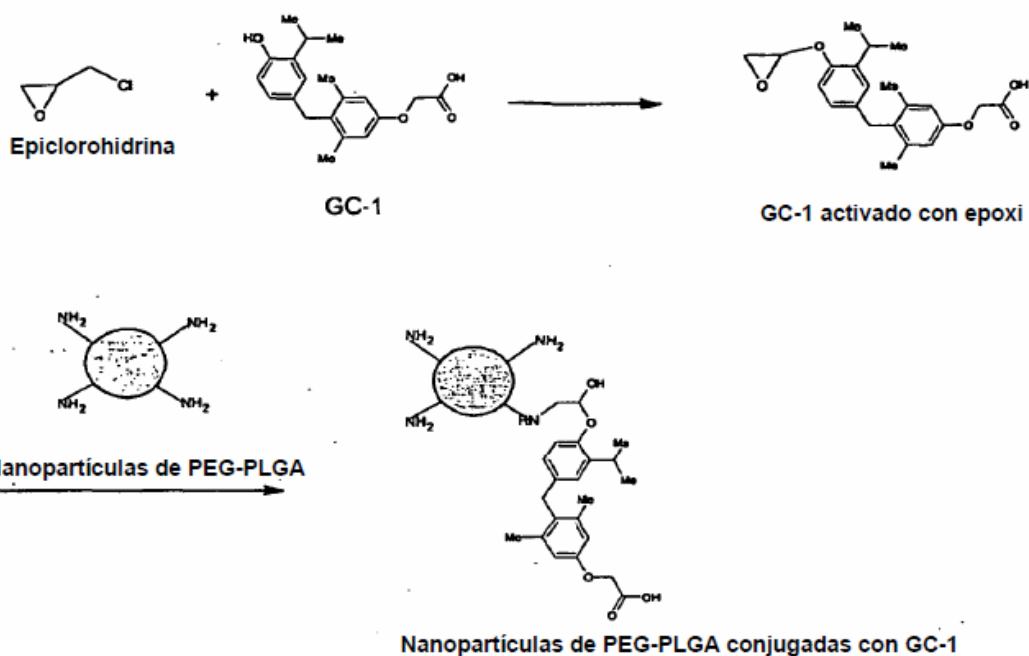
- 10 Una realización representativa de una nanopartícula de la divulgación también incluye la encapsulación de GC-1 en nanopartículas de PEG-PLGA, conjugadas a través de un enlace de éster, como se muestra a continuación.



- 15 Otra realización adecuada de una nanopartícula de la divulgación incluye un conjugado de GC-1 con mono- o di-PEGOH a través de un enlace de éter estable, como se muestra a continuación.

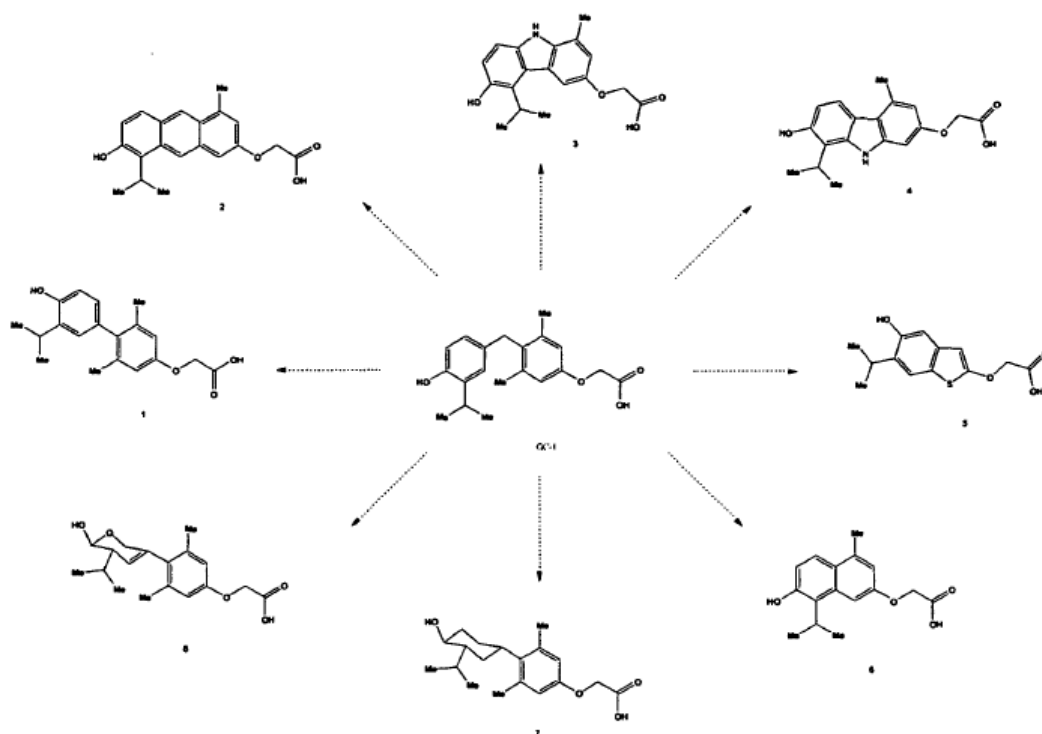


Otra realización adecuada de una nanopartícula de la divulgación incluye nanopartículas de PEG-PLGA conjugadas con GC-1. En este caso, primero se prepararán las nanopartículas huecas. Se seleccionará el polímero de amino-PEG-PLGA para preparar las nanopartículas. Se activará GC-1 mediante el uso de epíclorhidrina. Este GC-1 activado reaccionará fácilmente con las nanopartículas de PEG-PLGA de terminación amino, como se muestra a continuación.



A continuación, se muestran más nanopartículas de análogos de GC-1 encapsulados o inmovilizados.

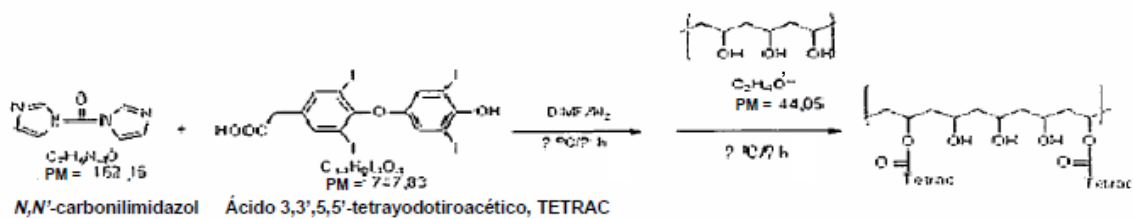
Nuevos análogos de GC-1



D. Nanopartículas de TETRAC

5

Las nanopartículas de TETRAC representativas del alcance de la divulgación se muestran en las Figuras 30A-B, las Figuras 31A-b y la Figura 32. A continuación, se muestra una representación adicional de un nanopolímero conjugado con TETRAC a través de un enlace éster.



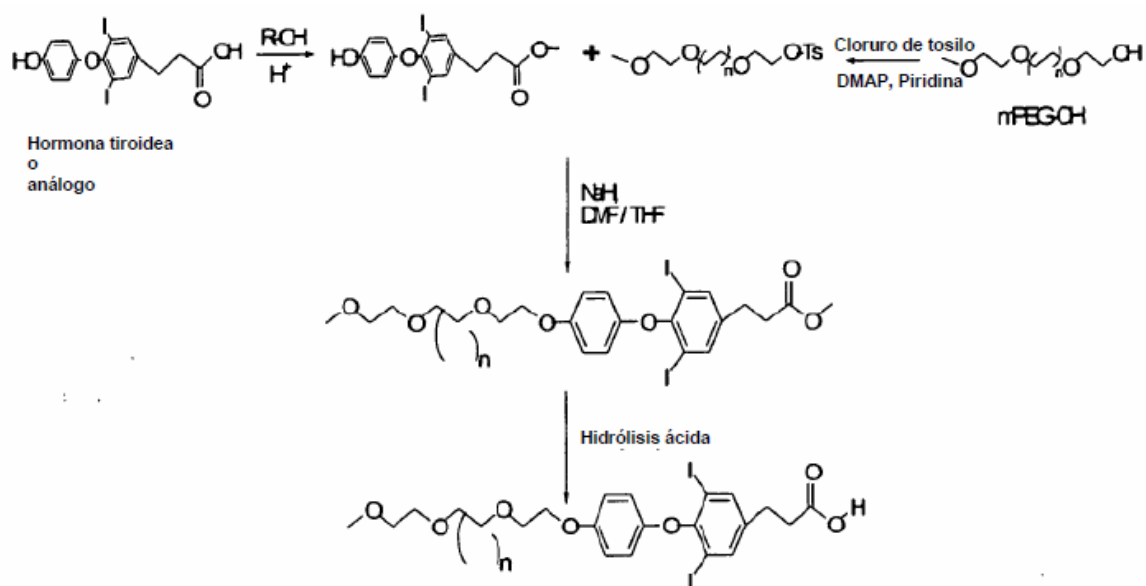
Diseño de los experimentos

Compuestos químicos	Fórmula	Peso mol.	Cantidad (mg)	mmol	Densidad	Volumen (ml)	Carga (%)
N,N' -carbonylimidazol	$C_7H_6N_4O$	162.15	131.0	0.800		2.50	
Ácido 3,3',5,5'-tetrayodotiroacético, TETRAC	$C_{13}H_6I_4O_3$	727.83	189.5	0.254		2.50	
Poli (alcohol vinílico)	C_2H_4O	44.05	135.5	3.000		6.50	58.34
Dimetilformamida						11.50	
		Conc. (g/ml)	Vol (ml)				
		PVA	0.021	6.50	Conc. mg Tetrac/ml		

PVA, 99+%, PM = 2K, HZ2_17

10

A continuación, se muestra una realización adecuada de un conjugado de TETRAC con mono- o di-PEGOH a través de un enlace de éter estable.

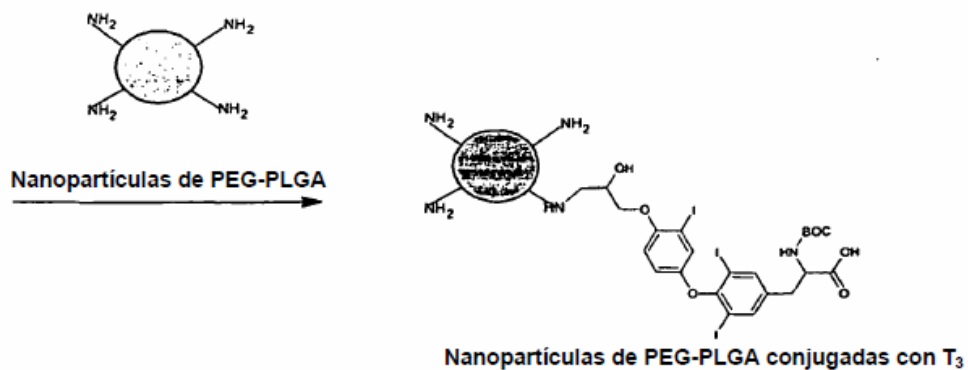
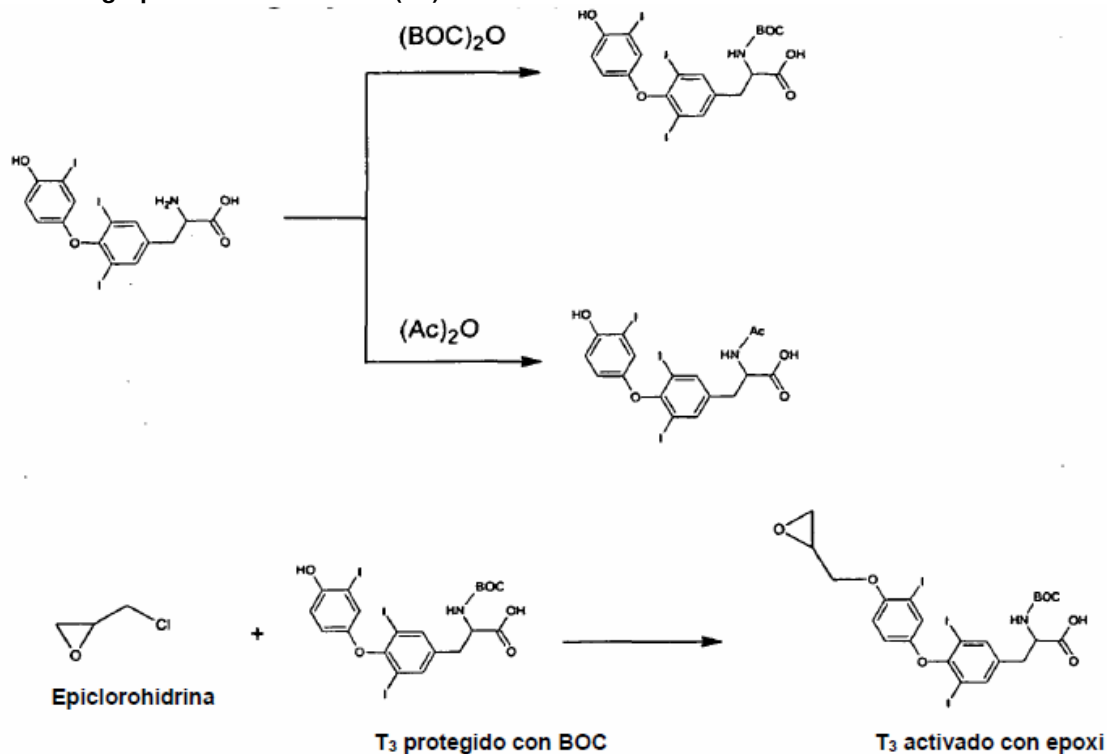


TETRAC inmovilizado con mono- o di-PEG(OH)

E. Nanopartículas de T₃

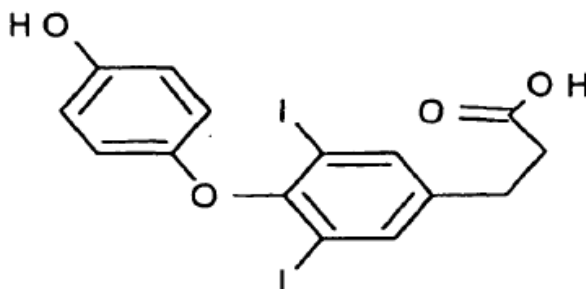
Otra realización adecuada es una preparación de nanopartículas de PEG-PLGA conjugadas con T₃. La conjugación de T₃ es similar a la conjugación de GC-1. Solo en este caso, primero se bloqueará el grupo amino altamente reactivo presente en T₃ mediante el uso de un grupo bien acetato (Ac) o BOC. A continuación, se activará con epiclorhidrina. Finalmente, tras la conjugación con T₃, se desprotegerá como se muestra a continuación.

Protección de grupo amino con acetato (Ac) o BOC



F. DITPA

- 5 Otras realizaciones de nanopartículas adecuadas adicionales incluyen análogos de DITPA, como se muestra a continuación.



DITPA -3,5-yodo se podría reemplazar por grupo metilo o halógeno.

Usos de los análogos de la hormona tiroidea

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación son T₃, T₄, GC-1, DITPA, TETRAC, TRIAC, y conjugados poliméricos y nanopartículas de los mismos. T₃, T₄, GC-1 y DITPA, y sus conjugados y nanopartículas, son proangiogénicos, y también se denominan en el presente documento agonistas de la hormona tiroidea. TETRAC y TRIAC, y sus conjugados y nanopartículas, son antiangiogénicos y antiproliferativos, y también se denominan en el presente documento antagonistas de la hormona tiroidea.

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación se pueden usar para tratar trastornos cutáneos. Estos trastornos incluyen la curación de heridas, afecciones cutáneas no cancerosas y afecciones cutáneas cancerosas. La curación de heridas engloba las incisiones quirúrgicas y las lesiones traumáticas. T₄, T₃, GC-1 y DITPA, tanto sin modificar como en forma de nanopartículas, se pueden usar para la curación de heridas. Estos análogos de la hormona tiroidea funcionan mediante la angiogénesis y mediante la mejora de la migración de los fibroblastos y los glóbulos blancos en la zona de la herida. T₄, modificada y en forma de una nanopartícula, tiene, además, la actividad de agregación plaquetaria pertinente para la curación temprana de heridas. Las acciones de las nanopartículas de T₄, T₃, GC-1 y DITPA se limitan a la superficie celular. Dado que no entran en la célula, evitan los efectos secundarios sistémicos al escapar del lugar de la aplicación local. Los ejemplos de estos efectos secundarios sistémicos intracelulares incluyen el estado de hipertiroidismo leve y, específicamente en las células tirotrópicas pituitarias, la supresión de la liberación de la tirotropina (TSH). Los trastornos cutáneos no cancerosos que se pueden tratar mediante las composiciones de la divulgación, específicamente TETRAC, TRIAC y otros análogos de la hormona tiroidea antiangiogénicos y antiproliferativos, tanto sin modificar como en forma de nanopartículas o conjugados poliméricos incluyen rosácea, angiomas, telangiectasias, poiquilodermia de Civate y psoriasis. Los ejemplos de trastornos cutáneos cancerosos que se pueden tratar mediante las composiciones de la presente invención son el carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas de la piel y melanoma. Las composiciones que se usarán para dichos fines son TETRAC, TRIAC y otros análogos de la hormona tiroidea antiangiogénicos y antiproliferativos, tanto sin modificar como en forma de nanopartículas o conjugados poliméricos. Para los trastornos cutáneos, las composiciones de la divulgación se pueden administrar como aplicaciones cutáneas tópicas tales como soluciones, pulverizados, incorporadas en gasas o en láminas sintéticas.

Los trastornos cutáneos no cancerosos que se pueden tratar con las composiciones de la divulgación, incluyendo TETRAC, TRIAC y otros análogos encapsulados o inmovilizados en nanopartículas incluyen rosácea, angiomas, telangiectasias, poiquilodermia, psoriasis. Para los trastornos cutáneos, las composiciones de la presente invención se pueden administrar como composiciones cutáneas tópicas (tales como soluciones, pulverizados, incorporadas en gasas u otras láminas sintéticas).

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación, incluyendo TETRAC, TRIAC y otros análogos de la hormona tiroidea antiproliferativos y antiangiogénicos, tanto sin modificar como en forma de nanopartículas o conjugados poliméricos también se pueden usar para tratar los cánceres de órganos, además de la piel. Estos cánceres incluyen glioma y glioblastoma, tumores de cabeza y cuello no tiroideos, y cáncer de tiroides, de pulmón, de mama y de ovario. Las nanopartículas de TETRAC y TRIAC o los conjugados poliméricos, administrados por vía sistémica o localmente, no acceden al interior de las células y funcionan exclusivamente en el receptor de la integrina de la superficie celular para la hormona tiroidea. Esta característica de las formulaciones elimina los efectos tiromiméticos secundarios no deseados del TETRAC y TRIAC no modificados, incluyendo hipertiroidismo y la supresión de la liberación de la tirotropina (TSH) por las células tirotrópicas pituitarias. El TETRAC se puede administrar a dosis de aproximadamente 200-2.000 ug/día o hasta aproximadamente 700 ug/m².

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación, incluyendo TETRAC, TRIAC, análogos, otros antagonistas de la hormona tiroidea, y conjugados poliméricos y nanopartículas de los mismos, también se pueden usar para tratar el cáncer, incluyendo glioma, y cáncer de cabeza y cuello, piel, pulmón, mama y tiroides. En la presente realización, el TETRAC se puede administrar con o sin nanopartículas. Las nanopartículas de TETRAC reducen el riesgo de hipotiroidismo, pues las nanopartículas no podrán entrar en la célula. Para el cáncer de tiroides, se administran conjuntamente tanto el TETRAC como las nanopartículas de TETRAC, o se administra el TETRAC encapsulado y/o inmovilizado en la superficie de las nanopartículas a través de la unión química estable. El TETRAC o las nanopartículas de TETRAC se pueden administrar a una dosis de aproximadamente 0,001 a 10 mg/kg.

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación, incluyendo TETRAC, TRIAC, análogos, antagonistas de la hormona tiroidea, y conjugados poliméricos y nanopartículas de los mismos, también se pueden usar como agentes quimiosensibilizantes del cáncer y agentes contra el cáncer. El TETRAC, el TRIAC, los análogos, los antagonistas de la hormona tiroidea, y los conjugados poliméricos y nanopartículas de los mismos, suprimen el desarrollo de la resistencia a los fármacos, que es un factor causal de la recaída de la enfermedad. El TETRAC mejora la respuesta celular y revierte la resistencia hacia la doxorubicina, etopósido, cisplatino y tricotatina A en líneas celulares tumorales resistentes derivadas del neuroblastoma, osteosarcoma y cáncer de mama.

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación, incluyendo TETRAC, TRIAC, análogos, antagonistas de la hormona tiroidea, y conjugados poliméricos y nanopartículas de los mismos, también se pueden usar para tratar los trastornos oculares, incluyendo la retinopatía diabética y la degeneración macular. El TETRAC y los análogos se

pueden administrar sin modificar, como un conjugado polimérico, o como nanopartículas bien sistémicamente o como gotas oculares.

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación, incluyendo T₃, T₄, GC-1, DITPA, y conjugados poliméricos y nanopartículas de los mismos, también se pueden usar para tratar la aterosclerosis, incluyendo la enfermedad de las arterias carótida o coronaria, los trastornos isquémicos de las extremidades, los trastornos intestinales isquémicos. Las realizaciones preferidas son las formas poliméricas de T₃, GC-1, DITPA con poli-L-arginina o poli-L-lisina o nanopartículas de los mismos. Además, las composiciones de la divulgación se pueden usar en combinación con endoprótesis vasculares biodegradables y no biodegradables u otra matriz.

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación también se pueden administrar para tratar trastornos que implican la migración celular, tales como los que incluyen las neuronas gliales y los NGF potenciados. Dichos trastornos por tratar incluyen enfermedades neurológicas. Además, los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación se pueden usar para trastornos hematopoyéticos y los relacionados con las células madre. Se pueden administrar en el momento del trasplante de médula ósea para que las células se reproduzcan más rápido. Las presentes composiciones también se pueden usar para la formación de imágenes de diagnóstico, incluyendo la formación de imágenes para la enfermedad de Alzheimer mediante el uso de nanopartículas de TETRAC marcado con yodo 125. Dado que las placas de Alzheimer tienen transtiretina que se une a TETRAC, esto se puede usar para la detección temprana. Las composiciones de la divulgación también se pueden usar en combinación con desfibriladores. También se pueden usar para el tratamiento de agentes virales, tales como el virus del Nilo Occidental, VIH, citomegalovirus (CMV), adenovirus y otros agentes virales.

A continuación, se describe detalladamente la información sobre los usos de las presentes composiciones, tanto en la promoción como en la inhibición de la angiogénesis.

Promoción de la angiogénesis

El efecto proangiogénico de los análogos, las formas poliméricas o nanopartículas de la hormona tiroidea de los mismos depende de un inicio no genómico, ensayado según la susceptibilidad del efecto hormonal hacia la reducción por los inhibidores farmacológicos de la vía de transducción de señales de MAPK. Dichos resultados indican que otra consecuencia de la activación de MAPK por la hormona tiroidea es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Esto último se inicia de forma no genómica, pero por supuesto, requiere el consiguiente complejo programa de transcripción de genes. Las concentraciones ambientales de la hormona tiroidea son relativamente estables. El modelo de CAM, en el momento ensayado por los presentes inventores, era tiroprival y, por lo tanto, se puede considerar un sistema, que no reproduce el organismo intacto.

La disponibilidad de un ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) para la angiogénesis ha proporcionado un modelo en el que cuantificar la angiogénesis y estudiar los posibles mecanismos implicados en la inducción por la hormona tiroidea del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. La presente solicitud desvela un efecto proangiogénico de T₄ que se aproxima al del modelo de CAM de FGF2 y que puede mejorar la acción de dosis subóptimas de FGF2. Se desvela además que el efecto proangiogénico de la hormona se inicia en la membrana plasmática, y depende de la activación por T₄ de la vía de transducción de señales de MAPK. Como se ha establecido anteriormente, se desvelan métodos para el tratamiento de enfermedades vasculares periféricas oclusivas y enfermedades coronarias, en particular, la oclusión de los vasos coronarios y los trastornos asociados con la oclusión de la vasculatura periférica y/o los vasos sanguíneos coronarios. También se desvelan composiciones y métodos para potenciar la angiogénesis y/o el reclutamiento de los vasos sanguíneos colaterales en un paciente en necesidad de ello. Las composiciones incluyen una cantidad eficaz de análogos, las formas poliméricas y los derivados de la hormona tiroidea. Los métodos implican la administración conjunta de una cantidad eficaz de los análogos, las formas poliméricas y los derivados de la hormona tiroidea a bajas dosis diarias durante una semana o más con otros factores de crecimiento proangiogénicos, vasodilatadores, anticoagulantes, trombolíticos u otros tratamientos relacionados con el sistema vascular convencionales.

El ensayo de CAM se ha usado para validar la actividad angiogénica de varios factores de crecimiento y compuestos que se cree que potencian la angiogénesis. Por ejemplo, se ha demostrado que T₄ a concentraciones fisiológicas es proangiogénico en este modelo *in vitro* y que, a nivel molar, tiene la actividad de FGF2. La presencia de PTU no redujo el efecto de T₄, lo que indica que la desyodación de T₄ para generar T₃ no era un requisito previo en este modelo. En la siguiente tabla, se presenta un resumen de los efectos proangiogénicos de diversos análogos de la hormona tiroidea.

Efectos proangiogénicos de diversos análogos de la hormona tiroidea en el modelo de CAM

TRATAMIENTO	ÍNDICE DE ANGIOGÉNESIS
PBS (Control)	89,4 ± 9,3
DITPA (0,01 uM)	133,0 ± 11,6

DITPA (0,1 uM)	167,3 ± 12,7
DITPA (0,2 mM)	117,9 ± 5,6
GC-1 (0,01 uM)	169,6 ± 11,6
GC-1 (0,1 uM)	152,7 ± 9,0
T ₄ -agarosa (0,1 uM)	195,5 ± 8,5
T ₄ (0,1 uM)	143,8 ± 7,9
FGF2 (1 ug)	155 ± 9
<u>n = 8 por grupo</u>	

La aparición del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en este modelo requiere varios días, lo que indica que el efecto de la hormona tiroidea dependía totalmente de la interacción del receptor nuclear de la hormona tiroidea (TR) con la hormona. Las acciones de las yodotironinas que requieren complejos intranucleares de TR con su ligando natural, T₃, son, por definición, genómicas, y culminan en la expresión génica. Por otro lado, la respuesta preferencial de este sistema modelo hacia T₄, (en lugar de T₃, el ligando natural de TR) ha planteado la posibilidad de que la angiogénesis pueda ser iniciada de forma no genómica en la membrana plasmática por T₄ y culminar en efectos que requieran la transcripción de genes. Las acciones no genómicas de T₄ se han descrito ampliamente, se suelen iniciar en la membrana plasmática y pueden estar mediadas por las vías de transducción de señales. No requieren ligando intranuclear de yodotironina ni TR, pero pueden interactuar con o modular la transcripción de genes. Las acciones no genómicas de esteroides también se han descrito bien, y se sabe que interactúan con las acciones genómicas de los esteroides o de otros compuestos. Los experimentos llevados a cabo con T₄ y TETRAC o con agarosa-T₄ indicaron, de hecho, que el efecto proangiogénico de T₄ se inició muy probablemente en la membrana plasmática. TETRAC bloquea los efectos iniciados en la membrana de T₄, pero, por sí mismo, no activa la transducción de señales. Por lo tanto, es una sonda para las acciones no genómicas de la hormona tiroidea. Se cree que agarosa-T₄ no puede entrar en el interior de la célula, y se ha usado para examinar los modelos en cuanto a las posibles acciones iniciadas en la superficie celular de la hormona. Las investigaciones de los efectos proangiogénicos de la hormona tiroidea en el modelo de membrana corioalantoidea de pollo ("CAM") demuestran que la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos existentes se potenció del doble al triple bien mediante L-tiroxina (T₄) o 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T₃) a 10⁻⁷- 10⁻⁹ M. Lo curioso fue que T₄-agarosa, un análogo de la hormona tiroidea que no atraviesa la membrana celular, produjo un potente efecto proangiogénico comparable al obtenido con T₃ o T₄.

En parte, la presente divulgación proporciona composiciones y métodos para potenciar la angiogénesis en un sujeto en necesidad de ello. Las afecciones susceptibles de tratamiento mediante la promoción de la angiogénesis incluyen, por ejemplo, la enfermedad vascular periférica oclusiva y las enfermedades coronarias, en particular, la oclusión de los vasos coronarios, y los trastornos asociados con la oclusión de la vasculatura periférica y/o los vasos sanguíneos coronarios, disfunción eréctil, apoplejía y heridas. También se desvelan composiciones y métodos para potenciar la angiogénesis y/o el reclutamiento de los vasos sanguíneos colaterales en un paciente en necesidad de ello. Las composiciones incluyen una cantidad eficaz de formas poliméricas, análogos y derivados de la hormona tiroidea y una cantidad eficaz de una adenosina y/o donante de óxido nítrico. Las composiciones pueden estar en forma de formulación farmacéutica, inyectable, estéril que incluye una cantidad angiogénicamente eficaz de sustancia similar a la hormona tiroidea y derivados de adenosina en un vehículo fisiológica y farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con uno o más excipientes.

Infarto de miocardio

Una razón importante de la insuficiencia cardíaca tras un infarto agudo de miocardio es una respuesta inadecuada de la formación de nuevos vasos sanguíneos, es decir, la angiogénesis. La hormona tiroidea y sus análogos son beneficiosos en la insuficiencia cardíaca y estimulan la angiogénesis coronaria. Los métodos de la divulgación incluyen, en parte, la administración de un solo tratamiento de un análogo de la hormona tiroidea en el momento del infarto, bien por inyección directa en el miocardio o por simulación de la inyección coronaria mediante la ligadura aórtica intermitente para producir contracciones isovolúmicas transitorias para lograr la angiogénesis y/o la remodelación ventricular.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación presenta métodos para el tratamiento de la enfermedad vascular oclusiva, enfermedad coronaria, infarto de miocardio, isquemia, apoplejía y/o trastornos vasculares de las arterias periféricas mediante la promoción de la angiogénesis a través de la administración a un sujeto en necesidad de ello de una cantidad de una forma polimérica de la hormona tiroidea, o un análogo de la misma, eficaz para potenciar la angiogénesis.

En el presente documento, también se proporcionan ejemplos de formas poliméricas de análogos de la hormona tiroidea, pudiendo incluir triyodotironina (T₃), levotiroxina (T₄), (GC-1) o ácido 3,5-diiodotiropropiónico (DITPA) conjugado con alcohol polivinílico, copolímero de ácido acrílico y etileno, ácido poliláctico, poli-L-arginina, poli-L-lisina.

Los métodos también incluyen la administración conjunta de una cantidad eficaz de sustancia similar a la hormona tiroidea y una cantidad eficaz de una adenosina y/o un donante de NO, en dosis diarias bajas durante una semana o más. Se pueden administrar uno o ambos componentes localmente a través de un catéter. Los análogos y derivados de la hormona tiroidea se pueden administrar *in vivo* en los lechos capilares que rodean el tejido isquémico mediante la incorporación de los compuestos en nanopartículas de tamaño adecuado. Los análogos, las formas poliméricas y los derivados de la hormona tiroidea se pueden dirigir hacia el tejido isquémico mediante el enlace covalente con un anticuerpo adecuado.

El método se puede usar como un tratamiento para restablecer la función cardíaca tras un infarto de miocardio. El método también se puede usar para mejorar el flujo sanguíneo en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria que padecen isquemia de miocardio o el flujo sanguíneo inadecuado hacia zonas distintas del corazón, incluyendo, por ejemplo, la enfermedad vascular periférica oclusiva (también conocida como enfermedad oclusiva arterial periférica) o la disfunción eréctil.

Curación de heridas

Las acciones de la hormona tiroidea que se inician en el receptor de la integrina y que son relevantes para la curación de heridas *in vivo* son la agregación plaquetaria, la angiogénesis y la inmigración de los fibroblastos.

La angiogénesis de las heridas es una parte importante de la fase proliferativa de la curación. La curación de cualquier herida cutánea que no sea la más superficial no puede ocurrir sin la angiogénesis. No solo es necesario reparar cualquier vasculatura dañada, sino que el aumento de la actividad celular local necesaria para la curación requiere un mayor aporte de nutrientes del torrente sanguíneo. Por otra parte, las células endoteliales que forman el revestimiento de los vasos sanguíneos son importantes en sí mismas como organizadores y reguladores de la curación.

Por lo tanto, la angiogénesis proporciona una nueva microcirculación para dar posibilidad a la curación de la herida. Los nuevos vasos sanguíneos se vuelven clínicamente visibles dentro del espacio de la herida a los cuatro días de la lesión. Las células vasculares endoteliales, los fibroblastos y las células del músculo liso proliferan coordinadamente para dar soporte a la granulación de la herida. Al mismo tiempo, se produce la reepitelización para restablecer la cubierta epitelial. Las células epiteliales del margen de la herida o de los folículos pilosos profundos migran a través de la herida y se establecen sobre el tejido de granulación y la matriz provisional. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) median este proceso. Existen varios modelos (deslizamiento frente a rodadura celular) de epitelización.

Como las hormonas tiroideas regulan la velocidad metabólica, cuando el metabolismo se ralentiza debido al hipotiroidismo, la cicatrización de las heridas también se ralentiza. El papel de los análogos o las formas poliméricas de la hormona tiroidea aplicados tópicamente en la curación de heridas representa, por tanto, una nueva estrategia para acelerar la curación de las heridas en personas diabéticas y en personas no diabéticas con problemas de curación de heridas. La administración tópica puede ser en forma unida a una tirita. Además, se pueden usar nanopolímeros y nanopartículas como matriz para la administración local de la hormona tiroidea y sus análogos. Esto ayudará en la administración controlada en la diana celular y tisular.

Por consiguiente, otra realización de la divulgación presenta métodos de tratamiento de heridas mediante la promoción de la angiogénesis a través de la administración a un sujeto en necesidad de ello de una cantidad de una forma polimérica o nanoparticulada de la hormona tiroidea, o un análogo de la misma, eficaz para potenciar la angiogénesis. Para más información, véanse los Ejemplos 9A y 9B.

Para las nanopartículas, T₄ como la formulación de PLGA, cuando se aplica localmente en heridas quirúrgicas o traumáticas a través de gasas o se adsorbe a películas sintéticas, mejorará la curación de heridas mediante los mecanismos descritos anteriormente. Para las pequeñas heridas o abrasiones cutáneas, se puede obtener derivado de T₄ para su uso clínico en gasas o películas de OTC.

T₄ como formulación de PLGA, cuando se aplica localmente en úlceras cutáneas a través de gasas o se adsorbe a películas sintéticas, mejorará la curación de las heridas mediante los mecanismos descritos anteriormente. Dado que no provoca la agregación de plaquetas, la T₃ nanoparticulada es menos deseable para estas aplicaciones.

Otros usos adicionales de curación de heridas incluyen el uso para los trastornos relacionados con la membrana mucosa, incluyendo la inflamación inducida por la radiación tras la biopsia, la ulceración del tracto GI, la detención de la hemorragia interna, el tratamiento tras la extracción de piezas dentales en pacientes con terapia anticoagulante. Para estos usos, se pueden usar nanopartículas o conjugados poliméricos.

Uso oftálmico

La divulgación también se dirige a la liberación sostenida y de largo tiempo de residencia de una formulación oftálmica de análogos de la hormona tiroidea que tienen termo-sensibilidad, muco-adherencia y pequeño tamaño de partícula ($10 < 1.000$ nm). Dicha formulación comprende solución micelar de copolímero de bloques aleatorios, que tiene antagonistas de la hormona tiroidea hidrófobos o hidrófilos. La divulgación también proporciona un proceso de preparación de dichas formulaciones con diferente tamaño de partícula y diferentes cargas superficiales (positiva, negativa o neutra) en gotas o pomadas oculares.

La mayoría de las enfermedades oculares se tratan con la aplicación tópica de soluciones administradas en forma de gotas o pomadas para los ojos. Uno de los principales problemas encontrados con la administración tópica de fármacos oftálmicos es la rápida y extensa pérdida precorneal causada por el drenaje y la alta renovación del fluido lagrimal. Tras la instilación de una gota ocular, normalmente menos del 2-3 % del fármaco aplicado penetra en la córnea y alcanza el tejido intraocular, mientras que una fracción mayor de la dosis instilada se suele absorber sistemáticamente a través del conducto nasolagrimal y conjuntivo. Otra limitación es la barrera corneal relativamente impermeable que limita la absorción ocular.

Debido a los problemas inherentes asociados con las gotas oculares convencionales, se han dirigido importantes esfuerzos hacia nuevos sistemas de administración de fármacos para la administración oftálmica, tales como hidrogeles, micropartículas y nanopartículas, liposomas y escudos de colágeno. La administración de fármacos oculares es una metodología para el control y, en última instancia, la optimización de la administración del fármaco en su tejido ocular diana. La mayoría de los esfuerzos realizados en la formulación están encaminados a optimizar la absorción del fármaco ocular a través de la prolongación del tiempo de residencia del fármaco en la córnea y el saco conjuntivo, así como a la ralentización de la liberación del fármaco desde el sistema de administración y minimizando la pérdida de fármaco precorneal sin el uso de gel que tenga efecto de desenfoque en la visión.

Para resolver el problema de la visión borrosa y la baja biodisponibilidad del fármaco mediante el uso de gel a granel en las formulaciones oftálmicas, se ha sugerido que los vehículos coloidales tendrían un mejor efecto. Las nanopartículas como vehículos de fármacos para la administración ocular han revelado ser más eficaces que los liposomas y, además, de todos los puntos positivos de los liposomas, estas nanopartículas son entidades excepcionalmente estables, y se puede modular la liberación sostenida del fármaco.

Se han realizado estudios sobre el uso de materiales copoliméricos para fármacos oftálmicos, siendo particularmente dignos de mención los intentos por incorporar fármacos hidrófobos en el núcleo hidrófobo de las micelas de copolímero. La eficacia farmacéutica de estas formulaciones depende de la naturaleza y las propiedades específicas de los materiales copoliméricos y del compuesto usado. Además, el largo tiempo de residencia y la liberación sostenida del fármaco en la superficie de la córnea no se logrado con otras formulaciones biocompatibles.

Uso neuronal

Al contrario del conocimiento tradicional de la inducción neuronal, la divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento inesperado de que los mecanismos que inician y mantienen la angiogénesis son promotores y sostenedores eficaces de la neurogénesis. Estos métodos y composiciones son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de la lesión de las neuronas motoras y la neuropatía en los traumatismos, las lesiones y los trastornos neuronales. Se desvela el uso de diversas estrategias proangiogénicas solas o en combinación con el factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. Los factores proangiogénicos incluyen análogos poliméricos de la hormona tiroidea como los ilustrados en el presente documento. Los análogos poliméricos de la hormona tiroidea y sus conjugados poliméricos solos o en combinación con otros factores de crecimiento proangiogénicos conocidos en la técnica y con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se pueden combinar para obtener una neurogénesis óptima.

Se desvelan métodos de tratamiento terapéutico, composiciones y dispositivos para mantener las vías neuronales en un mamífero, incluyendo la mejora de la supervivencia de las neuronas en riesgo de morir, la inducción de la reparación celular de neuronas y vías neuronales dañadas, y la estimulación de las neuronas para mantener su fenotipo diferenciado. Además, una composición que contiene análogos poliméricos de la hormona tiroidea y combinaciones de los mismos, en presencia de agentes antioxidantes y/o antiinflamatorios, demuestra la regeneración y protección neuronal.

La divulgación también proporciona hormonas tiroideas, análogos y conjugaciones poliméricas, solas o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, para mejorar la supervivencia de las neuronas y mantener las vías neuronales. Como se describe en el presente documento, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos son capaces de mejorar la supervivencia de las neuronas, estimular la expresión neuronal de CAM, mantener la expresión fenotípica de las neuronas diferenciadas, inducir la rediferenciación de células transformadas de origen neuronal y estimular el crecimiento axonal durante los descansos de los procesos neuronales, particularmente las grandes lagunas en los axones. Los morfógenos también protegen contra la destrucción del tejido asociada al daño

del tejido nervioso relacionado con el sistema inmune. Por último, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se pueden usar como parte de un método de control de la viabilidad del tejido nervioso en un mamífero.

La divulgación también proporciona efectos de las hormonas tiroideas poliméricas sobre la formación sináptica entre neuronas corticales de rata cultivadas, usando un sistema para estimar la formación sináptica funcional *in vitro*. La exposición a hormonas tiroideas poliméricas 10^{-9} M, 3,5,3'-triyodotironina o tiroxina generó un aumento en la frecuencia de los cambios oscilatorios sincrónicos espontáneos a la concentración de calcio intracelular, que se correlacionaba con el número de sinapsis formadas. La detección de la proteína asociada a la vesícula sináptica, la sinapsina I, mediante análisis inmunocitoquímico y de inmunotransferencia también confirmó que la exposición a la tiroxina facilitó la formación sináptica. La presencia de amiodarona, un inhibidor de la 5'-desyodinasas, o amitrol, un herbicida, inhibió la formación sináptica en presencia de tiroxina. Así pues, la divulgación también proporciona un sistema de ensayo *in vitro* útil para la detección de diversos productos químicos que pudieran interferir en la formación sináptica en el SNC en desarrollo mediante la interrupción del sistema tiroideo polimérico.

Como cuestión general, los métodos de la divulgación se pueden aplicar al tratamiento de cualquier sujeto mamífero en riesgo de o afectado por una lesión del tejido neuronal o neuropatía. La divulgación es adecuada para el tratamiento de cualquier primate, preferentemente un primate superior tal como un ser humano. Además, sin embargo, la divulgación se puede emplear en el tratamiento de mamíferos domesticados que se mantienen como animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, caballos), que tienen un importante valor comercial (por ejemplo, cabras, cerdos, ovejas, ganado, animales deportivos o de tiro), que tienen un importante valor científico (por ejemplo, los ejemplares cautivos o libres de especies en peligro de extinción, o cepas de animales endogámicas o creadas por ingeniería genética) o que sean valiosos por otra causa.

Los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento mejoran la supervivencia celular, particularmente de las células neuronales en riesgo de morir. Por ejemplo, las neuronas completamente diferenciadas son no mitóticas y mueren *in vitro* cuando se cultivan en condiciones de cultivo de células de mamífero convencionales, usando un medio químicamente definido o bajo en suero conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Charness, *J. Biol. Chem.* 26:3164-3169 (1986) y Freese, *et al., Brain Res.* 521: 254-264 (1990). Sin embargo, si se trata un cultivo primario de células neuronales no mitóticas con análogo polimérico tiroideo solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, se mejora significativamente la supervivencia de estas células. Por ejemplo, se preparó un cultivo primario de ganglios basales estriales aislados de la sustancia negra del cerebro de rata adulta usando procedimientos convencionales, por ejemplo, mediante disociación por trituración con una pipeta Pasteur del tejido de sustancia negra, usando protocolos de cultivo de tejido convencionales, y se cultivó en un medio bajo en suero, por ejemplo, que contenía DMEM al 50 % (medio de Eagle modificado por Dulbecco), medio F-12 al 50 %, suero de caballo inactivado por calor suplementado con penicilina/estreptomicina y 4 g/l de glucosa. En condiciones convencionales de cultivo, estas células experimentan una importante muerte celular a las tres semanas, cuando se cultivan en un medio exento de suero. La muerte celular se evidencia morfológicamente por la incapacidad de las células para permanecer adheridas y por los cambios en sus características ultraestructurales, por ejemplo, por la formación de grumos de cromatina y la desintegración de los orgánulos. En concreto, las células permanecieron adheridas y siguieron manteniendo la morfología de las neuronas diferenciadas viables. En ausencia de análogo tiroideo solo o en combinación con el tratamiento con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, la mayoría de las células cultivadas se disociaron y sufrieron necrosis celular.

Las disfunciones en los ganglios basales de la sustancia negra están asociadas con la corea de Huntington y el parkinsonismo *in vivo*. La capacidad de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos definidos en el presente documento para aumentar la supervivencia de las neuronas indica que estos análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos serán útiles como parte de una terapia para mejorar la supervivencia de las células neuronales en riesgo de morir *in vivo* debido, por ejemplo, a una neuropatía, o un traumatismo químico o mecánico. La divulgación ofrece, además, que estos análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos proporcionen un agente terapéutico útil para tratar neuropatías que afecten a los ganglios basales estriales, incluyendo la corea de Huntington y la enfermedad de Parkinson. Para las aplicaciones clínicas, se pueden administrar los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o, como alternativa, se puede administrar un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otro agente estimulante de factores neurogénicos.

Los compuestos de hormona tiroidea descritos en el presente documento también se pueden usar para la protección del tejido nervioso de un traumatismo químico. La capacidad de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento para aumentar la supervivencia de las células neuronales e inducir la agregación celular y la adhesión célula-célula en las células rediferenciadas indica que los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos serán útiles como agentes

terapéuticos para mantener las vías neuronales, protegiendo las células que definen la vía de los daños causados por un traumatismo químico. En particular, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden proteger a las neuronas, incluyendo las neuronas en desarrollo, de los efectos de las toxinas que se sabe que inhiben la proliferación y la migración de las neuronas y que interfieren en la adhesión célula-célula. Los ejemplos de dichas toxinas incluyen etanol, una o más de las toxinas presentes en el humo del cigarrillo y varios opiáceos. Los efectos tóxicos del etanol sobre las neuronas en desarrollo induce el daño neurológico que se manifiesta en el síndrome del alcoholismo fetal. Los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos también pueden proteger a las neuronas de los efectos citotóxicos asociados con aminoácidos excitatorios tales como el glutamato.

Por ejemplo, el etanol inhibe los efectos de adhesión de célula-célula inducidos en células NG108-15 tratadas con análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con el factor de crecimiento nervioso u otros factores cuando se proporciona a estas células a una concentración de 25-50 mM. La mitad de la inhibición máxima se puede lograr con etanol 5-10 mM, la concentración de alcohol en sangre en un adulto tras la ingestión de una sola bebida alcohólica. El etanol probablemente interfiere en la unión homófila de las CAM entre las células, en vez de su inducción, pues los niveles de N-CAM inducidos por el análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos no se ven afectados por el etanol. Por otra parte, el efecto inhibitor es inversamente proporcional a la concentración de análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. Por consiguiente, se prevé que la administración de un análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con agente estimulante de factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos a las neuronas, particularmente a las neuronas en desarrollo, en riesgo de daño por exposición a toxinas tales como el etanol, puede proteger a estas células del daño del tejido nervioso superando los efectos inhibidores de la toxina. El análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con el factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento también son útiles en terapias para tratar las vías neuronales dañadas como resultado de una neuropatía inducida por la exposición a estas toxinas.

Las actividades *in vivo* de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento también se evalúan fácilmente en un modelo animal como se describe en el presente documento. Un animal adecuado, preferentemente aquel que presenta daño en el tejido nervioso, por ejemplo, inducido genética o ambientalmente, recibe por inyección intracerebral una cantidad eficaz de un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos en una formulación terapéutica adecuada, tal como solución salina tamponada con fosfato, pH 7. Los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se inyectan preferentemente en la zona de las neuronas afectadas. El tejido afectado se extirpa en un punto temporal posterior, y se evalúa el tejido morfológicamente y/o mediante la evaluación de un marcador bioquímico adecuado (por ejemplo, mediante la localización de análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o N-CAM); o midiendo el efecto dependiente de la dosis sobre un marcador bioquímico de la actividad neurotrófica del SNC o daño en el tejido del SNC, usando, por ejemplo, proteína ácida fibrilar glial como marcador. La dosis y el tiempo de incubación variarán con el animal que se vaya a ensayar. Los intervalos de dosificación adecuados para las diferentes especies se pueden determinar mediante su comparación con modelos animales establecidos. A continuación, se presenta un protocolo ilustrativo para un modelo de punzada de cerebro de rata.

En resumen, se anestesian ratas Long Evans macho, obtenidas de fuentes comerciales convencionales, y se prepara la zona de la cabeza para la cirugía. Se dejan los calvarios al descubierto usando procedimientos quirúrgicos convencionales y se perfora un orificio hacia el centro de cada lóbulo usando un alambre de 0,035 K, perforando justo los calvarios. Entonces, se proporcionan 25 ml de soluciones que contienen bien análogo polimérico tiroideo solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos (por ejemplo, OP-1, 25 mg) o PBS a cada uno de los orificios con una jeringa Hamilton. Las soluciones se administran a una profundidad de aproximadamente 3 mm por debajo de la superficie, en la corteza subyacente, el cuerpo calloso y el hipocampo. A continuación, se sutura la piel y se deja que el animal se recupere.

Tres días después de la cirugía, se sacrifican las ratas por decapitación y se procesan los cerebros para el seccionamiento. Se evalúa la formación de tejido cicatricial por tinción de inmunofluorescencia para la proteína ácida fibrilar glial, una proteína marcadora de la cicatrización glial, para determinar cualitativamente el grado de formación de cicatrices. Los anticuerpos de proteína ácida fibrilar glial están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. Las secciones también se probaron con anticuerpos anti-OP-1 para determinar la presencia de OP-1. Se prevén niveles reducidos de proteína ácida fibrilar glial en las secciones de tejido de animales tratados con el análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, evidenciando la capacidad del análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos para inhibir la formación de cicatriz glial y estimular la regeneración del nervio.

Formación de imágenes cerebrales, diagnóstico y terapias de enfermedades neurodegenerativas

La divulgación se refiere a nuevos compuestos farmacéuticos y radiofármacos útiles para el diagnóstico precoz, la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. La divulgación también incluye nuevos compuestos químicos que tienen unión específica en un sistema biológico y que se pueden usar para la tomografía por emisión de positrones (PET), métodos de formación de imágenes por emisión de fotón único (SPECT) y métodos de formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). La capacidad de T₄ y otros análogos de la hormona tiroidea para unirse a ligandos localizados dentro del organismo hace posible la utilización de dichos compuestos en la formación de imágenes *in situ* de los ligandos por PET, SPECT, MRI y métodos de formación de imágenes similares. En principio, no es necesario saber nada acerca de la naturaleza del ligando, siempre y cuando se produzca la unión, y dicha unión sea específica de una clase de células, órganos, tejidos o receptores de interés.

La formación de imágenes por PET se realiza con ayuda de compuestos indicadores marcados con un isótopo emisor de positrones (Goodman, M. M. "Clinical Positron Emission Tomography", Mosby Yearbook, 1992, K. F. Hubner *et al.*, Capítulo 14). Para la mayoría de materiales biológicos, son pocos los isótopos adecuados. El isótopo de carbono, ¹¹C, se ha usado para la PET, pero su corta semivida, de 20,5 minutos, limita su utilidad a los compuestos que se pueden sintetizar y purificar rápidamente, y a las instalaciones que están próximas a un ciclotrón, donde se genera el material de partida de C¹¹ precursor. Otros isótopos tienen semividas incluso más cortas. N¹³ tiene una semivida de 10 minutos y O¹⁵ tiene una semivida todavía más corta, de 2 minutos. Las emisiones de ambos son más energéticas que las de C¹¹. Sin embargo, se han llevado a cabo estudios de PET con estos isótopos (Hubner, K. F., en "Clinical Positron Emission Tomography", Mosby Year Book, 1992, K. F. Hubner, *et al.*, Capítulo 2). Un isótopo más útil, ¹⁸F, tiene una semivida de 110 minutos. Esto permite tiempo suficiente para la incorporación en un indicador radiomarcado, para la purificación y para la administración a un sujeto humano o animal. Además, las instalaciones más alejadas de un ciclotrón, hasta las situadas en un radio de aproximadamente 322 Km (aproximadamente 200 millas), pueden hacer uso de compuestos marcados con ¹⁸F. Las desventajas de ¹⁸F son la relativa escasez de los análogos fluorados que tienen equivalencia funcional con los materiales biológicos de origen natural, y la dificultad de diseñar métodos de síntesis que utilicen eficazmente el material de partida generado en el ciclotrón. Dicho material de partida puede ser bien ión fluoruro o flúor gaseoso. En este último caso, solo un átomo de flúor del gas bimolecular es en realidad un radionúclido, por lo que el gas se designa F-F¹⁸. Las reacciones que usan F-F¹⁸ como material de partida generan, por lo tanto, productos que solo tienen la mitad de abundancia de radionúclidos de las reacciones que utilizan K. F¹⁸ como material de partida. Por otro lado, F¹⁸ se puede preparar en cantidades de curies como ión fluoruro para la incorporación a un compuesto radiofarmacéutico en actividad muy específica, teóricamente 1,7 Ci/nmol usando reacciones de sustitución nucleófila sin vehículo. La emisión de energía de F¹⁸ es de 0,635 MeV, lo que resulta en un intervalo de positrones medio relativamente corto, de 2,4 mm, que permite imágenes de PET de alta resolución.

La formación de imágenes por SPECT emplea indicadores isotópicos que emiten fotones de alta energía (emisores γ). La gama de isótopos útiles es mayor que para PET, pero SPECT proporciona una resolución tridimensional inferior. Sin embargo, SPECT se usa ampliamente para obtener información clínicamente significativa acerca de la unión, la localización y las velocidades de aclaramiento de los análogos. Un isótopo útil para la formación de imágenes por SPECT es el emisor α - γ I¹²³, con una semivida de 13,3 horas. Los compuestos marcados con I¹²³ se pueden enviar hasta aproximadamente 1.600 Km (aprox. 1000 millas) de la planta de fabricación, o el propio isótopo se puede transportar para la síntesis *in situ*. El ochenta y cinco por ciento de las emisiones de los isótopos son fotones de 159 KeV, que se miden fácilmente con la instrumentación de SPECT que está actualmente en uso. Los compuestos de la divulgación se pueden marcar con tecnecio. El Tecnecio-99m se conoce como un radionúclido útil para la formación de imágenes por SPECT. Los análogos de T₄ de la divulgación se unen a un grupo de metales de Tc-99m a través de una cadena de 4-6 carbonos que puede estar saturada o poseer un enlace doble o triple.

El uso de compuestos marcados con F¹⁸ en PET se ha limitado a unos cuantos compuestos análogos. Más notablemente, la fluorodesoxiglucosa marcada con ¹⁸F se ha usado ampliamente en estudios de metabolismo de la glucosa y de localización de la captación de glucosa asociada con la actividad cerebral. También se han usado la L-fluorodopa marcada con ¹⁸F y otros análogos de receptores de la dopamina en la cartografía de la distribución de los receptores de la dopamina.

Otros isótopos de halógeno pueden servir para la formación de imágenes por PET o SPECT o para el marcaje con indicadores convencionales. Estos incluyen ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br y ⁸²Br como aquellos que tienen semividas y características de emisión útiles. En general, existen medios químicos para sustituir cualquier resto de halógeno para los isótopos descritos. Por lo tanto, las actividades bioquímicas o fisiológicas de cualquier homólogo halogenado de los compuestos descritos se encuentran ahora disponibles para su uso por los expertos en la materia, incluyendo el homólogo halogenado de isótopo estable. La astatina se puede sustituir con otros isotipos de halógeno. ²¹⁰At, por ejemplo, emite partículas α con una semivida de 8,3 h. Otros isótopos también emiten partículas α con semividas razonablemente útiles. Por lo tanto, los compuestos sustituidos con At son útiles para la terapia cerebral, donde la unión es suficientemente específica del cerebro.

Numerosos estudios han demostrado una mayor incorporación de los hidratos de carbono y los aminoácidos a las células cerebrales malignas. Esta acumulación está asociada con la proliferación acelerada y la síntesis de proteínas de dichas células. El análogo de glucosa ^{18}F -2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (2-FDG) se ha usado para distinguir cerebros altamente malignos de tejido cerebral normal o crecimientos benignos (DiChiro, G. *et al.* (1982) *Neurology* (NY) 32:1323-1329). Sin embargo, la 2-FDG marcada con ^{18}F no es el agente de elección para la detección de cerebros con bajo grado, porque la alta absorción en el tejido normal puede enmascarar la presencia de un cerebro. Además, la 2-FDG marcada con ^{18}F no es el radiofármaco ideal para distinguir los cerebros y pulmones de tejido infeccioso o detectar el carcinoma de ovario debido a la alta absorción de la radiactividad de 2-FDG en el tejido infeccioso y en la vejiga, respectivamente. El aminoácido metionina de origen natural, marcado con carbono-11, también se ha usado para distinguir el tejido maligno del tejido normal. Pero también tiene absorción relativamente alta en el tejido normal. Por otra parte, la semivida del carbono-11 es solo de 20 minutos; por lo que la metionina marcada con carbono-11 no se puede almacenar durante un largo período de tiempo.

La transtiretina ("TTR") del líquido cefalorraquídeo ("LCR"), la principal proteína portadora de tiroxina (T_4) del LCF en la rata y en el ser humano, se sintetiza en el plexo coroides ("PC"). Tras la inyección de ^{125}I - T_4 en la rata, la T_4 radiactiva se acumula primero en el PC, a continuación, en el LCF y, más tarde, en el cerebro (Chanoine J. P., Braverman L. E., "The role of transthyretin in the transport of thyroid hormone to cerebrospinal fluid and brain". *Acta Med Austriaca*. 1992; 19 Supl. 1:25-8).

Los compuestos de la divulgación mejoran sustancialmente la formación de imágenes por PET para las partes del cuerpo que tienen proteína amiloide, especialmente del cerebro. Todos los isótopos emisores de positrones disponibles que se podrían incorporar a un compuesto biológicamente activo tienen una semivida corta. La utilidad práctica de dichos compuestos marcados depende, por tanto, de lo rápido que se pueda sintetizar el compuesto marcado, del rendimiento sintético y de la pureza radioquímica del producto final. Incluso el tiempo de envío desde la fuente de los isótopos, una instalación de ciclotrón, al hospital o laboratorio donde se vaya a llevar a cabo la formación de imágenes por PET, es limitado. Un cálculo aproximado de la distancia útil es de aproximadamente 3 kilómetros (aprox. dos millas) por minuto de semivida. Así pues, el C^{11} , con una semivida de 20,5 min, se limita a un radio de aproximadamente 65 kilómetros (40 millas) de su fuente, mientras que los compuestos marcados con F^{18} se pueden usar en un radio de aproximadamente 322 kilómetros (aprox. 200 millas). Otros requisitos de un compuesto marcado con ^{18}F son que tienen la especificidad de unión para la molécula receptora o diana que se pretende unir, que la unión inespecífica a otras dianas es suficientemente baja para permitir distinguir entre la unión con la diana y la unión con una molécula no diana; y que el marcador es estable en las condiciones del ensayo para evitar el intercambio con otras sustancias en el entorno del ensayo. Más particularmente, los compuestos de la divulgación deben mostrar una unión adecuada con la diana deseada, al tiempo que no se unen en ningún grado comparable con otros tejidos o células.

Una solución parcial a los estrictos requisitos de la formación de imágenes por PET es emplear isótopos de emisión γ en la formación de imágenes por SPECT. I^{123} es un marcador isotópico comúnmente usado para SPECT, que tiene una semivida de 13 horas para un intervalo útil de más de 1.600 kilómetros (1.000 millas) desde el lugar de la síntesis. Los compuestos de la divulgación se pueden marcar rápida y eficazmente con I^{123} para su uso en el análisis de SPECT como una alternativa a la formación de imágenes por PET. Además, dado que el mismo compuesto se puede marcar con cualquier isótopo, por primera vez, es posible comparar los resultados obtenidos por PET y por SPECT usando el mismo indicador.

La especificidad de la unión al cerebro también proporciona utilidad para los compuestos sustituidos con I de la divulgación. Dichos compuestos se pueden marcar con ^{123}I de corta duración para la formación de imágenes por SPECT o con ^{125}I de mayor duración para los estudios a más largo plazo, tales como el seguimiento de un curso terapéutico. Otros isótopos de yodo y bromo se pueden sustituir con los ejemplificados.

En general, los agentes radiactivos de formación de imágenes de la divulgación se preparan mediante la reacción de derivados de 4-halobencilo radiactivos con derivados de piperazina. Se prefieren los derivados de 4-fluorobencilo marcados con F^{18} para la formación de imágenes por PET. Un método general para la preparación de haluros de 4-fluorobencilo marcados con F^{18} se describe en Iwata *et al.*, "Applied Radiation and Isotopes" (2000), vol. 52, pág. 87-92.

Para la tomografía computarizada de emisión de fotón único ("SPECT"), se prefieren los compuestos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Una ruta sintética general para estos compuestos se inicia con análogos de la HT no radiactivos de la divulgación que se hacen reaccionar con quelantes de unión a $^{99\text{m}}\text{Tc}$, por ejemplo, quelantes de N_2S_2 . La síntesis de los quelantes sigue procedimientos convencionales, por ejemplo, los procedimientos descritos en A. Mahmood *et al.*, "A N_2S_2 -Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine", (1999), Vol. 5, pág. 71; o en Z. P. Zhuang *et al.*, "Bioconjugate Chemistry" (1999), Vol. 10, pág. 159.

Uno de los quelantes bien se une directamente al nitrógeno del grupo $-\text{N}(\text{R}^4)\text{R}^5$ de los compuestos no radiactivos de los análogos de HT de la presente invención, o a través de un resto enlazador que comprende un radical alquilo que tiene de uno a diez átomos de carbono, en el que el radical alquilo contiene opcionalmente de uno a diez grupos $-\text{C}(\text{O})-$, de uno a diez grupos $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})-$, de uno a diez grupos $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})-$, de uno a diez grupos $-\text{N}(\text{R})-$, de

uno a diez grupos --N(R)₂, de uno a diez grupos hidroxilo, de uno a diez grupos --C(O)OR--, de uno a diez átomos de oxígeno, de uno a diez átomos de azufre, de uno a diez átomos de nitrógeno, de uno a diez átomos de halógeno, de uno a diez grupos arilo y de uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados, en los que R es hidrógeno o alquilo. Un resto enlazador preferido es --C(O)--CH₂--N(H)--.

Por lo tanto, los compuestos de la divulgación proporcionan métodos mejorados para la formación de imágenes del cerebro usando PET y SPECT. Los métodos implican la administración a un sujeto (que puede ser un ser humano o un animal, para fines de diagnóstico y/o experimentales) de una cantidad generadora de imágenes de un compuesto de la divulgación, marcado con el isótopo apropiado y luego la medición de la distribución del compuesto por PET si se emplea F¹⁸ u otro emisor de positrones, o SPECT si se emplea I¹²³ u otro emisor γ . Una cantidad generadora de imágenes es la cantidad que al menos sea capaz de proporcionar una imagen en un escáner de PET o SPECT, teniendo en cuenta la sensibilidad de detección y el nivel de ruido del escáner, la edad del isótopo, el tamaño corporal del sujeto y la vía de administración, siendo todas estas variables ilustrativas de las conocidas y explicadas por los cálculos y las mediciones conocidas por los expertos en la materia sin necesidad de recurrir a la experimentación.

Se entenderá que los compuestos de la divulgación se pueden marcar con un isótopo de cualquier átomo o combinación de átomos en la estructura. Aunque, en el presente documento, se ha hecho hincapié en F¹⁸, I¹²³ e I¹²⁵ por ser particularmente útiles para el análisis de PET, de SPECT y de indicadores, se contemplan otros usos incluyendo los derivados de las propiedades fisiológicas o farmacológicas del homólogo de isótopo estable, y serán evidente para los expertos en la materia.

La divulgación también proporciona el marcaje con tecnecio (Tc) a través aductos de Tc. Los isótopos de Tc, en concreto, el Tc^{99m}, se han usado para la formación de imágenes del cerebro. La divulgación proporciona aductos complejados con Tc de compuestos de la invención, que son útiles para la formación de imágenes del cerebro. Los aductos son complejos de coordinación de Tc unidos al aminoácido cíclico por una cadena de 4-6 carbonos que puede estar saturada o poseer un enlace doble o triple. Cuando hay un enlace doble presente, se pueden sintetizar isómeros bien *E* (*trans*) o *Z* (*cis*), pudiéndose emplear cualquiera de los isómeros. La síntesis se describe para incorporar el isótopo ^{99m}Tc como última etapa, para maximizar la vida útil del isótopo.

Los siguientes métodos se emplearon en los procedimientos presentados en el presente documento. Se produjo ¹⁸F-fluoruro a partir de un ciclotrón Seimens usando la reacción ¹⁸O (p,n) ¹⁸F con protones de 11 MeV en agua con ¹⁸O enriquecido al 95 %. Todos los disolventes y productos químicos fueron de grado analítico y se usaron sin purificación adicional. Se determinaron los puntos de fusión de los compuestos en tubos capilares mediante el uso de un aparato Buchi SP. El análisis de cromatografía en capa fina (TLC) se realizó mediante el uso de capas gruesas de 250 mm de gel de sílice G PF-254 recubriendo aluminio (obtenido de Analtech, Inc.). La cromatografía en columna se realizó usando gel de sílice de malla 60-200 (Aldrich Co.). Se registraron los espectros infrarrojos (IR) en un espectrofotómetro Beckman 18A con placas de NaCl. Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN de ¹H) se obtuvieron a 300 MHz con un instrumento Nicolet de alta resolución.

En otro aspecto, la divulgación se dirige a un método de uso de un compuesto de la invención para la fabricación de un producto radiofarmacéutico para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano. En otro aspecto, la divulgación se dirige a un método de preparación de los compuestos de la divulgación.

Los compuestos de la divulgación descritos en el presente documento son los análogos de la hormona tiroidea u otros ligandos de unión de TTR, que se unen a TTR y tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, los compuestos son adecuados como agentes de diagnóstico *in vivo* para la formación de imágenes de la enfermedad de Alzheimer. La detección de la radiactividad se realiza de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, ya sea mediante el uso de una cámara γ o por tomografía de emisión de positrones (PET).

Preferentemente, la base libre o una forma de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal monoclóruo o dicloruro, de un compuesto de la divulgación se usa en una formulación galénica como agente de diagnóstico. La formulación galénica que contiene el compuesto de la divulgación contiene opcionalmente adyuvantes conocidos en la técnica, por ejemplo, tampones, cloruro sódico, ácido láctico, tensioactivos etc. Es posible realizar una esterilización por filtración de la formulación galénica en condiciones estériles antes de su uso.

La dosis radiactiva debería estar en el intervalo de 1 a 100 mCi, preferentemente de 5 a 30 mCi y lo más preferentemente de 5 a 20 mCi por aplicación. Las composiciones de HT del alcance de la divulgación se pueden usar como agentes de diagnóstico en la tomografía por emisión de positrones (PET).

Los compuestos de la divulgación se pueden administrar por cualquier vía adecuada, preferentemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha vía, y a una dosis eficaz para unirse a TTR en el cerebro y, por lo tanto, ser detectados por la cámara γ o PET. Por lo general, la administración es parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o intramuscular. Se prefiere la administración intravenosa. Así pues, por ejemplo, la divulgación proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden una solución de medios de contraste disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, por ejemplo, suero o solución

fisiológica de cloruro sódico.

Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares, se describen, por ejemplo, en REMMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, XV Ed. Easton: Mack Publishing Co., pág. 1405-1412 y 1461-1487 (1975); y THE NATIONAL FORMULARY XIV., XIV Ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). Se prefieren los vehículos acuosos.

La composición farmacéutica de la presente divulgación se produce de una manera conocida en sí mediante la suspensión o disolución de los compuestos de la presente invención (opcionalmente combinados con los aditivos habituales en la farmacia galénica) en un medio acuoso y, a continuación, opcionalmente, la esterilización de la suspensión o solución. Los aditivos adecuados son, por ejemplo, tampones fisiológicamente aceptables (tales como, por ejemplo, trometamina), adiciones de compuestos formadores de complejos (por ejemplo, ácido dietilentriaminopentaacético) o, si son necesarios, electrolitos, por ejemplo, cloruro de sodio o, si son necesarios, antioxidantes tales como, por ejemplo, ácido ascórbico.

Si se desean suspensiones o soluciones de los compuestos de la presente divulgación en agua o solución salina fisiológica para la administración enteral o para otros fines, se mezclan con uno o varios de los agentes auxiliares (por ejemplo, metilcelulosa, lactosa, manitol) y/o agentes tensioactivos (por ejemplo, lecitinas, "Tween", "Myrj") y/o agentes aromatizantes para mejorar el sabor (por ejemplo, aceites etéreos), como es habitual en la farmacia galénica.

Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o se pueden filtrar de forma estéril. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como están, o liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables si se requieren para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Para los compuestos de acuerdo con la divulgación que tienen halógenos radiactivos, estos compuestos se pueden enviar como compuestos "calientes", es decir, con el halógeno radiactivo en el compuesto y administrarse, por ejemplo, en una solución salina fisiológicamente aceptable. En el caso de los complejos metálicos, estos compuestos se pueden enviar como compuestos "fríos", es decir, sin el ión radiactivo, y luego mezclarse con eluato generador de Tc o con eluato generador Re.

Inhibición de la angiogénesis

La divulgación también proporciona, en otra parte, composiciones y métodos para inhibir la angiogénesis en un sujeto en necesidad de ello. Las afecciones susceptibles de tratamiento mediante la inhibición de la angiogénesis incluyen, por ejemplo, tumores primarios o metastásicos y retinopatía diabética. Las composiciones pueden incluir una cantidad eficaz de ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), ácido triyodotiroacético (TRIAC), anticuerpo monoclonal LM609 o combinaciones de los mismos. Dichos agentes antiangiogénicos pueden actuar en la superficie celular para inhibir los agentes proangiogénicos. Las composiciones pueden estar en forma de una formulación farmacéutica inyectable, estéril, que incluye una cantidad eficaz contra la angiogénesis de una sustancia antiangiogénica en un vehículo fisiológica y farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con uno o más excipientes.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona métodos para tratar una afección susceptible de tratamiento mediante la inhibición de la angiogénesis a través de la administración a un sujeto en necesidad de ello de una cantidad de un agente antiangiogénico eficaz para inhibir la angiogénesis. Las composiciones de la divulgación se pueden usar para inhibir la angiogénesis asociada con los cánceres, incluyendo el de cabeza y cuello, glioma, piel, pulmón, mama y tiroides. Los antagonistas de la hormona tiroidea, como el TETRAC, se pueden administrar como conjugados poliméricos o como nanopartículas.

Naturaleza de las acciones celulares de TETRAC que se inician en la membrana plasmática:

Actuando en el receptor de la membrana plasmática de la hormona tiroidea, el TETRAC inhibe los efectos proangiogénicos de T_4 y T_3 en ensayos convencionales de neovascularización (membrana corioalantoidea de pollo, células endoteliales microvasculares dérmicas humanas). El TETRAC bloquea la acción de los análogos de la hormona tiroidea agonistas (T_4 , T_3) en el crecimiento de las células cancerosas humanas y de animales *in vitro*, así como en determinados modelos *in vivo*. Entre los modelos de células cancerosas humanas cuya proliferación es inhibida por TETRAC están el cáncer de mama y el cáncer de pulmón. Entre las células tumorales de animales están las células de glioma que son modelos para el cáncer de cerebro humano, tales como glioma/glioblastoma.

Acción de TETRAC iniciada en la membrana plasmática en ausencia de análogos de la hormona tiroidea agonistas:

La proximidad del sitio receptor de la hormona al sitio RGD de la integrina subyace a la capacidad de TETRAC, en ausencia de agonistas de la hormona, tales como T_4 y T_3 , para bloquear las actividades proangiogénicas de factores polipeptídicos de crecimiento endotelial tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

TETRAC para inducir la apoptosis en células de glioma y de cáncer de tiroides

Las figuras presentadas más adelante demuestran que TETRAC es capaz de inducir la apoptosis en células de glioma C6 y en células de cáncer de tiroides (BHP 2-7). Por lo tanto, al menos parte de la reducción en la proliferación de las células cancerosas cuando se exponen a TETRAC es muerte celular programada (apoptosis). Cuando se detiene la proliferación en los estudios de las células cancerosas, la cuestión es si las células sobreviven en un modo de detención del ciclo celular o si mueren. La muerte celular es más deseable que la detención del ciclo celular.

TETRAC para agentes virales

El TETRAC se puede usar para el tratamiento de agentes virales tales como el virus del Nilo Occidental, VIH, citomegalovirus (CMV), adenovirus y otros agentes virales. Ciertos agentes virales tales como el Virus del Nilo Occidental, cuya entrada en la célula depende de la integrina $\alpha V\beta 3$ a través del sitio de unión RGD, se pueden tratar con TETRAC. El mecanismo de acción propuesto es que el monómero αV migra hacia el núcleo de la célula y que esta es la vía de entrada de muchos virus para entrar en las células. El TETRAC se puede usar para el tratamiento de agentes virales, ya que puede bloquear la entrada de los virus en las células, mediante la unión al sitio de unión de la integrina $\alpha V\beta 3$.

TETRAC para el cáncer de pulmón humano

El efecto de la hormona tiroidea/TETRAC implica el receptor de estrógeno (ER) en células humanas de carcinoma de pulmón tanto pequeñas como no pequeñas. La L-tiroxina (T_4) y la 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T_3) provocan la proliferación de líneas humanas de carcinoma de pulmón de células pequeñas y de células no pequeñas, y lo hace a través de un mecanismo que requiere la presencia en las células tumorales del receptor de estrógenos α ($ER\alpha$). El ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) es una sonda para la participación del receptor de la superficie celular para la hormona tiroidea en la integrina $\alpha V\beta 3$ en las acciones celulares de T_4 y T_3 . TETRAC, ya sea libre o en forma de nanopartícula, bloquea esta acción proliferativa de T_4 y T_3 sobre las células de carcinoma de pulmón. Esto indica que el receptor de la superficie celular para la hormona tiroidea en la integrina $\alpha V\beta 3$ media los efectos de T_4 y T_3 . Los presentes inventores también han bloqueado las acciones proliferativas de T_4 y T_3 sobre las células del cáncer de pulmón con anti- αV y anti- $\beta 3$, y con el péptido RGD. Estas observaciones apoyan aún más el papel de los receptores de la integrina para la hormona tiroidea en la promoción por parte de T_4 y T_3 de la proliferación de las células de cáncer de pulmón.

El TETRAC, ya sea libre o en forma de nanopartícula, es una estrategia atractiva y novedosa para el tratamiento del carcinoma de pulmón humano. Además de su acción antiproliferativa, el TETRAC, ya sea libre o en forma de nanopartícula, es antiangiogénico, inhibiendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que da apoyo al crecimiento del carcinoma de pulmón. Por lo tanto, el TETRAC tiene al menos dos acciones diferenciadas que son relevantes para la inhibición del crecimiento del tumor de pulmón.

Entre las formulaciones nanoparticuladas de TETRAC están el TETRAC unido por enlace de éster o éter al ácido polilácidico (PLGA) o a colágeno u otras moléculas de tamaño suficiente para prohibir la entrada a la célula por parte del TETRAC. Estas formulaciones limitan las acciones de TETRAC al receptor de la superficie celular para la hormona tiroidea en la integrina $\alpha V\beta 3$.

Crecimiento de nuevos vasos sanguíneos relacionado con el cáncer:

Los ejemplos de las afecciones susceptibles de tratamiento mediante la inhibición de la angiogénesis incluyen tumores primarios o metastásicos, incluyendo el glioma y el cáncer de mama. En dicho método, los compuestos que inhiben el efecto angiogénico inducido por la hormona tiroidea se usan para inhibir la angiogénesis. Los detalles de dicho procedimiento se ilustran en el Ejemplo 12. También se pueden usar los antagonistas de la hormona tiroidea, tales como TETRAC, análogos, conjugados poliméricos y nanopartículas del mismo como un agente antiangiogénico para inhibir la angiopoeitina-2. Esta inhibición puede ayudar a prevenir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos relacionado con el cáncer, pues la angiopoeitina-2 desestabiliza los vasos sanguíneos de alrededor de los tumores, haciendo a estos vasos sanguíneos más susceptibles a la inducción de crecimientos por parte del VEGF.

Retinopatía diabética:

Los ejemplos de las afecciones susceptibles de tratamiento mediante la inhibición de la angiogénesis incluyen la retinopatía diabética y afecciones relacionadas. En dicho método, los compuestos que inhiben el efecto angiogénico inducido por la hormona tiroidea se usan para inhibir la angiogénesis. Los detalles de dicho método se ilustran en los Ejemplos 8A y B.

Se sabe que la retinopatía proliferativa inducida por la hipoxia (en lugar de la diabetes) depende de la expresión de la integrina αV (E Chavakis *et al.*, "Diabetology" 45:262-267, 2002). En el presente documento, se propone que la acción de la hormona tiroidea en una integrina específica $\alpha V\beta 3$ es permisiva en el desarrollo de la retinopatía diabética. La integrina $\alpha V\beta 3$ se identifica en el presente documento como el receptor de la superficie celular para la hormona tiroidea. La hormona tiroidea, sus análogos y conjugaciones poliméricas actúan a través de este receptor para inducir la angiogénesis.

Dermatología - Ácido tetrayodotiroacético en nanopartículas (TETRAC) para reducir el tamaño de las telangiectasias cutáneas y los angiomas:

Los antagonistas de la hormona tiroidea, tales como TETRAC, análogos, conjugados poliméricos y nanopartículas del mismo, también se pueden usar para tratar los trastornos cutáneos no cancerosos. Esta acción terapéutica y/o cosmética del TETRAC derivatizado se basa en su actividad antiangiogénica. Aplicado localmente en forma de pomada o crema a las telangiectasias cutáneas o los angiomas de araña, el TETRAC derivatizado se opondrá a las acciones proangiogénicas en las células endoteliales de la hormona tiroidea endógena (circulante) y de factores polipeptídicos de crecimiento vascular. Los efectos sistémicos del análogo de hormona aplicado localmente como un derivado de PLGA no serán relevantes. Para las telangiectasias o los angiomas de bajo grado, el TETRAC derivatizado puede estar disponible para su uso clínico en las preparaciones OTC.

Dado que el TETRAC se opone a la acción de agregación de plaquetas de la hormona tiroidea, el traumatismo del sitio de aplicación del TETRAC podría sufrir un sangrado local. Esto es un riesgo con las telangiectasias y los angiomas no tratados existentes. La reducción satisfactoria con la aplicación de TETRAC del tamaño de dichas lesiones vasculares reducirá, sin embargo, el riesgo de equimosis locales.

Las aplicaciones tópicas dermatológicas adicionales para los antagonistas tiroideos conjugados nanoparticulados incluyen poiquilodermia de Civate (exposición a largo plazo a la luz solar que conduce a neovascularización facial y dilatación de los vasos sanguíneos), acné o rosácea facial, psoriasis, solos o en combinación con análogos de vitamina D, y cáncer de piel.

Los agentes antiangiogénicos disponibles son demasiado caros para usarlos en las lesiones cutáneas específicas del presente documento. Además, puede que estos agentes sean inadecuados para la aplicación cutánea debido a que no son absorbidos a nivel local.

TETRAC para quimiosensibilizador contra el cáncer y como agente anticancerígeno

Los análogos de la hormona tiroidea de la divulgación, incluyendo TETRAC, TRIAC, análogos de TETRAC y TRIAC, conjugados poliméricos y nanoparticulados de los mismos, y otros antagonistas del receptor de la hormona tiroidea en la integrina $\alpha V\beta 3$ también se pueden usar como agentes quimiosensibilizadores contra el cáncer y agentes anticancerígenos. El TETRAC, el TRIAC, los análogos, los antagonistas tiroideos, y los conjugados poliméricos y nanoparticulados de los mismos inhiben el desarrollo de la resistencia a los fármacos, que es un factor causante de la recaída en la enfermedad. El TETRAC mejora la respuesta celular y revierte la resistencia a la doxorrubicina, el etopósido, el cisplatino y la tricostatina A en líneas celulares tumorales resistentes, derivadas de neuroblastomas, osteosarcomas y cáncer de mama.

Como se ha tratado anteriormente, las hormonas tiroideas desempeñan un papel clave en la progresión del cáncer. Además, en el presente documento, se ha demostrado que el TETRAC posee funciones anticancerígenas a través de su capacidad para inhibir la proliferación celular y la angiogénesis. Como se muestra detalladamente en el Ejemplo 31, el TETRAC también inhibe el desarrollo de la resistencia a fármacos, que es un factor causante de la recaída en la enfermedad. Como se muestra en el Ejemplo 31, el TETRAC aumentó la respuesta celular *in vitro* a la doxorrubicina, el etopósido, el cisplatino y la tricostatina A en líneas celulares tumorales resistentes derivadas de neuroblastomas, osteosarcomas y cáncer de mama. El mecanismo de acción del TETRAC no implicaba la expresión de genes con resistencia a fármacos clásicos. Sin embargo, la captación de la doxorrubicina radiomarcada en las células fue aumentada por el TETRAC, lo que sugiere la inhibición de uno o más mecanismos de exportación de agentes quimioterapéuticos. También se encontró que el TETRAC mejoró la susceptibilidad celular a la apoptosis y la senescencia, lo que sugiere que el agente puede dirigirse a múltiples mecanismos de resistencia a fármacos. Ya se había demostrado previamente que el TETRAC inhibe la proliferación de células tumorales *in vitro*. Estudios *in vivo* publicados en el presente documento revelaron que el TETRAC en una pauta de dosificación pulsada era eficaz en la supresión del crecimiento de un tumor de mama humano resistente a la doxorrubicina en el ratón atímico. En este paradigma, no se restableció la sensibilidad a la doxorrubicina, lo que indica que 1) la restauración *in vitro* de la

sensibilidad a fármacos por parte del TETRAC no se puede correlacionar con los fenómenos de resistencia *in vivo*; y 2) el TETRAC es un agente quimioterapéutico eficaz en las células resistentes a la doxorrubicina.

Una de las características notables de las células cancerosas es su capacidad de adaptación y, por lo tanto, de volverse resistentes a prácticamente cualquier tipo de estrés. Desde el punto de vista clínico, esto se considera la principal causa de fracaso en el tratamiento y de recaída en la enfermedad. Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de metodologías para prevenir y/o revertir el desarrollo de la resistencia a los fármacos. En los últimos años, se ha identificado una serie de candidatos a fármacos (la mayoría de los cuales son inhibidores de los canales iónicos) y, aunque la mayoría resultaron ser muy eficaces en la reversión de la resistencia a fármacos *in vitro*, fueron incapaces de actuar *in vivo*, a menudo debido a su alta toxicidad. En la búsqueda de nuevos reguladores de la resistencia a fármacos menos tóxicos, los presentes inventores han identificado el antagonista de la hormona tiroidea TETRAC como un agente prometedor que, a diferencia de otros agentes de inversión de la resistencia a fármacos descubiertos previamente, no tiene toxicidad detectable y ejerce una acción doble sobre el transporte de los fármacos y las vías de señalización que controlan la susceptibilidad celular a la detención de la proliferación inducida por fármacos y la muerte apoptótica. Esto, además de su efecto descrito anteriormente en la angiogénesis tumoral, convierte al TETRAC en un prometedor candidato a fármaco anticancerígeno.

El hallazgo inicial de que el TETRAC ejerce actividad antiproliferativa equivalente *in vitro* contra las células sensibles a fármacos y resistentes a fármacos (Figura 53) sugirió que este antagonista puede superar la resistencia a fármacos. Las respuestas celulares a la doxorrubicina, el etopósido, el cisplatino y TSA se mejoraron significativamente al combinar estos fármacos con TETRAC (Figura 54). Sin embargo, ya que los mecanismos implicados en la resistencia a estos agentes no son necesariamente similares, se sugiere que el TETRAC puede actuar mediante la regulación de más de una ruta de resistencia a fármacos. Para hacer frente a esta posibilidad, en el Ejemplo 31, los presentes inventores han estudiado el efecto de TETRAC sobre la expresión de P-glucoproteína, SOD y GST- π , y encontraron que ninguna expresión de estos genes se modificó significativamente (Figura 55). Otros han demostrado que la hormona tiroidea agonista puede aumentar la expresión de P-gp. El TETRAC a las concentraciones usadas ejerce su actividad antagonista hacia la hormona tiroidea principalmente en el receptor de la integrina y, por lo tanto, sus resultados indican que la expresión del gen P-gp no está modulada desde el receptor de la integrina de la superficie celular.

Sin embargo, el análisis del transporte de fármacos reveló que la acumulación intracelular de doxorrubicina radiomarcada aumentó significativamente en presencia de TETRAC en comparación con las células no tratadas (Figura 55C) y sugirió que TETRAC puede actuar como inhibidor de la actividad de P-gp. A la luz de la observación anterior de que las hormonas tiroideas son capaces de unirse a la integrina $\alpha V\beta 3$ y a P-gp, el hallazgo de que TETRAC inhibe su unión a las integrinas plantea la posibilidad de que TETRAC también pueda interferir en su unión a P-gp. Usando la misma lógica, TETRAC también puede competir con los fármacos por la unión de P-gp y, por tanto, afectar a la eficacia de este transportador. Independientemente del mecanismo, la conclusión de que la exportación de fármacos fue inhibida por TETRAC es de una importancia fundamental, ya que arroja luz sobre el papel fundamental de la homeostasis hormonal en la regulación de la respuesta del cáncer a la quimioterapia.

Aunque este hallazgo puede representar un avance significativo en la comprensión del mecanismo por el cual TETRAC invierte la resistencia a los fármacos, no explica por qué este antagonista aumenta la respuesta celular al cisplatino, un sustrato no p-gp (Figura 54). Dado que la acumulación de pruebas indica que la capacidad celular para someterse a la senescencia o la muerte apoptótica desempeña papeles clave en el resultado de la quimioterapia, los presentes inventores han ensayado en el Ejemplo 31 el efecto de TETRAC en las vías correspondientes. Como se muestra en la Figura 56, la capacidad celular para sufrir la detención de la proliferación inducida por la doxorrubicina (aumento de la expresión de p21/WAF1) y SA- β -Gal y la muerte celular (activación de la 3-caspasa y condensación de la cromatina) se mejoraron de manera espectacular tras la exposición a TETRAC, lo que sugiere que forzar a las células cancerosas a la senescencia o la apoptosis puede representar mecanismos adicionales mediante los cuales TETRAC invierte la resistencia a los fármacos.

En este sentido, los estudios preliminares han demostrado que el aumento de la expresión de genes proapoptóticos tales como *bad* y la *bax* se asociaron con el aumento de la respuesta a los agentes quimioterapéuticos en el cáncer de orígenes hematopoyéticos. Sin embargo, en la mayoría de los tumores sólidos, no se estableció una relación clara entre la apoptosis y la respuesta celular a la quimioterapia. Por el contrario, se ha descubierto recientemente que la capacidad celular de someterse a la senescencia se asocia con el resultado del tratamiento de estos tumores. Los presentes inventores han encontrado que el TETRAC regula ambos procesos, así como los mecanismos que regulan el transporte de fármacos; por lo tanto, este antagonista puede tener un amplio uso para el tratamiento de los cánceres agresivos de origen tanto hematopoyético como sólido. Un ejemplo de esto es proporcionado por los datos *in vivo* que demuestran que el TETRAC es eficaz en la supresión del crecimiento de tumores resistentes a los fármacos en ratones atímicos (Figura 57) sin ningún efecto tóxico notable. Estos hallazgos, además del hecho de que también TETRAC es capaz de suprimir la angiogénesis hacen de este antagonista hormonal una herramienta atractiva para el tratamiento de los cánceres agresivos.

La observación de que la resistencia a la doxorrubicina fue invertida *in vitro* por el TETRAC, pero que no restableció la sensibilidad a los fármacos en xenoinjertos merece varios comentarios. En primer lugar, la concentración de

TETRAC usada en los estudios de xenoinjerto es suficientemente alta (30 mg/kg x 3) para haberse obtenido la máxima respuesta tumoral. En segundo lugar, la incrustación de células en la matriz extracelular en los estudios de xenoinjertos proporciona un microambiente que es muy diferente al del cultivo celular, y la diferencia puede afectar a las bombas de MDR u otros factores que influyen en el tiempo de residencia intracelular de los agentes quimioterapéuticos. Será importante realizar estudios de concentración de TETRAC y doxorubicina para determinar si las concentraciones inferiores de TETRAC permitirán la detección de un efecto de la doxorubicina en las células previamente resistentes.

Métodos de tratamiento y formulaciones:

Los análogos, las formas poliméricas y los derivados de la hormona tiroidea se pueden usar en un método para promover la angiogénesis en un paciente en necesidad de ello. El método implica la administración conjunta de una cantidad eficaz de análogos, formas poliméricas y derivados de la hormona tiroidea a dosis bajas, todos los días durante una semana o más. El método se puede usar como tratamiento para restablecer la función cardíaca tras un infarto de miocardio. El método también se puede usar para mejorar el flujo sanguíneo en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria que padecen isquemia miocárdica o flujo sanguíneo inadecuado en zonas distintas del corazón, por ejemplo, enfermedad vascular periférica, por ejemplo, enfermedad oclusiva arterial periférica, donde la disminución del flujo sanguíneo es un problema.

Los compuestos se pueden administrar a través de cualquier medio médicamente aceptable que sea adecuado para la administración del compuesto, incluyendo la administración oral, rectal, tópica o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa). Por ejemplo, la adenosina tiene una semivida muy corta. Por esta razón, se administra preferentemente por vía intravenosa. Sin embargo, se han desarrollado agonistas de adenosina A₂ que tienen semividas mucho más largas, y que se pueden administrar a través de otros medios. Los análogos, las formas poliméricas y los derivados de la hormona tiroidea se pueden administrar, por ejemplo, mediante administración intravenosa, oral, tópica e intranasal.

En algunas realizaciones, los análogos, las formas poliméricas y los derivados de la hormona tiroidea se administran a través de diferentes medios.

Como es evidente, las cantidades de la hormona tiroidea, y de sus análogos, formas poliméricas y derivados necesarias para ser eficaces en la estimulación de la angiogénesis variarán con el individuo que se esté tratando y, en última instancia, serán decisión del médico. Los factores por considerar incluyen el estado del paciente que se esté tratando, la eficacia del agonista del receptor de adenosina A₂ que se use en particular, la naturaleza de la formulación, y el peso corporal del paciente. Las dosis de los análogos de la hormona tiroidea o sus formas poliméricas y derivados para el tratamiento de las obstrucciones son cualquier dosis que proporcione el efecto deseado.

Los compuestos descritos anteriormente se administran preferentemente en una formulación que incluya los análogos de la hormona tiroidea o sus formas poliméricas y derivados junto con un vehículo aceptable para el modo de administración. Se puede usar cualquier formulación o sistema de administración de fármacos que contenga los principios activos, que sea adecuado para el uso previsto, según lo comúnmente entendido por los expertos en la materia. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración oral, rectal, tópica o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa) son conocidos por los expertos en la materia. El vehículo debe ser farmacéuticamente aceptable en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el receptor de los mismos.

Lo conveniente es que las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyan la preparación acuosa estéril del compuesto activo, que es preferentemente isotónica con la sangre del receptor. Por lo tanto, lo conveniente es que dichas formulaciones puedan contener agua destilada, dextrosa al 5 % en agua destilada o solución salina. Las formulaciones útiles también incluyen soluciones concentradas o sólidos que contienen el compuesto de fórmula (I), que tras la dilución con un disolvente apropiado, dé una solución adecuada para la administración parental anterior.

Para la administración enteral, se puede incorporar un compuesto en un soporte inerte en unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos, comprimidos o pastillas, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del compuesto activo; en forma de un polvo o gránulos; o una suspensión o solución en un líquido acuoso o líquido no acuoso, por ejemplo, un jarabe, un elixir, una emulsión o una poción. Los vehículos adecuados pueden ser almidones o azúcares, e incluyen lubricantes, aromatizantes, aglutinantes y otros materiales de la misma naturaleza.

Los comprimidos se pueden fabricar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos fabricados por compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el compuesto activo en una forma suelta, por ejemplo, un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con ingredientes auxiliares, por ejemplo, aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, agentes tensioactivos o dispersantes. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando, en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto activo en polvo con cualquier vehículo adecuado.

Los jarabes o suspensiones se pueden preparar añadiendo el compuesto activo a una solución acuosa concentrada de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, a la que también se pueden añadir ingredientes auxiliares. Dichos ingredientes auxiliares pueden incluir aromatizantes, un agente para retardar la cristalización del azúcar o un agente para aumentar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, por ejemplo, como un alcohol polihídrico, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

Las formulaciones para la administración rectal pueden presentarse en forma de supositorio con un vehículo convencional, por ejemplo, manteca de cacao o Witepsol S55 (marca registrada de Dynamite Nobel Chemical, Alemania), para una base de supositorio.

Como alternativa, el compuesto se puede administrar en liposomas o microesferas (o micropartículas). Los métodos para preparar liposomas y microesferas para la administración a un paciente son bien conocidos por los expertos en la materia. La patente de EE.UU. N° 4.789.734 describe métodos para encapsular materiales biológicos en liposomas. Esencialmente, el material se disuelve en una solución acuosa, se añaden los fosfolípidos y lípidos apropiados, junto con tensioactivos si se requieren, y se dializa o sonica el material, según sea necesario. G. Gregoriadis, Capítulo 14, "Liposomes", *Drug Carriers in Biology and Medicine*, pág. 287-341 (Academic Press, 1979) proporcionan una revisión de los métodos conocidos.

Las microesferas formadas por polímeros o proteínas son bien conocidas por los expertos en la materia, y se pueden adaptar para hacerlas pasar a través del tracto gastrointestinal directamente al torrente sanguíneo. Como alternativa, se puede incorporar el compuesto, e implantarse las microesferas o compuestos de microesferas para la liberación lenta durante un período de tiempo que varíe de días a meses. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.906.474; 4.925.673 y 3.625.214, y Jein, *TIPS* 19: 155-157 (1998).

En una realización, los análogos de la hormona tiroidea o sus formas poliméricas y derivados de adenosina se pueden formular en un liposoma o una micropartícula que tenga un tamaño adecuado para alojarse en los lechos capilares tras la administración intravenosa. Cuando el liposoma o la micropartícula está alojado en los lechos capilares que rodean el tejido isquémico, los agentes se pueden administrar localmente en el sitio en el que pueden ser más eficaces. Los liposomas adecuados para dirigirse al tejido isquémico son generalmente de menos de aproximadamente 200 nanómetros y también, normalmente, son vesículas unilamelares, según lo desvelado, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.593.688, concedida a Baldeschweiler, titulada "Liposomal targeting of ischemic tissue".

Las micropartículas preferidas son las preparadas a partir de polímeros biodegradables tales como poliglicólido, poliláctido y copolímeros de los mismos. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente un sistema transportador apropiado dependiendo de diversos factores, incluyendo la velocidad de liberación del fármaco deseada y la dosis deseada.

En una realización, las formulaciones se administran mediante un catéter directamente en el interior de los vasos sanguíneos. La administración se puede producir, por ejemplo, a través de los orificios del catéter. En aquellas realizaciones en las que los compuestos activos tienen una semivida relativamente larga (del orden de 1 día a una semana o más), las formulaciones se pueden incluir en hidrogeles poliméricos biodegradables, tales como los desvelados en la patente de EE.UU. N° 5.410.016, concedida a Hubbell *et al.* Estos hidrogeles poliméricos se pueden administrar en el interior de un lumen de tejido, y liberarse los compuestos activos a lo largo del tiempo a medida que el polímero se degrada. Si se desea, los hidrogeles poliméricos pueden tener micropartículas o liposomas que incluyan el compuesto activo dispersado en los mismos, proporcionando otro mecanismo para la liberación controlada de los compuestos activos.

Es conveniente que las formulaciones se puedan presentar en forma de dosificación unitaria y se puedan preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de poner el compuesto activo en asociación con un vehículo, que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido o un vehículo sólido finamente dividido y, a continuación, si es necesario, conformar el producto en la forma de dosificación unitaria deseada.

Las formulaciones pueden incluir opcionalmente componentes adicionales, tales como diversas sustancias biológicamente activas tales como factores de crecimiento (incluyendo TGF- β , factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF2), factor de crecimiento epitelial (EGF), factores de crecimiento transformante α y β (TGF α y β), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento endotelial vascular y factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF)), agente antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio, inmunosupresor, analgésico, vascularizante y molécula de adhesión celular.

Además de los ingredientes anteriormente mencionados, las formulaciones pueden incluir además uno o más ingredientes auxiliares opcionales utilizados en la técnica de las formulaciones farmacéuticas, por ejemplo, diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, aglutinantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, agentes de suspensión, conservantes (incluyendo antioxidantes) y similares.

Formulaciones y métodos de tratamiento

Los inductores de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea, solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o los agonistas de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con receptores de factores de crecimiento nervioso o de otros factores neurogénicos de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía que sea compatible con el análogo polimérico de la hormona tiroidea, solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductor o agonista del mismo, empleado en particular. Por lo tanto, según sea apropiado, la administración puede ser oral o parenteral, incluyendo las vías de administración intravenosa e intraperitoneal. Además, la administración puede ser por inyecciones periódicas de un bolo del análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductor o agonista del mismo, o se puede hacer más continua mediante la administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que sea externo (por ejemplo, una bolsa IV) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable, o una colonia implantada de células productoras de análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos).

Los agentes terapéuticos de la invención (es decir, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, los inductores o agonistas de análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con receptores de factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos) se pueden proporcionar a un individuo por cualquier medio adecuado, directamente (por ejemplo, localmente, como por inyección, implantación o administración tópica en un locus de tejido) o sistémicamente (por ejemplo, parenteral u oralmente). Cuando el agente se va a proporcionar parenteralmente, tal como mediante administración intravenosa, subcutánea, intramolecular, oftálmica, intraperitoneal, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intranasal o por aerosol, el agente comprende preferentemente parte de una suspensión o solución de líquido acuoso o fisiológicamente compatible. Por lo tanto, el vehículo de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos es fisiológicamente aceptable de modo que, además de la administración del agente deseado al paciente, no afecta adversamente de ningún otro modo al equilibrio electrolítico y/o volumétrico del paciente. Por lo tanto, el medio líquido para el agente puede comprender solución salina fisiológica normal (por ejemplo, NaCl acuoso al 9,85 %, 0,15 M, pH 7-7,4).

La asociación del dímero con un predominio del análogo polimérico de la hormona tiroidea da lugar a la proforma del análogo polimérico de la hormona tiroidea que normalmente es más soluble en soluciones fisiológicas que la forma madura correspondiente.

Las soluciones útiles para la administración parenteral se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, descritos, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Gennaro, A., ed.), Mack pub., 1990. Las formulaciones de los agentes terapéuticos de la invención pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados, y similares. Las formulaciones para la administración directa, en particular, pueden incluir glicerol y otras composiciones de alta viscosidad para ayudar a mantener el agente en el locus deseado. Los polímeros biocompatibles, preferentemente biorreabsorbibles, incluyendo, por ejemplo, los polímeros de ácido hialurónico, colágeno, fosfato tricálcico, polibutirato, láctido y glicólido, y los copolímeros de láctido/glicólido, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación del agente *in vivo*. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para estos agentes incluyen las partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para la administración por inhalación contienen como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietilen-9-lauriléter, glicocolato y desoxicocolato, o soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel de aplicación por vía intranasal. Las formulaciones para la administración parenteral también pueden incluir glicocolato para la administración bucal, metoxisalicilato para la administración rectal o ácido cútrico para la administración vaginal. También se pueden preparar supositorios para la administración rectal mediante la mezcla de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductor o agonista de los mismos, con un excipiente no irritante tal como manteca de cacao u otras composiciones que sean sólidas a temperatura ambiente y líquidas a las temperaturas corporales.

Las formulaciones para la administración tópica en la superficie de la piel se pueden preparar mediante la dispersión de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductor o agonista de los mismos, con un vehículo dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, pomada o jabón. Son particularmente útiles los vehículos capaces de formar una película o capa sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir su retirada. Para la administración tópica en superficies de tejidos internos, se puede dispersar el agente en un adhesivo tisular líquido u otra sustancia conocida por aumentar la adsorción a una superficie de tejido. Por ejemplo, se pueden usar beneficiosamente las soluciones de hidroxipropilcelulosa o fibrinógeno/trombina. Como alternativa, se pueden usar soluciones de recubrimiento de tejidos tales como las formulaciones que contienen pectina.

Como alternativa, los agentes descritos en el presente documento se pueden administrar por vía oral. La administración oral de proteínas como agentes terapéuticos no se emplea en general, pues la mayoría de las proteínas son fácilmente degradadas por las enzimas y ácidos digestivos en el sistema digestivo de los mamíferos antes de que puedan ser absorbidas en el torrente sanguíneo. Sin embargo, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento normalmente son estables en medio ácido y resistentes a las proteasas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.968.590). Además, se ha identificado la OP-1 en extracto de glándula mamaria, calostro y leche de 57 días. Es más, la OP-1 purificada del extracto de glándula mamaria es morfogénicamente activa y se detecta también en el torrente sanguíneo. La administración materna, a través de la leche ingerida, puede ser una vía de administración natural de las proteínas de la superfamilia de TGF- β . Letterio *et al.*, *Science* 264: 1936-1938 (1994), informan que el TGF- β está presente en la leche murina, y que el TGF- β radiomarcado es absorbido por la mucosa gastrointestinal de los menores lactantes. El TGF- β radiomarcado ingerido aparece rápidamente en forma intacta en los tejidos de los organismos jóvenes, incluyendo el pulmón, corazón e hígado. Finalmente, la forma soluble de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea, solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, por ejemplo, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea maduros solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos con o sin agentes antioxidantes o antiinflamatorios. Estos hallazgos, así como los desvelados en los siguientes ejemplos, indican que la administración oral y parenteral son medios viables para administrar proteínas de la superfamilia de TGF- β , incluyendo el análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, a un individuo. Además, mientras que las formas maduras de cierto análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descrito en el presente documento normalmente son poco solubles, la forma del análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos encontrada en la leche (y extracto de glándula mamaria y calostro) es fácilmente soluble, probablemente por la asociación de la forma morfogénicamente activa madura con parte o todo el prodominio de la secuencia polipeptídica de longitud completa expresada y/o por asociación con uno o más componentes de la leche. Por consiguiente, los compuestos proporcionados en el presente documento también se pueden asociar con moléculas capaces de aumentar su solubilidad *in vitro* o *in vivo*.

Cuando los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos están destinados a usarse como agente terapéutico para los trastornos del SNC, se debe hacer frente a un problema adicional: la superación de la barrera hematoencefálica, la estructura de la pared capilar cerebral que actúa eficazmente como filtro de todas excepto categorías seleccionadas de sustancias presentes en la sangre, evitando que pasen al cerebro. La barrera hematoencefálica se puede salvar eficazmente mediante la infusión directa de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea en el cerebro, o por administración intranasal o inhalación de formulaciones adecuadas para la captación y el transporte retrógrado por parte de las neuronas olfativas. Como alternativa, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea se pueden modificar para mejorar su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, las formas truncadas de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o un agente estimulante de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden producir los mejores resultados. Como alternativa, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductores o agonistas de los mismos, proporcionados en el presente documento pueden derivatizarse o conjugarse a un resto lipófilo o a una sustancia que se transporte activamente a través de la barrera hematoencefálica, usando medios convencionales conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pardridge, *Endocrine Reviews* 7:314-330 (1986) y la patente de EE.UU. Nº 4.801.575.

Los compuestos proporcionados en el presente documento también se pueden asociar con moléculas capaces de dirigir los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductor o agonista de los mismos, al tejido deseado. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo u otra proteína de unión que interaccione específicamente con una molécula de superficie sobre las células del tejido deseado. Se pueden diseñar moléculas de dirección útiles, por ejemplo, usando la tecnología del sitio de unión de cadena única desvelada en la patente de EE.UU. Nº 5.091.513. Las moléculas de dirección pueden estar asociadas covalente o no covalentemente con los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductor o agonista de los mismos.

Como el experto habitual en la materia apreciará, las composiciones formuladas contienen cantidades terapéuticamente eficaces de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductores o agonistas de los mismos. Es decir, contienen una cantidad que proporciona concentraciones apropiadas del agente al tejido del sistema nervioso afectado durante un tiempo suficiente para estimular un restablecimiento detectable de la función afectada del sistema nervioso central o periférico, hasta e incluyendo una restauración completa de la misma. Como los expertos en la materia apreciarán, estas concentraciones variarán dependiendo de una serie de factores, incluyendo la eficacia biológica del agente seleccionado, las características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) del agente específico, la formulación del mismo, incluyendo una mezcla con uno o más excipientes, la vía de administración y el tratamiento previsto, incluyendo si el principio activo se administrará directamente en un sitio del tejido o si se va a administrar

sistémicamente. También es probable que la dosis preferida por administrar dependa de variables tales como el estado de los tejidos enfermos o dañados y el estado general de salud del mamífero en particular. Como cuestión general, las dosis individuales diarias, quincenales o semanales de 0,00001 a 1.000 mg de un análogo tiroideo polimérico solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos son suficientes en presencia de agentes antioxidantes y/o antiinflamatorios, prefiriéndose la dosis de 0,0001 a 100 mg, e incluso más preferentemente la dosis de 0,001 a 10 mg. Como alternativa, se puede emplear ventajosamente una sola dosis diaria, quincenal o semanal de 0,01 a 1.000 µg/kg de peso corporal, más preferentemente de 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal. Una nanopartícula contiene entre 1 y 100 moléculas de hormona tiroidea por nanopartícula bien encapsuladas o inmovilizadas en la superficie de la nanopartícula a través de enlaces químicos. La nanopartícula puede encapsular conjuntamente análogos de la hormona tiroidea, junto con agentes quimioterapéuticos u otros agentes proangiogénicos o antiangiogénicos conocidos. Además, la nanopartícula contiene en su interior los agentes quimioterapéuticos, y los agentes proangiogénicos o antiangiogénicos y los análogos de la hormona tiroidea están inmovilizados en la superficie de la nanopartícula mediante unión química estable. La superficie de las nanopartículas contiene un resto de dirección al sitio tal como ligando de $\alpha V\beta 3$ unido a la superficie mediante unión química estable. La dosis eficaz presente se puede administrar en una sola dosis o en una pluralidad (dos o más) de dosis a plazos, según se desee o se considere apropiado en las circunstancias específicas. Se puede usar una inyección de bolo o formulación en infusión difusible. Si se desea facilitar infusiones repetidas o frecuentes, puede ser aconsejable la implantación de una endoprótesis vascular semipermanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular).

Como es evidente, los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, o inductores o agonistas de los mismos, de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otras moléculas conocidas por ser beneficiosas en el tratamiento de las afecciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, también se pueden administrar diversos factores de crecimiento bien conocidos, hormonas, enzimas, composiciones terapéuticas, antibióticos u otros agentes bioactivos con los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. Así pues, en la presente formulación de análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, se pueden incluir diversos factores de crecimiento conocidos tales como NGF, EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α y TGF- β , así como enzimas, inhibidores de enzimas, antioxidantes, agentes antiinflamatorios, agentes de barrido de radicales libres, antibióticos y/o factores quimioatrayentes/quimiotácticos.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos 1-7

Para los Ejemplos 1-7, se usaron los siguientes materiales y métodos. Todos los reactivos eran de grado químico, y se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) o a través de VWR Scientific (Bridgeport, NJ). El acetato de cortisona, la albúmina de suero bovino (BSA) y la solución de gelatina (tipo B al 2 % de piel bovina) se adquirieron en Sigma Chemical Co. Los huevos de gallina fertilizados se adquirieron en Charles River Laboratories, SPAFAS Avian Products & Services (North Franklin, CT). La T_4 , la 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T_3), el ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), el T_4 -agarosa, el 6-N-propil-2-tiouracilo (PTU), los péptidos que contienen RGD y los péptidos que contienen RGE se obtuvieron de Sigma; el PD 98059 de Calbiochem; y el CGP41251 fue un obsequio de Novartis Pharma (Basilea, Suiza). El anticuerpo policlonal contra FGF2 y el anticuerpo monoclonal contra β -actina se obtuvieron en Santa Cruz Biotechnology, y FGF2 y VEGF recombinantes humanos, en Invitrogen.

El anticuerpo policlonal contra ERK1/2 fosforilada era de New England Biolabs y la IgG de cabra anti-conejo, de DAKO. Los anticuerpos monoclonales contra $\alpha V\beta 3$ (SC73 12) y α -tubulina (E9) se adquirieron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La IgG de ratón normal y la Ig de cabra anti-conejo conjugada con HRP se adquirieron en Dako Cytomation (Carpinteria, CA). Los anticuerpos monoclonales contra $\alpha V\beta 3$ (LM609) y $\alpha V\beta 5$ (P1F6), así como $\alpha V\beta 3$ purificada, se adquirieron en Chemicon (Temecula, CA). $L-[^{125}I]-T_4$ (actividad específica, 1.250 µCi/µg) se obtuvo en Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA).

Modelo de angiogénesis de membrana corioalantoidea (CAM): se examinó la neovascularización *in vivo* mediante los métodos descritos anteriormente. Se adquirieron de 9 a 12 embriones de pollo de diez días de vida en SPAFAS (Preston, CT) y se incubaron a 37 °C con una humedad relativa del 55 %. Se usó una aguja hipodérmica para hacer un pequeño orificio en la cáscara que ocultaba el saco de aire, y se realizó un segundo orificio en el lado ancho del huevo, directamente sobre una porción avascular de la membrana embrionaria que fue identificada al trasluz. Se creó un saco de aire falso debajo del segundo orificio mediante la aplicación de presión negativa en el primer orificio, separando la CAM de la cáscara. Se cortó una ventana de aproximadamente 1,0 cm² en la cáscara sobre la CAM desprendida con una muela artesanal (Dremel, división de Emerson Electric Co.), lo que permitió el acceso directo a la CAM subyacente. Se usó FGF2 (1 µg/ml) como agente proangiogénico convencional para inducir nuevas ramificaciones de los vasos sanguíneos en la CAM de embriones de 10 días de vida. Se trataron previamente discos estériles de papel de filtro N° 1 (Whatman International) con 3 mg/ml de acetato de cortisona y 1 mmol/l de PTU, y se

secaron al aire en condiciones estériles. A continuación, se aplicaron la hormona tiroidea, los análogos de la hormona, FGF2 o los disolventes de control y los inhibidores a los discos, y se dejaron secar los discos. Entonces, se suspendieron los discos en PBS y se colocaron sobre las CAM en crecimiento. Se colocaron filtros tratados con T₄ o FGF2 el primer día de la incubación de 3 días, con anticuerpo contra FGF2 añadido 30 minutos más tarde a las muestras seleccionadas como se indica. A las 24 horas, también se añadió inhibidor de la cascada de MAPK PD 98059 a las CAM tópicamente por medio de los discos de filtro.

Análisis microscópico de secciones de CAM:

Tras la incubación a 37 °C con una humedad relativa del 55 % durante 3 días, se extirpó el tejido de CAM situado directamente debajo de cada disco de filtro de las muestras de CAM de control y tratadas. Se lavaron los tejidos 3 veces con PBS, se colocaron en placas de Petri de 35 mm (Nalge Nunc), y se examinaron bajo un microscopio estereoscópico SV6 (Zeiss) con un aumento de 50 veces. Se recogieron imágenes digitales de secciones de CAM expuestas a los filtros a través de un sistema de cámaras de vídeo de color de un dispositivo de acoplamiento de 3 cargas (Toshiba) y se analizaron con el programa informático Image-Pro (Media Cybernetics). Se contó el número de puntos de ramificación de los vasos contenidos en una región circular igual a la superficie de cada disco de filtro. Se realizó el recuento en una imagen de cada preparación de CAM, y se analizaron los resultados de 8 a 10 preparaciones de CAM para cada condición de tratamiento (hormona tiroidea o análogos, FGF2, anticuerpo contra FGF2, PD 98059). Además, cada experimento se realizó 3 veces. El índice de la angiogénesis resultante es la media $\pm$ ETM de los nuevos puntos de ramificación de cada conjunto de muestras.

Ensayos de FGF2:

Se cultivaron células endoteliales ECV304 en medio M 199 complementado con suero fetal bovino al 10 %. Se sembraron células ECV304 (10⁶ células) sobre placas de 24 pocillos recubiertas con gel al 0,2 % en medio completo durante una noche y, a continuación, se lavaron las células con medio exento de suero y se trataron con T₄ o T₃ como se indica. Tras 72 horas, se recogieron los sobrenadantes y se realizaron ensayos para FGF sin dilución usando un sistema de ELISA comercial (R & D Systems).

Activación de MAPK:

Se cultivaron células endoteliales ECV304 en medio M 199 con suero 13 agotado en hormona al 0,25 % durante 2 días. A continuación, se trataron las células con T₄ (10⁻⁷ mol/l) durante 15 minutos a 6 horas. En experimentos adicionales, las células se trataron con T₄ o FGF2 o con T₄ en presencia de PD 98059 o CGP41251. Se prepararon fracciones nucleares de todas las muestras mediante el método presentado anteriormente en el presente documento, se separaron las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y se transfirieron a membranas para la inmunotransferencia con anticuerpo contra la ERK1/2 fosforilada. La aparición de ERK1/2 fosforilada nuclear significa la activación de estas isoformas de MAPK por T₄.

Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa:

Se trataron células ECV304 confluentes en placas de 10 cm con T₄ (10⁻⁷ mol/l) durante de 6 a 48 horas, y se extrajo el ARN total usando isotiocianato de guanidinio (Biotecx Laboratories). Se sometió el ARN (1 µg) a reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) usando el sistema de acceso RT-PCR (Promega). Se transcribió de forma inversa el ARN total en ADNc a 48 °C durante 45 minutos, luego se desnaturizó a 94 °C durante 2 minutos. Se realizaron la síntesis y la amplificación por PCR de la segunda cadena durante 40 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 60 s y extensión a 68 °C durante 120 s, con la extensión final durante 7 minutos a 68 °C tras la finalización de todos los ciclos. Los cebadores de PCR para FGF2 fueron los siguientes: cadena sentido de FGF2 5'-TGGTATGTGGCACTGAAACG-3' (SEC ID N° 1), cadena antisentido 5' CTCAATGACCTGGCGAAGAC-3' (SEC ID N° 2); la longitud del producto de PCR era de 734 pb. Los cebadores para GAPDH incluían la cadena sentido 5'-AAGGTCATCCCTGAGCTGAACG-3' (SEC ID N° 3) y la cadena antisentido 5'-GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGA-3' (SEC ID N° 4); la longitud del producto de PCR era de 218 pb. Los productos de RT-PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Las bandas diana del gel se cuantificaron usando el programa informático LabImage (Kapelan), y se calculó el valor de [FGF2/GAPDH] x 10 para cada punto temporal.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de la varianza de 1 vía (ANOVA) comparando el grupo experimental con el respectivo grupo de control, y se calculó la significación estadística basándose en P < 0,05.

Angiogénesis in vivo en implante de líneas celulares de cáncer o FGF2 en Matrigel en ratones: Modelo de angiogénesis murino in vivo:

El modelo murino de Matrigel se realizará de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (Grant *et al*, 1991; Okada *et al*, 1995) y como se aplica en el laboratorio de los presentes inventores (Powel *et al.*, 2000). En resumen,

se descongelará Matrigel exento de factor de crecimiento (Becton Dickinson, Bedford MA) durante una noche a 4 °C y se colocará en hielo. Se dispondrán alícuotas de Matrigel en tubos de polipropileno fríos y FGF2, se añadirán análogos de la hormona tiroidea o células cancerosas (1×10^6 células) al Matrigel. Se inyectará subcutáneamente Matrigel con solución salina, FGF2, análogos de la hormona tiroidea o células cancerosas en la línea media ventral de los ratones. Al décimo cuarto día, los ratones se sacrificarán y se extirparán los geles solidificados y se analizará la presencia de nuevos vasos. Los compuestos A-D se inyectarán por vía subcutánea a diferentes dosis. Se dispondrán implantes de gel experimentales y de control en un tubo de microcentrifugación que contendrá 0,5 ml de solución de lisis celular (Sigma, St. Louis, MO), y se triturarán con una mano de mortero. Posteriormente, los tubos se dejarán incubar durante una noche a 4 °C y, al día siguiente, se centrifugarán a 1.500 xg durante 15 minutos. Se añadirá una alícuota de 200 µl de lisado celular a 1,3 ml de solución de reactivo de Drabkin (Sigma, St. Louis, MO) para cada muestra. Se analizará la solución en un espectrofotómetro a 540 nm. La absorción de la luz es proporcional a la cantidad de hemoglobina contenida en la muestra.

Crecimiento y metástasis tumoral - Modelo de implantación del tumor de membrana corioalantoidea de pollo (CAM):

El protocolo es como se ha descrito previamente (Kim *et al.*, 2001). En resumen, se dispondrán 1×10^7 células tumorales en la superficie de cada CAM (embrión de 7 días de vida) y se incubarán durante una semana. Se extirparán los tumores resultantes y se cortarán en fragmentos de 50 mg. Estos fragmentos se colocarán en 10 CAM adicionales por grupo y se tratarán por vía tópica al día siguiente con 25 µl de compuestos (A-D) disueltos en PBS. Siete días después, se extirparán los tumores de los huevos y se determinará el peso de los tumores para cada CAM. La Figura 8 es un diagrama esquemático que muestra las etapas que intervienen en el modelo de crecimiento tumoral *in vivo* en la CAM.

Se pueden determinar los efectos de TETRAC, TRIAC y los antagonistas de la hormona tiroidea sobre la velocidad de crecimiento tumoral, la angiogénesis tumoral y la metástasis tumoral de líneas celulares de cáncer.

Crecimiento y metástasis tumoral - Modelo de xenoinjerto tumoral en ratones:

El modelo es como se ha descrito en las publicaciones de los presentes inventores realizadas por Kerr *et al.*, 2000; Van Waes *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2001; y Ali *et al.*, 2001. Es posible determinar y comparar la eficacia contra el cáncer del TETRAC, del TRIAC y de otros antagonistas de la hormona tiroidea a diferentes dosis y contra diferentes tipos de tumores.

Crecimiento y metástasis tumoral - Modelo de metástasis experimental:

El modelo es como se ha descrito en las publicaciones recientes de los presentes inventores (Mousa, 2002; Amirkhosravi *et al.*, 2003a y 2003b). En resumen, se cultivaron células malignas de melanoma murino B16 (ATCC, Rockville, MD) y otras líneas de cáncer en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con suero bovino fetal al 10 %, penicilina y estreptomycin (Sigma, St. Louis, MO). Se cultivaron las células hasta la confluencia del 70 %, y se recogieron con tripsina-EDTA (Sigma) y se lavaron dos veces con tampón de fosfato salino (PBS). Se volvieron a suspender las células en PBS a una concentración bien de $2,0 \times 10^5$ células/ml para la metástasis experimental. Animales: se usarán ratones C57/BL6 (Harlan, Indianápolis, Indiana) con un peso de 18-21 gramos para este estudio. Todos los procedimientos se ajustan a las directrices de IACUC y a las directrices institucionales. Es posible determinar y comparar la eficacia contra el cáncer para el TETRAC, el TRIAC y otros antagonistas de la hormona tiroidea a diferentes dosis y en contra de diferentes tipos de tumores.

Efecto de los análogos de la hormona tiroidea sobre la angiogénesis:

T₄ indujo un aumento significativo en el índice de angiogénesis (aumento de varias veces por encima del nivel basal) en el modelo de CAM. T₃ a 0,001-1,0 µM o T₄ a 0,1-1,0 µM alcanzaron el máximo efecto en la producción de un aumento de 2-2,5 veces en el índice de angiogénesis en comparación con un aumento de 2-3 veces en el índice de angiogénesis alcanzado con 1 µg de FGF2 (Tabla 1 y Figura 1a y 1b). El efecto de T₄ en la potenciación de la angiogénesis (2-2,5 veces de aumento en el índice de angiogénesis) se alcanzó en presencia o ausencia de PTU, que inhibe la conversión de T₄ en T₃. La propia T₃ a 91-100 nM indujo un efecto proangiogénico en el modelo de CAM. T₄-agarosa produjo un efecto proangiogénico similar al alcanzado por T₄. El efecto proangiogénico bien de T₄ o de T₄-agarosa fue bloqueado al 100 % por parte de TETRAC o TRIAC.

Aumento de la actividad proangiogénica de FGF2 por concentraciones submáximas de T₄:

La combinación de T₄ y FGF2 a concentraciones submáximas produjo un aumento aditivo en el índice de angiogénesis hasta el mismo nivel que el efecto proangiogénico máximo bien de FGF2 o de T₄ (Figura 2).

Efectos de los inhibidores de la cascada de MAPK sobre las acciones proangiogénicas de T₄ y FGF2 en el modelo de CAM:

El efecto proangiogénico bien de T₄ o de FGF2 fue totalmente bloqueado por PD 98059 a 0,8-8 µg (Figura 3).

Efectos de los antagonistas específicos de la integrina $\alpha V\beta 3$ sobre las acciones proangiogénicas de T₄ y FGF2 en el modelo de CAM:

El efecto proangiogénico bien de T₄ o de FGF2 fue totalmente bloqueado por el anticuerpo monoclonal específico LM609 a 10 µg (Figura 4a y 4b).

Se ha usado el ensayo de la CAM para validar la actividad angiogénica de varios factores de crecimiento y otros promotores o inhibidores de la angiogénesis. En los presentes estudios, T₄ a concentraciones fisiológicas demostró ser proangiogénica, con una actividad comparable a la de FGF2. La presencia de PTU no redujo el efecto de T₄, lo que indica que la desyodación de T₄ para generar T₃ no era un requisito previo en este modelo. Dado que la aparición de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en este modelo requiere varios días, se asume que el efecto de la hormona tiroidea dependía totalmente de la interacción del receptor nuclear de la hormona tiroidea (TR). Las acciones de las yodotironinas que requieren complejos intranucleares de TR con su ligando natural, T₃, son, por definición, genómicas, y culminan en la expresión génica. Por otro lado, la respuesta preferencial de este sistema modelo para T₄, en lugar de T₃, el ligando natural de TR planteó la posibilidad de que la angiogénesis podría ser iniciada de manera no genómica en la membrana plasmática por T₄ y culminar en efectos que requieren la transcripción de genes. Las acciones no genómicas de T₄ se han descrito ampliamente, se suelen iniciar en la membrana plasmática y pueden estar mediadas por vías de transducción de señales. No requieren la unión a ligandos intranucleares de la yodotironina ni del TR, pero pueden interactuar con o modular la transcripción de genes. También se han descrito bien las acciones no genómicas de los esteroides, y se sabe que interaccionan con las acciones genómicas de los esteroides o de otros compuestos. Los experimentos llevados a cabo con T₄ y TETRAC o con agarosa-T₄ indicaron que, de hecho, el efecto proangiogénico de T₄ se inició muy probablemente en la membrana plasmática. Los presentes inventores han demostrado en otra parte que TETRAC bloquea los efectos iniciados en la membrana de T₄, pero que, por sí mismo, no activa la transducción de señales. Por lo tanto, es una sonda para las acciones no genómicas de la hormona tiroidea. Se cree que agarosa-T₄ no puede entrar en el interior de la célula, y ha sido usado por los presentes y otros inventores para examinar los modelos en cuanto a las posibles acciones iniciadas en la superficie celular de la hormona.

Estos resultados sugieren que otra consecuencia de la activación de MAPK por la hormona tiroidea es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Este se inicia de manera no genómica, pero, como es evidente, requiere el consiguiente programa de transcripción de genes complejo.

Las concentraciones ambientales de la hormona tiroidea son relativamente estables. El modelo de CAM, en el momento ensayado por los inventores, fue tiroprival y, por lo tanto, se puede considerar un sistema que no reproduce el organismo intacto. Se propone que los niveles circulantes de T₄ sirven, con otros varios reguladores, para modular la sensibilidad de los vasos a los factores angiogénicos endógenos, tales como VEGF y FGF2.

Ensayo de angiogénesis tridimensional

Angiogénesis de crecimiento tridimensional in vitro de células endoteliales microvasculares dérmicas (HDMEC) cultivadas sobre perlas microtransportadoras recubiertas con fibrina: se mezclaron HDMEC confluentes (pasajes 5-10) con perlas Cytodex-3 recubiertas de gelatina con una proporción de 40 células por perla. Se suspendieron las células y las perlas (150-200 perlas por pocillo de placa de 24 pocillos) con 5 ml de EBM + suero humano normal al 15 %, se mezclaron suavemente cada hora durante las 4 primeras horas, luego se dejaron en cultivo en una incubadora de CO₂ durante la noche. Al día siguiente, se añadieron 10 ml de EBM recién preparado + HS al 5 %, y se cultivó la mezcla durante otras 3 horas. Antes de los experimentos, se verificó el cultivo de las perlas con CE; a continuación, se añadieron 500 µl de PBS a un pocillo de la placa de 24 pocillos, y se añadieron 100 µl de la solución de cultivo de perlas con EC al PBS. Se contó el número de perlas, y se calculó la concentración de la CE/perlas.

Se preparó una solución de fibrinógeno (1 mg/ml) en medio EBM con o sin factores angiogénicos o factores de ensayo. Para el control positivo, se usaron 50 ng/ml de VEGF + 25 ng/ml de FGF2. Se lavaron las perlas con CE con medio EBM dos veces, y se añadieron a la solución de fibrinógeno. El experimento se realizó por triplicado para cada condición. Se mezclaron suavemente las perlas con CE en solución de fibrinógeno, y se añadieron 2,5 µl de trombina humana (0,05 U/µl) en 1 ml de solución de fibrinógeno. Se transfirieron 300 µl de inmediato a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. La solución de fibrinógeno se polimeriza en 5-10 minutos. Tras 20 minutos, se añadieron EBM + suero humano normal al 20 % + 10 µg/ml de aprotinina. Se incubó la placa en una incubadora de CO₂. Se requieren aproximadamente de 24 a 48 horas para que las HDMEC invadan el gel de fibrina y formen tubos.

Se modificó un ensayo de angiogénesis *in vitro* con microvehículo previamente diseñado para investigar el comportamiento angiogénico de células endoteliales de la arteria pulmonar bovina en geles de fibrina bovina [Nehls y Drenckhahn, 1995a, b] para el estudio de la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas en entornos de ECM tridimensionales (Figuras 1 y 2). En síntesis, se disolvió fibrinógeno humano, aislado como se ha descrito anteriormente [Feng *et al.*, 1999], en medio 199M a una concentración de 1 mg/ml (pH 7,4) y se esterilizó

por filtración a través de un filtro de 0,22 micrómetros. Se preparó una solución isotónica de 1,5 mg/ml de colágeno mezclando Vitrogen 100 estéril en 5 x medio M199 y agua destilada. Se ajustó el pH a 7,4 mediante NaOH 1 N. En ciertos experimentos, se añadieron factores de crecimiento y proteínas de la MEC (tales como VEGF, bFGF, PDGF-BB, suero, gelatina y fibronectina) a las soluciones de fibrinógeno o de colágeno. A continuación, se añadieron 500 perlas con EC a 1 mg/ml de fibrinógeno o 1,5 mg/ml de soluciones de colágeno. Posteriormente, se sembró la suspensión de EC-perlas-colágeno o EC-perlas-fibrinógeno (500 perlas con EC/ml) en placas de 24 pocillos a 300 ul/pocillo. Se incubaron los cultivos de EC-perlas-colágeno a 37 °C para formar gel. La gelificación de los cultivos de EC-perlas-fibrinógeno se produjo en menos de 5 minutos a temperatura ambiente tras la adición de trombina a una concentración final de 0,5 U/ml. Tras la gelificación, se añadió a cada pocillo 1 ml de medio de ensayo recién preparado (EBM suplementado con suero humano normal al 20 % para HDMEC o EBM suplementado con suero bovino fetal al 10 %). Se controló la respuesta angiogénica visualmente y se registró mediante la captura de imágenes de vídeo. En concreto, se observó y se grabó la formación de crecimientos capilares con un microscopio invertido Nikon Diaphot-TMD (Nikon Inc., Melville, NY), dotado de una carcasa de incubación con un termostato NP-2 Nikon y mezcladora de flujo de dióxido de carbono Sheldon Nº 2004. Se interconectó el microscopio directamente a un sistema de vídeo que consistía en una cámara de vídeo Dage-MTI CCD-72S y un monitor de vídeo de 12 pulgadas PVM-122 de Sony conectado a un ordenador Macintosh G3. Las imágenes se capturaron en diversas ampliaciones usando Adobe Photoshop. Se cuantificó visualmente el efecto de los factores angiogénicos en la angiogénesis del crecimiento determinando el número y el porcentaje de perlas con CE con crecimientos capilares. Se contó un centenar de perlas (de cinco a seis campos aleatorios de baja potencia) en cada uno de los pocillos por triplicado para cada condición experimental. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces.

Cultivo celular:

Se sembró la línea celular de fibroblastos de mono verde africano, CV-1 (ATCC, Manassas, VA), que carece del receptor nuclear de la hormona tiroidea, a 5.000 células/cm² y se mantuvo en DMEM, suplementado con FBS inactivado con calor al 10 % (v/v), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y L-glutamina 2 mM. Todos los reactivos de cultivo se adquirieron en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Se mantuvieron los cultivos en una cámara humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada tres días y las líneas celulares se pasaron al 80 % de confluencia. Para el tratamiento experimental, se sembraron las células en placas de cultivo celular de 10 cm (Corning Incorporated, Corning, NY) y se dejaron crecer durante 24 h en medio que contenía FBS al 10 %. A continuación, se enjuagaron las células dos veces con tampón de fosfato salino (PBS) y se alimentaron con DMEM exento de suero suplementado con penicilina, estreptomycin y HEPES. Tras 48 h de incubación en medio exento de suero, se trataron las células con un control de vehículo (concentración final de KOH 0,004 N con polietilenglicol al 0,4 % [v/v]) o T₄ (concentración final de 10⁻⁷ M) durante 30 min. A continuación, se recogieron los medios y se determinaron los niveles de T₄ libre mediante inmunoensayos enzimáticos. Se incubaron los cultivos con T₄ total a 10⁻⁷ M que tenía T₄ libre a 10⁻⁹ M a 10⁻¹⁰ M. Tras el tratamiento, se recogieron las células y se prepararon las proteínas nucleares como se ha descrito anteriormente.

Transfecciones transitorias con ARNip:

Se sembraron células CV-1 en placas de 10 cm (150.000 células/placa) y se incubaron durante 24 h en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Se aclararon las células en OPTI-MEM (Ambion, Austin, TX) y transfirieron con ARNip (concentración final de 100 nM) a αV, β3, o αV y β3 juntos usando siPORT (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se transfirieron grupos adicionales de células CV-1 con un ARNip mezclados, para usarlos como control negativo. Cuatro horas después de la transfección, se añadieron 7 ml de medios que contenían FBS al 10 % a las placas y se dejaron incubar los cultivos una noche. A continuación, se aclararon las células con PBS y se colocaron en DMEM exento de suero durante 48 h antes del tratamiento con T₄.

Aislamiento de ARN y RT-PCR:

Se extrajo el ARN total de cultivos de células 72 h después de la transfección usando el kit RNeasy de Qiagen (Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. Se transcribieron de forma inversa doscientos nanogramos de ARN total usando el sistema de RT-PCR Access (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores se basaban en secuencias específicas de la especie publicadas: αV (número de acceso NM-002210) F-5'-TGGGATTGTGGAAGGAG (SEC ID Nº 5) y R-5'-AAATCCCTGTCCATCAGCAT (SEC ID Nº 6) (producto de 319 pb), p3 (NM000212) F-5'-GTGTGAGTGCTCAGAGGAG (SEC ID Nº 7) y R-5'-CTGACTCAATCTCGTCACGG (SEC ID Nº 8) (producto de 515 pb) y GAPDH (AF261085) F-5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT (SEC ID Nº 9) y R-5'-TGAGCTTGACMGTTGGTCG (SEC ID Nº 10) (producto de 212 pb). LA RT-PCR se realizó en el ciclador térmico Flexigene eom TECHNE (Burlington, NJ). Tras una incubación de 2 min a 95 °C, se realizaron 25 ciclos de las siguientes etapas: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 57 °C durante 1 min y extensión durante 1 min a 68 °C durante 25 ciclos. Se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,8 % (p/v) teñido con bromuro de etidio.

Transferencia Western:

Se mezclaron alícuotas de proteínas nucleares (10 µg/carril) con tampón de muestra Laemmli y se separaron por SDS-PAGE (gel de resolución al 10 %) y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Tras bloquear con leche desnatada al 5 % en solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 al 1 % (TBST) durante 30 min, se incubaron las membranas con una dilución 1:1000 de un anticuerpo monoclonal contra MAP quinasa p44/42 fosforilada (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) en TBST con leche al 5 % durante una noche a 4 °C. Tras 3 lavados de 10 min en TBST, se incubaron las membranas con Ig de cabra anti-conejo conjugada con HRP (dilución 1:1000) de DakoCytomation (Carpinteria, CA) en TBST con leche al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las membranas 3 veces durante 5 min en TBST y se detectaron las proteínas inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham). Se determinó la intensidad de las bandas usando el sistema de imágenes VersaDoc 5000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Ensayo de unión de radioligandos:

Se mezclaron dos µg de $\alpha\text{V}\beta 3$ purificada con las concentraciones indicadas de los compuestos de ensayo, y se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadió T_4 marcada con ^{125}I (2 µCi) y se dejó incubar la mezcla durante otros 30 min a 20 °C. Se mezclaron las muestras con tampón de muestra (glicerol al 50 %, Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, y azul de bromofenol) y el agotaron en un gel nativo básico al 5 % durante 24 horas a 45 mA en frío. Se desmontó el aparato y se colocaron los geles sobre papel de filtro, se envolvieron en una envoltura de plástico y se expusieron a una película. Se determinó la intensidad de las bandas usando el sistema de formación de imágenes VersaDoc 5000.

Ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) (estudios de $\alpha\text{V}\beta 3$):

Se adquirieron embriones de pollo de diez días de vida en SPAFAS (Preston, CT) y se incubaron a 37 °C con una humedad relativa del 55 %. Se usó una aguja hipodérmica para hacer un pequeño orificio en el polo afilado del huevo, y se realizó un segundo orificio en el polo ancho del huevo, directamente sobre una porción avascular de la membrana embrionaria. Se succionó suavemente el primer orificio para desplazar el saco de aire y se soltó la CAM del cascarón. Con una muela artesanal de Dremel (Dremel, Racine, WI), se cortó una ventana de aproximadamente 1,0 cm² en la cáscara sobre el falso saco de aire, lo que permitió el acceso a la CAM. Se trataron previamente discos estériles de papel de filtro N° 1 (Whatman, Clifton, NJ) con 3 mg/ml de acetato de cortisona y propiltiouracilo 1 mM, y se secaron al aire en condiciones estériles. Se aplicaron hormona tiroidea, disolventes de control y anticuerpo monoclonal LM609 a los discos, y después se secaron. Entonces, se suspendieron los discos en PBS y se colocaron sobre las CAM en crecimiento. Tras la incubación durante 3 días, se extirpó la CAM de debajo del disco de filtro y se enjuagó con PBS. Se colocó cada membrana en una placa de Petri de 35 mm y se examinó bajo un estereomicroscopio SV6 con un aumento de 50 veces. Se capturaron imágenes digitales y analizaron con el programa informático Image-Pro (Mediacybetics). Se contó el número de puntos de ramificación de los vasos contenidos en una región circular igual a la disco de filtro. Se contó una imagen de cada una de 8 a 10 preparaciones de CAM para cada condición de tratamiento, y además cada experimento se realizó 3 veces.

Ejemplo 1. Efecto de la hormona tiroidea sobre la angiogénesis:

Como se observa en la Figura 1A y se resume en la Figura 1B, tanto L-T_4 como L-T_3 aumentaron la angiogénesis en el ensayo de CAM. T_4 , a una concentración total en el medio fisiológico de 0,1 µmol/l, aumentó la formación de ramificaciones de los vasos sanguíneos en 2,5 veces ($P < 0,001$). T_3 (1 nmol/l) también estimuló el doble la angiogénesis. La posibilidad de que T_4 solo fuera eficaz debido a la conversión de T_4 en T_3 por 5'-monodesyodinasas celular se descartó por el hallazgo de que el PTU inhibidor de la desyodinasas no tuvo ningún efecto inhibitor sobre la angiogénesis producida por T_4 . Se aplicó PTU a todos los discos de filtro usados en el modelo de CAM. Por lo tanto, T_4 y T_3 potencian la formación de nuevas ramificaciones de los vasos sanguíneos en un modelo de CAM estandarizado previamente para el ensayo de factores de crecimiento.

Ejemplo 2. Efectos de la T_4 -agarosa y TETRAC:

Los presentes inventores han demostrado anteriormente que T_4 -agarosa estimula las vías de transducción de señales celulares iniciadas en la membrana plasmática del mismo modo que T_4 , y que las acciones de T_4 y T_4 -agarosa son bloqueadas por un análogo de yodotironina desaminado, el TETRAC, que es un conocido inhibidor de la unión de T_4 a las membranas plasmáticas. En el modelo de CAM, la adición de TETRAC (0,1 µmol/l) inhibió la acción de T_4 (Figura 2A), pero TETRAC solo no tuvo ningún efecto sobre la angiogénesis (Figura 2C). La acción de T_4 -agarosa, añadido a una concentración de hormona de 0,1 µmol/l, fue comparable a la de T_4 en el modelo de CAM (Figura 2B), y el efecto de T_4 -agarosa también fue inhibido por la acción de TETRAC (Figura 2B; resumida en 2C).

Ejemplo 3. Mejora de la actividad proangiogénica de FGF2 por una concentración submáxima de T₄:

La angiogénesis es un proceso complejo que, por lo general, requiere la participación de factores de crecimiento polipeptídicos. El ensayo de CAM requiere al menos 48 horas para que se manifieste el crecimiento de los vasos. Por lo tanto, los efectos aparentes en la membrana plasmática de la hormona tiroidea en este modelo tienden a producir una respuesta transcripcional compleja hacia la hormona. Por lo tanto, los presentes inventores determinaron si FGF2 participó en la respuesta hormonal y si la hormona podría potenciar el efecto de los niveles subfisiológicos de este factor de crecimiento. T₄ (0,05 µmol/l) y FGF2 (0,5 µg/ml) estimularon individualmente la angiogénesis en un grado modesto (Figura 3). El efecto angiogénico de esta concentración submáxima de FGF2 fue aumentado por una concentración subfisiológica de T₄ hasta el nivel causado por 1,0 µg de FGF2 solo. Por lo tanto, los efectos de las concentraciones submáximas de hormona y factor de crecimiento parecen ser aditivos. Para definir con más precisión el papel de FGF2 en la estimulación de la angiogénesis de la hormona tiroidea, se añadió un anticuerpo policlonal contra FGF2 a los filtros tratados bien con FGF2 o con T₄, y se midió la angiogénesis tras 72 horas. La Figura 4 demuestra que el anticuerpo contra FGF2 inhibió la angiogénesis estimulada bien por FGF2 o por T₄ en ausencia de FGF2 exógeno, lo que sugiere que el efecto de T₄ en el ensayo de CAM fue mediado por un aumento de la expresión de FGF2. El anticuerpo IgG de control no tiene ningún efecto estimulador ni inhibidor en el ensayo de CAM.

Ejemplo 4. Estimulación de la liberación de FGF2 desde células endoteliales por la hormona tiroidea:

Se midieron los niveles de FGF2 en los medios de células endoteliales ECV304 tratadas bien con T₄ (0,1 µmol/l) o con T₃ (0,01 µmol/l) durante 3 días. Como se observa en la siguiente tabla, T₃ estimuló la concentración de FGF2 en el medio 3,6 veces, mientras que T₄ provocó un aumento de 1,4 veces. Este hallazgo indica que la hormona tiroidea puede aumentar el efecto angiogénico de FGF2, al menos en parte, mediante el aumento de la concentración del factor de crecimiento disponible para las células endoteliales.

Efecto de T₄ y T₃ sobre la liberación de FGF2 desde células endoteliales ECV304

Tratamiento celular	FGF2 (pg/ml/10 ⁶ células)
Control	27,7 ± 3,1
T ₃ (0,01 µmol/l)	98,8 ± 0,5*
T ₃ + PD 98059 (2 µmol/l)	28,4 ± 3,2
T ₃ + PD 98059 (20 µmol/l)	21,7 ± 3,5
T ₄ (0,1 µmol/l)	39,2 ± 2,8†
T ₄ + PD 98059 (2 µmol/l)	26,5 ± 4,5
T ₄ + PD 98059 (20 µmol/l)	23,2 ± 4,8
*P < 0,001, comparando las muestras tratadas con T ₃ con las muestras de control por ANOVA;	
†P < 0,05, comparando las muestras tratadas con T ₄ con las muestras de control por ANOVA.	

Ejemplo 5. Papel de la vía de transducción de señales de ERK1/2 en la estimulación de la angiogénesis por la hormona tiroidea y FGF2:

Una vía por la cual T₄ ejerce un efecto no genómico sobre las células es la cascada de transducción de señales de MAPK, en concreto, la de la activación de ERK1/2. Se sabe que T₄ aumenta la activación de ERK1/2 por el factor de crecimiento epidérmico. Se examinó el papel de la vía de MAPK en la estimulación por la hormona tiroidea de la expresión de FGF2 mediante el uso de PD 98059 (2 a 20 µmol/l), un inhibidor de la activación de ERK1/2 por las tirosina-treonina quinasas MAPK quinasa-1 (MEK1) y MEK2. Los datos de la tabla demuestran que PD 98059 bloqueó de manera eficaz el aumento en la liberación de FGF2 desde las células endoteliales ECV304 tratadas bien con T₄ o con T₃. Se realizaron estudios paralelos de la inhibición de ERK1/2 en ensayos de CAM, y los resultados representativos se muestran en la Figura 5. Una combinación de T₃ y T₄, cada una a concentraciones fisiológicas, provocó un aumento de 2,4 veces en la ramificación de los vasos sanguíneos, un efecto que fue completamente bloqueado por 3 µmol/l de PD 98059 (Figura 5A). La estimulación por FGF2 de la formación de ramificaciones (2,2 veces) también fue bloqueada eficazmente por este inhibidor de la activación de ERK1/2 (Figura 5B). Así pues, el efecto proangiogénico de la hormona tiroidea comienza en la membrana plasmática e implica la activación de la vía de ERK1/2 para potenciar la liberación de FGF2 desde las células endoteliales. Una vez más, se requiere la activación de ERK1/2 para la transducción de la señal de FGF2 y la generación de formación de nuevos vasos sanguíneos.

Ejemplo 6. Acción de la hormona tiroidea y FGF2 sobre la activación de MAPK: Se estudió la estimulación de la fosforilación y la translocación nuclear de las MAPK ERK1/2 en células ECV304 tratadas con T_4 (10^{-7} mol/l) durante 15 minutos a 6 horas. La aparición de ERK1/2 fosforilada en los núcleos celulares se produjo a los 15 minutos del tratamiento con T_4 , alcanzó un nivel máximo a los 30 minutos y todavía seguía siendo evidente a las 6 horas (Figura 6A). Este efecto de la hormona fue inhibido por PD 98059 (Figura 6B), un resultado que era de esperar, porque este compuesto bloquea la fosforilación de ERK1/2 mediante la MAPK quinasa. El inhibidor de la proteína tradicional quinasa C (PKC)- α , PKC- β y PKC- γ , CGP4125, también bloqueó el efecto de la hormona sobre la activación de MAPK en estas células, como se observó con T_4 en otras líneas celulares. La hormona tiroidea aumenta la acción de varias citoquinas y factores de crecimiento tales como el interferón- γ 13 y el factor de crecimiento epidérmico. En las células ECV304, T_4 aumentó la activación de MAPK causada por FGF2 en una incubación de 15 minutos (Figura 6C). Con la aplicación de las observaciones realizadas en las células ECV304 al modelo de CAM, los presentes inventores proponen que el complejo mecanismo por el cual la hormona induce la angiogénesis incluye la liberación de células endoteliales de FGF2 y el aumento del efecto autocrino de FGF2 liberado sobre la angiogénesis.

Ejemplo 7. RT-PCR en células ECV304 tratadas con hormona tiroidea:

La última cuestión abordada en los estudios del mecanismo de la acción proangiogénica de T_4 fue si la hormona puede inducir la expresión del gen *FGF2*. Se trataron las células endoteliales con T_4 (10^{-7} mol/l) de 6 a 48 horas, y se realizaron las estimaciones basadas en RT-PCR de ARN de *FGF2* y *GAPDH* (inferidas de las mediciones del ADNc; Figura 7). El aumento en la abundancia de ADNc de *FGF2*, corregida para el contenido de *GAPDH*, se hizo evidente en 6 horas de tratamiento hormonal y aumentó aún más en 48 horas.

Ejemplo 8A. Modelo de neovascularización retiniana en ratones (diabéticos y no diabéticos):

Para evaluar la actividad farmacológica de un artículo de ensayo sobre la neovascularización retiniana, se expusieron ratones lactantes a un ambiente de alto nivel de oxígeno durante 7 días y se dejó que se recuperaran, estimulando así la formación de nuevos vasos en la retina. Se evalúan los artículos de ensayo para determinar si se suprime la neovascularización retiniana. Se examinan las retinas con tinción de hematoxilina-eosina y con al menos un tinte que demuestre la neovascularización (por lo general, tinte de selectina). Se pueden usar otros tintes (tales como PCNA, PAS, GFAP, marcadores de la angiogénesis, etc.). A continuación, se presenta un resumen del modelo:

Modelo animal

- Se disponen los ratones lactantes (P7) y sus presas en un ambiente hiperoxigenado (70-80 %) durante 7 días.
- En P12, se retiran los ratones del ambiente oxigenado y se colocan en un ambiente normal.
- Se deja que los ratones se recuperen durante 5-7 días.
- Entonces, se sacrifican los ratones y se extirpan los ojos.
- Los ojos bien se congelan o se fijan según proceda.
- Se tiñen los ojos con tintes histoquímicos apropiados.
- Se tiñen los ojos con tintes inmunohistoquímicos apropiados.
- Se pueden extraer sangre, suero u otros tejidos.
- Se examinan los ojos, principalmente, las alteraciones microvasculares, para todos y cada uno de los hallazgos. Se registrará semicuantitativamente el crecimiento neovascular. También se encuentra disponible el análisis de imágenes.

Ejemplo 8B: Hormona tiroidea y retinopatía diabética:

Se usa un protocolo desvelado en J de la Cruz *et al.*, *J Pharmacol Exp Ther* 280: 454-459, 1997, para la administración de TETRAC a ratas que tienen diabetes experimental inducida por estreptozotocina (STZ) y retinopatía diabética. El criterio de valoración es la inhibición por TETRAC de la aparición de retinopatía proliferativa (angiogénesis).

Ejemplo 9A. Curación de heridas y tratamiento hemostático usando una nueva formulación polimérica farmacéutica de la hormona tiroidea y análogos:

La presente invención también incluye un nuevo tratamiento de curación de heridas y hemostático que incluye un análogo de la hormona tiroidea inmovilizado, preferentemente análogos de T_4 , cloruro de calcio y colágeno. Esta nueva formulación controla significativamente la hemorragia tanto venosa como arterial, reduce el tiempo de sangrado, genera un tapón de fibrina/plaquetas, libera factores de curación de heridas derivados de plaquetas de manera sostenida en presencia de colágeno a un bajo nivel y es segura. El desarrollo de dicho apósito de curación de heridas y hemostático puede ser muy valioso para el uso a corto y largo plazo en la atención médica en conflictos bélicos. Se puede optimizar la formulación farmacéutica de L-tiroxina (T_4) inmovilizada y hexasacárido globular en un hidrogel o apósito que contiene colágeno y cloruro de calcio. Este nuevo tratamiento de curación de heridas y hemostático (formulación WH) en hidrogel o apósito también puede incluir la adición de un microbicida.

La L-tiroxina conjugada con polímero o inmovilizada en agarosa demostró una potente estimulación de la angiogénesis a través de la activación de un receptor de superficie celular de adhesión (integrina $\alpha V\beta 3$) que conduce a la activación de un evento de señalización intracelular, que a su vez conduce a la regulación positiva de diversas producciones de factores de crecimiento. Además, T_4 inmovilizada produjo la migración de células epiteliales, fibroblastos y queratinocitos. T_4 inmovilizada, pero no T_3 u otros análogos, aumentó la agregación y la secreción plaquetaria inducida por colágeno, que potenciaría la formación de un tapón de plaquetas propio del sujeto. Se sabe que la hormona tiroidea estimula la producción de radicales libres en los leucocitos polimorfonucleares humanos (E. Mezosi *et al.*, *J. Endocrinol.* 85: 121-129, 2005), aparentemente a través de un receptor de membrana, y esto es un efecto importante para combatir la infección.

Por lo tanto, T_4 o T_4 -agarosa (10-100 nM), pero no T_3 , DIPTA o GC-1, es eficaz en el aumento de la agregación y la secreción de plaquetas (desgranulación). Por consiguiente, se prefiere T_4 (o los análogos y las conjugaciones poliméricas de los mismos, por ejemplo, T_4 -agarosa), en combinación con cloruro de calcio 10 mM, y con o sin colágeno, para la curación de heridas. Véanse las Figuras 23A-E.

Tromboelastografía:

La tromboelastografía (TEG) se ha usado en diversos entornos hospitalarios desde que fue desarrollada por Hartert en 1948. El principio de la TEG se basa en la medición de las características viscoelásticas físicas del coágulo de sangre. Se monitorizó la formación del coágulo a 37 °C en una cubeta cilíndrica de plástico oscilatoria ("copa") y un pistón fijo suspendido coaxialmente ("clavija") con una distancia de 1 mm entre las superficies, usando un trombelastógrafo computarizado (TEG Modelo 3000, Haemoscope, Skokie, IL). La copa oscila en cualquier dirección cada 4,5 segundos, con un período estacionario a mitad del ciclo de 1 segundo; lo que resulta en una frecuencia de 0,1 Hz y una velocidad de cizalla máxima de 0,1 por segundo. La clavija está suspendida por un cable de torsión que actúa como un transductor de par. Con la formación de coágulos, las fibrillas de fibrina enlazan físicamente la copa a la clavija y se muestra en línea la rotación de la copa efectuada por la viscoelasticidad del coágulo (transmitida a la clavija) usando un ordenador personal compatible con IBM y un programa informático diseñado a medida (Haemoscope Corp., Skokie, IL). El par de torsión experimentado por la clavija (con respecto a la oscilación de la copa) se representa en función del tiempo (Figura 58).

La TEG evalúa la coagulación mediante la medición de diversos parámetros tales como el tiempo de latencia para la iniciación del coágulo (R), el tiempo de iniciación de una firmeza del coágulo fijo (k) de aproximadamente 20 mm de amplitud, la cinética del desarrollo del coágulo medida por el ángulo (α) y la amplitud máxima del coágulo (MA). El parámetro A mide la anchura del trazado en cualquier punto de la MA. La amplitud A en mm es una función de la resistencia o elasticidad del coágulo. La amplitud en el trazado de TEG es una medida de la rigidez del coágulo; la resistencia pico o el módulo elástico de cizalla alcanzado por el coágulo, G, es una función de la rigidez del coágulo y se puede calcular a partir de la amplitud máxima (MA) del trazado de TEG. Se midieron los siguientes parámetros a partir del trazado de TEG:

- R, el *tiempo de reacción* (tiempo de gelificación) representa el período de latencia antes del establecimiento de una red de gel de fibrina tridimensional (con rigidez medible de aproximadamente 2 mm de amplitud).
- La amplitud máxima (MA, en mm) es la rigidez pico manifestada por el coágulo.
- El módulo elástico de cizalla o resistencia del coágulo (G, dinas/cm²) se define por: $G = (5000A)/(100-A)$.

La firmeza del coágulo de sangre es un parámetro importante para la trombosis y la hemostasis *in vivo* debido a que el coágulo debe resistir el esfuerzo cortante en el sitio de la lesión vascular. La TEG puede evaluar la eficacia de diferentes intervenciones farmacológicas en varios factores (activación de la coagulación, generación de trombina, formación de fibrina, activación de plaquetas, interacción de plaquetas y fibrina, y polimerización de la fibrina) que participan en la formación y retracción de los coágulos. En la Tabla 3, se muestra el efecto de la endotoxina (0,63 ug), Xa (0,25 nM), trombina (0,3 mU) y TF (25 ng) sobre los diferentes parámetros de coagulación medidos mediante TEG computarizada en sangre entera humana.

Muestreo de sangre:

Se extrajo sangre de voluntarios bajo su consentimiento en virtud de un protocolo aprobado por el Comité de Investigaciones en Seres Humanos del Hospital William Beaumont. Usando el método de dos jeringas, se extrajeron muestras a través de una aguja de mariposa de calibre 21, desechándose los 3 primeros mililitros de sangre. Se recogió sangre entera (WB) en tubos Vacutainer siliconados (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, que contenían citrato trisódico al 3,8 %, de manera que se mantuvo una proporción del citrato con respecto a la sangre entera de 1:9 (v/v). Se realizó la TEG a las 3 horas de la recogida de sangre. Se volvió a añadir calcio a 1-2,5 mM seguido de la adición de diferentes estímulos. El cloruro de calcio por sí mismo a la concentración usada solo mostró un efecto mínimo sobre la formación de coágulos y la resistencia de los coágulos.

Se inicia la formación de coágulos mediante la escisión inducida por la trombina de fibrinopéptido A del fibrinógeno. Los monómeros de fibrina resultantes se polimerizan espontáneamente para formar hebras de fibrillas que se

someten a extensión lineal, ramificación y asociación lateral que conduce a la formación de una red tridimensional de fibras de fibrina. Una propiedad única de las estructuras en red es que se comportan como sólidos elásticos rígidos, capaces de resistir la deformación de la tensión de corte. Esta resistencia a la deformación se puede medir por el módulo elástico, un índice de la resistencia de los coágulos. A diferencia de los ensayos de coagulación convencionales (como el tiempo de protrombina y el tiempo parcial de tromboplastina) que se basan solo en el tiempo hasta el inicio de la formación del coágulo, la TEG permite la adquisición de información cuantitativa permitiendo la medición de la resistencia máxima alcanzada por los coágulos. A través del receptor GPIIb/IIIa, las plaquetas se unen a la fibrina (fibrinógeno) y modulan las propiedades viscoelásticas de los coágulos. Los presentes resultados demuestran que la resistencia de los coágulos en TF-TEG es claramente función de la concentración de las plaquetas, y las plaquetas aumentaron la resistencia de los coágulos ~ 8 veces bajo cizalla. Los diferentes antagonistas de GPIIb/IIIa de plaquetas (clase I frente a clase II) se comportaron con una eficacia distinta en la inhibición de la resistencia de los coágulos mediada por la fibrina y las plaquetas usando TF-TEG bajo cizalla.

Análisis estadístico:

Los datos se expresan como media $\pm$ ETM. Los datos se analizaron mediante análisis pareado o de grupo usando la prueba t de Student o ANOVA cuando fue aplicable; las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$.

Efecto del cloruro de calcio frente al factor tisular en la dinámica de los coágulos en sangre entera humana citrada usando TEG

Parámetros de la TEG	25 ng de TF + Ca^{+2} 2,25 mM (media $\pm$ ETM)	Ca^{+2} 10 mM media $\pm$ ETM)
r (min)	29,7 $\pm$ 2,3	14,5 $\pm$ 2,5*
K (min)	5,8 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 0,7
α (ángulo)	45,0 $\pm$ 2,6	47,3 $\pm$ 2,7
MA (mm)	58,2 $\pm$ 1,7	56,5 $\pm$ 2,2
Los datos representan la media $\pm$ ETM, n = 4, *P < 0,01.		

Agregación y desgranulación plaquetaria en sangre entera usando la técnica de la impedancia: en este estudio, se usaron el agregómetro de sangre entera Modelo 560 y el programa informático Aggro-Link asociado de la empresa Chrono-Log. Se colocan dos electrodos en sangre diluida y se envía un impulso eléctrico de uno al otro. A medida que las plaquetas se van agregando alrededor de los electrodos, el Chrono-Log mide la impedancia de la señal eléctrica en ohmios de resistencia.

Muestreo de sangre:

Se extrajo diariamente sangre de donantes sanos con edades comprendidas entre los 17 y 21 años en viales Vacutainer de 4,5 mililitros con citrato de sodio tamponado al 3,8 % (Becton Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey). Se mantuvo la sangre en un eje de balancín para prolongar la vida de las plaquetas, y los experimentos se realizaron a las 5 horas de la flebotomía.

Procedimiento: para el control, se mezclaron 500 microlitros de sangre entera, 500 microlitros de solución salina al 0,9 % y una varilla de agitación magnética en una cubeta, y se calentaron durante cinco minutos a 37 grados centígrados. Se indujo la agregación subumbral con 5 microlitros de 1-2 $\mu\text{g/ml}$ de colágeno, que el agregómetro midió durante 6-7 minutos. Se ensayaron los efectos de T_4 , T_4 -agarosa frente a T_3 y otros análogos de la hormona tiroidea sobre la agregación y la secreción inducida por el colágeno. Ingberman-Wojenski C., Smith J. B., Silver M. J. "Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets". *J Lab Clin Med*. Enero de 1983; 101(1):44-52.

Ensayo de migración celular:

Se aíslan granulocitos humanos de sangre derramada mediante el método de Mousa *et al.* y se llevan a cabo ensayos de migración celular como se ha descrito anteriormente (*Methods In Cell Science*, 19 (3): 179-187, 1997, y *Methods In Cell Science* 19 (3): 189-195, 1997). En síntesis, se usará una cámara de quimiotaxis desechable de 96 pocillos con neurosonda con un tamaño de poro de 8 μm . Esta cámara permite la cuantificación de la migración celular hacia un gradiente de quimioquina, citoquina o proteínas de la matriz extracelular. Se añadirá suspensión celular (45 μl de 2×10^6) a una placa de polipropileno que contendrá 5 μl de agentes de ensayo, tales como flavonoides o derivados de la hormona tiroidea, y se incubarán durante 10 minutos a 22 $^{\circ}\text{C}$. Se añadirá IL8 (0,1-100 ng) con o sin T_3/T_4 (33 μl) a 0,001-0,1 μM a los pocillos inferiores de una cámara de quimiotaxis desechable, luego se montará la cámara usando el filtro previamente enmarcado. Se añadirán 25 μl de suspensión de células/agente de ensayo a los pocillos filtrantes superiores, luego se incubarán durante la noche (22 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$,

CO₂ al 5 %) en una incubadora de cultivo celular humidificado. Tras la incubación durante la noche, se retirarán cuidadosamente las células no migradas y el exceso de medios usando una pipeta de 12 canales y un rascador de células. A continuación, se lavarán los filtros dos veces en tampón de fosfato salino (PBS) y se fijarán con formaldehído al 1 % en tampón PBS. Se impregnarán las membranas de células migradas con Triton X-100 (0,2 %) y, a continuación, se lavarán 2-3 veces con PBS. Se teñirán los filamentos de actina de las células migradas con rodamina faloidina (12,8 UI/ml) durante 30 minutos (22 °C). La rodamina faloidina se preparará semanalmente y se reutilizará hasta un máximo de 3 días, si se mantiene protegida de la luz a 4 °C. Se determinará la quimiotaxis cuantitativamente por detección de fluorescencia usando un fluorímetro de micro-filtro Cytofluor II (excitación a 530/emisión a 590). Todos los tratamientos con células y los posteriores lavados se llevarán a cabo usando una estación de tratamiento/lavado de diseño único (*Methods In Cell Science*, 19 (3): 179-187, 1997). Esta técnica permitirá la cuantificación exacta de la migración celular y proporcionará resultados reproducibles con una variabilidad mínima entre ensayos y dentro de un mismo ensayo.

Ensayos de migración celular:

Estos ensayos se realizaron usando una cámara de quimiotaxis desechable de 96 pocillos con neurosonda con un tamaño de poro de 8 µm. Esta cámara permitió la cuantificación de la migración celular hacia un gradiente bien de vitronectina o de osteopontina. Se retiraron las células cultivadas tras un método estandarizado usando EDTA/tripsina (0,01 %/0,025 %). Tras la retirada, las células se lavaron dos veces y se volvieron a suspender (2 x 10⁶/ml) en EBM (medio basal de células endoteliales, Clonetics Inc.). Se añadió bien vitronectina u osteopontina (33 µl) a 0,0125-100 µg/ml a los pocillos inferiores de una cámara de quimiotaxis desechable, y luego se montó usando el filtro preenmarcado. Se añadió la suspensión celular (45 µl) a una placa de polipropileno que contenía 5 µl de agente de ensayo a diferentes concentraciones y se incubó durante 10 minutos a 22 °C. Se añadieron 25 µl de suspensión de células/agente de ensayo a los pocillos filtrantes superiores, luego se incubaron durante la noche (22 horas a 37 °C) en una incubadora de cultivo celular humidificado. Tras la incubación durante la noche, se retiraron cuidadosamente las células no migradas y el exceso de medios usando una pipeta de 12 canales y un rascador de células. A continuación, se lavaron los filtros dos veces en PBS (sin Ca⁺² o Mg²⁺²) y se fijaron con formaldehído al 1 %. Se impregnaron las membranas de células migradas con Triton X-100 (0,2 %) y, a continuación, se lavaron 2-3 veces con PBS. Se tiñeron los filamentos de actina de las células migradas con rodamina faloidina (12,8 UI/ml) durante 30 minutos (22 °C). La rodamina faloidina se preparó semanalmente y se reutilizó hasta un máximo de 3 días, manteniéndola protegida de la luz a 4 °C. Se determinó la quimiotaxis cuantitativamente por detección de fluorescencia usando un fluorímetro de Cytofluor II (excitación a 530/emisión a 590). Todos los tratamientos con células y los posteriores lavados se llevaron a cabo usando una estación de tratamiento/lavado de diseño único. Esta estación consistía en seis unidades individuales de reactivos cada una con una capacidad de volumen de 30 ml. Cada unidad se llenó con uno de los siguientes reactivos: PBS, formaldehído, Triton X-100 o rodaminafaloidina. Usando esta técnica, los filtros se sumergieron suavemente en la solución apropiada, minimizando así la pérdida de células migradas. Esta técnica permitió la cuantificación máxima de la migración celular y proporcionó resultados reproducibles con una variabilidad mínima entre ensayos y dentro de un mismo ensayo.

Migración hacia la proteína de la matriz extracelular vitronectina

Tratamientos (Unidades de fluorescencia) + DE	Migración media de células endoteliales
A. Migración inespecífica sin matriz en CI	270 ± 20
B. Vitronectina (25 ug) en CI	6,116 ± 185
C. CS de T ₃ (0,1 uM)/Vitronectina (25 ug) en CI	22,016 ± 385
D. CS de T ₄ (0,1 uM)/Vitronectina (25 ug) en CI	13,083 ± 276
C + XT199 (10 uM)	4,550 ± 225
D + XT 199 (10 uM)	3,890 ± 420
C + PD (0,8 ug)	7,555 ± 320
D + PD (0,8 ug)	6,965 ± 390

CI = Cámara inferior; CS = cámara superior.

Se obtuvieron datos similares con otros antagonistas de avb3 potentes y específicos, tales como LM609 y SM256.

Ejemplo 9B. Curación de heridas de células epiteliales y fibroblastos humanos *in vitro*:

El método de curación de heridas bidimensional *in vitro* es como se describe en Mohamed S., Nadijcka D., Hanson, V. "Wound healing properties of cimetidine *in vitro*". *Drug Intell Clin Pharm* 20: 973-975; 1986. Además, en este estudio, se utilizará un método de curación de heridas tridimensional ya establecido en el laboratorio de los presentes inventores (véase más adelante). Los datos muestran una potente estimulación de la curación de las heridas por la hormona tiroidea.

Ensayo de curación de heridas tridimensional *in vitro* de células de fibroblastos dérmicos humanos:**Etapla 1:** preparación de geles de colágeno contraídos:

- 5 1) Se recubre una placa de 24 pocillos con 350 ul de BSA al 2 % a temperatura ambiente durante 2 horas.
 2) Se tratan con tripsina NHDF (células de fibroblastos dérmicos humanos normales, paso 5-9) al 80 % de confluencia y se neutralizan con medio de crecimiento, se centrifugan y se lavan una vez con PBS.
 3) Se prepara una mezcla de células y colágeno, se mezcla suavemente y siempre en el hielo:

<u>Solución madre</u>	Concentración final
5 x DMEC	1 x DMEM
3 mg/ml de vitrogen	2 mg/ml
H ₂ O dd	óptima
NHDF	2 x 10 ⁻⁵ células/ml
FBS	1 %

- 10 4) Se aspira la BSA al 2 % de la placa de 24 pocillos, se añaden 350 ul/pocillo de mezcla de células y colágeno, y se incuba la placa a 37 °C en una incubadora de CO₂.
 5) Tras 1 h, se añaden 0,5 ml/pocillo de medio de DMEM + FBS al 5 %, se usa una punta de 10 ul para separar el gel de colágeno del borde de cada pocillo, luego se incuba durante 2 días. Las células de fibroblastos contraerán el gel de colágeno.

Etapla 2: Preparación de cultivo de colágeno de herida incrustado y coágulo de herida de fibrina tridimensional

- 20 1) Se prepara solución de fibrinógeno (1 mg/ml) con o sin reactivos de ensayo. 350 ul de solución de fibrinógeno para cada pocillo en un tubo eppendorf.

<u>Solución madre</u>	Concentración final
5 x DMEC	1 x DMEM
fibrinógeno	1 mg/ml
H ₂ O dd	óptima
reactivos de ensayo	concentración óptima
FBS	1 % o 5 %

- 25 2) Se corta cada gel de colágeno contraído por la mitad con unas tijeras. Se lava el gel con PBS y se transfiere el gel al centro de cada pocillo de placa 24 pocillos.
 3) Se añaden 1,5 ul de trombina humana (0,25 U/ul) a cada tubo, se mezcla bien y luego se añade la solución alrededor del gel de colágeno, la solución polimerizará en 10 minutos.

30 Tras 20 minutos, se añade DMEM + FBS al 1 % (o 5 %) con o sin agente de ensayo, 450 ul/pocillo, y se incuba la placa en una incubadora de CO₂ a 37 °C hasta 5 días. Se toman fotografías de cada día.

Curación de heridas *in vivo* en ratas diabéticas:

35 Usando un modelo de heridas por incisión aguda en ratas diabéticas, se ensayan los efectos de los análogos de la hormona tiroidea y sus formas conjugadas. Se realizan análisis de la velocidad de cierre de las heridas, de resistencia a la rotura y de histología periódicamente los días 3-21.

Métodos:

40 Se producen en los animales (ratones y ratas) del estudio dos heridas punzantes pequeñas. Se aplica WH en una de las heridas, y se cubre la otra con una solución salina como control. En otros casos, las heridas se dejan curar de manera natural.

45 Se sacrifican los animales cinco días después de herirlos. Se extirpa una pequeña superficie de piel - de 1 a 1,5 milímetros - de los bordes de las heridas tratadas y no tratadas.

Se determinan el cierre de la herida y el tiempo en cerrarse la herida. Además, se determinan los niveles de tenascina, una proteína que ayuda a desarrollar el tejido conjuntivo, en el tejido de granulación de las heridas. También se determina la calidad del tejido de granulación (es decir, tejido rugoso, rosáceo que normalmente se forma cuando una herida se está curando, nuevos capilares y tejido conjuntivo).

Materiales y métodos:

Se preparan heridas crónicas de granulación mediante métodos bien conocidos en la técnica. Se aclimatan ratas macho Sprague Dawley con un peso de 300 a 350 gramos durante una semana en las instalaciones de los

presentes inventores antes de su uso. Bajo anestesia con Nembutal intraperitoneal (35 mg/kg), se afeita y se depila el dorso de la rata. Los animales se alojan en jaulas individuales y se les ofrece comida y agua a voluntad. Todos los experimentos se llevan a cabo de acuerdo con las directrices del comité de cuidado y uso de animales del departamento del centro médico de veteranos de Albany, Nueva York.

Ya se había realizado con anterioridad la caracterización histológica de esta herida con respecto a una herida de granulación crónica humana. Se dividieron sesenta y cuatro ratas en ocho grupos de tratamiento ($n = 8/\text{grupo}$). Se trataron los animales con la aplicación tópica de vehículo (controles del vehículo) en los días 5, 9, 12, 15 y 18. El control del vehículo puede ser bien agarosa (Grupo 1) o la forma polimérica (Grupo 2) que se usará en la conjugación de L-tiroxina. Se trataron las heridas con T₄-agarosa (Grupos 3-5) o T₄-polímero (Grupos 6-8) a 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en presencia de 10 μg de hexasacárido globular, 10 μg de colágeno y cloruro de calcio 10 mM de aplicación tópica en los días 5, 9, 12, 15 y 18. Todas las heridas se dejan al descubierto. Cada 48 horas, se pueden rastrear los contornos de las heridas en hojas de acetato, y se pueden realizar cálculos de superficie con planimetría digital computarizada.

A continuación, se recogen tres tiras transversales, de espesor total, de tejido de granulación de los extremos cefálico, medio y caudal de las heridas el día 19 y se fijan en formalina tamponada al 10 por ciento. Se toman secciones transversales (5 μm) de cada muestra, y se tiñen con hematoxilina y eosina. El espesor del tejido de granulación se puede estimar con un micrómetro ocular a baja potencia. Se examinan los campos de alta potencia inmediatamente debajo de la capa inflamatoria superficial del tejido de granulación. De cada tira de tejido de granulación, se pueden fotografiar y codificar cinco campos de alta potencia adyacentes. Entonces, se usan impresiones ampliadas de estas exposiciones para el análisis histométrico de una manera ciega. Se realiza el recuento de los fibroblastos, las células "redondas" (macrófagos, linfocitos y neutrófilos) y los capilares. Además, se clasifica la celularidad de cada sección para la celularidad a una escala de 1 (recuentos de células reducidas) a 5 (muy celular).

Análisis estadístico:

Se representaron las mediciones de superficie en serie frente al tiempo. Para los datos de cada animal, se ajustará una ecuación de Gompertz (r^2 típico = 0,85). Usando esta curva, se puede estimar la semivida de la herida. La comparación entre los grupos se realiza mediante el análisis de tablas de vida y el ensayo de rangos de Wilcoxon. Estos análisis estadísticos se realizan usando los paquetes informáticos SAS (Guía SAS/STAT para ordenadores personales, Versión 6 Edition, Cary, Carolina del Norte, 1987, pág. 1028) y BMDP (Manual del programa informático de estadística BMDP, Los Ángeles, programa informático BMDP, Inc. 1988) en un ordenador personal.

Se combinan los recuentos de células para los diferentes grupos de tratamiento y se analizan usando un análisis de la varianza de una vía. Los análisis *post hoc* de las diferencias entre los grupos se pueden llevar a cabo usando el ensayo de Tukey (ensayo de comparación múltiple por parejas), considerado significativo $p < 0,05$. Se usará el programa informático de estadística Sigma Stat (Jandel Scientific, Corte Madera, California) para el análisis de los datos.

Ejemplo 10. Modelo de infarto de miocardio en roedores:

El modelo de infarto de miocardio de ligadura de la arteria coronaria se usa para investigar la función cardiaca en ratas. Inicialmente, se anestesia la rata con xilazina y ketamina, y tras obtener la anestesia adecuada, se entuba la tráquea y se inicia la ventilación con presión positiva. Se coloca al animal en posición supina sujetando sus extremidades sin apretar, y se realiza una esternotomía media. Se saca el corazón al exterior con suavidad y se ata firmemente una sutura 6-0 alrededor de la arteria coronaria descendente anterior. Se vuelve a colocar rápidamente el corazón en el pecho y se cierra la incisión de toracotomía con una sutura en bolsa de 3-0, tras lo que se cierra la piel con suturas interrumpidas o clips quirúrgicos. Se colocan los animales en una almohadilla térmica a temperatura regulada y se observan de cerca durante la recuperación. Si es necesario se administra suplemento de oxígeno y se realiza reanimación cardiopulmonar. Tras la recuperación, la rata se devuelve a la instalación de cuidado de los animales. Dicha ligadura de la arteria coronaria produce en la rata infartos de miocardio grandes de la pared anterior. La mortalidad a las 48 horas de este procedimiento puede ser tan elevada como del 50 %, y hay variabilidad en el tamaño del infarto producido por este procedimiento. Basándose en estas consideraciones y la experiencia previa, para obtener 16-20 ratas con infartos grandes de modo que se puedan comparar los dos modelos de administración de hormona tiroidea descritos a continuación, se requieren aproximadamente 400 ratas.

Estos experimentos están diseñados para demostrar que la administración sistémica de la hormona tiroidea ya sea antes o después de la ligadura de la arteria coronaria conduce a efectos beneficiosos en animales intactos, incluyendo el grado de las anomalías hemodinámicas evaluado por ecocardiografía y las mediciones hemodinámicas, y la reducción del tamaño del infarto. Se propone realizar la medición de los resultados a las tres semanas de los infartos. Aunque algunas ratas pueden no tener infartos, o solo producirse un pequeño infarto, estas ratas se pueden identificar por ecocardiogramas normales y hemodinámicas normales (presión diastólica final del ventrículo izquierdo < 8 mm Hg).

Administración de la hormona tiroidea:

Hay dos metodologías de administración. En la primera, la hormona tiroidea se inyecta directamente en el miocardio con periinfarto. A medida que se va identificando fácilmente la demarcación entre el miocardio normal y el isquémico durante la oclusión aguda a pecho abierto, esta metodología proporciona una administración suficiente de hormona para detectar los efectos angiogénicos.

Aunque el primer modelo es útil en pacientes sometidos a cirugía de revascularización de la arteria coronaria, y constituye la prueba de principio de que una inyección local induce la angiogénesis, también se puede usar una metodología más amplia usando un segundo modelo. En el segundo modelo, se coloca un catéter retrógrado en el ventrículo izquierdo a través de una arteria carótida en la rata anestesiada antes de la inducción del infarto de miocardio. Como alternativa, se realiza una punción con aguja directa de la aorta, justo por encima de la válvula aórtica. A continuación, se simula la inyección intracoronaria de la hormona tiroidea bruscamente mediante la oclusión de la aorta por encima del origen de los vasos coronarios durante varios segundos, produciendo así contracciones isovolúmicas. Se inyecta la hormona tiroidea en el ventrículo izquierdo o en la aorta inmediatamente después de la constricción de la aorta. Las contracciones isovolúmicas resultantes propulsan la sangre en los vasos coronarios perfundiendo todo el miocardio con hormona tiroidea. Este procedimiento se puede realizar tantas veces como sea necesario para que sea eficaz. El número de inyecciones depende de las dosis usadas y la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Ecocardiografía:

Se ha desarrollado un método para la obtención de ecocardiogramas bidimensionales y en modo M en ratas sin anestesiarse. Se pueden medir de manera reproducible y fiable las dimensiones, la función, el espesor de la pared y el movimiento de la pared del ventrículo izquierdo. Las mediciones se llevan a cabo de una manera ciega para eliminar el sesgo con respecto a la administración de la hormona tiroidea.

Hemodinámica:

Las mediciones hemodinámicas se usan para determinar el grado de deterioro del ventrículo izquierdo. Se anestesian las ratas con isoflurano. A través de una incisión a lo largo de la parte anterior derecha del cuello, se aíslan la arteria carótida derecha y la vena yugular derecha, y se canulan con un catéter transductor de presión (Millar, SPR-612, 1.2 Fr). Entonces, se realizan las siguientes mediciones: frecuencia cardíaca, presión sistólica y diastólica, presión arterial media, presión telediastólica y sistólica del ventrículo izquierdo, y $+y$ y $-dP/dt$. Son de particular utilidad las mediciones de la presión telediastólica del ventrículo izquierdo, cuya elevación progresiva se correlaciona con el grado de daño miocárdico.

Tamaño del infarto:

Se sacrifican las ratas para la medición del tamaño del infarto usando la metodología TTC.

Morfometría:

Se medirá la densidad microvascular [microvasos/mm²] en la zona infartada, zona periinfartada y del otro miocardio opuesto al del infarto, por lo general, la pared posterior. De cada rata, se registrarán digitalmente de 7 a 10 campos de alta potencia microscópicos [x 400] con miocitos transversalmente seccionados usando el programa informático de análisis de imágenes. Los microvasos serán contados por un investigador ciego. La microcirculación se definirá como los vasos más allá de las arteriolas de tercer orden con un diámetro de 150 micrómetros o inferior, que proporcionan tejido entre las arteriolas y las vénulas. Para corregir las diferencias en la hipertrofia ventricular izquierda, se dividirá la densidad de los microvasos entre el peso del ventrículo izquierdo corregido para el peso corporal. El miocardio de las ratas con operación simulada sirve como controles.

Ejemplo 11. Efectos de los antagonistas de $\alpha V\beta 3$ sobre el efecto proangiogénico de T₄ o FGF2:

El inhibidor de $\alpha V\beta 3$ LM609 inhibió totalmente los efectos proangiogénicos inducidos tanto por FGF2 como por T₄ en el modelo de CAM a 10 microgramos (Figura 16).

Ejemplo 12. Inhibición del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos relacionado con el cáncer:

Se usa un protocolo desvelado en J. Bennett, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 99: 2211-2215, 2002, para la administración de ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) a ratones SCID que han recibido implantes de células de cáncer de mama humano (MCF-7). El TETRAC se proporciona en el agua potable para elevar el nivel en circulación del análogo de la hormona en el modelo de ratón hasta 10⁻⁶ M. El criterio de valoración es la acción inhibidora de TETRAC sobre la angiogénesis de los tumores implantados.

Ejemplo 13. Efecto potenciador de la angiogénesis de la hormona tiroidea y sus análogos a niveles subumbral de VEGF y FGF2 en un modelo de crecimiento endotelial microvascular tridimensional *in vitro*:

T₃, T₄, T₄-agarosa o el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) más el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) produjo un efecto proangiogénico comparable en el modelo de crecimiento endotelial microvascular tridimensional *in vitro*. El efecto proangiogénico de los análogos de la hormona tiroidea fue bloqueado por DP 98059, un inhibidor de la cascada de transducción de señales de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK; ERK1/2). Además, un antagonista específico de la integrina $\alpha V\beta 3$ (XT199) inhibió el efecto proangiogénico de los análogos de la hormona tiroidea o de T₄-agarosa. Los datos también demostraron que el antagonista de la hormona tiroidea TETRAC inhibe la respuesta proangiogénica del análogo tiroideo. Por lo tanto, esos análogos de la hormona tiroidea ensayados son proangiogénicos, una acción que se inicia en la membrana plasmática e incluye a los receptores de integrina $\alpha V\beta 3$, y depende de MAPK.

La presente invención describe un efecto proangiogénico promotor de T₃, T₄ o T₄-agarosa a niveles subumbral de VEGF y FGF2 en un modelo de crecimiento endotelial microvascular tridimensional *in vitro*. La invención también proporciona pruebas de que el efecto de la hormona se inicia en la membrana plasmática de la célula endotelial y está mediada por la activación de la integrina $\alpha V\beta 3$ y la vía de transducción de señales de ERK1/2.

Se demostró el aumento producido por T₃, T₄ o T₄-agarosa de la actividad angiogénica de bajas concentraciones de VEGF y FGF2 en el ensayo de crecimiento tridimensional. Bien T₃, T₄ a 10^{-7} - 10^{-8} M o T₄-agarosa a concentración total de hormona de 10^{-7} M fue comparable en cuanto a la actividad proangiogénica con las concentraciones máximas del efecto de VEGF y FGF2 en este modelo *in vitro*. Aunque se ha publicado que el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el corazón de la rata se produce concomitantemente con la inducción de la hipertrofia miocárdica por una alta dosis de T₄, la hormona tiroidea no se ha considerado como un factor angiogénico. El presente ejemplo establece que la hormona a concentraciones fisiológicas es proangiogénica en un entorno distinto del corazón.

T₄-agarosa reprodujo los efectos de T₄, y no se cree que este derivado de la hormona tiroidea pueda acceder al interior de la célula. Se ha usado en el laboratorio de los presentes inventores para examinar los modelos de acción de la hormona para las posibles acciones iniciadas en la superficie celular de las yodotironinas. Además, los experimentos llevados a cabo con T₄ y TETRAC también apoyaron la conclusión de que la acción de T₄ en este modelo se inició en la membrana plasmática. TETRAC bloquea los efectos iniciados en la membrana de T₄.

Dado que la hormona tiroidea activa de manera no genómica la vía de transducción de señales de MAPK (ERK1/2), la acción de la hormona sobre la angiogénesis puede estar mediada por MAPK. Al añadirse al modelo de CAM, un inhibidor de la cascada de MAPK, PD 98059, inhibió la acción proangiogénica de T₄. Aunque este resultado coincidió con una acción sobre la transducción de la señal de la hormona tiroidea corriente arriba de un efecto de T₄ sobre la elaboración de FGF2, se sabe que FGF2 también actúa a través de un mecanismo dependiente de MAPK. T₄ y FGF2 causan individualmente fosforilación y translocación nuclear de ERK1/2 en las células endoteliales y, cuando se usan a dosis submáximas, se combinan para mejorar aún más la activación de ERK1/2. Para examinar la posibilidad de que solo el componente dependiente de MAPK de la estimulación hormonal de la angiogénesis se relacione exclusivamente con la acción de FGF2 sobre el crecimiento de los vasos, se midió la liberación celular de FGF2 en respuesta a T₄ en presencia de PD 98059. El último agente bloqueó el aumento inducido por la hormona de la concentración de factor de crecimiento, indicando la participación de la activación de MAPK en la acción de T₄ sobre la liberación de FGF2 desde las células endoteliales, así como el consiguiente efecto de FGF2 sobre la angiogénesis.

Efecto de la hormona tiroidea sobre la angiogénesis:

Bien T₄, T₃ o T₄-agarosa al 0,01-0,1 μ M dio lugar a la estimulación significativa ($P < 0,01$) de la angiogénesis, véase la siguiente tabla. Esto se demuestra ser comparable a la eficacia proangiogénica de FGF2 (50 ng/ml) más VEGF (25 ng/ml)

Efecto proangiogénico *in vivo* de factores de crecimiento, hormona tiroidea y análogos en el ensayo de crecimiento endotelial microvascular humano tridimensional

Grupos de tratamiento	Longitud media de los vasos de los tubos (mm) $\pm$ DE
Control	0,76 $\pm$ 0,08
FGF2 (25 ng) + VEGF (50 ng)	2,34 $\pm$ 0,25*
T ₃ (20 ng)	1,88 $\pm$ 0,21*
T ₄ (23 ng)	1,65 $\pm$ 0,15*
T ₄ -agarosa (23 ng)	1,78 $\pm$ 0,20*

*Se obtuvieron los datos de tres experimentos (medias $\pm$ DE). Las células se trataron previamente con el nivel subumbral de FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Los datos representan la media $\pm$ DE, $n = 3$, * $P < 0,01$ por ANOVA, comparando los grupos tratados con el grupo de control.*

Efectos de TETRAC sobre la acción proangiogénica tiroidea:

T₃ estimula las vías de transducción de señales celulares iniciadas en la membrana plasmática. Estas acciones proangiogénicas son bloqueadas por un análogo de yodotironina desaminado, el TETRAC, que es conocido por inhibir la unión de T₄ a las membranas plasmáticas. La adición de TETRAC (0,1 μ M) inhibió la acción proangiogénica de T₃, T₄ o T₄-agarosa (Tablas 5-7). Esto se demuestra por la inhibición de número de migraciones de células endoteliales microvasculares y la longitud de los vasos (Tabla 5-7).

Papel de la vía de transducción de señales de ERK1/2 en la estimulación de la angiogénesis por la hormona tiroidea:

Se llevaron a cabo estudios en paralelo de la inhibición de ERK1/2 en los ensayos de crecimiento microvascular tridimensional. La hormona tiroidea y el análogo a 0,01-0,1 μ M provocaron un aumento significativo de la longitud de los tubos y del número de células que migraron, un efecto que fue inhibido significativamente ($P < 0,01$) por PD 98059 (Tablas 5-7). Esto se demuestra por la inhibición del número de migraciones de células endoteliales microvasculares y la longitud de los vasos (Tabla 5-7).

Papel de la integrina α V β 3 en la estimulación de la angiogénesis por la hormona tiroidea:

La proangiogénesis mediada bien por T₃, T₄ o T₄-agarosa a 0,01-0,1 μ M en presencia de niveles subumbral de VEGF y FGF2 fue significativamente bloqueada ($P < 0,01$) por el antagonista de la integrina α V β 3 XT199 (Tablas 5-7). Esto se demuestra por la inhibición del número de migraciones de las células endoteliales microvasculares y la longitud de los vasos, véanse las tablas que figuran a continuación.

Así pues, el efecto proangiogénico de la hormona tiroidea y sus análogos comienza en la integrina α V β 3 de la membrana plasmática e implica la activación de ERK1/2.

Mecanismos proangiogénicos de la hormona tiroidea T₃ en el ensayo de crecimiento endotelial microvascular humano tridimensional

Tratamiento de HDMEC	Número medio de células migradas $\pm$ DE	Longitud media de los vasos (mm) $\pm$ DE
Control	88 $\pm$ 14	0,47 $\pm$ 0,06
T ₃ (0,1 μ M)	188 $\pm$ 15*	0,91 $\pm$ 0,04*
T ₃ (0,1 μ M) + PD98059 (3 μ g)	124 $\pm$ 29	0,48 $\pm$ 0,09
T ₃ (0,1 μ M) + XT199 (2 μ g)	118 $\pm$ 18	0,47 $\pm$ 0,04
T ₃ (0,1 μ M) + TETRAC (0,15 μ g)	104 $\pm$ 15	0,58 $\pm$ 0,07
<i>Se usaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMVC). Las células se trataron previamente con FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Las imágenes se tomaron con aumento 4 y 10, el día 3. Los datos representan la media $\pm$ DE, $n = 3$, *$P < 0,01$.</i>		

Mecanismos proangiogénicos de la hormona tiroidea T₄ en el ensayo de crecimiento endotelial microvascular humano tridimensional

Tratamiento de HDMEC	Número medio de células migradas $\pm$ DE	Longitud media de los vasos (mm) $\pm$ DE
Control	88 $\pm$ 14	0,47 $\pm$ 0,06
T ₄ (0,1 μ M)	182 $\pm$ 11*	1,16 $\pm$ 0,21*
T ₄ (0,1 μ M) + PD98059 (3 μ g)	110 $\pm$ 21	0,53 $\pm$ 0,13
T ₄ (0,1 μ M) + XT 199 (2 μ g)	102 $\pm$ 13	0,53 $\pm$ 0,05
T ₄ (0,1 μ M) + TETRAC (0,15 μ g)	85 $\pm$ 28	0,47 $\pm$ 0,11

Se usaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMVC). Las células se trataron previamente con FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Las imágenes se tomaron con aumento 4 y 10, el día 3. Los datos representan la media $\pm$ DE, $n = 3$, $*P < 0,01$.

Mecanismos proangiogénicos de la hormona tiroidea T₄-agarosa en el ensayo de crecimiento endotelial microvascular humano tridimensional

Tratamiento de HDMEC	Número medio de células migradas $\pm$ DE	Longitud media de los vasos (mm) $\pm$ DE
Control	88 $\pm$ 14	0,47 $\pm$ 0,06
T ₄ -agarosa (0,1 uM)	191 $\pm$ 13*	0,97 $\pm$ 0,08*
T ₄ -agarosa (0,1 uM) + PD98059 (3 ug)	111 $\pm$ 8	0,56 $\pm$ 0,03
T ₄ -agarosa (0,1 uM) + XT 199 (2 ug)	106 $\pm$ 5	0,54 $\pm$ 0,03
T ₄ -agarosa (0,1 uM) + TETRAC (0,15 ug)	87 $\pm$ 14	0,45 $\pm$ 0,09
Se usaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMVC). Las células se trataron previamente con FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Las imágenes se tomaron con aumento 4 y 10, el día 3. Los datos representan la media $\pm$ DE, $n = 3$, $*P < 0,01$.		

5 **Ejemplo 14. Modelo *in vitro* para la evaluación del transporte de análogos de la hormona tiroidea a través de la barrera hematoencefálica**

10 A continuación, se describe un método *in vitro* de evaluación de la facilidad con la que un análogo tiroideo polimérico seleccionado solo o en combinación con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos tiende probablemente pasará a través de la barrera hematoencefálica. Audus, *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci* 507: 9-18 (1987) proporcionan una descripción detallada del modelo y del protocolo.

15 En resumen, se aíslan células endoteliales microvasculares de la materia gris cerebral de cerebros bovinos recién extraídos. Los cerebros se obtienen de un matadero local y se transportan al laboratorio en medio esencial mínimo ("MEM") enfriado con hielo con antibióticos. En condiciones estériles, se extirpan los grandes vasos sanguíneos superficiales y las meninges usando procedimientos de disección convencionales. Se retira la sustancia gris cortical por aspiración, a continuación, se trocea en cubos de aproximadamente 1 mm. Después, se incuba la materia gris troceada con dispasa al 0,5 % (BMB, Indianápolis, Ind.) durante 3 horas a 37 °C en un baño de agua con agitación.

20 Tras la digestión de 3 horas, se concentra la mezcla por centrifugación (1.000 x g durante 10 min), luego se vuelve a suspender en dextrano al 13 % y se centrifuga durante 10 min a 5.800 x g. Se desecha la grasa sobrenadante, los residuos celulares y la mielina, y se vuelve a suspender el sedimento de microvasos en bruto en 1 mg/ml de colagenasa/dispasa y se incuba en un baño de agua con agitación durante 5 horas a 37 °C. Tras la digestión de 5 horas, se aplica la suspensión de microvasos a un gradiente de Percoll al 50 % preestablecido y se centrifugan durante 10 min a 1.000 x g. Se retira la banda que contiene células endoteliales purificadas (segunda banda de la parte superior del gradiente) y se lava dos veces con medio de cultivo (por ejemplo, MEM al 50 %/mezcla de nutrientes F-12 al 50 %). Se congelan las células (-80 °C) en medio que contiene DMSO al 20 % y suero de caballo al 10 % para su posterior uso.

30 Tras el aislamiento, se siembran aproximadamente 5×10^5 células/cm² en placas de cultivo o filtros de policarbonato de tamaño de poro de 5-12 mm que se recubren con colágeno y fibronectina de rata. 10-12 días después de la siembra de las células, se examinan las monocapas de células en cuanto a la confluencia por microscopía.

35 La caracterización de las propiedades morfológicas, histoquímicas y bioquímicas de estas células ha demostrado que estas células poseen muchas de las características destacadas de la barrera hematoencefálica. Estas características incluyen: uniones intercelulares estrechas, falta de fenestraciones de la membrana, bajos niveles de actividad pinocítica y presencia de actividades de la γ -glutamyl transpeptidasa, la fosfatasa alcalina y del antígeno del Factor VIII.

40 Las células cultivadas se pueden usar en una amplia variedad de experimentos en los que se requiera un modelo de unión o transporte polarizado. Mediante la siembra de las células en placas de múltiples pocillos, se puede realizar la unión al receptor y al no receptor de moléculas tanto grandes como pequeñas. Para llevar a cabo las mediciones del flujo de células transendoteliales, se cultivan las células sobre filtros de membrana de policarbonato poroso (por ejemplo, de Nucleopore, Pleasanton, California). Se usan filtros de gran tamaño de poro (5-12 mm) para evitar la posibilidad de que el filtro se convierta en la barrera limitante de la velocidad del flujo molecular. El uso de estos filtros de gran tamaño de poro no permite el crecimiento celular debajo del filtro, y permite la inspección visual de la monocapa celular.

Una vez que las células alcanzan la confluencia, se colocan en un aparato de celdas de difusión de un lado al otro (por ejemplo, de Crown Glass, Sommerville, N. J.). Para las mediciones del flujo, se pulsa la cámara donante de la celda de difusión con una sustancia de ensayo, a continuación, en diversos momentos posteriores a la pulsación, se retira una parte alícuota de la cámara receptora para el análisis. Las sustancias radiactivas o marcadas fluorescentemente permiten una cuantificación fiable del flujo molecular. La integridad de la monocapa se mide simultáneamente mediante la adición de una sustancia de ensayo no transportable tal como sacarosa o inulina, y se miden repeticiones de al menos 4 determinaciones con el fin de asegurar la significación estadística.

Ejemplo 15. Modelo de lesión traumática

Se usó el modelo de lesión cerebral por percusión de fluido para evaluar la capacidad de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o en combinación con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos para restablecer las funciones del sistema nervioso central tras una lesión cerebral traumática importante.

/ Procedimiento de lesión cerebral por percusión de fluido

Los animales usados en este estudio fueron ratas macho Sprague-Dawley que pesaban 250-300 gramos (Charles River). La preparación quirúrgica básica para la lesión cerebral por percusión de fluido se ha descrito previamente. Dietrich, *et al.*, *Acta Neuropathol.* 87: 250-258 (1994). En resumen, se anestesiaron las ratas con halotano al 3 %, oxígeno al 30 % y un equilibrio de óxido nitroso. Se realizó la intubación traqueal y se colocaron las ratas en un marco estereotáxico. A continuación, se realizó una craneotomía de 4,8 mm recubriendo la corteza parietal derecha, 3,8 mm detrás del bregma y 2,5 mm al lado de la línea media. Se colocó un tubo de lesión sobre la duramadre al descubierto y se unió con adhesivo. Entonces, se vertió acrílico dental alrededor del tubo de lesión y luego se unió el tubo lesión a una esponja de espuma de gel. Se cerró mediante sutura el cuero cabelludo, y se devolvió al animal a su jaula y se dejó que se recuperara durante la noche.

Al día siguiente, se produjo la lesión cerebral por percusión de fluido esencialmente como se ha descrito por Dixon, *et al.*, *J. Neurosurg.* 67: 110-119 (1987) y Clifton, *et al.*, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11: 114-121 (1991). El dispositivo de percusión de fluido consistía en un cilindro de plexiglás lleno de solución salina que estaba dotado de una carcasa del transductor y un tornillo de lesión adaptado al cráneo de la rata. El tornillo de metal estaba firmemente conectado al tubo de lesión de plástico de la rata anestesiada intubada (óxido nitroso al 70 %, halotano al 1,5 % y oxígeno al 30 %), y se produjo la lesión mediante el descenso de un péndulo que golpeó el pistón. Las ratas sufrieron una lesión en la cabeza de leve a moderada, variando de 1,6 a 1,9 atm. Se monitorizó indirectamente la temperatura del cerebro con una sonda termistor insertada en el músculo temporal derecho y se mantuvo a 37-37,5 °C. También se midió la temperatura rectal y se mantuvo a 37 °C antes y durante el período de monitorización.

Ensayo del comportamiento:

Se usaron tres ensayos funcionales/conductuales convencionales para evaluar la función sensoriomotora y refleja tras una lesión cerebral. Los ensayos se han descrito completamente en la literatura, incluyendo Bederson, *et al.*, (1986) *Stroke* 17: 472-476; DeRyck, *et al.*, (1992) *Brain Res.* 573: 44-60; Markgraf, *et al.*, (1992) *Brain Res.* 575: 238-246; y Alexis, *et al.*, (1995) *Stroke* 26: 2338-2346.

A. Ensayo de colocación de la extremidad anterior

Se midió la colocación de la extremidad anterior ante tres estímulos separados (visual, táctil y propioceptivo) para evaluar la integración sensoriomotora. Deryck, *et al.*, *Brain Res.* 573: 44-60 (1992). Para el subensayo de colocación visual, el investigador mantuvo el animal en posición vertical y lo acercó a la superficie de una mesa. La colocación normal de la extremidad sobre la mesa se califica como "0", la colocación retardada (< 2 segundos) se califica como "1", y la no colocación o la colocación muy retardada (> 2 segundos) se califican como "2". Se obtienen puntuaciones separadas por primera vez cuando el animal es adelantado y luego otra vez cuando se coloca al animal al lado de la mesa (puntuación máxima por miembro = 4; en cada caso los números más altos denotan déficits mayores). Para el subensayo de colocación táctil, se sujeta al animal de manera que no pueda ver ni tocar la superficie de la mesa con sus bigotes. Se coloca la pata dorsal ligeramente en contacto con la superficie de la mesa adelantando primero al animal y colocándolo luego al lado de la mesa. Se puntúa cada colocación como se ha explicado anteriormente (puntuación máxima por miembro = 4). Para el subensayo de colocación propioceptiva, solo se adelanta el animal y se aplica una mayor presión en la pata delantera dorsal; la colocación se puntúa como se ha explicado anteriormente (puntuación máxima por miembro = 2). Por último, se ensayó la capacidad de los animales para colocar el miembro anterior en respuesta a la estimulación de los bigotes por la superficie de la mesa (puntuación máxima por miembro = 2). Luego se sumaron las subpuntuaciones para obtener la puntuación total de colocación de la extremidad anterior por extremidad (intervalo = 0-12).

B. Ensayo de equilibrio en viga

El equilibrio en una viga es sensible a las lesiones corticales motoras. Se usó esta tarea para evaluar la función vestibulomotora bruta haciendo que una rata mantuviera el equilibrio de manera constante sobre una viga estrecha.

Feeney, *et al.*, *Science*, 217: 855-857 (1982); Goldstein, *et al.*, *Behav. Neurosci.* 104:318-325 (1990). El ensayo incluía tres ensayos de entrenamiento de 60 segundos 24 horas antes de la cirugía para adquirir datos de referencia. El aparato consistía en una viga de 1,90 cm (3/4 pulgadas) de ancho, 25,4 cm (10 pulgadas) de largo, suspendida 0,30 m (1 pie) por encima de una mesa. Se colocó la rata en la viga y tenía que mantener la postura estable con todas las extremidades sobre la viga durante 60 segundos. Se calificó el rendimiento de los animales con la escala de Clifton, *et al.*, *J. Cereb Blood Flow Metab.* 11: 114-121 (1991), que varía de 1 a 6, siendo la puntuación de 1 igual a normal e indicando la puntuación de 6 que el animal era incapaz de sostenerse por sí mismo en la viga.

C. Ensayo de caminar sobre una viga

Se trataba de un ensayo de integración sensoriomotora que examinaba específicamente la función de las extremidades posteriores. Se adaptaron los aparatos de ensayo y los procedimientos de calificación de Feeney *et al.*, *Science*, 217: 855-857 (1982). Se suspendió una viga de 2,54 cm (1 pulgada) de ancho, 1,22 m (4 pies) de largo, a 0,91 m (3 pies) del suelo en una sala con poca luz. En el otro extremo de la viga había una caja de destino oscura con una entrada estrecha. A la misma distancia a lo largo de la viga, se colocaron cuatro tornillos de metal de 7,62 cm (3 pulgadas), orientados hacia el lado opuesto del centro de la viga. Un generador de ruido blanco y una fuente de luz brillante al principio de la viga hacían que el animal atravesara la viga y entrara en la caja de destino. Una vez dentro de la caja de destino, se apagaban los estímulos. Se registraron la latencia de la rata para llegar a la caja de destino (en segundos) y el rendimiento de las extremidades posteriores al atravesar la viga (basándose en una escala de calificación del 1 al 7). Una puntuación de 7 indica un recorrido normal por la vía con menos de 2 resbalones, y una puntuación de 1 indica que la rata había sido incapaz de atravesar la viga en menos de 80 segundos. Cada rata fue entrenada durante tres días antes de la cirugía para que aprendiera la tarea y lograra un rendimiento normal (una puntuación de 7) en tres ensayos consecutivos. Se recogieron tres ensayos de control 24 horas antes de la cirugía, y tras ellos, se registraron diariamente tres ensayos de prueba. Se calcularon los valores medios de latencia y de puntuación de cada día.

Ejemplo 16. T₄ es un ligando de la integrina $\alpha V\beta 3$

Para determinar si T₄ es un ligando de la integrina $\alpha V\beta 3$, se incubaron 2 μ g de proteína purificada disponible en el mercado con T₄ marcada con ¹²⁵I, y se agotó la mezcla en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. $\alpha V\beta 3$ se une a T₄ radiomarcada, y esta interacción fue interrumpida competitivamente por T₄ sin marcar, que se añadió a $\alpha V\beta 3$ antes de la incubación con T₄ marcada con ¹²⁵I de un manera dependiente de la concentración (Figura 24). La adición de T₄ sin marcar redujo la unión de la integrina con el ligando radiomarcado en un 13 % a una concentración total de T₄ de 10⁻⁷ M total (3 x 10¹⁰ M exenta de T₄), 58 % a 10⁻⁶ M total (1,6 x 10⁹ M libre), y la inhibición de la unión fue máxima con T₄ sin marcar a 10⁻⁵ M. Usando la regresión no lineal, se determinó que la interacción de $\alpha V\beta 3$ con T₄ libre tenía una K_d de 333 pM y una CE₅₀ de 371 pM. T₃ sin marcar fue menos eficaz en el desplazamiento de la unión de T₄ marcada con ¹²⁵I con $\alpha V\beta 3$, reduciendo la señal en un 28 % a T₃ 10⁻⁴ total.

Ejemplo 17. La unión de T₄ a $\alpha V\beta 3$ es bloqueada por TETRAC, péptido RGD y anticuerpo contra la integrina

Los presentes inventores han demostrado previamente que las vías de señalización estimuladas por T₄ activadas en la superficie celular pueden ser inhibidas por el análogo de yodotironina TETRAC, que se sabe que evita la unión de T₄ a la membrana plasmática. En el ensayo de unión de radioligandos de la presente invención, mientras que TETRAC 10⁻⁸ M no tuvo ningún efecto sobre la unión de T₄ marcada con ¹²⁵I a $\alpha V\beta 3$ purificada, la asociación de T₄ y $\alpha V\beta 3$ se redujo en un 38 % en presencia de TETRAC 10⁻⁷ M y en un 90 % con TETRAC 10⁻⁵ M (Figura 25). Para determinar la especificidad de la interacción, se añadieron un péptido RGD, que se une al sitio de unión a la matriz extracelular de $\alpha V\beta 3$, y un péptido RGE, que tiene un resto de ácido glutámico en lugar de un resto de ácido aspártico y que, por lo tanto, no se une a $\alpha V\beta 3$, en un intento de desplazar a T₄ de la unión con la integrina. La aplicación de un péptido RGD, pero no de un péptido RGE, redujo la interacción T₄ marcada con ¹²⁵I con $\alpha V\beta 3$ de una manera dependiente de la dosis (Figura 25).

Para caracterizar mejor la interacción de la T₄ con $\alpha V\beta 3$, se añadieron anticuerpos contra $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$ a $\alpha V\beta 3$ purificada antes de la adición de T₄ marcada con ¹²⁵I. La adición de 1 μ g/ml de anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$ LM609 redujo la formación de complejos entre la integrina y T₄ en un 52 %, en comparación con las muestras de control no tratadas. El aumento de la cantidad de LM609 hasta 2 μ g, 4 μ g y 8 μ g/ml redujo la intensidad de la banda en un 64 %, 63 % y 81 %, respectivamente (Figura 26). Se observaron resultados similares cuando se incubó un anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 3$, el SC7312, con la integrina. SC7312 redujo la capacidad de T₄ para unirse a $\alpha V\beta 3$ en un 20 % con 1 μ g/ml de anticuerpo presente, 46 % con 2 μ g, 47 % con 4 μ g y 59 % cuando había 8 μ g/ml de anticuerpo. La incubación con anticuerpos monoclonales contra αV y $\beta 3$, por separado, no afectó a la unión de T₄ marcada con ¹²⁵I con $\alpha V\beta 3$, lo que sugiere que la asociación requiere el bolsillo de unión generado desde el complejo heterodimérico de $\alpha V\beta 3$ y no necesariamente una región específica de un monómero. Para verificar que la reducción en la intensidad de la banda se debió al reconocimiento específico de $\alpha V\beta 3$ por los anticuerpos, se incubó $\alpha V\beta 3$ purificada con un anticuerpo monoclonal contra $\alpha V\beta 5$ (P1F6) o IgG de ratón antes de la adición de T₄ marcada con ¹²⁵I, ninguno de los cuales influyó en la formación de complejos entre la integrina y el radioligando (Figura 26).

Ejemplo 18. La activación de MAPK estimulada por T₄ es bloqueada por los inhibidores de la unión de la hormona y de la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$

Se estudió la translocación nuclear de MAPK fosforilada (pERK1/2) en células CV-1 tratadas con niveles fisiológicos de T₄ a una concentración de hormona total de 10^{-7} , de hormona libre 10^{-10} M) durante 30 minutos. De acuerdo con los resultados previamente publicados por los presentes inventores, T₄ indujo la acumulación nuclear de MAPK fosforilada en células CV-1 a los 30 minutos (Figura 27). La preincubación de las células CV-1 con las concentraciones indicadas de antagonistas de $\alpha\text{V}\beta 3$ durante 16 h redujo la capacidad de T₄ para inducir la activación y la translocación de MAPK. La aplicación de un péptido RGD a 10^{-8} y 10^{-7} M tuvo un efecto mínimo sobre la activación de MAPK. Sin embargo, el péptido RGD 10^{-6} M inhibió la fosforilación de MAPK en un 62 % en comparación con cultivos de control, y la activación se redujo al máximo cuando RGD 10^{-5} M (reducción del 85 %) y RGD 10^{-4} M (reducción del 87 %) estaban presentes en los medios de cultivo. La adición del péptido RGE no específico al medio de cultivo no tuvo efecto sobre la fosforilación ni la translocación nuclear MAPK tras el tratamiento con T₄ en células CV-1.

TETRAC, que impide la unión de T₄ a la membrana plasmática, es un inhibidor eficaz de la activación de MAPK inducida por T₄. Cuando está presente a una concentración de 10^{-6} M con T₄, TETRAC reduce la fosforilación y translocación de MAPK en un 86 % en comparación con los cultivos tratados con T₄ sola (Figura 27). La inhibición aumentó en un 97 % cuando se añadió TETRAC 10^{-4} M a los medios de cultivo durante 16 h antes de la aplicación de T₄. La adición del anticuerpo monoclonal contra $\alpha\text{V}\beta 3$ LM609 a los medios de cultivo 16 h antes de la estimulación con T₄ también redujo la activación de MAPK inducida por T₄. LM609 a 0,01 y 0,001 $\mu\text{g/ml}$ de medios de cultivo no afectó a la activación de MAPK tras el tratamiento con T₄. El aumento de la concentración de anticuerpo en los medios de cultivo hasta 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ redujo los niveles de MAPK fosforilada encontrados en las fracciones nucleares de las células en un 29 %, 80 % y 88 %, respectivamente, en comparación con las células tratadas con T₄ solo.

Se transfirieron transitoriamente células CV-1 con ARNip contra αV o $\beta 3$, o tanto contra αV como contra $\beta 3$ y se dejó que se recuperaran durante 16 h antes de colocarlas en medio exento de suero. Tras el tratamiento con T₄ durante 30 min, se recogieron las células y se extrajo bien la proteína nuclear o el ARN. La Figura 28A demuestra la especificidad de cada ARNip por la subunidad de integrina diana. Las células CV-1 transferidas con ARNip bien contra αV , o tanto contra αV como contra $\beta 3$ mostraron una reducción de los productos de la RT-PCR de la subunidad αV , pero no hubo diferencia en la expresión del ARNm de αV cuando se transfirieron las células con el ARNip específico de $\beta 3$, o cuando se expusieron al reactivo de transfección en ausencia de ARNip exógeno. Del mismo modo, las células transferidas con ARNip de $\beta 3$ tuvieron niveles reducidos de ARNm de $\beta 3$, pero niveles relativamente invariables de ARNip de αV . La adición de T₄ durante 30 min no alteró los niveles de ARNm hacia αV ni $\beta 3$, independientemente del ARNip transferido a las células.

Se midieron los niveles de MAPK activados mediante transferencia Western en células CV-1 transferidas con ARNip contra αV y $\beta 3$, bien individualmente o en combinación (Figura 28B). Las células CV-1 tratadas con ARNip de control negativo mezclados resultaron tener niveles ligeramente elevados de MAPK activada inducida por T₄ en comparación con la línea celular precursora. Las células expuestas solo al reactivo de transfección muestran niveles y patrones de fosforilación de MAPK similares a los de las células CV-1 no transferidas. Cuando se transfirió ARNip de αV o ARNip de $\beta 3$, solo o en combinación, a células CV-1, el nivel de la MAPK fosforilada en los cultivos tratados con vehículo fue elevado, pero se inhibió la capacidad de T₄ para inducir una mayor elevación de los niveles de MAPK activados.

Ejemplo 19. La angiogénesis inducida por la hormona es bloqueada por el anticuerpo contra $\alpha\text{V}\beta 3$

Se estimula la angiogénesis en el ensayo de CAM mediante la aplicación de concentraciones fisiológicas de T₄ (Figura 29A y resumida en la Figura 29B). T₄ 10^{-7} M dispuesta en un disco de filtro de CAM indujo la formación de ramificaciones de los vasos sanguíneos en 2,3 veces ($P < 0,001$) en comparación con las membranas tratadas con PBS. El propiltiouracilo, que impide la conversión de T₄ en T₃, no tiene ningún efecto sobre la angiogénesis provocada por T₄. La adición de un anticuerpo monoclonal, LM609 (10 $\mu\text{g/disco}$ de filtro) dirigido contra $\alpha\text{V}\beta 3$, inhibió la respuesta proangiogénica hacia T₄.

Ejemplo 20. Preparación de formulaciones de nanopartículas de TETRAC y usos - PLGA

Se prepararon nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) con TETRAC encapsulado mediante el método de emulsión única. Se obtuvieron una solución homogénea de PLGA y el TETRAC mediante la mezcla de 30 mg de PLGA y 1,6 mg de TETRAC en 1 ml de acetona. Se prepararon nanopartículas de PLGA con y sin la presencia de un estabilizador (se usó alcohol polivinílico como estabilizador). Se añadieron 100 μl de esta solución que contenía tanto PLGA como TETRAC a 10 ml de agua desionizada y se agitó durante 2 horas. Para la síntesis de las nanopartículas con un estabilizador, se añadieron 100 ml de la solución mencionada anteriormente a solución de PVA al 1 % gota a gota con agitación constante. Se purificaron las nanopartículas mediante diálisis o aproximadamente 12 horas mediante el uso de la membrana de diálisis adecuada. La adición del estabilizador

aporta monodispersidad y estabilidad a las nanopartículas en solución acuosa. Los resultados se muestran en la Figura 33.

- 5 Los estudios en el modelo de CAM de la angiogénesis inducida por b-FGF demostraron una eficacia antiangiogénica potente para el TETRAC libre y las nanopartículas de TETRAC-PLGA como se muestra en la Figura 34. Además, los estudios de la eficacia antiangiogénica de TETRAC frente a las nanopartículas de TETRAC sobre la angiogénesis mediada por T₄ en el modelo de CAM se muestran en la siguiente tabla y en la Figura 59.

Tratamiento	Ptos. ramificación ± ETM	% de inhibición ± ETM
PBS	62,8 ± 9,5	
T ₄ (100 nM)	125,5 ± 14,9	88,6 ± 10,2
T ₄ + TETRAC (100 ng)	69,1 ± 11,8	91,2 ± 8,9
T ₄ + nano con TETRAC encaps. (100 ng)	67,8 ± 9,3	103,4 ± 8,6
T ₄ + nano conj. con TETRAC (100 ng)	60,9 ± 8,7	
Nanopartículas de PLGA huecas	76,8 ± 11,1	

10 **Ejemplo 21. Preparación de nanopartículas de PLGA con TETRAC y temozolomida encapsulados conjuntamente**

15 Otra nanopartícula adecuada incluye nanopartículas de PLGA con TETRAC y temozolomida encapsulados conjuntamente. Una de las principales ventajas de las nanopartículas es su capacidad para encapsular a la vez múltiples números de materiales de encapsulación juntos. En la Figura 35, se muestra un esquema.

Ejemplo 22. Nanopartículas de colágeno conjugadas a T₄ que contienen fosfato de calcio

20 La cinética de liberación desde el interior de las nanopartículas de colágeno demostró una liberación del 40 % en las 2 primeras horas con la liberación lenta sostenida durante 20 horas como se muestra en la Figura 36B. La preparación de las nanopartículas se muestra en la Figura 36A. Se inmovilizó T₄ en el exterior de las nanopartículas con una estabilidad de > 99 % como se muestra a continuación. La formulación para la curación de heridas contiene nanopartículas de colágeno con T₄ inmovilizada encima y nanopartículas de fosfato de calcio en el interior o se pueden colocar fuera las nanopartículas de colágeno para la formulación tópica. Los resultados de los

25 cromatogramas se muestran en las Figuras 37A-B y las Figuras 38A-B.

Ejemplo 23. Preparación de nanopartículas de PEG-PLGA con GC-1 encapsulado

30 Se preparan nanopartículas de PEG-PLGA con GC-1 encapsulado mediante el método de emulsión única. Se prepara una solución de PEG-PLGA en DMSO (por ejemplo, 80 mg/ml). Se prepara otra solución de GC-1 en DMSO (por ejemplo, 15 g/ml) por separado. Ahora, se mezcla la misma cantidad de ambas soluciones (PEG-PLGA y GC-1). A continuación, se añaden 100 µl de esta solución a solución de PVA al 1 % (alcohol polivinílico) con agitación constante. Tras 4 horas, se somete toda la solución que contiene las nanopartículas con GC-1 encapsulado a diálisis para eliminar las impurezas. En la Figura 39, se muestra un diagrama esquemático para la preparación de

35 nanopartículas de PLGA-PEG con GC-1 encapsulado.

Ejemplo 24. Preparación de nanopartículas de PEG-PLGA con GC-1 o T₃ encapsulado

40 Se prepararán nanopartículas de PEG-PLGA con GC-1 o T₃ encapsulado mediante el método de emulsión única. Se preparará una solución de PEG-PLGA en DMSO (por ejemplo, 80 mg/ml). Se preparará otra solución de GC-1 o T₃ en DMSO (por ejemplo, 15 g/ml) por separado. Entonces, se mezclará la misma cantidad de ambas soluciones (PEG-PLGA y GC-1 o T₃). Se añadirán 100 µl de esta solución a solución de PVA (alcohol polivinílico) al 1 % con agitación constante. Tras 4 horas, se someterá toda la solución que contendrá las nanopartículas con GC-1 o T₃ encapsulado a diálisis para eliminar las impurezas. En la Figura 40, se muestra un diagrama esquemático para la

45 preparación de nanopartículas de PLGA-PEG con T₃ encapsulado.

Las nuevas formulaciones de TETRAC incluyen la unión con nanopartículas, una construcción que se opone a la entrada de TETRAC en la célula y limita su actividad al receptor de la integrina de la membrana plasmática.

50 El fármaco hidrófobo usado para el atrapamiento está en forma de solución o en forma de polvo, y el disolvente usado para disolver el fármaco se selecciona entre dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano, acetato de etilo y etanol.

55 Las micelas de copolímeros de bloque se elaboran con componentes de polímeros mucoadhesivos y termosensibles, y cuando se instilan, penetran en la membrana de mucina, se adhieren a los poros de la membrana y, a la temperatura corporal, se vuelven más hidrófobas para liberar el fármaco más rápido.

El copolímero de micelas de bloques aleatorios de la presente invención se puede preparar mezclando monómeros tales como vinilpirrolidona (VP), *N*-isopropil-acrilamida (NIPAAM) y ácido acrílico (AA) en presencia de *N,N'*-metilen-bis-acrilamida (MBA), y polimerizar la mezcla por reacción de polimerización de radicales libres usando persulfato de amonio como catalizador. El resto hidrófobo de la cadena polimérica permanece enterrado dentro de las micelas que ayudan a la disolución del fármaco, y el resto hidrófilo, tal como los ácidos carboxílicos, se extiende fuera de la superficie de las micelas. La solución transparente de la dispersión micelar en solución acuosa se puede instilar en los ojos del paciente de manera mucho más eficaz, y la liberación sostenida del fármaco encapsulado en el interior de las micelas mejora el efecto terapéutico del fármaco.

Para incorporar uno o más fármacos mencionados anteriormente en las micelas de copolímero de bloques, se pueden usar diversos métodos que se describen a continuación, solos o en combinación.

(i) Agitación: se añade un fármaco a una solución acuosa de un copolímero de bloques, y se agita durante 2 a 24 horas, obteniéndose micelas que contienen fármaco.

(ii) Calentamiento: se mezclan un fármaco y una solución acuosa de un copolímero de bloques, y se agita a 30 °C a 80 °C durante 5 minutos a un par de horas, y después se enfría hasta la temperatura ambiente mientras se agita, obteniéndose micelas que contienen el fármaco.

(iii) Tratamiento ultrasónico: se somete una mezcla de un fármaco y una solución acuosa de un copolímero de bloques a un tratamiento de ultrasonidos durante 10 minutos a 30 minutos, y después se agita a temperatura ambiente, obteniéndose micelas que contienen el fármaco.

(iv) Evaporación en disolvente: se disuelve un fármaco en un disolvente orgánico, tal como cloroformo, y se añade a una solución acuosa de micelas. Posteriormente, se evapora el disolvente orgánico lentamente mientras se agita, y después se filtra para eliminar el fármaco libre.

(v) Diálisis: se añade la solución de micelas poliméricas a una solución orgánica de fármaco, y se somete la mezcla a diálisis frente a una solución tampón y después agua.

La solución de micelas de copolímeros de bloques se prepara mediante la disolución de monómeros anfifílicos en un medio acuoso, obteniéndose micelas, la adición de soluciones acuosas de agente de reticulación, activador e iniciador a dichas micelas, el sometimiento de dicha mezcla a polimerización en presencia de un gas inerte a 30 °C a 40 °C hasta que se completa la polimerización de las micelas.

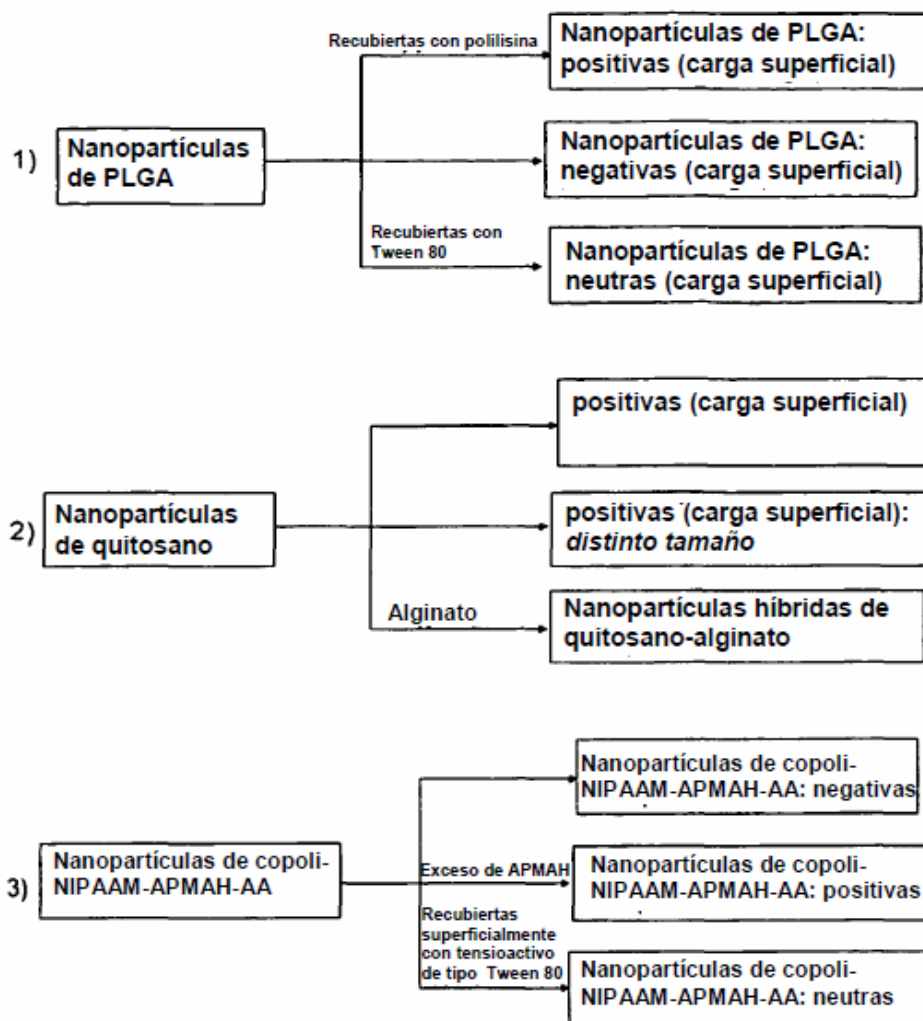
La etapa de purificación se realiza por diálisis. La diálisis se lleva a cabo durante 2-12 horas para eliminar los monómeros sin reaccionar y el/los compuesto/s hidrófobo/s libre/s, si los hay, en la fase acuosa. Se puede incorporar un fármaco hidrófobo a las micelas poliméricas de la presente invención durante el tiempo de polimerización en el que el fármaco se disuelve en las micelas de los monómeros en solución acuosa, y realizarse la polimerización en presencia del fármaco. Como el fármaco contenido en el núcleo hidrófobo de las micelas se libera sobre la superficie de la córnea de una manera controlada durante un largo tiempo, la composición de la presente invención es adecuada para la formulación de fármacos que no son susceptibles a las técnicas de formulación convencionales o usando micelas no mucoadhesivas.

Ejemplo 25. Diseño de formulación de nanopartículas para uso ocular

En los experimentos iniciales, se prepararán tres tipos diferentes de formulaciones de nanopartículas basadas en diferentes polímeros. Se examinará la eficacia de estas nanopartículas con diferentes variaciones como la carga superficial, el tamaño y la mucoadhesividad. Se encapsulará TETRAC en todas estas formulaciones de nanopartículas. En líneas generales, se sintetizarán nanopartículas copoliméricas de PLGA, quitosano y a la medida con diferente proporción de *N*-isopropilacrilamida, clorhidrato de *N*-3-aminopropilmetacrilamida y ácido acrílico.

El objetivo es diseñar diferentes formulaciones de nanopartículas para las cinéticas oculares mejoradas por TETRAC. Se definirán dos opciones diferentes, donde las nanopartículas permanecen en la membrana de la córnea y administran el TETRAC, y otra opción es aumentar la nano-absorción a través de la membrana de la córnea. Se ajustarán el tamaño y la carga superficial, así como la naturaleza del material nanoparticulado para obtener una formulación de colirio óptima para el TETRAC.

Representación esquemática que muestra la síntesis de diferentes tipos de nanopartículas con TETRAC encapsulado y su modificación de la superficie.



- 5 **NIPAAm:** *N*-isopropilacrilamida (polímero termosensible)
 APMAH: clorhidrato de *N*-3-aminopropilmetacrilamida (manipulación de carga superficial)
 AA: ácido acrílico (para inducir propiedades mucoadhesivas).

10 **Análisis de las nanopartículas:**

Basándose en el método original desarrollado por PRI, se desarrollará un método analítico de HPLC modificado específico de las nanopartículas de TETRAC. También se prevé el desarrollo de un método analítico para la cuantificación indirecta de TETRAC en el interior de las nanopartículas. En conjunto, se desintegrará la mitad de la cantidad total de las nanopartículas en acetona al 50 %, y se analizará directamente por HPLC la cantidad total de TETRAC libre y encapsulado. Por otro lado, la otra mitad de las nanopartículas se filtrará a través de un dispositivo de membrana de filtro centrífugo de 100 KD, y se analizará la cantidad total de TETRAC libre del filtrado por HPLC. Por lo tanto, la diferencia entre las cantidades de TETRAC en los dos análisis representaría la cantidad de TETRAC del interior de las nanopartículas.

20 Se tendría que ensayar el protocolo de preparación de muestras para cada tipo de nanopartículas, y ajustarse en consecuencia.

25 **Cinética de liberación *in vitro*:**

Para estudiar la cinética de liberación, se suspenderá una cantidad conocida de la formulación de nanopartículas con TETRAC encapsulando en un medio deseado en el que se vaya a estudiar la cinética de liberación. Se distribuirá la solución en alícuotas de 500 µl en tubos de microcentrifugación. A intervalos predeterminados de

tiempo, las soluciones se filtrarán a través del dispositivo de membrana de filtro centrífugo (corte en 100 kD) como se ha indicado anteriormente para separar el TETRAC libre de las nanopartículas cargadas. La concentración de TETRAC libre se determinará por HPLC.

$$\% \text{ de liberación} = \frac{[\text{TETRAC}]_{f,t}}{[\text{TETRAC}]_0} \times 100$$

en la que $[\text{TETRAC}]_{f,t}$ es la concentración de TETRAC en el filtrado en el momento t y $[\text{TETRAC}]_0$ es la cantidad total del TETRAC encapsulado.

Experimentos *in vivo*

Se realizará un experimento *in vivo* preliminar para ensayar la eficacia de las formulaciones de nanopartículas en los ojos de conejos blancos de Nueva Zelanda en comparación con un control del fármaco sin nanopartículas. El procedimiento de aplicación, el método de recogida del humor acuoso etc. se describirán en detalle en el protocolo para animales. La parte restante de cada ojo se guardará y se almacenará congelada a -80°C para su posible análisis en el futuro.

Se usarán cuatro ojos de dos conejos para cada formulación en cada punto de ensayo ($n = 4$). Se recogerán muestras de humor acuoso a los 30 y 90 minutos de la administración tópica del fármaco, donde se sacrificarán dos animales por cada punto temporal. Esto requerirá el sacrificio de al menos 40 conejos a lo largo del estudio.

Las muestras de humor acuoso recogidas se congelarán a -80°C hasta el momento del análisis si son necesarias.

Todas las muestras se analizarán por HPLC. Se usará el nuevo método específico para el análisis de TETRAC en nanopartículas para analizar el TETRAC, tanto libre como encapsulado. Se usará la filtración del humor acuoso a través de filtros de 100 KD como se ha descrito anteriormente para estudiar las dos formas de TETRAC.

Dependiendo de los resultados de la cinética de liberación *in vivo*, se seleccionarán tres formulaciones para la Fase II. Se preparará un lote piloto para cada formulación. Las características y la estabilidad de estas formulaciones seleccionadas serán estudios posteriores.

Ejemplo 26. Preparación de nanopartículas que contienen TETRAC o análogos:

La formulación en suspensión para los estudios farmacocinéticos y toxicológicos se prepara mediante el siguiente procedimiento:

1. Se pesan 50 mg de TETRAC, y se añaden a 10 ml de CMC (carboximetilcelulosa) al 0,5 %.
2. Se mezclan bien hasta que se suspende el TETRAC.
3. Se mezcla antes de usar.

Se preparó otra formulación que se elaboró y se usó para la administración intravenosa usando el procedimiento descrito a continuación:

1. Se disuelven 200 mg de TETRAC en 1,0 ml de DMSO.
2. Se añaden 1,0 ml de Tween 80 y se agitan durante 5 minutos. Se verifica que todo el Tween 80 se haya disuelto.
3. Se añaden gota a gota (mientras se agita) 10 ml de PBS.
4. Se ajusta el pH a 7,4 usando fosfato de sodio dibásico 1,0 M, añadido lentamente mientras se agita.
5. Se completa hasta 20 ml con PBS.
6. Se diluye en PBS a 5 mg/ml (dilución 1:1).

Ejemplo 27. Medición del tamaño de partícula mediante el experimento de dispersión dinámica de luz: Se purificaron las nanopartículas por diálisis o aproximadamente 12 horas mediante el uso de la membrana de diálisis adecuada. La adición del estabilizador aporta monodispersidad y estabilidad a las nanopartículas en solución acuosa. Se determinaron la distribución del tamaño y el potencial zeta usando el analizador de tamaño de zeta. Los resultados se pueden observar en las Figuras 41A-B.

Ejemplo 28. Inhibición de la angiogénesis por el ácido tetrayodotiroacético (TETRAC):

El análogo de la hormona tiroidea desaminado, el ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), es un nuevo agente antiangiogénico de bajo coste, sobre el que se ha propuesto que su actividad representa una interacción entre el receptor de la hormona tiroidea y el sitio de reconocimiento RGD en la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$.

Este estudio fue diseñado para examinar los efectos del TETRAC sobre la angiogénesis inducida por VEGF y FGF2. La inducción de la angiogénesis por VEGF y FGF2 implica la unión de estos factores de crecimiento con la integrina $\alpha V\beta 3$ en las células endoteliales. Dicha unión implica dominios específicos del ligando proteico en la integrina, así como un sitio de reconocimiento Arg-Gly-Asp (RGD) que identifica genéricamente los ligandos proteicos de $\alpha V\beta 3$ y otras diversas integrinas. Los péptidos RGD también bloquean las acciones proangiogénicas de T_4 y T_3 , lo que sugiere que el sitio de reconocimiento RGD y el sitio receptor de la hormona tiroidea-TETRAC sobre la integrina $\alpha V\beta 3$ están cerca el uno del otro. Sin pretender quedar limitados por la teoría, debido a la proximidad del sitio de reconocimiento RGD y el dominio de unión de la hormona-TETRAC sobre $\alpha V\beta 3$, TETRAC es antiangiogénico en ausencia de la hormona tiroidea. Es decir, la oclusión del sitio receptor de la hormona tiroidea puede alterar las capacidades de VEGF y FGF2 para interactuar con la integrina en el sitio RGD.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

La T_4 (≥ 98 % de pureza por HPLC), la T_3 , el TETRAC, el acetato de cortisona y el propiltiouracilo (PTU) se adquirieron en Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). El FGF2 y VEGF se adquirieron de Invitrogen Life Technologies, Inc. (Carlsbad, CA). El Matrigel se adquirió en BD Bioscience (San Jose, CA).

Cultivo celular

Se cultivaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HMVEC-d; Clonetics, San Diego, CA) en matraces de cultivo recubiertos con colágeno de tipo I (1 mg/ml) y se mantuvieron en medios de crecimiento endotelial-2 (EGM-2MV; Clonetics) suplementados con extracto de cerebro bovino (12 μ g/ml), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (10 ng/ml), suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10 % (vol/vol), hidrocortisona (1 μ g/ml), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM. Todos los aditivos de cultivo se adquirieron en Invitrogen. Los cultivos se mantuvieron en una cámara húmeda a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada 3 d, y las líneas celulares se pasaron a la confluencia del 80 %.

Ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (ensayo de CAM de pollo)

Se adquirieron embriones de pollo de diez días de vida en SPAFAS (Preston, CT) y se incubaron a 37 °C con una humedad relativa del 55 %. Se realizaron ensayos de CAM de pollo como los descritos previamente. En resumen, se usó una aguja hipodérmica para hacer un pequeño orificio en el polo afilado del huevo, y se realizó un segundo orificio en el polo ancho del huevo, directamente sobre una porción avascular de la membrana embrionaria. Se succionó suavemente el primer orificio para desplazar el saco de aire y se soltó la CAM del cascarón. Con una muela artesanal de Dremel (Dremel, Racine, WI), se cortó una ventana de aproximadamente 1,0 cm² en la cáscara sobre el falso saco de aire, lo que permitió el acceso a la CAM. Se trataron previamente discos estériles de papel de filtro N° 1 (Whatman, Clifton, NJ) con 3 mg/ml de acetato de cortisona y propiltiouracilo 1 mM, y se secaron al aire en condiciones estériles. Se aplicaron hormona tiroidea, disolventes de control y tratamientos experimentales a los discos, y después se secaron. Entonces, se suspendieron los discos en PBS y se colocaron sobre las CAM en crecimiento. Tras la incubación durante 3 días, se extirpó la CAM de debajo del disco de filtro y se enjuagó con PBS. Se colocó cada membrana en una placa de Petri de 35 mm y se examinó bajo un estereomicroscopio SV6 con un aumento de 50 veces. Se capturaron imágenes digitales y analizaron con el programa informático Image-Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Se contó el número de puntos de ramificación de los vasos contenidos en una región circular igual a la disco de filtro.

Ensayo de crecimiento *in vitro*

Se mezclaron células HMVEC-d confluentes (paso 5-10) con perlas Ctodex-3 recubiertas de gelatina (Sigma) con una proporción de 40 células por perla. Se suspendieron las células y las perlas (150-200 perlas por pocillo de placa de 24 pocillos) con 5 ml de medio basal endotelial (EBM) + suero humano normal al 15 % (vol/vol) (HS), y se mezclaron suavemente durante 4 h a temperatura ambiente, luego se incubaron durante la noche en incubadora de CO₂ a 37 °C. Se trataron los cultivos con 10 ml de EBM recién preparado + HS al 15 % durante 3 h. Se mezclaron cien μ l del cultivo de HMVEC/perlas con 500 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se colocaron en 1 pocillo de una placa de 24 pocillos. Se contó el número de perlas/pocillo, y se calculó la concentración de perlas/CE.

Se disolvió fibrinógeno humano, aislado como se ha descrito anteriormente, en EBM a una concentración de 1 mg/ml (pH 7,4) y se esterilizó por filtración y se suplementó con los factores angiogénicos por ensayar. Se usaron VEGF (30 ng/ml) + FGF2 (25 ng/ml) como control positivo. Se lavó dos veces el cultivo de HMVEC/perlas con medio EBM y se añadió a solución de fibrinógeno. Se mezclaron suavemente los cultivos, y se añadieron 2,5 μ l de trombina humana (0,05 U/ μ l) y se transfirieron 300 μ l del cultivo a cada pocillo de una placa de 24 pocillos, y se dejaron incubar durante 20 min. Se añadieron EBM + HS normal al 20 % y 10 μ g/ml de aprotinina, y se incubó la placa en una incubadora de CO₂ durante 48 h. Para cada condición, el experimento se llevó a cabo por triplicado.

Se observó y se grabó la formación de crecimientos capilares con un microscopio invertido Nikon Diaphot-TMD (Nikon Inc., Melville, NY), dotado de una carcasa de incubación con un termostato NP-2 Nikon y mezcladora de flujo de dióxido de carbono Sheldon Nº 2004. Se interconectó el microscopio directamente a un sistema de vídeo que consistía en una cámara de vídeo Dage-MTI CCD-72S y un monitor de vídeo de 12 pulgadas PVM-12Z de Sony conectado a un ordenador Macintosh G3. Las imágenes se capturaron en diversas ampliaciones usando Adobe Photoshop. Se cuantificó visualmente el efecto de los factores proangiogénicos en la angiogénesis del crecimiento determinando el número y el porcentaje de BC-perlas con crecimientos capilares. Se contó un centenar de perlas (de cinco a seis campos aleatorios de baja potencia) en cada uno de los pocillos por triplicado para cada condición experimental. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

Se aisló ARN total usando el kit Ambion Aqueous (Austin, TX). Se determinó la calidad y cantidad del ARN aislado con el sistema de electroforesis automatizado Bio-Rad Experion (Hercules, CA). Se transcribió a la inversa un µg de ARN total usando el kit de PCR para transcripción inversa Advantage (Clontech; Mountain View, CA). La PCR se realizó usando Cepheid Smart Cyclyer (Sunnyvale, CA) mediante la mezcla de 2 µl de ADNc, 10 µl de mezcla maestra Sybergreen (Qiagen; Valencia, CA) y 0,5 µl de cebadores específicos de genes 20 µM. Se incubaron las muestras durante 20 min a 25 °C y se amplificaron en 35 ciclos de PCR con 30 s a 95 °C y 90 s en 60 °C (PCR de dos etapas). Se determinaron los valores de ciclo umbral (C_t) a partir de gráficas de amplificación semilogarítmica (aumento logarítmico de la fluorescencia frente al número de ciclos). Se ensayaron la especificidad y el tamaño de los productos de PCR mediante la adición de una curva de fusión en el extremo de las ampliaciones, y mediante el procesamiento de los productos de PCR en gel de agarosa al 2 % y secuenciación de las bandas. Todos los valores se normalizaron con respecto a la ciclofilina A. Los cebadores de PCR fueron los siguientes: Angio-1,5'- GCAACT-GGAGCTGATGGACACA-3' (SEC ID Nº 11) (sentido) y 5'-CATCTGCACAGTCTCTAAATGGT-3' (SEC ID Nº 12) (antisentido), amplicón de 116 pb; Angio-2,5'-TGGGATTTGGTAACCCTTCA-3' (SEC ID Nº 13) (sentido) y 5'-GTAAGCCTCATTCCCTTCCC-3' (SEC ID Nº 14) (antisentido), amplicón de 122 pb; integrina α_v , 5'-TTGTTGCTACTGGCTGTTTTG-3' (SEC ID Nº 15) (sentido) y 5'-TCCCTTTCTTGTCTTCTTGAG-3' (SEC ID Nº 16) (antisentido), amplicón de 89 pb; integrina β_3 , 5'-GTGACCTGAAGGAGAATCTGC-3' (SEC ID Nº 17) (sentido) y 5'-TTCTTGAATCATCTGGCC-3' (SEC ID Nº 18) (antisentido), amplicón de 184 pb; y ciclofilina A, 5'-CCCACCGTGTCTTCGACAT-3' (SEC ID Nº 19) (sentido) y 5'-CCAGTGCTCAGAGCAGAAA-3' (SEC ID Nº 20) (antisentido), amplicón de 116 pb.

Análisis de micromatrices: Se amplificaron diez microgramos de ARN total de células HMVEC-d y se marcaron con biotina de acuerdo con el manual técnico de análisis de la expresión de GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA). Se hibridó el ARNc fragmentado con el chip génico humano U 133 PLUS 2 (Affymetrix); se lavaron los chips y se tiñeron con estreptavidina R-ficoeritrina (Molecular Probes, Eugene, OR). Se escanearon los chips y se analizaron los datos con el juego de micromatrices y la herramienta de minería de datos (Affymetrix).

Inhibición mediante TETRAC de la angiogénesis estimulada por la hormona: Se estimula la angiogénesis en el ensayo de CAM mediante la aplicación de concentraciones fisiológicas de FGF2, VEGF y T_3 . Como se muestra en la Figura 42, FGF2 (1 µg/ml) colocado en un disco de filtro de CAM indujo la formación de ramificaciones de vasos sanguíneos por 2,4 veces ($P < 0,001$) en comparación con las membranas tratadas con PBS. La adición de TETRAC (75 ng/disco de filtro) inhibió la respuesta proangiogénica hacia FGF2, mientras TETRAC solo no tuvo ningún efecto sobre la angiogénesis.

Se realizó una curva de dosis-respuesta de TETRAC para encontrar la inhibición máxima de la angiogénesis estimulada por FGF2. Como se muestra en la Figura 43, setenta y cinco ng/disco de filtro y 100 ng/disco de filtro inhibieron la angiogénesis en un 57 % y 59 %, respectivamente. Cuando se aumentó la concentración de TETRAC hasta 1 µg/disco de filtro, se inhibió la angiogénesis estimulada por FGF2 en un 74 %. La inhibición máxima se observó cuando las concentraciones de TETRAC se aumentaron más, hasta 3 µg/disco de filtro, y esto se mantuvo a 5 µg/disco de filtro.

TETRAC inhibe de manera similar el efecto proangiogénico de VEGF y T_3 en un 52 % y 66 %, respectivamente, como se muestra en la Figura 44.

Inhibición por TETRAC de la formación de tubos: Se cultivaron células HMVEC-d en Matrigel durante 24 horas y se estimularon con VEGF (50 ng/ml) en presencia o ausencia de cantidades crecientes de TETRAC. El TETRAC inhibió la formación de tubos inducida por VEGF como se demuestra por una reducción en el número de uniones y el número de tubos, y una disminución de la longitud total de los túbulos, como se muestra en la Figura 45. Este efecto se representa en las fotografías de la Figura 46.

El número de uniones de tubos disminuyó de $32,0 \pm 9,6$ (TETRAC 0 µM) a $18,0 \pm 1,5$, $4,7 \pm 1,8$ y $3,0 \pm 2,5$ con TETRAC 1 µM, 2,5 µM y 10 µM, respectivamente. Del mismo modo, el número de tubos disminuyó de $212,3 \pm 21,3$ (TETRAC 0 µM) a $180,0 \pm 4,0$ (TETRAC 1 µM), $150,0 \pm 8,1$ (TETRAC 2,5 µM) y $81,3 \pm 24,8$ (TETRAC 10 µM). La longitud total de los tubos también se redujo de una manera dependiente de la dosis; observándose la disminución máxima del 70 % de la longitud de los tubos a TETRAC 10 µM, que se mantuvo a TETRAC 25 µM y 50 µM (datos no mostrados).

La expresión de ARNm de las integrinas α_v y β_3 , y angiopoyetina-2 son disminuidas por TETRAC: Se

cultivaron células HMVEC-d en Matrigel y se estimularon con VEGF (50 ng/ml) con y sin TETRAC durante 2 horas. Se aisló el ARN mensajero y se realizó la RT-PCR en tiempo real para la integrina αV y la integrina $\beta 3$, como se muestra en las Figuras 47A-B.

TETRAC inhibió la expresión del ARNm tanto de la integrina αV como de la integrina $\beta 3$ de una manera dependiente de la dosis. Los niveles de ARNm de αV disminuyeron de $0,1149 \pm 0,0124$ unidades fluorescentes relativas (RFU) en las células tratadas con VEGF a $0,0618 \pm 0,00927$ RFU tras el tratamiento con TETRAC $1 \mu M$, y disminuyeron aún más tras el tratamiento con TETRAC $3 \mu M$. La expresión de la integrina $\beta 3$, cuya expresión es mucho menor que la de la integrina αV , disminuyó tras el tratamiento con TETRAC de una manera similar a la integrina αV . Las células tratadas con VEGF expresaron $0,0299 \pm 0,0026$ RFU de $\beta 3$. La expresión se redujo hasta $0,0160 \pm 0,0013$ y $0,0159 \pm 0,0016$ RFU con TETRAC $1 \mu M$ y $3 \mu M$, respectivamente. Se realizó la RT-PCR en tiempo real para la angiopoyetina-1 y la angiopoyetina-2, y se encontró que TETRAC inhibió la expresión del ARNm de la angiopoyetina-2 de una manera dependiente de la dosis y que no afectó a los niveles de ARNm de la angiopoyetina-1, como se muestra en las Figuras 48A-B. Además, la incubación de células HMVEC-d durante la noche con TETRAC y VEGF no alteró más la expresión de la angiopoyetina-1 y la angiopoyetina-2 (datos no mostrados).

Análisis de micromatrices

Para identificar otros posibles mecanismos de inhibición con TETRAC de la angiogénesis estimulada por VEGF, se realizó el análisis de micromatrices usando la matriz U133 Plus 2.0 humana de Affymetrix. Se incubaron células HDMEC con VEGF a 50 ng/ml durante 24 horas con y sin TETRAC ($3 \mu M$). Los resultados del análisis de Affymetrix GeneChip indicaron que tres transcripciones de tipo angiopoyetina diferentes se expresaron diferencialmente en las células HMVEC-d. Como se muestra en las Figuras 49A-C, la expresión de la angiopoyetina de tipo 1 (ANGPTL-1, conjunto de sondas con ID N° 231773) se aumentó 5,9 veces tras el tratamiento con VEGF. El aumento estimulado en la expresión se redujo por debajo de los niveles de referencia al tratar las células conjuntamente con TETRAC y VEGF. La expresión de la angiopoyetina de tipo 2 (ANGPTL-2, conjunto de sondas con ID N° 239039) se aumentó 1,6 veces tras el tratamiento con VEGF en comparación con el control no tratado. La adición de TETRAC redujo la expresión de ANGPTL-2 hasta casi los niveles basales. Curiosamente, la expresión de la angiopoyetina de tipo 3 (ANGPTL-3, conjunto de sondas con ID N° 231684) no se vio afectada por el tratamiento de las células HMVEC-d con VEGF. Sin embargo, TETRAC redujo la expresión de ANGPTL-3 1,9 veces en comparación tanto con las muestras de control sin tratar como con las muestras tratadas con VEGF. Estos datos sugieren además que TETRAC puede inhibir la expresión de genes diana que son necesarios para la estimulación de la angiogénesis.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) se han implicado claramente en la angiogénesis. Los inhibidores de MMP tanto sintéticos como endógenos bloquean la angiogénesis en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los presentes inventores usaron la micromatriz para examinar los cambios en la expresión de MMP tras el tratamiento con VEGF con y sin TETRAC. Las células HMVEC-d tratadas con VEGF tienen un aumento de 5,1 en la expresión de MMP-15 y un aumento de 2,9 veces en la expresión de MMP-19. Como se muestra en las Figuras 50A-D, al tratar las células conjuntamente con TETRAC ($3 \mu M$), la expresión de MMP-15 y MMP-19 se redujo en 3,2 veces y 8,7 veces, respectivamente. Curiosamente, la expresión de MMP-24 se redujo ligeramente mediante el tratamiento con VEGF, pero se redujo aún más mediante la adición de TETRAC. La expresión del inhibidor tisular de la metaloproteinasa 3 (TIMP-3), que es un potente inhibidor de varios miembros de la familia de MMP, se aumenta 5,4 veces tras el tratamiento con VEGF y TETRAC en comparación con las células HMVEC-d tratadas con VEGF. Esto sugiere que parte del mecanismo de inhibición por TETRAC de la angiogénesis estimulada por VEGF está regulado por los aumentos en la expresión de TIMP, que a su vez bloquean el papel de las MMP en la reorganización del citoesqueleto que se produce durante la angiogénesis.

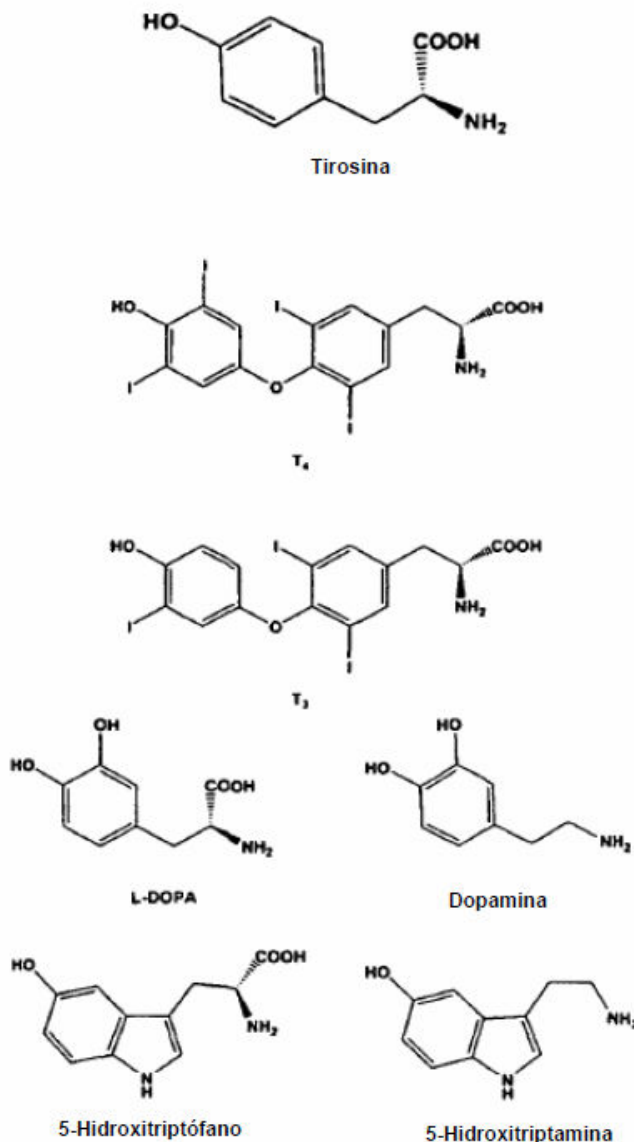
Actualmente, hay un gran interés clínico en los compuestos antiangiogénicos, principalmente para un uso adyuvante en el entorno de los cánceres. Como se ha demostrado anteriormente, la molécula pequeña TETRAC, dirigida hacia el receptor de membrana plasmática de la hormona tiroidea, tiene una potente actividad antiangiogénica. Aunque TETRAC es un antagonista de las acciones iniciadas en la superficie celular de la hormona tiroidea, se ha observado ahora que el TETRAC en ausencia de la hormona tiroidea inhibe la actividad angiogénica de VEGF y FGF2 en ensayos de células endoteliales humanas y de pollo. Por lo tanto, el TETRAC tiene la cualidad deseable de dirigirse a una integrina mediante la cual las señales de VEGF y FGF2 angiogénicas son transducidas en las células endoteliales, pero también inhibe la acción trófica de las concentraciones fisiológicas de la hormona tiroidea sobre la proliferación de ciertas células tumorales, incluyendo las células MCF-7 de cáncer de mama positivas en el receptor de estrógeno humano (ER) y los modelos celulares de glioma murinos de glioblastoma.

Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se especula que la hormona tiroidea tiene varios efectos sobre los tumores a nivel celular o molecular. Estos efectos incluyen un efecto proliferativo directo sobre las células tumorales, un efecto directo sobre la migración de las células cancerosas que puede dar soporte a la metástasis y el apoyo indirecto del crecimiento del tumor a través de la acción proangiogénica. En los entornos de los cánceres, el TETRAC y TRIAC sin modificar o modificados en forma de nanopartículas o conjugados poliméricos, en calidad de agentes contra la hormona tiroidea, pueden tener aplicación terapéutica.

Recientemente, se ha obtenido un importante beneficio de supervivencia con la administración de TETRAC a un modelo murino de implantes intracraneales de células de glioma murino (R. A. Fenstermaker, M. Ciesielski, F. Davis, y P. J. Davis, observaciones no publicadas). Además, un reciente estudio clínico prospectivo indica que la hormona tiroidea es un factor de crecimiento para el glioblastoma multiforme (GBM) y que la inducción del hipotiroidismo leve en pacientes con GBM tiene un beneficio sustancial de supervivencia. Un análisis retrospectivo de experiencia con el cáncer de mama en pacientes con hipotiroidismo en el Centro de Cáncer M. D. Anderson demostró que el hipotiroidismo confirió un menor riesgo de cáncer de mama y, cuando éste se produjo en mujeres con hipotiroidismo, se asoció con lesiones menos agresivas. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se especula que se observan dos efectos de la hormona tiroidea, un efecto directamente proliferativo sobre las células tumorales y el apoyo indirecto del crecimiento tumoral a través de la angiogénesis. En los entornos de estos dos tipos de cáncer, el TETRAC puede tener aplicación terapéutica.

Ejemplo 29. Nuevos conjugados de T₄/poliméricos y conjugados de T₄/nanopartículas:

La glándula tiroidea es la fuente de dos tipos fundamentalmente diferentes de hormonas. Las hormonas de yodotironina incluyen la tiroxina (T₄) y la 3,5,3'-triiodotironina (T₃). Son esenciales para el crecimiento y el desarrollo normales, y desempeñan un papel importante en el metabolismo energético. Las hormonas tiroideas son aminoácidos aromáticos derivados, en última instancia, de la tirosina. Son química y biosintéticamente similares a L-DOPA y 5-hidroxitriptófano, los precursores biosintéticos de los neurotransmisores dopamina y serotonina (5-hidroxitriptamina), respectivamente. A continuación, se muestran las estructuras químicas de T₄ y T₃, y de sus análogos biosintéticos.



La conjugación bien de T₃ o de T₄ con un polímero, o la inmovilización de T₃ o T₄ con nanopartículas dará lugar a partículas con un diámetro que no permite que el conjugado atraviese la membrana del núcleo. Por lo tanto, solo se puede obtener la actividad de la superficie celular de T₃ o T₄ sin ningún efecto genómico no deseado.

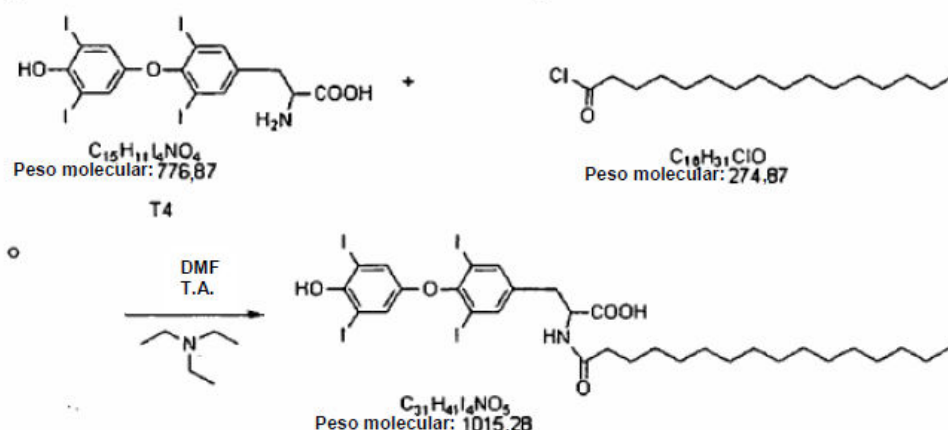
- 5 Tanto T₃ como T₄ portan tres grupos funcionales que pueden reaccionar para formar un conjugado polimérico: un grupo de ácido carboxílico, un grupo amino y un grupo hidroxilo. Para sintetizar los conjugados de T₃ o T₄/polímeros, usando T₄ con fines ilustrativos, el sitio de reacción puede ser cualquiera de los siguientes:

- 10 1) El grupo de ácido carboxílico: el grupo ácido puede reaccionar para formar un éster o una amida. Debido a la alta reactividad del grupo amino en T₄, éste se debe proteger antes de la reacción de conjugación, y luego desprotegerse. De lo contrario, la autopolimerización formará los oligómeros T₄. Los polímeros candidatos incluyen PVA, PEG-NH₂, poli(lisina) y polímeros relacionados.
- 15 2) El grupo amino: el grupo amino puede reaccionar con un polímero que lleve una función de ácido carboxílico o un grupo halógeno. Si el polímero tiene una gran cantidad de grupo ácido activado, la reacción puede producirse directamente. De este modo, se pueden usar poli(ácido metacrílico) y poli(ácido acrílico).
- 20 3) El grupo hidroxilo: debido a la existencia de un grupo amino reactivo superior, es difícil la reacción directa de T₄ con un polímero que contenga un ácido carboxílico. Este grupo amino debe protegerse antes de la reacción y desprotegerse después de la reacción de conjugación. El grupo protector común puede ser un grupo de anhídrido acético (Ac₂O), *N*-metilo, *N*-etilo, *N*-trifenilo o di-*tert*-butildicarbonato (BOC₂O).

Para cada una de las siguientes realizaciones, se puede usar T₃ en lugar de T₄.

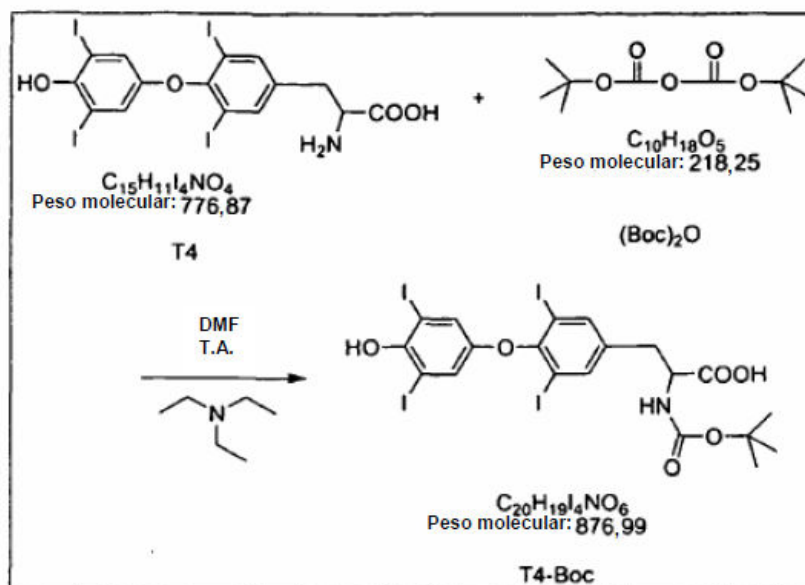
Protección del grupo amino de L-T₄

- 25 La protección del grupo amino de L-T₄ se puede realizar usando anhídrido acético (Ac₂O), di-*tert*-butildicarbonato (BOC₂O) y anhídrido butírico (Bu₂O) como agentes protectores, o usando cualquier grupo alifático largo adecuado. En el siguiente esquema de síntesis, se muestra un ejemplo de esquema de síntesis usando un grupo alifático largo, el cloruro de palmitoilo.

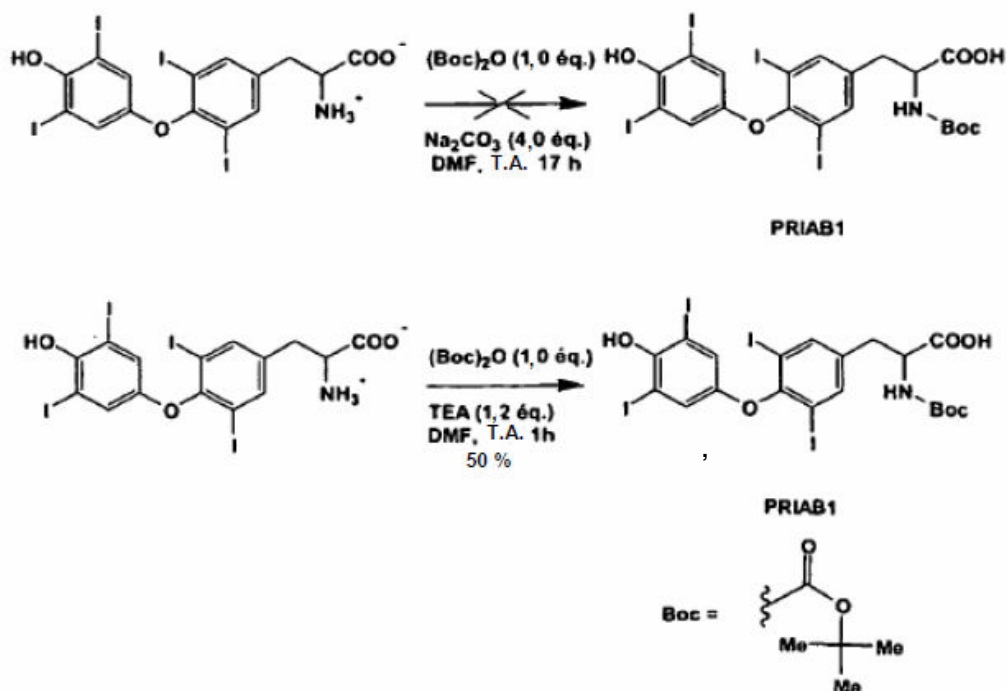


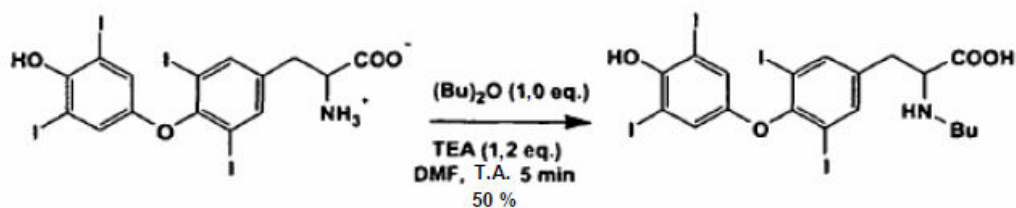
T4	776,87	1	180,0		
Cloruro de palmitoilo	274,87	1	35,4		
TEN	101,19	1,2	13,0	17,9	0,726

- 30 A continuación, se muestra un esquema de la protección del grupo amino de L-T₄ usando di-*tert*-butildicarbonato (BOC₂O) (T₄-BOC).

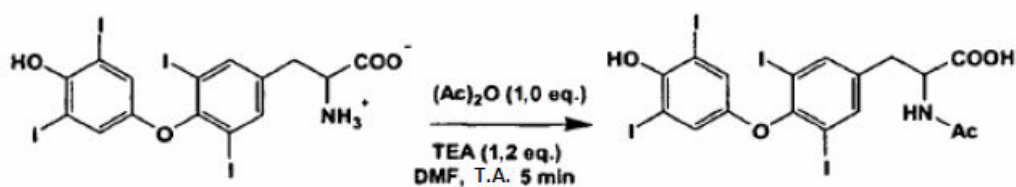
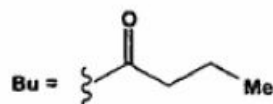


5 L-T₄ se protegió selectivamente teniendo en cuenta la reactividad del grupo amino en comparación con la del fenol y la forma zwitteriónica de la L-T₄ comercial. Esto se realizó usando una cantidad equimolar de los productos, una base mineral (Na₂CO₃) o una base orgánica (TEA) en un disolvente polar (DMA o DMF). Los compuestos PRIAB1, PRIAB4 y PRIAB5 se sintetizaron en las siguientes condiciones de reacción que se muestran a continuación.

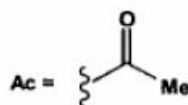




PRIAB4



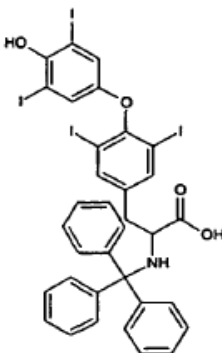
PRIAB5

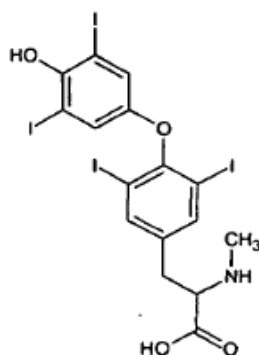
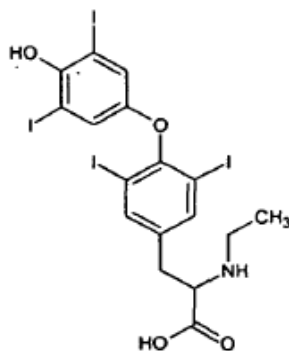


A continuación, se establece el procedimiento general para obtener las muestras analíticamente puras para ensayo, usando PRIAB1 como ejemplo:

5 Ácido 2-[[*tert*-butoxicarbonil]amino]-3-[4-(4-hidroxi-3,5-diyodofenoxi)-3,5-diyodofenil]propanoico (PRIAB1).
Sólido blanco; rendimiento del 50 % ; disolvente recristalizado: AcOEt; R_f = 0,79 (DCM/MeOH 5/5); p.f. = 212 °C ;
IR (v cm⁻¹): 3.407,41 (NH); 1.701,65 (CO); 1.660,49 (CO); RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): 1,34 (s, 9H, 3 CH₃);
10 2,71-2,79 (t, J = 11,7 Hz, 1H, CH); 3,04-3,08 (dd, J = 13,6 Hz, J = 2,0 Hz, 2H, CH₂); 4,16 (sa, 1H, NH); 7,05 (s, 2H, ArH); 7,82 (s, 2H, ArH); 11,68 (sa, 1H, OH) ; MS (ESI⁺): 899,7 [M+Na]⁺; 821,7 [M-tBu]⁺; 777,7 [M-Boc]⁺.
También se sintetizaron PRIAB2, PRIAB6 y PRIAB 12 (mostrado a continuación), se desprotegeron y se analizó la pureza, de una manera similar a la descrita anteriormente.

PRIAB2



PRIAB6**PRIAB12**

Estos nuevos grupos sustituidos en N (*N*-metilo, *N*-etilo o *N*-trifenilo) mostraron una eficacia proangiogénica comparable a la de b-FGF o L-T₄ como se muestra en la siguiente Tabla en el modelo de CAM.

5

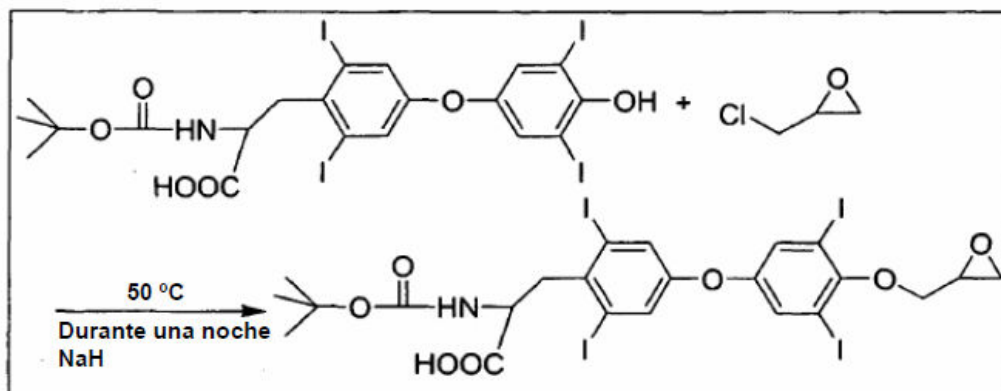
Efecto de los análogos de L-T₄ PRIAB2, PRIAB6, PRIAB12 en el modelo de angiogénesis de la CAM

Tratamiento	Ptos. ramificación ± ETM	% de inhibición ± ETM
PBS	76,0 ± 8,5	
FgF (1,25 µg/ml))	137,9 ± 7,5	
PRIAB2 (0,1 µM) (análogo de T ₄)	136,0 ± 18,1	
PRIAB6 (0,1 µM) (análogo de T ₄)	136,2 ± 12,4	
PRIAB12 (0,1 µM) (análogo de T ₄)	121,7 ± 13,6	

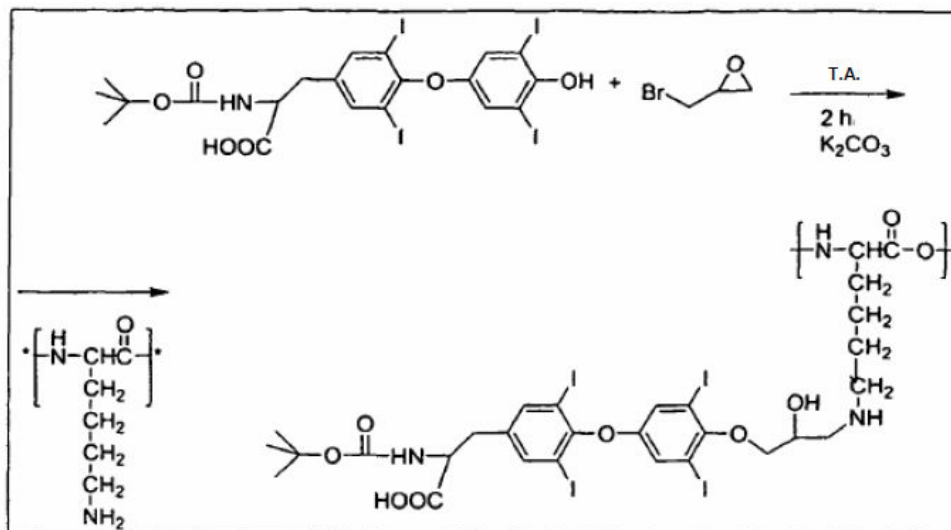
Activación de T₄-BOC

10

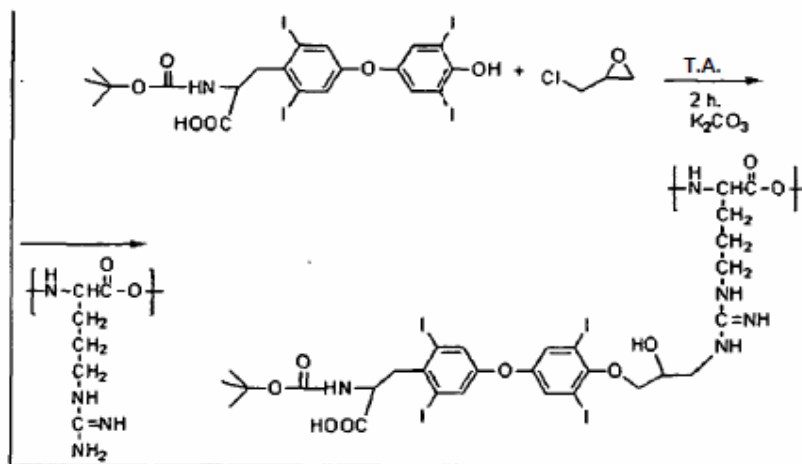
T₄-BOC se puede activar usando epiclorhidrina u otro agente de activación adecuado (por ejemplo, epibromohidrina). Por ejemplo, a continuación, se muestra un esquema de síntesis de productos intermedios de T₄-BOC activados.



Síntesis de nuevos conjugados de T₄/poliméricos: T₄-BOC activado se puede conjugar con diferentes polímeros, incluyendo, sin limitación, PVA, PEG, polilisina y poliarginina. La conjugación de T₄ a un polímero a través del grupo hidroxilo fenólico puede ser deseable, porque T₄ y T₃ se conjugan cada uno con ácido glucurónico y ácido sulfónico en el hígado durante la degradación. Por ejemplo, a continuación, se muestra un esquema de síntesis de la conjugación de T₄-Boc activado a polilisina.

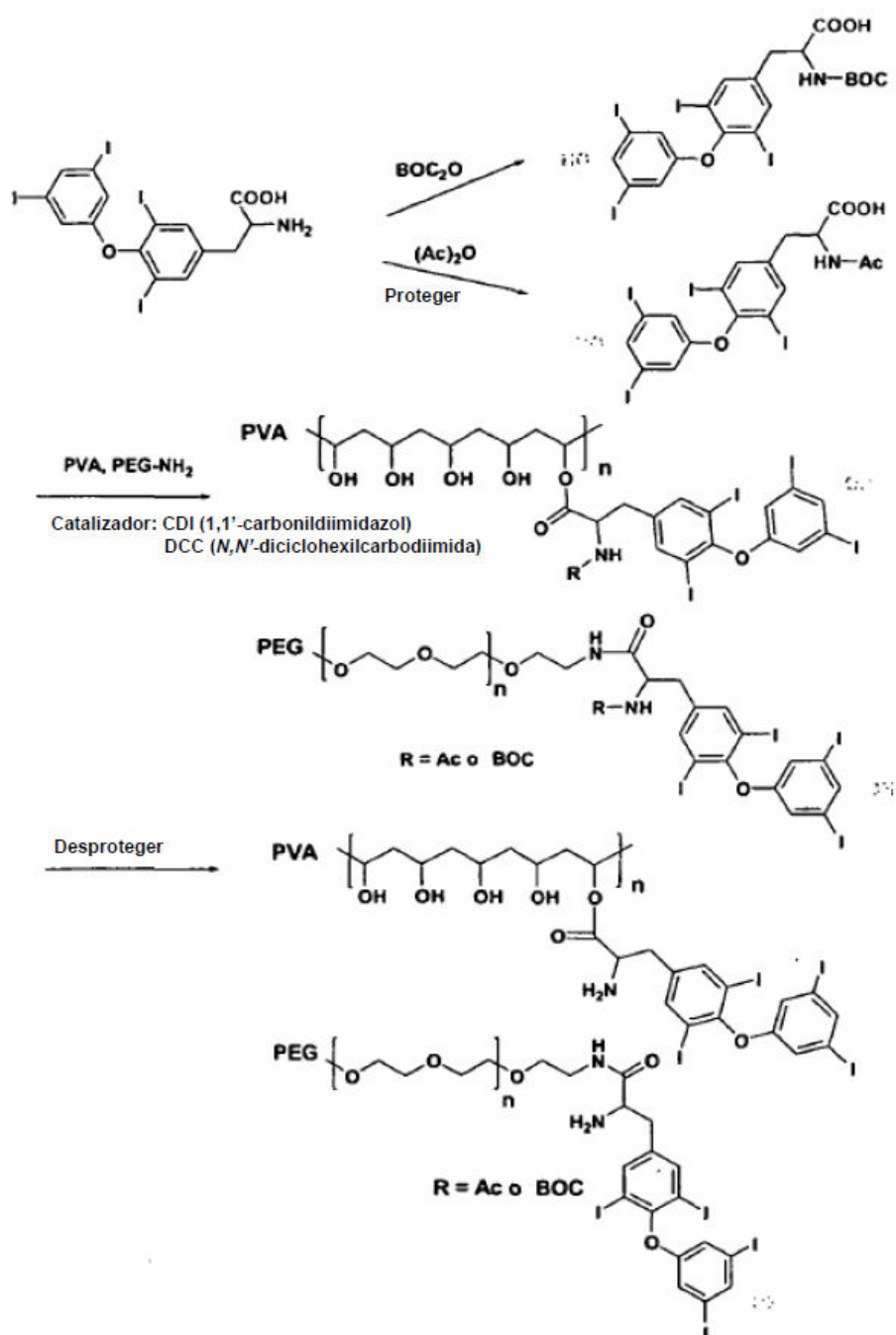


A continuación, se muestra un esquema de síntesis de la conjugación de T₄-Boc a poliarginina.



	PM	proporción	Peso (mg)	Volumen (ul)	Densidad	mmol
T ₄ -Boc	876,99	1	40,0			45,6
Epibromohidrina	136,98	1,5	9,4			68,4
Poliarginina			60,0			
K ₂ CO ₃	138,21	1,5	9,5			68,4
NaOH	40	1,5	2,7			68,4

A continuación, se muestra un esquema que representa la protección de T₄ usando anhídrido acético (Ac₂O) o di-*terc*-butildicarbonato (BOC₂O), la desprotección y la posterior conjugación con PVA o PEG.

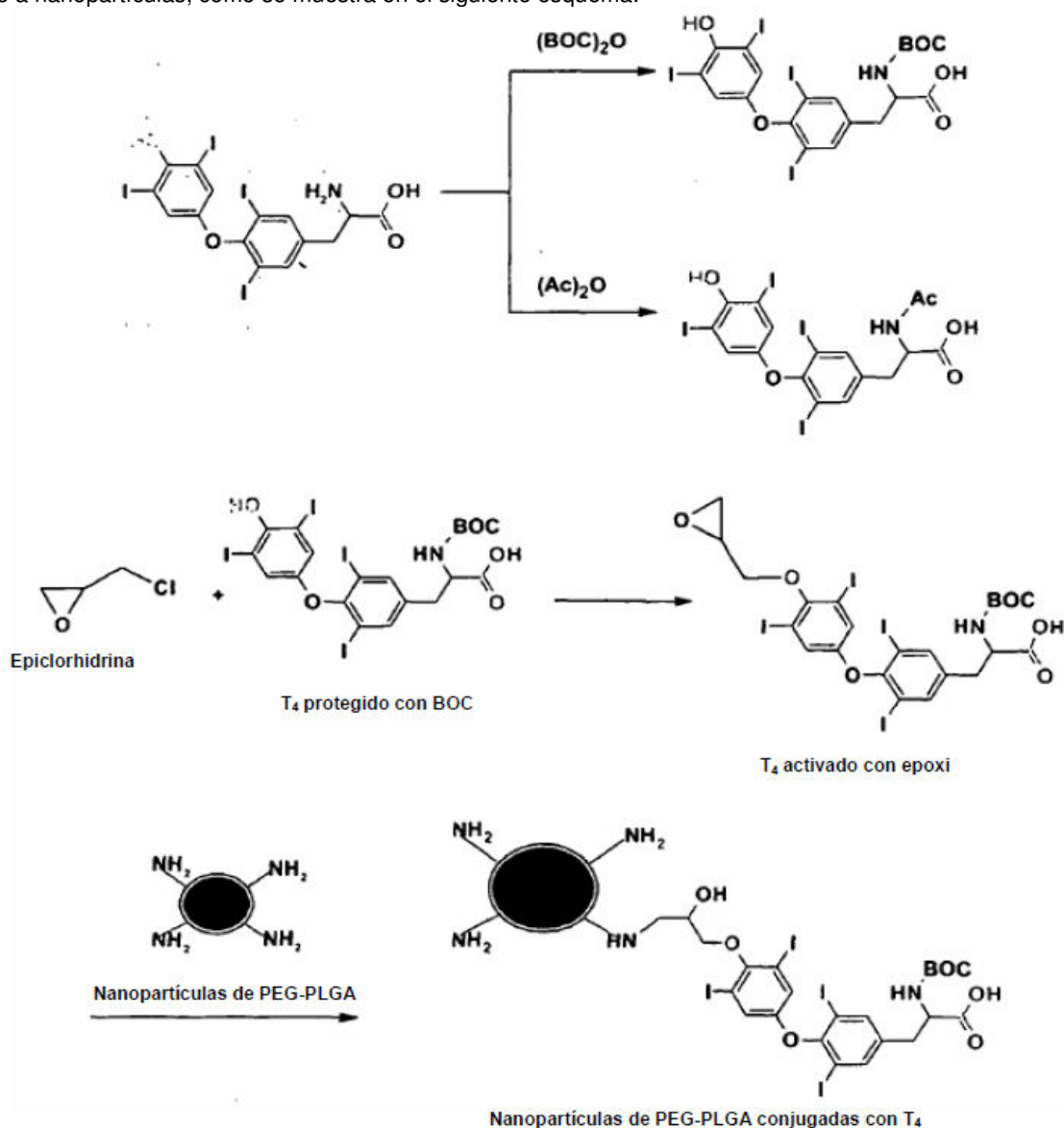


Preparación de nanopartícula con T₄ encapsulado

Tras la conjugación, por ejemplo, la conjugación con PEG, los conjugados de T₄/PEG se pueden usar para la inmovilización con nanopartículas mediante cualquier método conocido para un experto habitual en la materia. Por ejemplo, sin limitación, las nanopartículas de PLGA-PEG que encapsulan T₄ N-protegido se preparan mediante el método de emulsión única de la siguiente manera (que se representa en la Figura 51). Se preparan soluciones de PEG-PLGA y T₄ N-protegido en DMSO por separado (por ejemplo, 80 mg/ml de PEG-PLGA y 15 mg/ml de T₄ N-protegido) y luego se mezclan en cantidades iguales. Se añaden 100 µl de esta solución a solución de PVA al 1 % (alcohol polivinílico) con agitación constante. Tras 4 horas, se somete toda la solución que contiene las nanopartículas que encapsulan T₄ a diálisis para eliminar las impurezas.

Preparación de nanopartículas de PEG-PLGA conjugadas a T₄

Los conjugados de T₄/PEG se pueden usar para la inmovilización con nanopartículas mediante la conjugación a nanopartículas usando un método de conjugación adecuado conocido por el experto habitual en la materia. Como ejemplo ilustrativo, primero se bloqueó el grupo amino altamente reactivo presente en T₄ mediante el uso bien de anhídrido acético (Ac₂O) o de di-*tert*-butildicarbonato (BOC₂O), y a continuación, se activó con epiclorhidrina y se conjugó a nanopartículas, como se muestra en el siguiente esquema.



Ensayos farmacológicos

Se ensayaron PRIAB1, PRIAB4 y PRIAB5, como se ha descrito anteriormente, usando el ensayo de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) antes de la conjugación. Los resultados se presentan en el presente documento y en

la Figura 52 para PRIAB1.

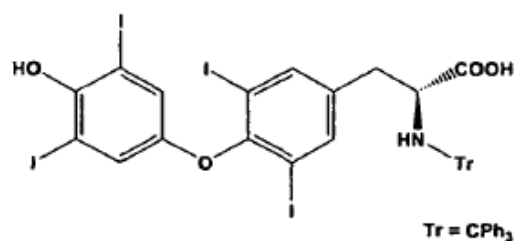
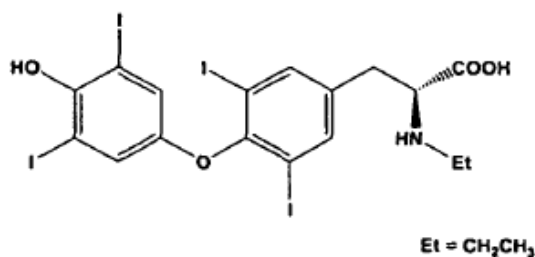
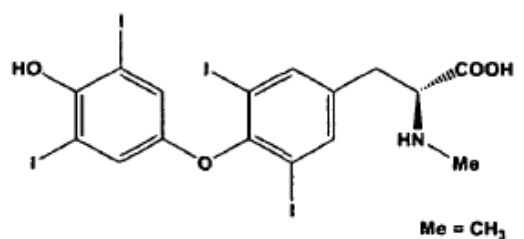
Tratamiento	Ptos. ramificación ± ETM
PBS	65,2 ± 14,9
T ₄ (0,1 μM)	137,3 ± 8,8
PRIAB1 (0,1 μM)	173 ± 9,9

- 5 Los resultados de los ensayos fueron sorprendentes. Los resultados de los ensayos mostraron una clara acción proangiogénica mediante los análogos de T₄ protegidos, y el grupo protector más voluminoso mostró la menor actividad. Debido a la formación de un enlace de amida, el doblete libre de electrones transportado por el nitrógeno secundario de esas moléculas se desplaza hacia el carbonilo que vuelve a la amina no nucleófila (la desactivación de la amina por el grupo carbonilo se muestra a continuación). Sin embargo todavía es básico.



10

A continuación, se muestran nuevos análogos diseñados para portar un grupo amino protegido (que difiere en volumen), que vuelve a la amina básica y nucleófila:



15

Los resultados de las investigaciones actuales y futuras sobre los análogos de T₄ y sus nanopartículas homólogas representan un paso importante en la mejora del conocimiento de la acción no genómica de T₄ hacia la estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Si son positivos, los resultados de los análogos de T₄ alquilados pueden conducir a iniciar numerosos ensayos biológicos nuevos. Estos resultados pueden contribuir al diseño de nuevos agonistas o antagonistas dobles de TR y α_vβ₃.

20

Ejemplo 30. Regeneración colateral en tejido coronario, carótido o periférico:**Modelo experimental de isquemia de extremidades:**

El presente estudio se llevó a cabo en tres grupos principales de conejos (8-12 meses de vida): a) grupo isquémico, sin tratar como grupo de control; b) grupo isquémico receptor de análogos de L-T₄; y c) grupo isquémico receptor de análogos de DITPA. Se permitió a los animales el libre acceso a agua y comida, y se alojaron en jaulas separadas a temperatura ambiente de 22 °C y ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Inmediatamente después de la cirugía, los conejos recibieron por inyección una sola dosis i.m. de tetraciclina. Los análogos tiroideos se administraron como una carga de dosis subcutánea (1 mg/animal) seguida de la administración oral diaria del fármaco (1 mg/animal).

Para examinar la viabilidad del uso de análogos tiroideos para estimular la angiogénesis y aumentar el desarrollo de vasos colaterales *in vivo*, se usó un modelo de conejos de isquemia de las extremidades posteriores. En resumen, bajo anestesia (una mezcla de 10 mg/kg de ketamina y 2,5 g/kg de xilazina, i.m.), se sometieron los conejos a incisión longitudinal que se extendió inferiormente desde el ligamento inguinal hasta un punto justo próximo a la rótula. A través de esta incisión, se diseccionó la arteria femoral a lo largo. Se diseccionarán todas las ramificaciones de la arteria femoral (incluyendo las arterias epigástrica inferior, femoral profunda, circunfleja lateral y epigástrica superficial). A la disección extensa de las arterias poplítea y safena, le siguió la ligadura de la arteria ilíaca externa y todas las arterias mencionadas anteriormente. A esto, le siguió la escisión completa de la arteria femoral de su origen proximal como una ramificación de la arteria ilíaca externa hasta el punto distal donde se bifurca para formar las arterias safena y poplítea. Por lo tanto, el suministro de sangre a la extremidad distal dependerá de las arterias colaterales que podrían proceder de la arteria ilíaca interna ipsilateral. Se tomaron muestras de músculo de la parte media del muslo.

Angiografía:

Se evaluó el desarrollo de vasos colaterales en la extremidad isquémica mediante angiografía aórtica un mes después de la cirugía o el tratamiento. Como la angiografía se realizó al final del período de estudio, las inyecciones se realizaron a través de un catéter introducido en la aorta. Inyección intraarterial de medios de contraste (5 ml de Isovue-370). Se registraron imágenes de la extremidad isquémica de diferentes grupos.

Tras el angiograma, se sacrificaron los animales y se recogieron muestras de sangre, y se prepararon secciones de tejido de los músculos de las extremidades posteriores y se introdujeron en parafina para su posterior inmunotinción.

Estudio de inmunohistoquímica:***Expresión de CD31:***

Se desparafinó la sección introducida en parafina, se rehidrató y se sometió a la recuperación de antígenos usando microondas y tampón de citrato, pH 6,1 durante 10 minutos. Se incubaron las secciones con anticuerpo CD31 monoclonal de ratón antihumano (DAKO) diluido 1:1.000 en solución salina tamponada con Tris. Este anticuerpo marca fuertemente las células endoteliales y es un buen marcador en la determinación de los capilares. El complejo de antígeno-anticuerpo fue visualizado usando DAB y a lo que le siguió una contratinción.

Evaluación de la densidad capilar:

Se contaron los capilares identificados por tinción positiva para CD31 por un solo observador ciego para el régimen de tratamiento bajo un objetivo de 40 aumentos, (número medio de capilares por fibra muscular). Se seleccionó aleatoriamente un total de 10 campos diferentes de secciones de tejido, se contó el número de capilares y se determinó la densidad capilar mediante el cálculo de la proporción de capilares/fibra muscular.

Ejemplo 31 - TETRAC como un quimiosensibilizador contra el cáncer

El receptor de superficie celular para la hormona tiroidea que es relevante para la proliferación de células tumorales está en la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, y la señal de la hormona es transducida por la vía de ERK/MAPK. Usando el modelo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) y ensayos de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas, los presentes inventores también han incluido el mecanismo de MAPK en el receptor de la $\alpha\text{V}\beta 3$ en el efecto proangiogénico de la hormona tiroidea. Los estudios del presente laboratorio han demostrado que TETRAC, un análogo no agonista desaminado de T₄, previene la unión del agonista T₄ y T₃ hacia $\alpha\text{V}\beta 3$ en la membrana plasmática e inhibe los efectos hormonales sobre la angiogénesis. El presente estudio se realizó para examinar otro componente del comportamiento de las células tumorales, es decir, la resistencia a los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. Existen varios mecanismos de resistencia, incluyendo la expresión de los genes de la bomba de resistencia a múltiples fármacos (MDR) cuyos productos génicos, insertados en la membrana plasmática, exportan agentes quimioterapéuticos contra el cáncer al espacio extracelular. Los presentes inventores han demostrado que la hormona tiroidea, actuando a través de su receptor de integrina, tiene acciones sobre los sistemas de transporte de iones de la membrana plasmática, tales como el antiportador de Na⁺/H⁺. Por lo tanto, los presentes inventores

han examinado en los presentes estudios la posibilidad de que TETRAC tenga acciones de membrana que sean relevantes para la manipulación celular de agentes quimioterapéuticos.

Materiales y métodos

Células y reactivos.

Las células SKN-SH de neuroblastoma humano, SaOS2 de osteosarcoma y MCF-7 de carcinoma de mama se adquirieron en ATCC (Rockville MA). El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y el suero bovino fetal (FBS) se obtuvieron en BioWhittaker (Walkersville, MD). Los siguientes fármacos y reactivos se obtuvieron de las compañías citadas: doxorubicina, etopósido, cisplatino y ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); [¹⁴C]-doxorubicina (Amersham, Arlington Heights, IL); anticuerpo contra el transportador de fármacos P-glucoproteína (P-gp) (Signet Laboratories, Dedham, MA), SOD y anticuerpos GST-π (Santa Cruz Biotechnology Laboratories, Santa Cruz, CA), anticuerpo contra la β-actina de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (BioRad, Hercules, CA).

Los reactivos de aumento de la quimioluminiscencia (ECL) se adquirieron en Amersham (Arlington Heights, IL) y las membranas de transferencia Immobilon-P para las transferencias Western se obtuvieron en Millipore (Bedford, MA). Las células resistentes se generaron mediante la incubación continua de líneas celulares parentales con aumentos por etapas en las concentraciones de fármacos, que variaron de 10⁻⁹ M hasta 10⁻⁵ M, durante un período de tres a seis meses. Al final de la selección, se ensayaron las células en cuanto a la resistencia a los fármacos usando el ensayo de viabilidad de MTT. Se sembraron las células a 10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron con el fármaco durante 96 h. Se añadieron diez µl de solución de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Las células se solubilizaron mediante la adición de 100 µl de SDS al 10 %/HCl 0,01 M y se incubaron durante 15 horas a 37 °C. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo en un lector de placas de ELISA, usando una longitud de onda de activación de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 650 nm. Se determinó el porcentaje de células viables mediante la comparación con células de control no tratadas

Transferencia Western

Se cultivó la monocapa celular en crecimiento de 25 cm² hasta una confluencia del 90 %, luego se lavó con PBS y se lisaron las células en HEPES 50 mM a pH 7,4 que contenía NaCl 150 mM, NaF 100 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 1,5 mM, glicerol al 10 %, Triton X100 al 1 %, 1 µg/ml de leupeptina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. Se separaron cantidades iguales de proteína por electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 12 % y se transfirieron a membranas Immobilon-P. Las proteínas de interés se identificaron mediante la reacción con anticuerpos primarios y secundarios específicos ligados a la peroxidasa de rábano picante y se detectaron por quimioluminiscencia.

Medición de la acumulación de doxorubicina

Se sembraron células resistentes a la doxorubicina en placas de 12 pocillos y se incubaron durante 24 h, tras lo que se añadió [¹⁴C]doxorubicina (5 nCi) en ausencia o en presencia de TETRAC (30 µg/ml) y se incubaron durante 24 h. Entonces, se lavaron las células 4 veces con PBS enfriado con hielo y se lisaron. Se midió la radiactividad en el lisado, que corresponde a la acumulación del fármaco celular, por espectrometría de centelleo.

Tinción de β-galactosidasa asociada a la senescencia (SA-β-Gal)

Se sembraron células en placas de 24 pocillos en medio de cultivo DMEM y, tras 24 horas, se añadieron doxorubicina, TETRAC o ambos, y se incubaron las células durante 5 días. Se realizó la tinción SA-β-Gal. En resumen, las células se fijaron durante 5 min en formaldehído al 3 %, se lavaron y se incubaron a 37 °C con X-gal (1 mg/ml), disuelto en una solución que contenía ácido cítrico 40 mM a pH 6,5, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferricianuro de potasio 5 mM, NaCl 150 mM y MgCl₂ 2 mM. Tras 24 h de incubación, se tomaron fotografías con un microscopio de fase.

Detección de la apoptosis

Se sembraron las células en placas de cultivo de 100 mm y se trataron con doxorubicina, TETRAC o ambos durante 24 h, tras lo que se sometieron las células a tratamiento con tripsina a 37 °C durante 3 min, se fijaron con formalina al 4 % en PBS y se lavaron con PBS. A continuación, se incubaron con 0,1 µg/ml de Hoechst 33248 (bisbenzimidaz, Sigma-Aldrich) y se aplicaron puntualmente en portaobjetos de microscopía. Se contaron las células positivas y se compararon sus fracciones entre las poblaciones no tratadas y tratadas.

Estudios en animales

Se obtuvieron ratones atímicos de la cepa CD1 en Charles River Laboratories (Wilmington, MA) de aproximadamente 5-6 semanas de vida y un peso de aproximadamente 30 g. Los animales recibieron la

implantación s.c. de células MCF7/R resistentes a la doxorrubicina (10^6 células en 100 μ l). Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 50 mm³, se agruparon los animales por parejas y se dividieron en cuatro grupos de cinco ratones de la siguiente manera: a) controles tratados con vehículo; b) ratones tratados con TETRAC (30 mg/kg); c) ratones tratados con doxorrubicina (2 mg/kg); d) ratones tratados con la combinación de ambos fármacos. Se realizó un total de tres inyecciones (separadas en 3 días). Se pesaron los ratones, y se verificaron los signos clínicos de toxicidad y letalidad de los fármacos. Se midieron los tumores con un calibrador tres veces por semana durante hasta 3 semanas y se convirtieron en volumen tumoral usando la fórmula $W \times L^2/2$. Se generaron curvas de crecimiento tumoral.

10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía usando el programa informático Statview (Adept Scientific, Acton, MA), comparando la media $\pm$ DE de los puntos de ramificación de cada grupo experimental con su respectivo grupo de control. La significación estadística se definió como $P < 0,05$.

15 **Resultados**

Efecto de TETRAC sobre la proliferación de células sensibles y resistentes a fármacos. Los presentes inventores han ensayado el efecto de TETRAC sobre la proliferación de líneas celulares sensibles y resistentes a fármacos derivadas de neuroblastoma (SKN-SH), osteosarcoma (SaOS2) y cáncer de mama (MCF7). Las líneas resistentes se seleccionaron mediante el aumento gradual de las concentraciones de doxorrubicina a lo largo del tiempo. Como se muestra en la Fig. 53 (paneles A, C y E), la respuesta celular a la doxorrubicina se redujo significativamente en las células resistentes. También se encontró que estas células eran resistentes a otros agentes relacionados y no relacionados tales como el etopósido, la vinblastina y el inhibidor de la histona desacetilasa tricotatina A. Sin embargo, el efecto de TETRAC sobre la proliferación celular fue similar en las líneas tanto sensibles como resistentes (paneles B, D y F), lo que sugiere que esta hormona antagonista es capaz de superar la resistencia a los fármacos. Curiosamente, en el caso de las células SAOS2, las células resistentes a los fármacos parecieron ser más sensibles a TETRAC que sus células sensibles a fármacos parentales. Esto sugiere que se podría haber producido alteraciones en las vías de señalización de la hormona tiroidea que vuelven a las células más sensibles hacia el TETRAC durante el proceso de selección de fármacos.

30 Mejora de la respuesta de las células cancerosas a los agentes anticancerígenos clásicos mediante TETRAC

Se examinó el efecto de TETRAC sobre la respuesta celular a agentes anticancerígenos conocidos, incluyendo la doxorrubicina, el etopósido, el cisplatino y TSA en homólogos resistentes y sensibles a fármacos. Para ello, primero se trataron previamente las células con TETRAC (30 μ g/ml), luego se sometieron a tratamiento con agentes anticancerígenos clásicos y se incubaron durante 4 días. Como se muestra en la Fig. 54, TETRAC mejoró de manera constante la respuesta celular a estos fármacos en las 3 líneas celulares resistentes. También se observaron efectos similares en líneas celulares sensibles a fármacos. Dado que la resistencia a la doxorrubicina y al etopósido se sabe que está asociada con la sobreexpresión del transportador de fármacos P-gp, existe la posibilidad de que TETRAC pueda inhibir la función de este transportador, sin embargo, dado que la resistencia al cisplatino ha demostrado ser independiente de este transportador, se sugiere que mecanismos independientes de P-gp también pueden mediar la acción de TETRAC. Otra posibilidad es que TETRAC afecte a la actividad de la bomba MDR cambiando el pH intracelular.

45 *Supuestos mecanismos mediante los cuales TETRAC aumenta la sensibilidad de las células cancerosas a los fármacos*

Como se ha mencionado anteriormente, la sobreexpresión del transportador de fármacos P-gp es una característica de la resistencia a inhibidores de la topoisomerasa tales como la doxorrubicina y el etopósido. Los presentes inventores han encontrado que este transportador sobreexpresó, de hecho, MCF7/R resistentes a la doxorrubicina en comparación con las células sensibles a fármacos parentales (Fig. 55A). En comparación, la expresión de otras moléculas de resistencia a fármacos, tales como SOD y GST- π , no cambió significativamente entre las dos líneas celulares (Fig. 55A), lo que sugiere que la alteración del transporte de fármacos podría ser el principal mecanismo de resistencia a los fármacos en estas células. Se llevó a cabo el análisis del efecto de TETRAC sobre la expresión de P-gp, SOD y GST- π mediante transferencias Western en las células MCF7/R bien sometidas o no al tratamiento con este antagonista y/o doxorrubicina. Los datos (Fig. 55B) indican que ninguno de los tratamientos afectó a la expresión de estos genes de resistencia a fármacos. Sin embargo, la medida del transporte de fármacos en presencia de TETRAC usando doxorrubicina radiomarcada indicó que la acumulación de este fármaco fue significativamente superior en las células tratadas (Fig. 55C), lo que sugiere que la función de P-gp podría ser inhibida por esta hormona antagonista. Esta observación arroja luz sobre una función previamente desconocida del TETRAC y proporciona pruebas convincentes de que este análogo tiene el potencial de ser considerado en el tratamiento de tumores resistentes a fármacos.

Teniendo en cuenta el hallazgo realizado en la Fig. 54 de que TETRAC aumenta la respuesta celular al cisplatino, un sustrato no P-gp, se pueden considerar mecanismos de resistencia a los fármacos adicionales. Por ejemplo,

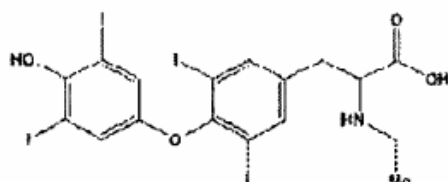
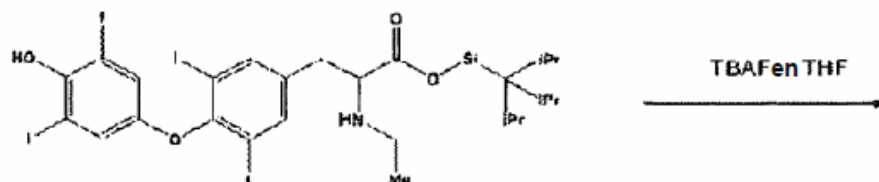
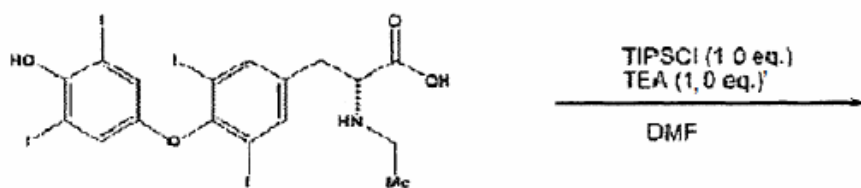
estudios recientes procedentes del presente laboratorio y de otros han demostrado que, independientemente de la naturaleza de la defensa celular contra el estrés, la susceptibilidad de las células cancerosas a someterse a la detención de la proliferación, es decir, la senescencia, o la muerte celular, es decir, la apoptosis, representan determinantes clave en el inicio y la progresión de los tumores resistentes a fármacos. Para comprobar si estas vías también se podrían ver afectadas por TETRAC, se midió la expresión de marcadores moleculares de la detención del crecimiento (inhibidor del ciclo celular p21/WAF1) y la apoptosis (caspasa-3 activa) en células sometidas a tratamiento con este compuesto, en comparación con células sin tratar. Como se muestra en la Fig. 56A, el TETRAC solo no tuvo ningún efecto sobre la expresión de p21/WAF1, mientras que su combinación con una concentración relativamente baja de doxorrubicina tuvo un fuerte efecto sobre este inhibidor del ciclo celular. Este hallazgo se fundamentaba además en la medición de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -Gal) (Fig. 56B), que indica que la exposición de las células a esta combinación de fármacos les fuerza a un estado de senescencia. Además, en estas mismas condiciones, se observó un fuerte aumento de la activación de la caspasa3 (Fig. 56A) y la condensación de la cromatina (Fig. 56B), lo que indica que una fracción de las células tratadas se vio comprometida a la muerte apoptótica. En conjunto, estos hallazgos proporcionaron pruebas de que, además de su efecto sobre el transporte de fármacos, el TETRAC también puede sinergizarse con fármacos citotóxicos para inducir la senescencia celular y la muerte celular apoptótica.

Efecto de TETRAC sobre la proliferación de tumores resistentes a fármacos in vivo

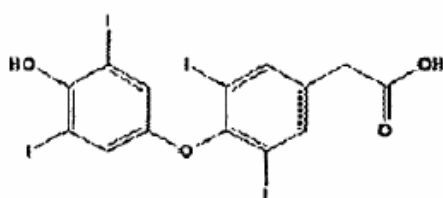
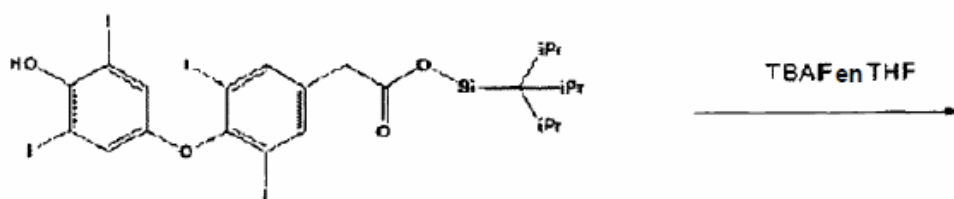
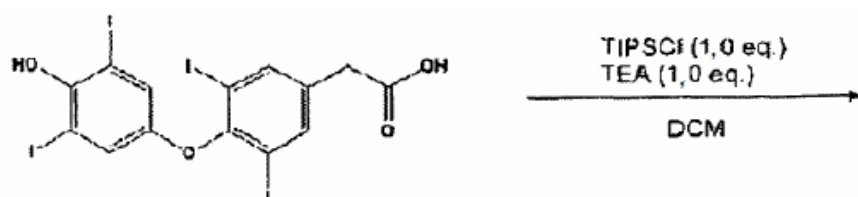
Para definir aún más la relevancia *in vivo* de TETRAC en la supresión de la resistencia a los fármacos, se ha ensayado su efecto, ya sea solo o en combinación con doxorrubicina, en ratones atímicos que portaban xenoinjertos de células cancerosas resistentes a fármacos. Los ratones recibieron por inyección la línea celular de cáncer de mama resistente a la doxorrubicina MCF7/R y, cuando los tumores se hicieron palpables, los ratones recibieron tres inyecciones de fármacos de doxorrubicina sola, TETRAC solo o la combinación de ambos. La dosis máxima tolerada (MTD) para la doxorrubicina fue de 2,5 mg/kg. Sin embargo, en el caso del TETRAC, no se detectó toxicidad hasta un máximo de 60 mg/ml. En cuanto a la eficacia de estos tratamientos, los datos indicaron que la doxorrubicina sola (2 mg/kg) no tuvo ningún efecto notable sobre el crecimiento tumoral. Por el contrario, el TETRAC a 30 mg/ml solo redujo el crecimiento tumoral en un 70 % (Fig. 57). Este efecto no se agravó aún más mediante la combinación de ambos fármacos, lo que sugiere una falta del efecto sinérgico a las concentraciones usadas. Curiosamente, la concentración de fármaco de TETRAC fue bien tolerada y no se observó toxicidad significativa en los animales tratados durante los experimentos. Estos hallazgos sugieren que TETRAC es capaz de suprimir la proliferación de los tumores resistentes a los fármacos *in vivo* y, por tanto, puede ser prometedor para el tratamiento de tumores resistentes a fármacos. Se garantizan otras investigaciones para determinar la dosis óptima a la que este compuesto se puede usar, ya sea solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos para obtener la máxima eficacia antitumoral.

Ejemplo 32. Rutas de síntesis ilustrativas

A.

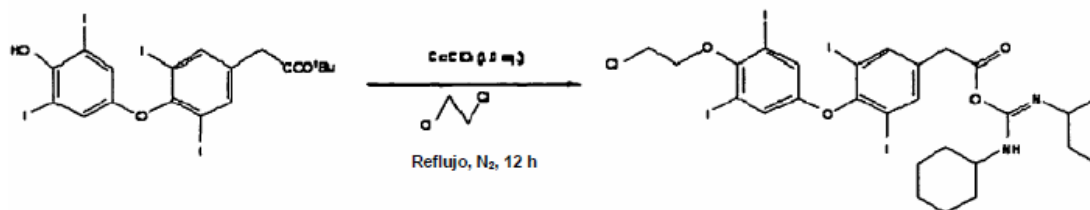
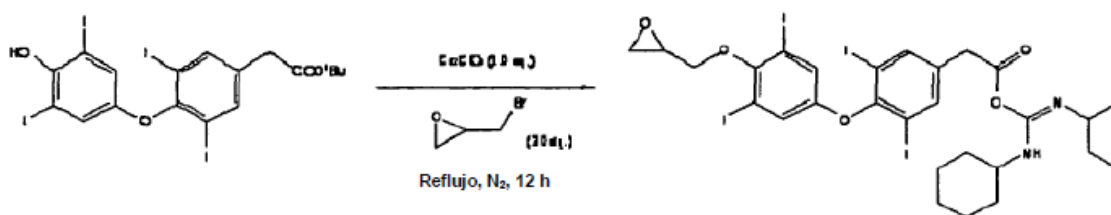


B.



Ejemplo 33. Química de las nanopartículas de TETRAC inmovilizado

A continuación, se presentan dos metodologías para inmovilizar TETRAC. En una metodología, se usa epiclorhidrina cíclica y en una segunda metodología, se usa un producto intermedio lineal. Los productos se purificaron por cromatografía en columna. Los compuestos sintetizados se pueden inmovilizar en las nanopartículas de PLGA.

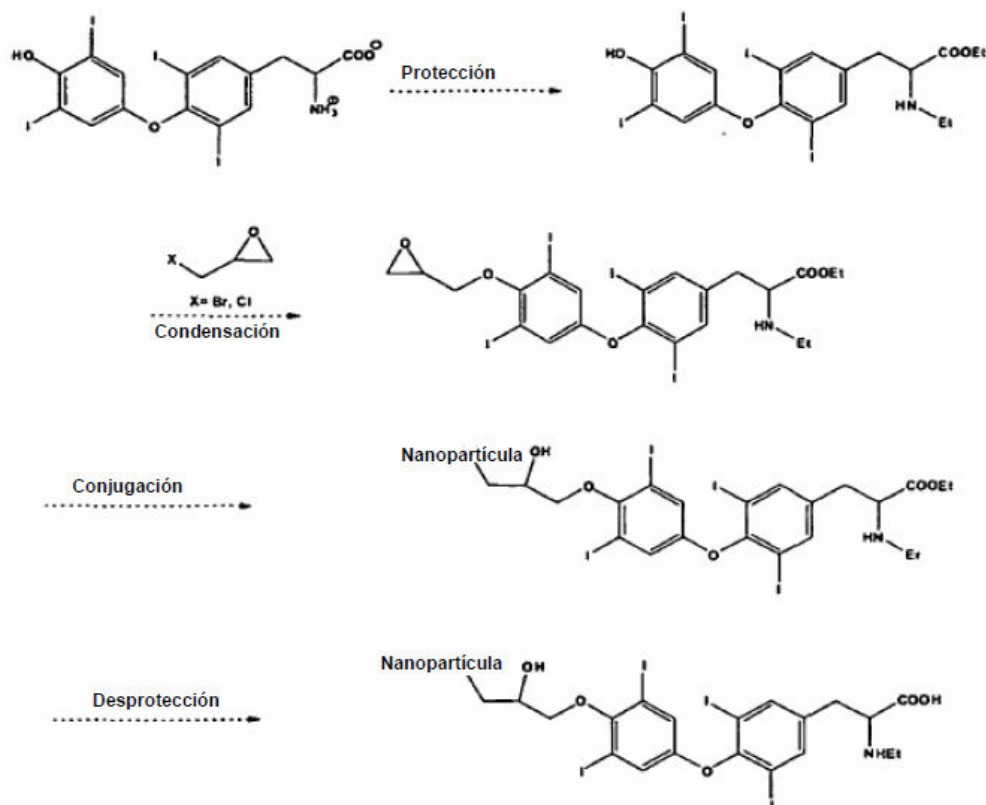
Síntesis del PRIAB24**Síntesis del PRIAB19**

- 10 La síntesis del análogo activado usando la epibromhidrina se sintetizó con un rendimiento del 2 %.

A partir de 2 g del material de partida, se obtuvieron aproximadamente 60 mg del producto recristalizado en forma de un polvo blanco.

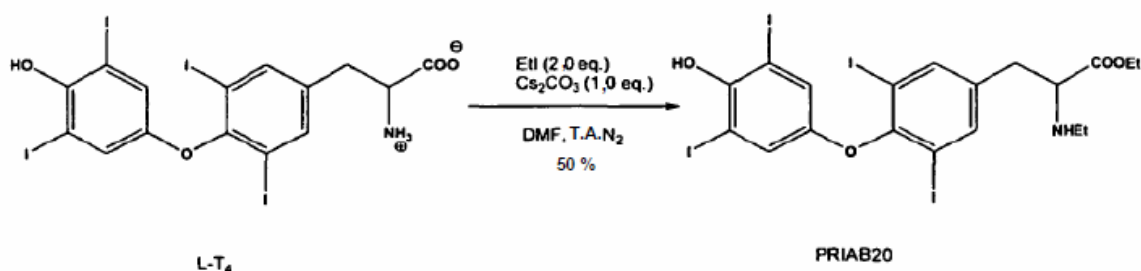
15 Ejemplo 34 - Diseño y ruta de síntesis de nanopartículas conjugadas con L-T₄

Se creía que el efecto proangiogénico en la superficie celular de L-T₄ se podía alcanzar mediante la conjugación de la molécula de L-T₄ con una nanopartícula que tuviera grupos amino en sus extremos. L-T₄ tiene tres grupos funcionales, una amina, un ácido carboxílico y un hidroxilo. Tras realizar las investigaciones sobre los efectos de L-T₄ y TETRAC en el sitio activo de la integrina, se encontró que el hidroxilo no contribuyó potentemente a los efectos observados de esas moléculas. La estrategia seguida para la conjugación fue la de enmascarar primero el grupo amino y luego el ácido carboxílico de L-T₄ en una segunda etapa, y luego activar el producto intermedio usando un derivado de epóxido como enlazador. La epiclorhidrina o la epibromhidrina resultaron ser mejores para este fin, porque el epóxido altamente reactivo permanecería sin obstáculos tras la condensación con L-T₄ y libre para reaccionar con cualquier grupo amino de la nanopartícula. Tras ello, la acidólisis tanto de la amida como del éster en condiciones suaves se usaría entonces para obtener el producto deseado.



Estrategia de síntesis de la activación de L-T₄ antes de la conjugación

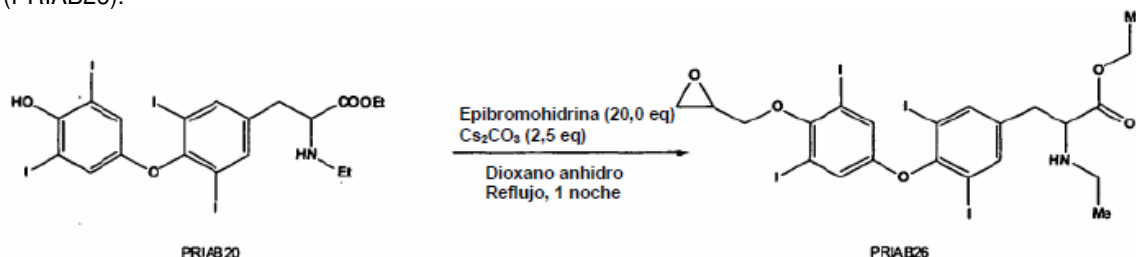
- 5 Primera etapa: Síntesis de etil-2-(etilamino)-3-[4-(4-hidroxi-3,5-diyodofenoxi)-3,5-diyodofenil]propanoato (PRIAB20).



A una suspensión agitada de L-T₄ (1,0 g, 1,29 mmol, 1,0 eq.) en DMF (20 ml), se añadió Cs₂CO₃ (419,4 mg, 1,29 mmol, 1,0 eq.). Tras agitar durante 5 minutos, se añadió ETI (206 µl, 2,57 mmol 2,0 eq.) gota a gota. Tras agitar durante 1 h, se eliminó el disolvente de la reacción, se disolvió el residuo en un mínimo de acetona y se añadió la solución obtenida gota a gota a 40 ml de H₂O. A continuación, se filtró y se recrystalizó el precipitado.

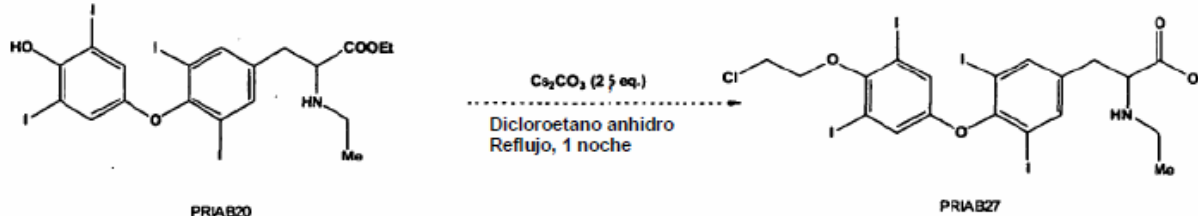
Rendimiento: 50 %; sólido blanquecino; disolvente de recrystalización: EtOH; TLC: R_f = 0,43 (EtOAc/EtOH 9/1); **RPTLC**: R_f = 0,43 (AcOH/H₂O 8/2); p.f. = 136 °C; IR (u cm⁻¹): 1.730 (CO); RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm): 7,79 (s, 2H, ArH), 7,14 (s, 2H, ArH), 4,06-4,02 (m, 2H, CH₂), 3,93-3,89 (c, J = 7,0 Hz, 2H, CH₂), 3,59-3,56 (t, J = 7,0 Hz, 1H, CH), 2,80-2,77 (m, 2H, CH₂), 1,88 (sa, 1H, NH), 1,41-1,39 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃), 1,15-1,12 (t, J = 7,0 Hz, 3H, CH₃); MS (ESI+) m/z 911,7 [(M+DMSO)⁺, 100], 833,7 [(M+H)⁺, 75]; Anal. calc. para C₁₉H₁₉I₄NO₄: C, 27,40; H, 2,30; N, 1,68, encontrado: C, 27,54; H, 1,94; N, 1,66. Solubilidad 10⁻³ M en agua tras preparar una solución a 10⁻¹ M en DMSO. Es destacable que si se prepara una suspensión de L-T₄ durante la noche, el rendimiento se puede aumentar.

Segunda etapa: síntesis de 3-(4-(3,5-diyodo-4-(oxiran-2-ilmetoxi)fenoxi)-3,5-diyodofenil)-2-(etilamino)propanoato de etilo (PRIAB26).



- 5 Se disolvió PRIAB20 (866,4 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) en dioxano anhidro (30 ml), a continuación, se añadió Cs_2CO_3 (325,8 mg, 1,0 mmol, 1,0 eq.) y luego epibromohidrina (1,78 ml, 20,8 mmol, 20,0 eq.). Después, se calentó el medio de reacción lentamente a reflujo. Se agitó la mezcla durante la noche a reflujo y después se enfrió hasta la temperatura ambiente. A continuación, se evaporó la solución orgánica y se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice (eluyente DCM/acetato de etilo, 1/9), proporcionando un polvo blanco que se recrystalizó adicionalmente.
- 10

Tercera etapa: Síntesis de 3-(4-(4-(2-cloroetoxi)-3,5-diyodofenoxi)-3,5-diyodofenil)-2-(etilamino)propanoato de etilo (PRIAB27).



- 15 Se disolvió PRIAB20 (1,0 eq.) en dicloroetano anhidro (30 ml), y después se añadió Cs_2CO_3 (2,5 eq.). Se calentó el medio de reacción lentamente a reflujo. Se agitó la mezcla durante la noche a reflujo y después se enfrió hasta la temperatura ambiente, se filtró y se eliminó el disolvente al vacío. A continuación, se purificó el aceite residual por cromatografía en columna, proporcionando un producto que se recrystalizó adicionalmente.
- 20

Cuarta etapa: Síntesis de nanopartículas

Etapa 1: Se preparó una solución de PLGA (poli-1-láctido-co-glicólido) en DMSO. La concentración del PLGA en DMSO era de 40 mg/ml.

- 25 **Etapa 2:** Se añadieron 100 μl de esta solución de 40 mg/ml de PLGA (poli-1-láctido-co-glicólido) en DMSO a 10 ml de una solución de PVA al 1 % (alcohol polivinílico) y se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente para formar las nanopartículas.

Etapa 3: A continuación, se sometió la suspensión de nanopartículas a diálisis durante 6 horas en una membrana 10-12 kD.

- 30 **Etapa 4:** A esta solución de 10 ml, se añadió 1 ml de tampón PBS (pH ~7,4, x 10) seguido de la adición de 60 mg de clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (clorhidrato de EDC), y se agitó durante al menos 30 minutos a 1 h.

Etapa 5: De nuevo, a la solución anterior, se añadieron 60 mg de etilendiamina y se agitaron durante la noche.

- 35 **Etapa 6:** Entonces, se sometió toda la solución a diálisis (a través de una membrana de 3,5 KD) durante aproximadamente 8 horas para eliminar los materiales sin reaccionar.

Conjugación de las nanopartículas con la L-T₄ activada

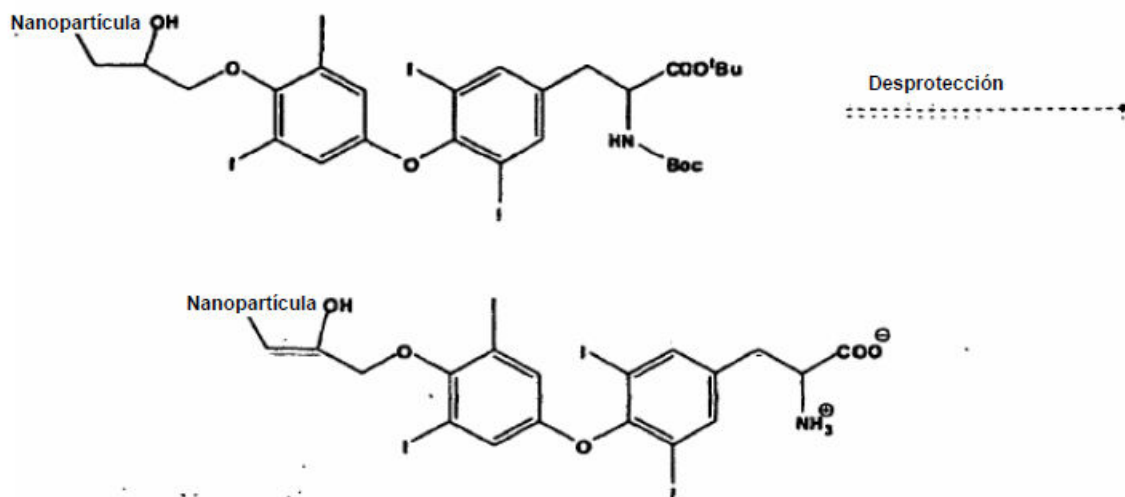
- 40 **Etapa 7:** Ahora, a las nanopartículas de PLGA anteriores con grupo $-\text{NH}_2$, se añadieron 100 μl de la L-T₄ activada (aproximadamente 20 mg/ml de DMSO), y se agitó durante 24 horas.

Etapa 8: Después, se sometió la solución a diálisis durante al menos 12 horas para su purificación.

- 45 Tras verificar el tamaño y la distribución de tamaño de las nanopartículas de L-T₄ recién formuladas, se saponificó el *tert*-butanoléster en condiciones ácidas suaves usando TFA. El tamaño de partícula varió de 200 a 250 nm. Las nanopartículas con L-T₄ inmovilizada se caracterizaron por su distribución de tamaño, cargas superficiales. Se observó la estabilidad de las nanopartículas de L-T₄ analizando los cambios en las distribuciones de tamaño a lo largo del tiempo (día 1, semana 1 y 1 mes) de L-T₄ inmovilizada en solución mantenida a 4 grados centígrados. El

tamaño medio de las nanopartículas varió de 200 a 250 nm, y no mostró cambios significativos en el intervalo durante el período de 1 mes ni L-T₄ libre no detectable desde las nanopartículas. Tras NaOH 5 mM, se liberó el 100 % de la L-T₄ libre de las nanopartículas tras la incubación durante la noche.

5 **Quinta etapa: Acidólisis de la nanopartícula**



10 Se realiza la desprotección en las nanopartículas de L-T₄ mediante la agitación de las partículas en una solución de TFA o HF diluido en agua durante 12 horas y luego la purificación.

REIVINDICACIONES

1. Uso de TETRAC, TRIAC o conjugados de nanopartícula de los mismos en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer resistente a la terapia farmacológica mediante el aumento de la quimiosensibilidad de las células cancerosas y/o la supresión del desarrollo de resistencia a fármacos en el cáncer.
2. TETRAC, TRIAC o conjugados de nanopartícula de los mismos para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer resistente a la terapia farmacológica mediante el aumento de la quimiosensibilidad de las células cancerosas y/o la supresión del desarrollo de resistencia a fármacos en el cáncer
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el TETRAC, el TRIAC o los conjugados de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho cáncer resistente a la terapia se selecciona del grupo que consiste en un tumor primario o metastásico, cáncer de mama, cáncer de tiroides, neuroblastoma, glioma y glioblastoma multiforme y otros cánceres de cerebro, cáncer de colon, cánceres de cabeza y cuello, melanoma y carcinomas de células basales y células escamosas de la piel, sarcoma, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de riñón, hepatoma, cáncer de pulmón y cáncer de estómago.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el TETRAC, el TRIAC o los conjugados de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha terapia farmacológica comprende la administración de fármacos quimioterapéuticos convencionales o nuevos, y en donde los fármacos quimioterapéuticos se seleccionan opcionalmente del grupo que consiste en doxorubicina, etopósido, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, cisplatino, tricotatina A, paclitaxel, gemcitabina, taxotere, cisplatino, carboplatino, irinotecán, topotecán, adriamicina, bortezomib atópida y temozolomida.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el TETRAC, el TRIAC o los conjugados de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el tratamiento o la prevención comprenden además la administración de un fármaco quimioterapéutico.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el TETRAC, el TRIAC o los conjugados de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los conjugados de nanopartícula de TETRAC o TRIAC comprenden una nanopartícula conjugada a una pluralidad de partículas de TETRAC o TRIAC con un tamaño de partícula de entre 10 y 1.000 nm, en donde las partículas de TETRAC o TRIAC están unidas a la nanopartícula por un enlace de éter (-O-) o azufre (-S-) que une el resto de alcohol de las partículas de TETRAC o TRIAC y la conjugación de la nanopartícula.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el TETRAC, el TRIAC o los conjugados de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde, en los conjugados de nanopartícula, el TETRAC o el TRIAC están conjugados a un miembro seleccionado del grupo que consiste en: poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), alcohol polivinílico, copolímero de ácido acrílico y etileno, polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico, poliglicólido, poliláctido, agarosa, PEO, m-PEG, PVA, PLLA, PGA, poli-L-lisina, albúmina de suero humana, derivado de celulosa, carbometoxi/etil/hidroxipropilo, ácido hialurónico, ciclodextrina/dextrano ligado a folato, polímero espaciado de sarcosina/aminoácidos, alginato/carragenina, pectina/quitosano, dextrano, colágeno, poliamina, polianilina, polialanina, politriptófano y politirosina.
8. El uso, o el TETRAC, el TRIAC o los conjugados de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la nanopartícula contiene entre 1 y 100 moléculas de TETRAC o de TRIAC por nanopartícula, preferentemente entre 15 y 30 moléculas de TETRAC o de TRIAC por nanopartícula, o más preferentemente entre 20 y 25 moléculas de TETRAC o de TRIAC por nanopartícula.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es una formulación farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y que, además, comprende opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
10. El TETRAC, el TRIAC o el conjugado de nanopartícula de los mismos para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el TETRAC, el TRIAC o el conjugado de nanopartícula de los mismos está en una formulación farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y que, además, comprende opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables
11. La formulación farmacéutica para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en donde la formulación es para la administración parenteral, oral, rectal o tópica, o combinaciones de las mismas.

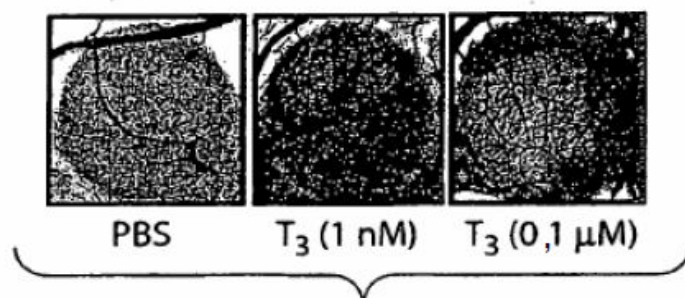
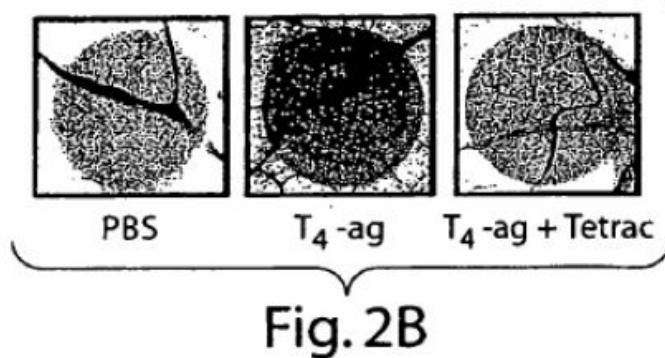
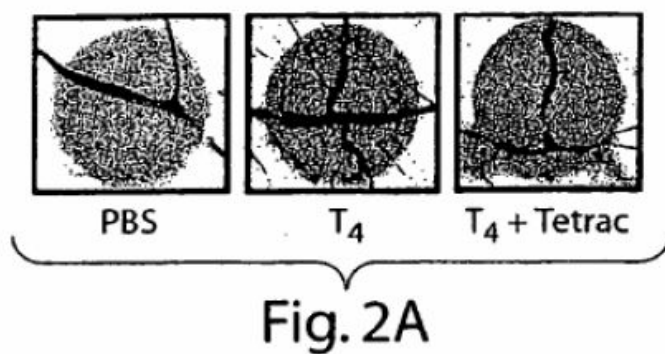


Fig. 1A

T₄ y T₃ estimulan la angiogénesis en el modelo de membrana corioalantoidea

<u>Tratamiento</u>	<u>Índice de angiogénesis</u>
PBS	63 10
T ₃ (1 nM)	121 18**
T ₄ (0,1 μM)	155 11**

Fig. 1B



Sumario de los efectos de T₄ y T₃-agarosa y TETRAC sobre la angiogenesis

Tratamiento	Índice de angiogenesis
PBS	67 9
T ₄ (0,1 μM)	156 16**
Tetrac (0,1 μM)	76 9
T ₄ + tetrac	66 6
T ₄ -agarosa (0,1 μM)	194 28**
T ₄ -agarosa + TETRAC	74 7

Fig. 2C

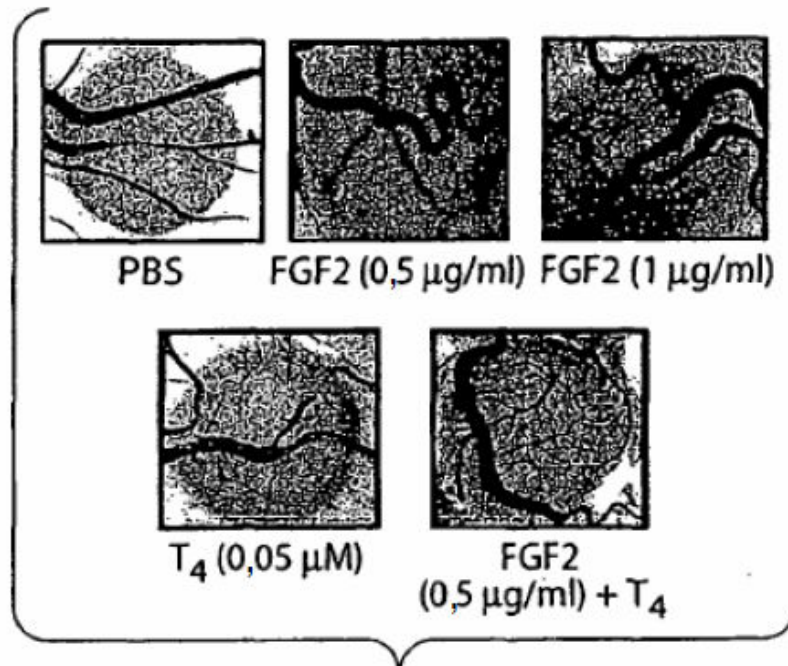


Fig. 3A

Efectos de FGF2 y T₄ sobre la angiogénesis

<u>Tratamiento</u>	<u>Índice de angiogénesis</u>
PBS	86 11
FGF2 (0,5 µg/ml)	126 17*
FGF2 (1,0 µg/ml)	172 9**
T ₄ (0,5 µM)	115 4*
T ₄ + FGF2 (0,5 µg/ml)	167 10**

Fig. 3B

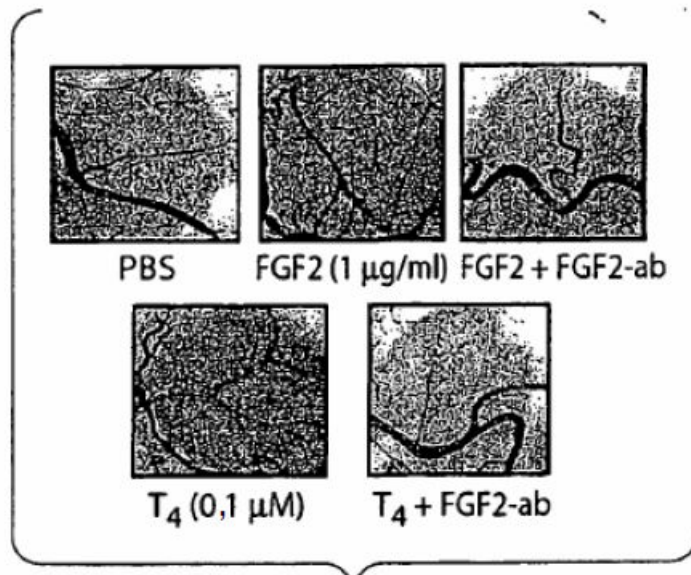


Fig. 4A

Efectos del anticuerpo FGF2 sobre la angiogénesis estimulada por T₄ y FGF2

Tratamiento	Índice de angiogénesis
PBS	92 10
FGF2 (1,0 µg/ml)	187 17*
FGF2 + FGF2-ab	118 7
T ₄ (0,1 µM)	142 12*
T ₄ + FGF2-ab	96 10

Fig. 4B

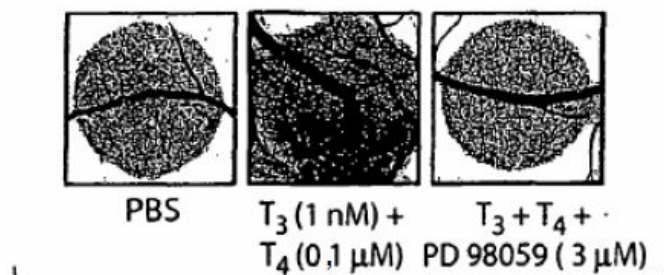


Fig. 5A

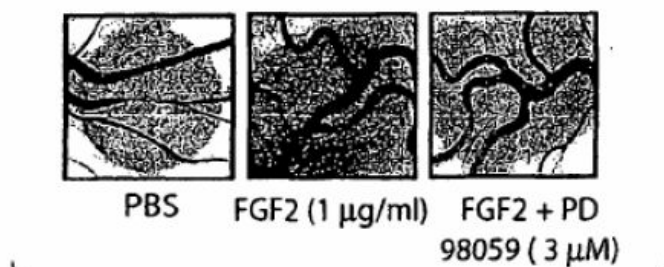
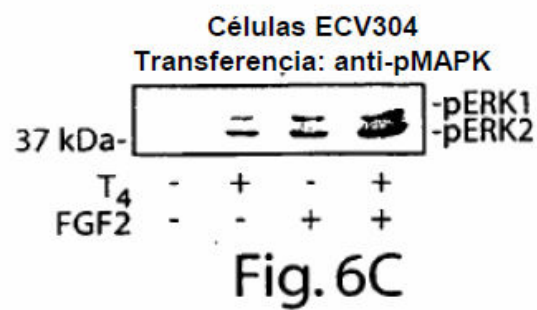
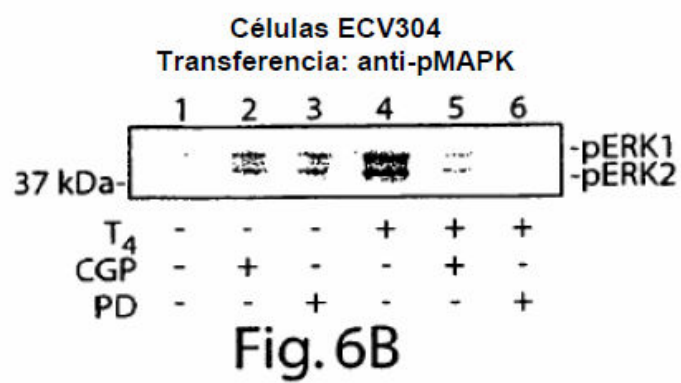
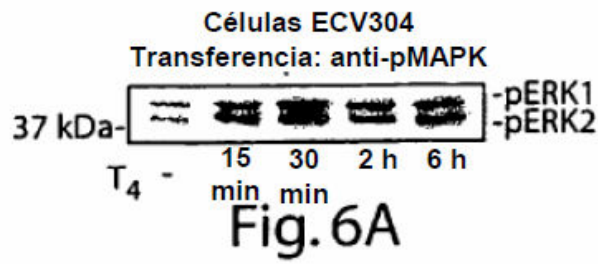


Fig. 5B

Efectos de PD 98059 sobre la
angiogénesis estimulada por T_4 y FGF2

Tratamiento	Índice de angiogénesis
PBS	63 10
T_3 (1 nM) + T_4 (0,1 μ M)	153 15*
T_3 + T_4 + PD 98059 (3 μ M)	50 10
PBS	86 11
FGF2 (1 μ g/ml)	191 15**
FGF2 + PD 98059 (3 μ M)	110 16

Fig. 5C



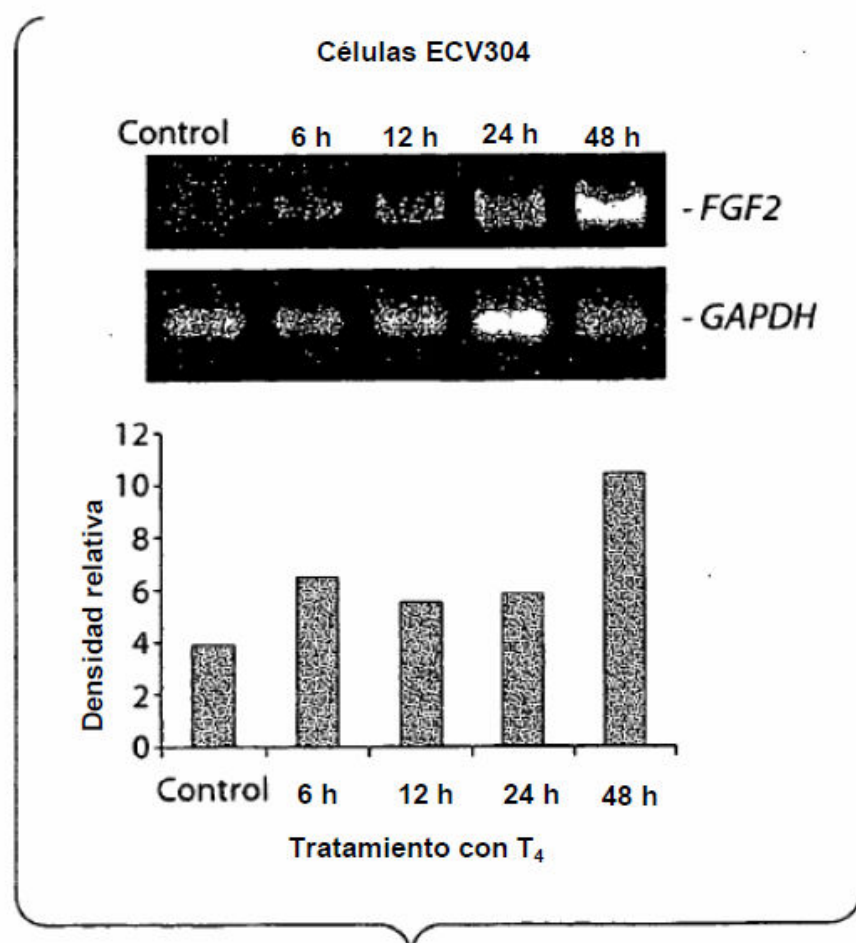


Fig. 7

Modelo de crecimiento tumoral en embrión de pollo de 7 días

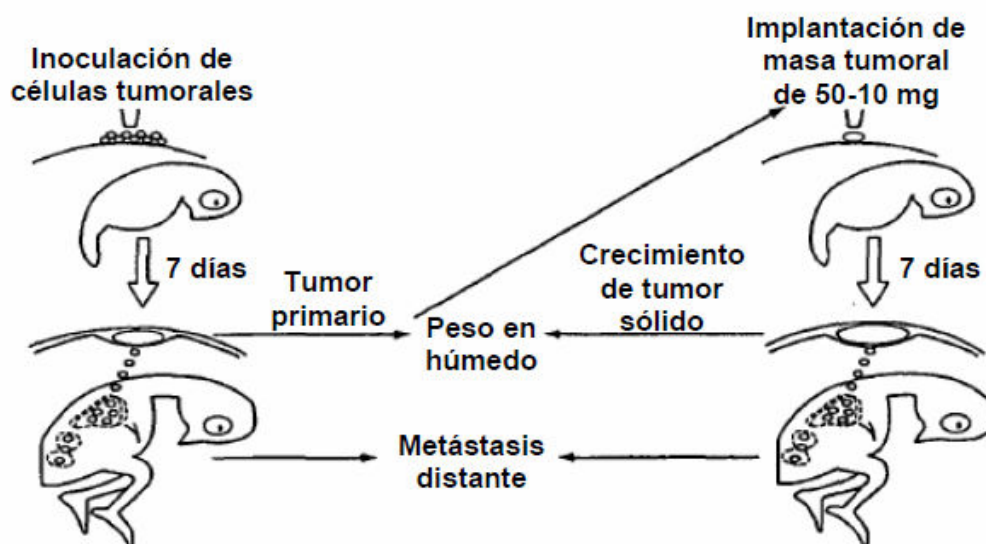
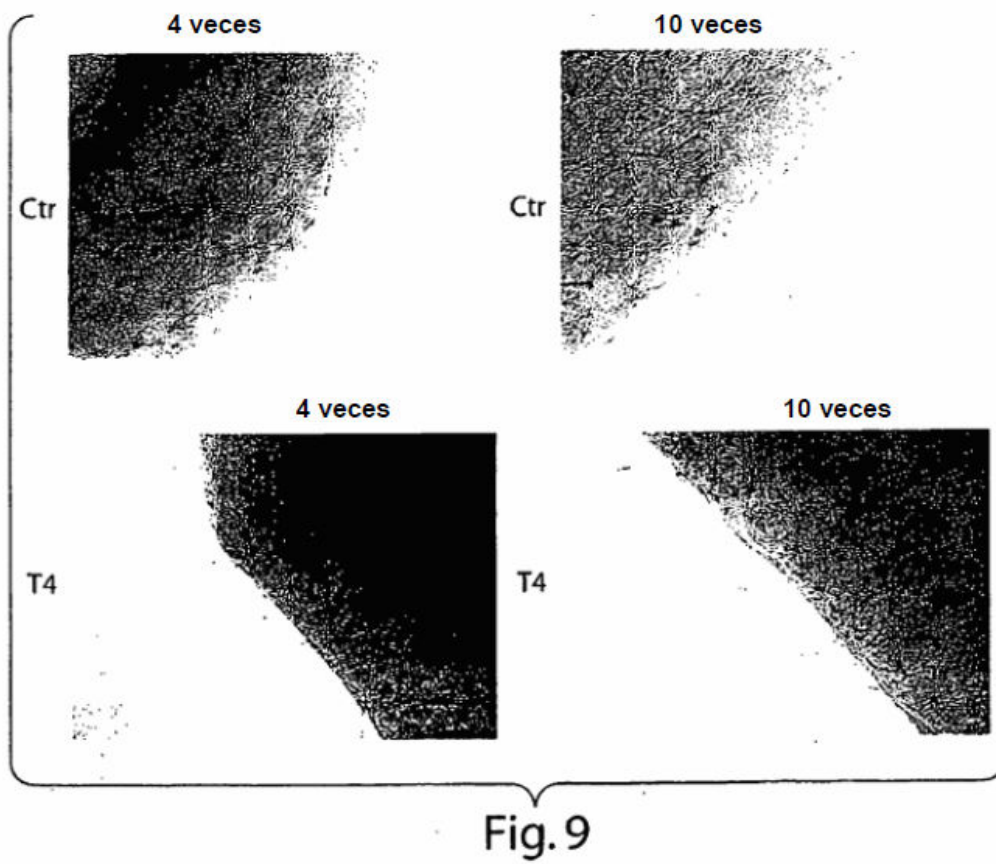


Fig. 8



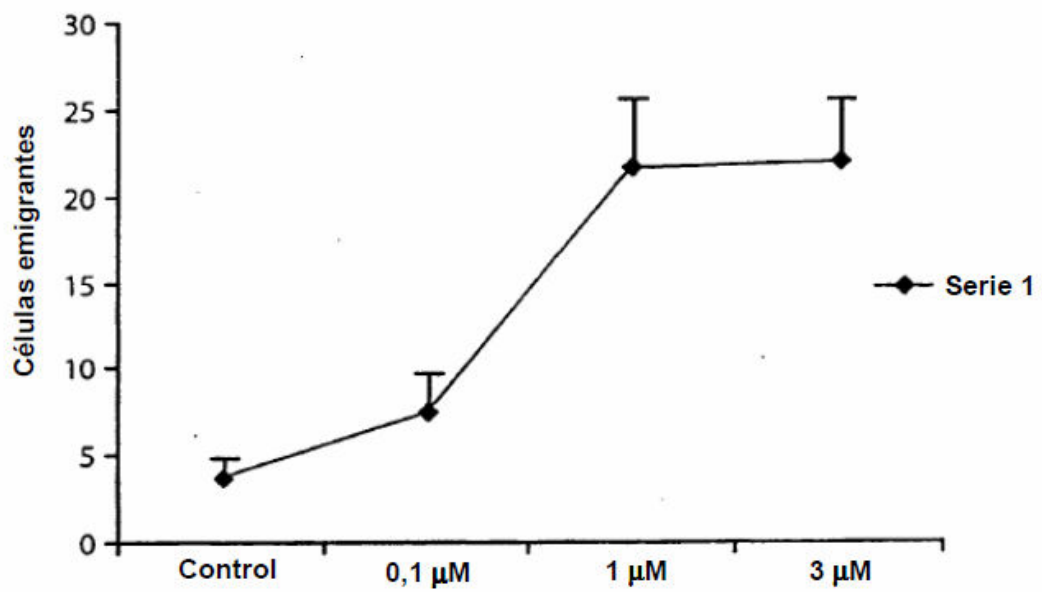


Fig. 10

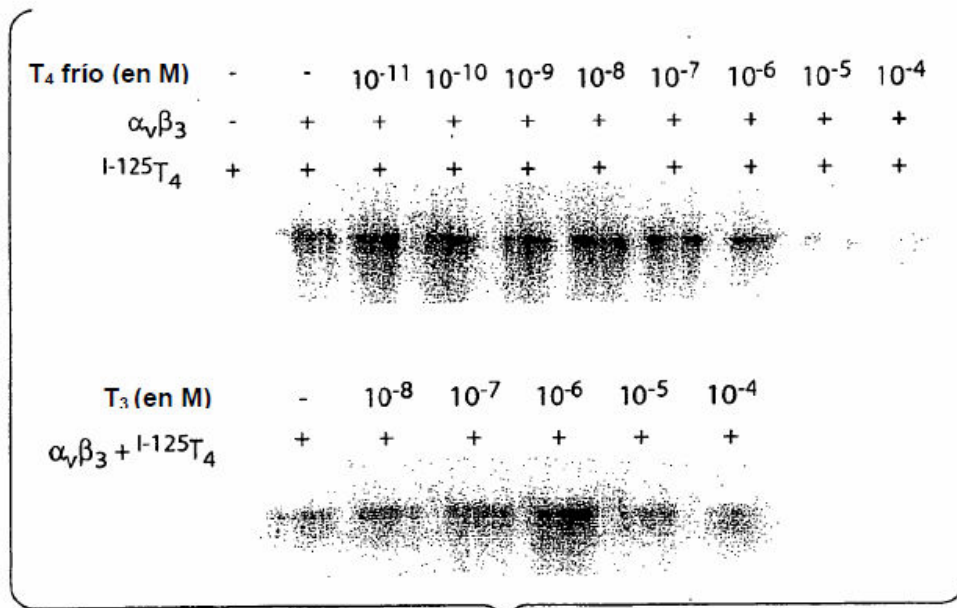


Fig. 11A

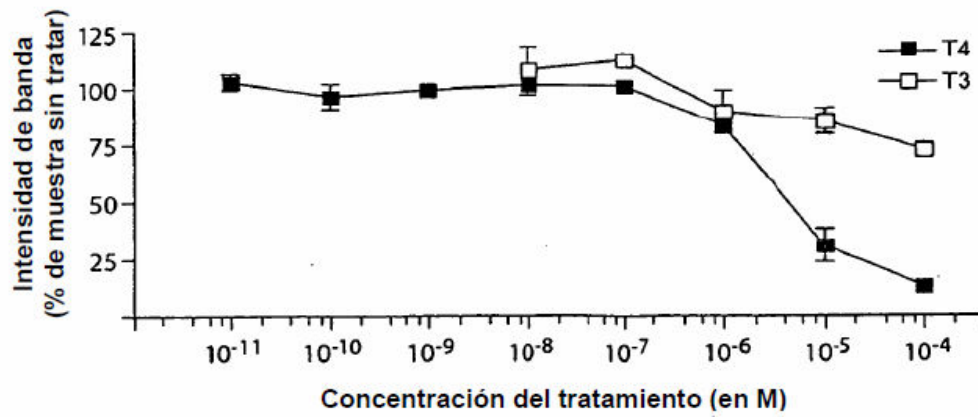


Fig. 11B

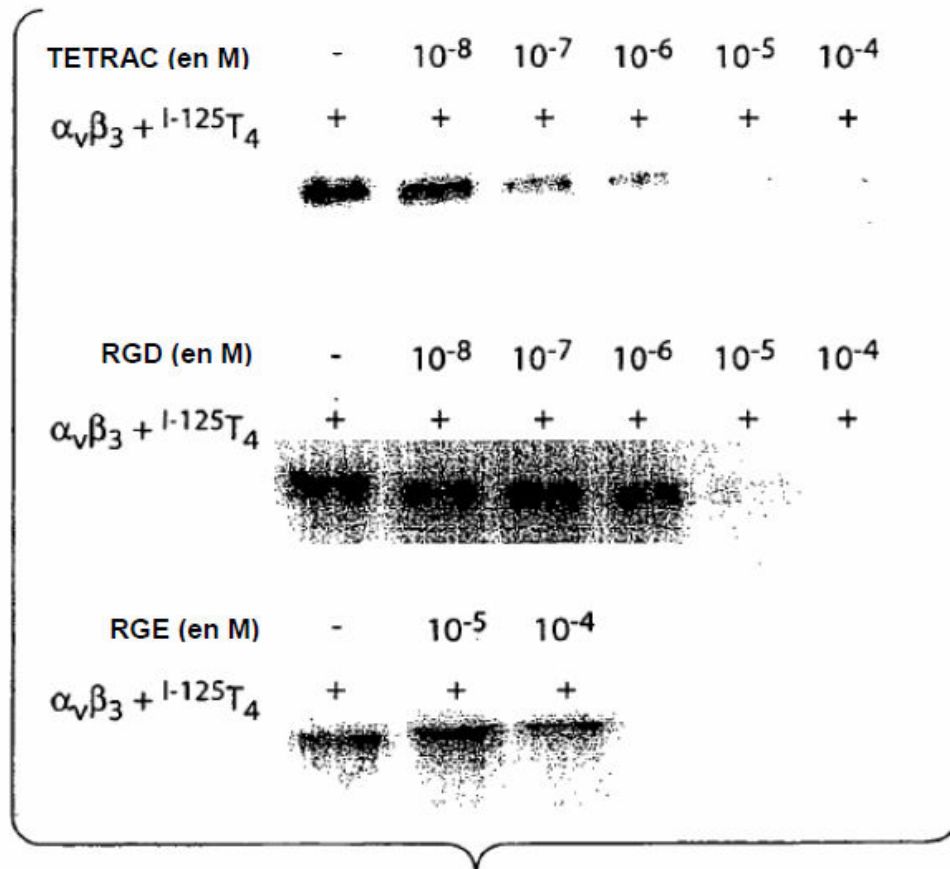


Fig. 12A

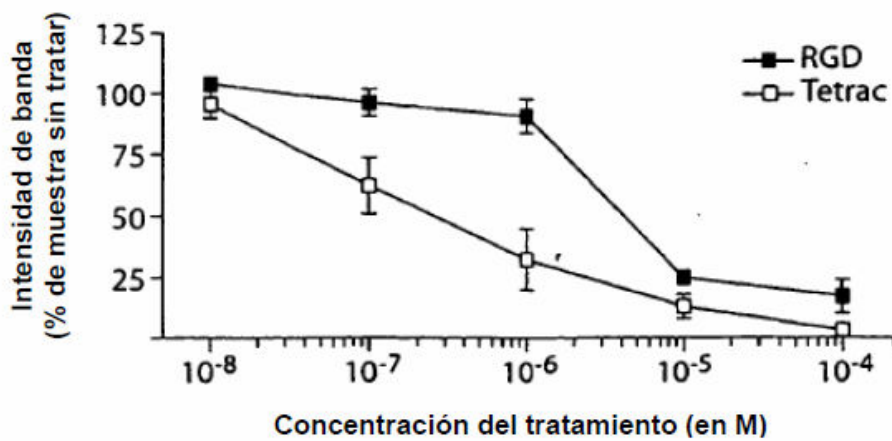


Fig. 12B

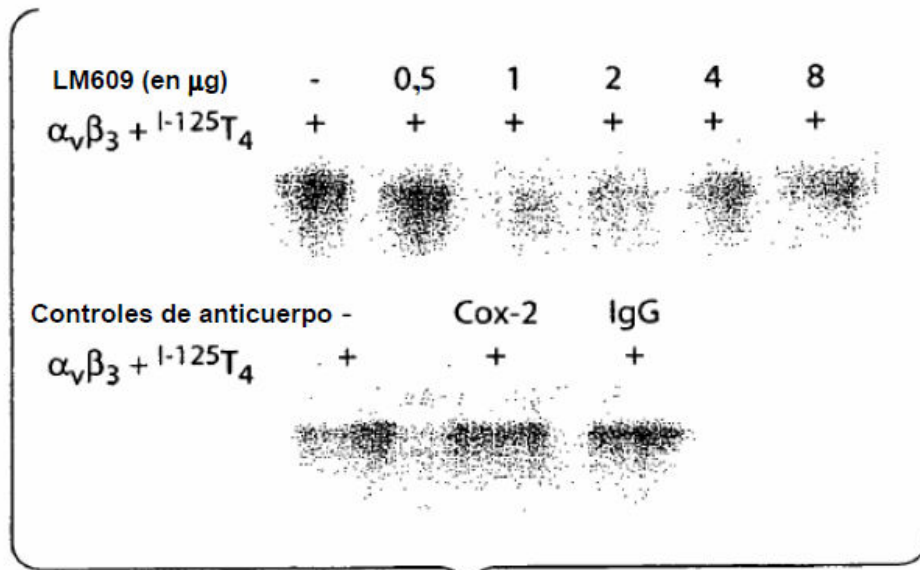


Fig. 13A

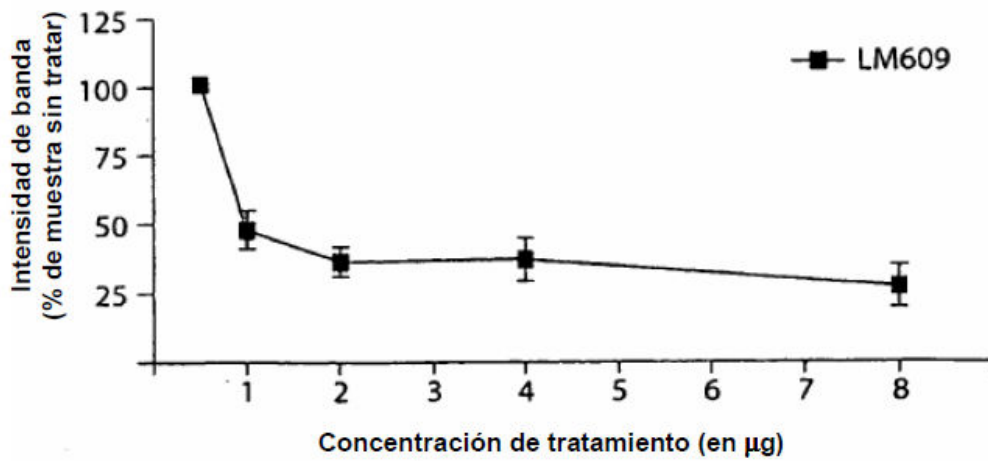


Fig. 13B

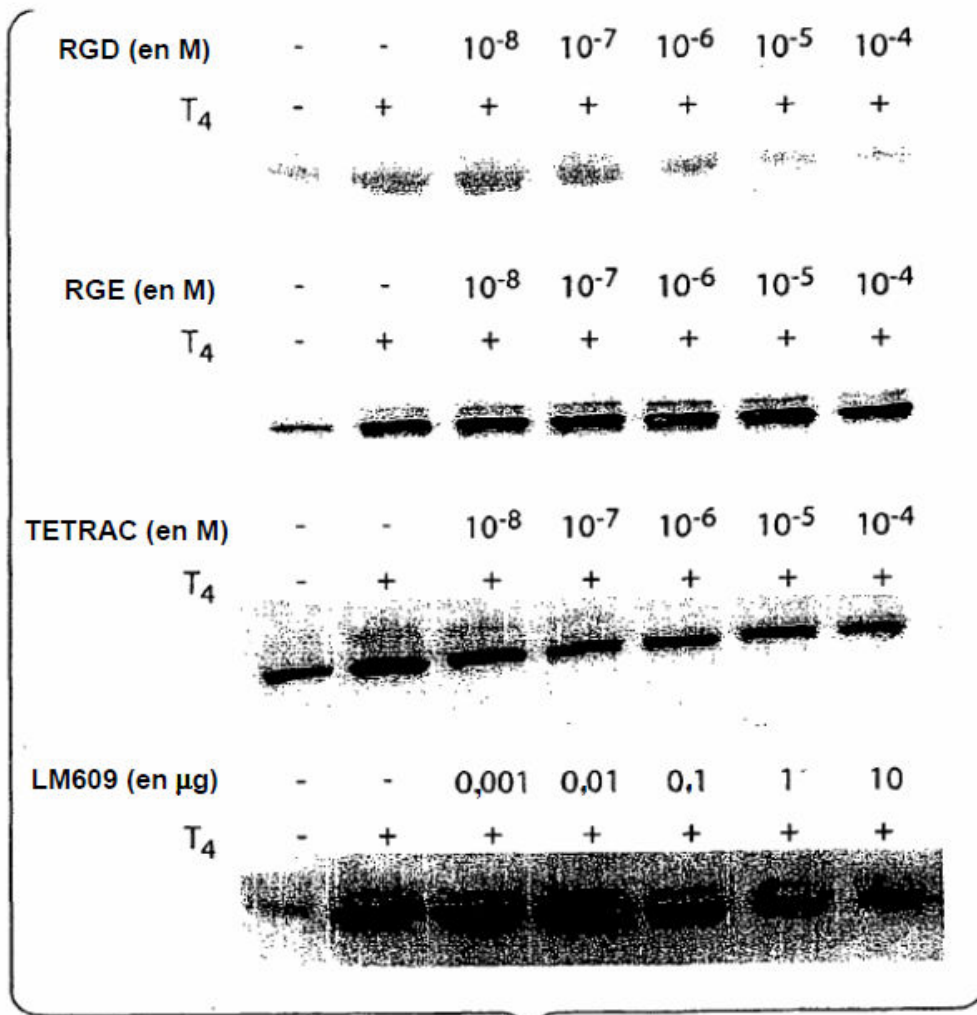


Fig. 14A

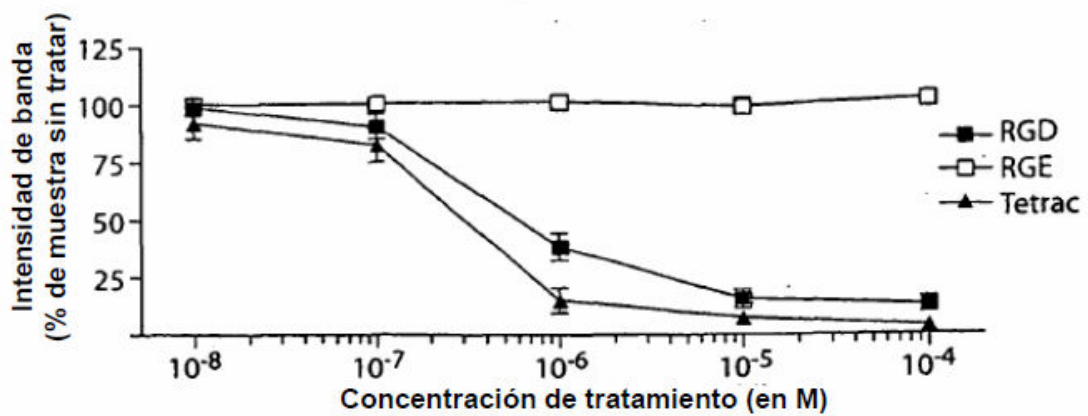


Fig. 14B

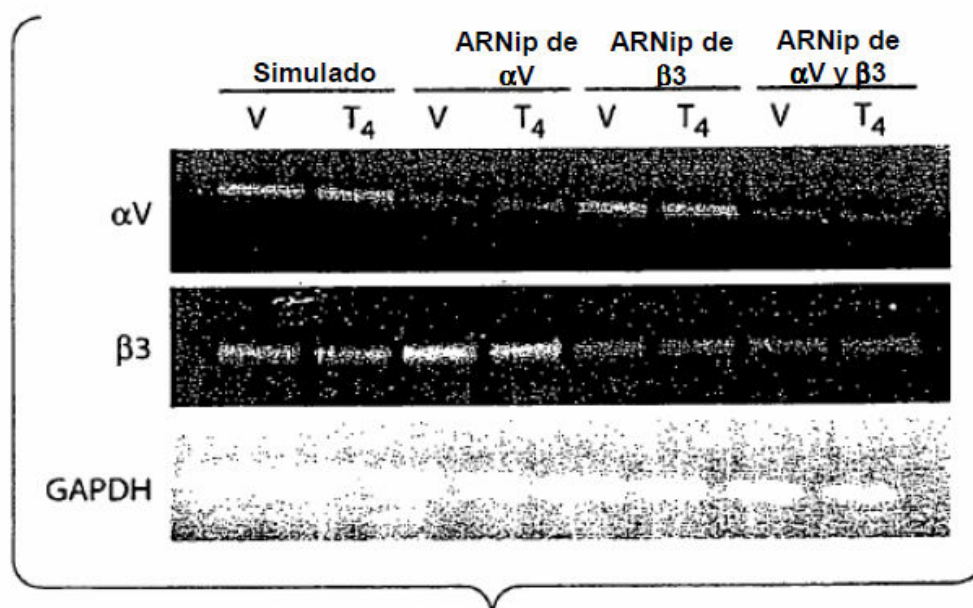


Fig. 15A

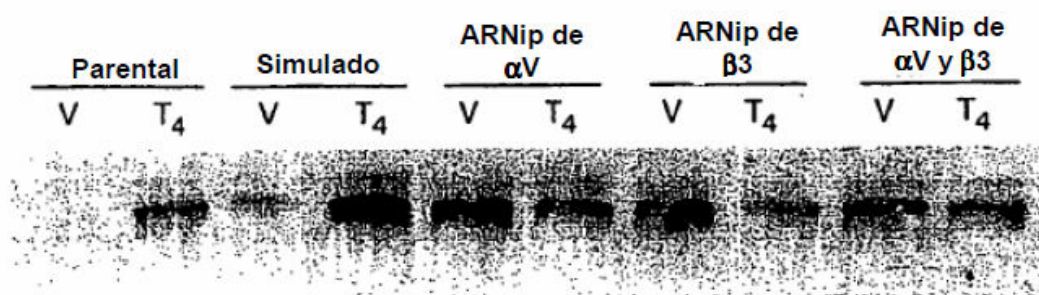


Fig. 15B

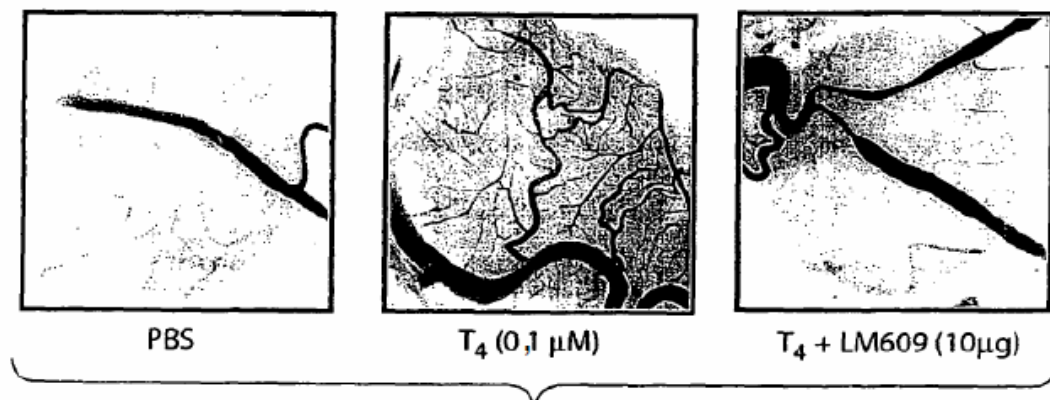


Fig. 16A

Tratamiento de CAM	Nº de ramificaciones ETM	% de inhibición ETM
PBS	73 8	
T_4 (0,1 μ M)	170 16	0
T_4 + LM609 (10 μ g)	109 9	64 9

Fig. 16B

Efecto inhibidor de anticuerpos monoclonales contra $\alpha V\beta 3$ (LM609) y XT 199 sobre la angiogénesis inducida por T_4 en el modelo de CAM

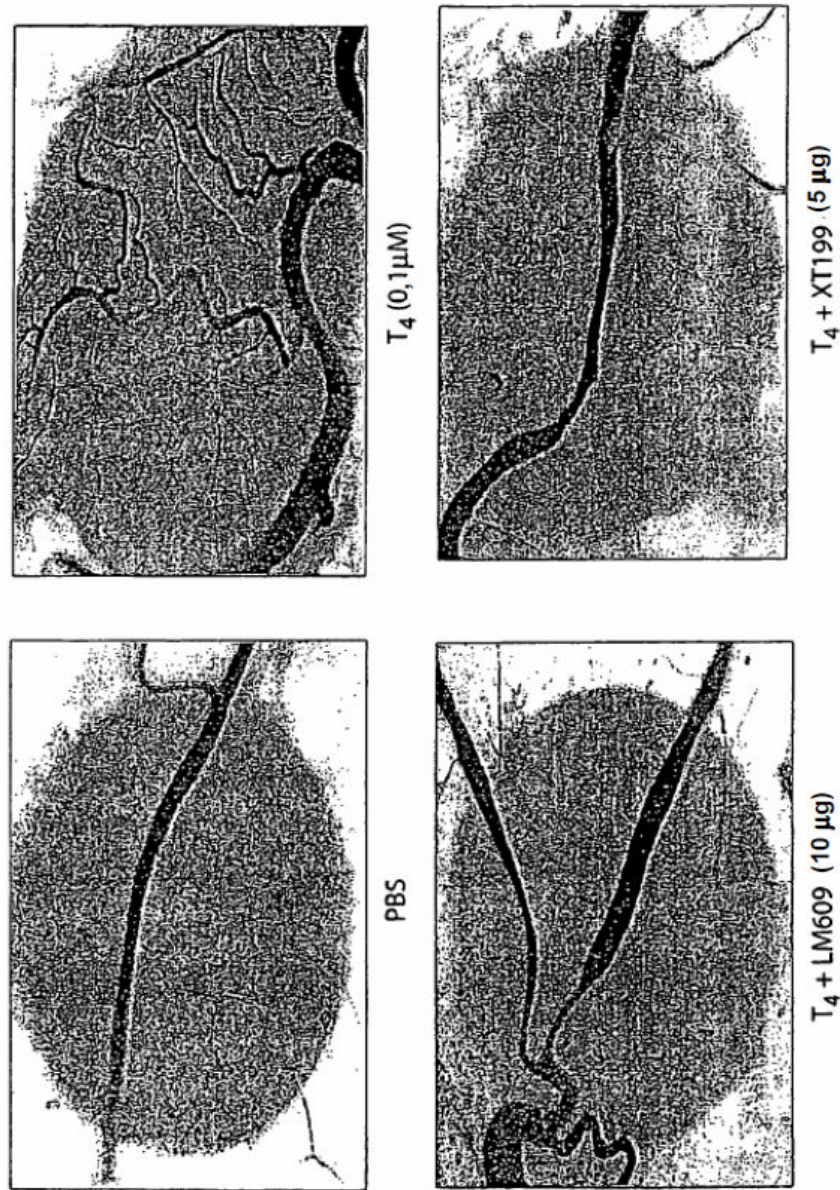
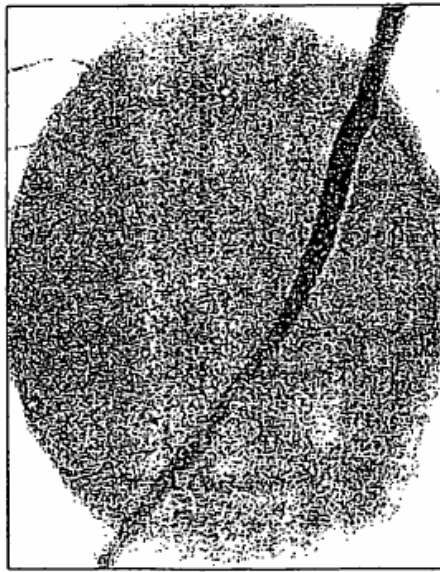
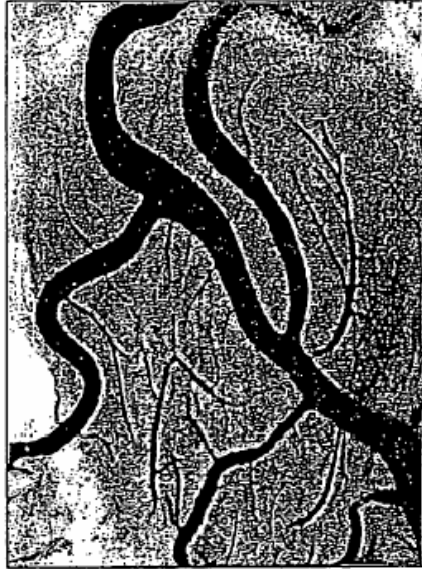


Fig.16C

Efecto inhibidor de antagonistas de la integrina $\alpha V\beta 3$ sobre la angiogenesis inducida por FGF2 en el modelo de CAM



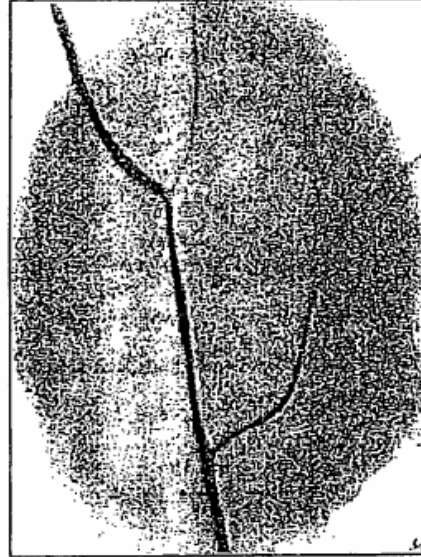
PBS



FGF2 (1 µg)

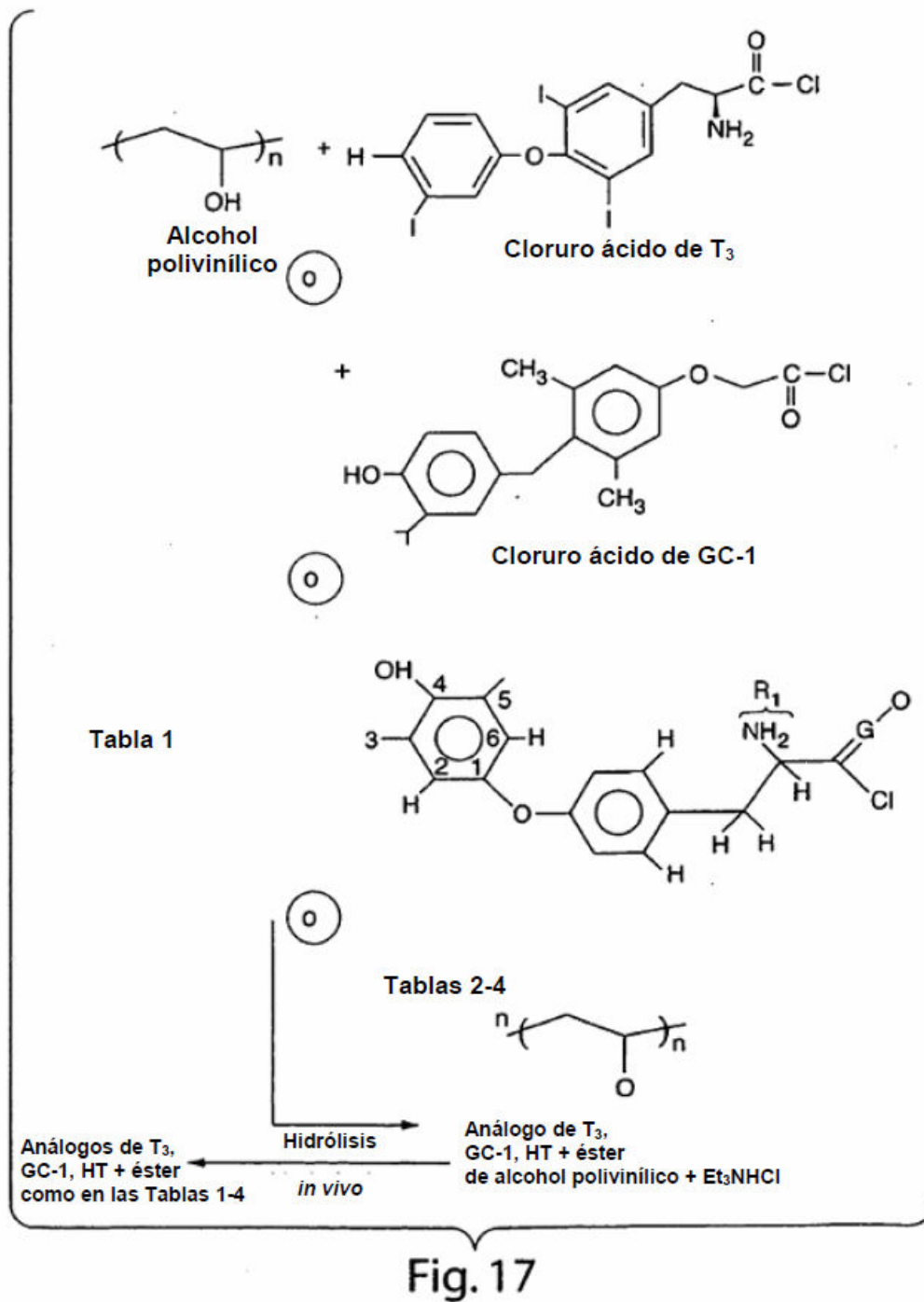


FGF2 + LM609



FGF2 + XT199

Fig.16D



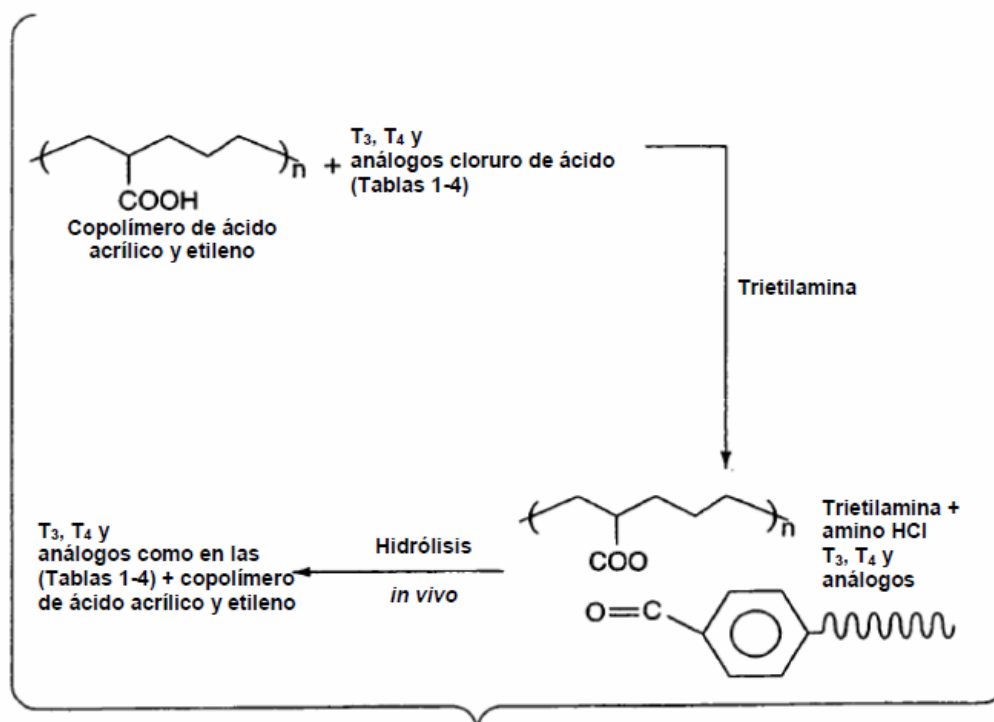


Fig. 18

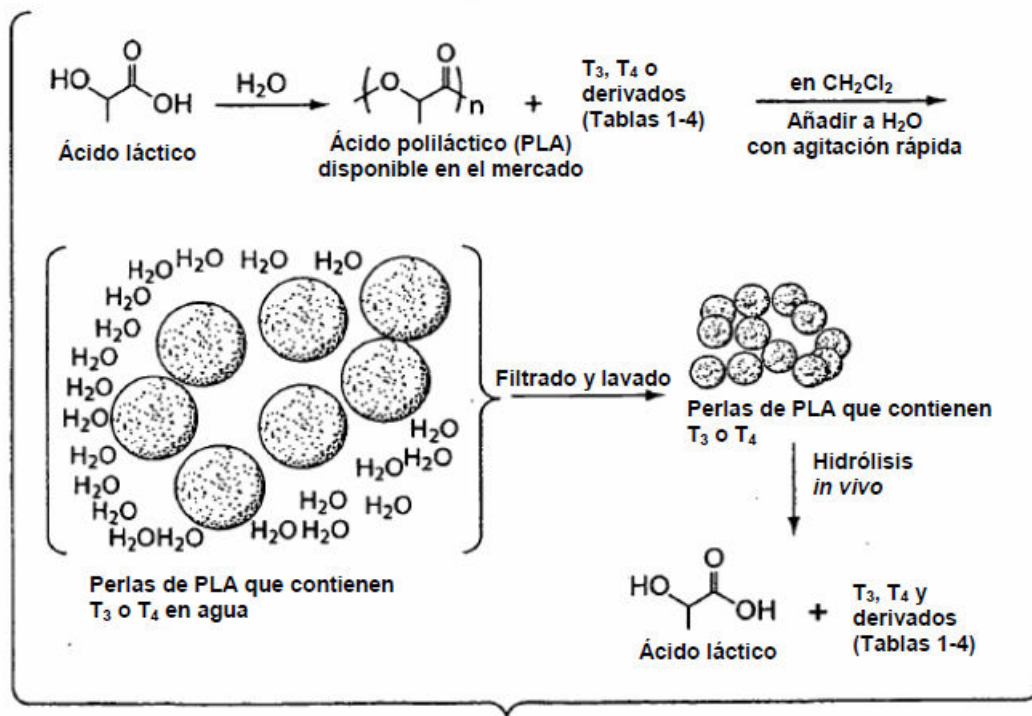
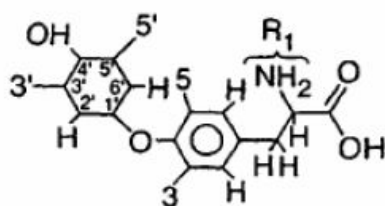


Fig. 19

Tabla A

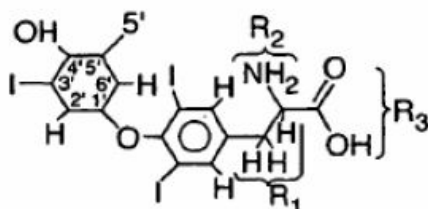


3'	5'	3	5	R ₁	Análogo
I	I	I	I	NH ₂	L-T ₄
I	H	I	I	NH ₂	L-T ₃
I	I	I	H	NH ₂	rT ₃
H	H	I	I	NH ₂	3,5-L-T ₂
I	I	H	H	NH ₂	3',5'-L-T ₂
I	H	I	H	NH ₂	3,3'-L-T ₂
I	H	H	H	NH ₂	3'-L-T ₃
Br	Br	Br	Br	NH ₂	3,5,3'-tetra-bromo-L-tironina
H	H	Br	Br	NH ₂	3,5,3'-tetra-dibromo-L-tironina
Isop ^a	H	Me ^b	Me	NH ₂	DIMIT
Isop	H	Me	Me	NH-COCH ₃	N-acetil-DIMIT

^a Isop, isopropilo^b Me, metilo

Fig. 20A

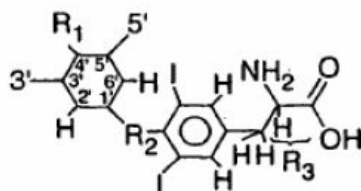
Tabla B



R ₁	R ₂	R ₃	5'	Análogo
CH ₂ CH	H	CO ₂ H	I	Ácido 3,5,3',5'-tetrayodo-tiropropiónico
CH ₂	H	CO ₂ H	I	Ácido 3,5,3',5'-tetrayodo-tiroacético
CH ₂	H	CO ₂ H	H	Ácido 3,5,3'-triyodotiroacético
CH ₂ CH	NH ₂	COC ₂ H ₅	I	L-T ₄ -etiléster
CH ₂ CH	NH ₂	H	H	3,5,3'-triyodotironamina

Fig. 20B

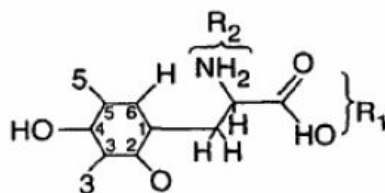
Tabla C



R_1	R_2	R_3	3'	5'	3	5	Análogo
H	O	L	H	H	I	I	4-desoxi-T ₂
OH	S	L	I	H	I	I	T ₃ unido a S
OH	O	D	I	I	I	I	D-T ₄
OH	O	D	I	H	I	I	D-T ₃

Fig. 20C

Tabla D



3	5	R_1	R_3	Análogo
I	I	COOH	NH ₂	3,5-diiodo-L-tirosina
Br	Br	COOH	NH ₂	3,5-dibromo-L-tirosina
Me	Me	COOH	NH ₂	3,5-dimetil-D,L-tirosina
NO ₂	NO ₂	COOH	NH ₂	3,5-dinitro-L-tirosina
I	H	COOH	NH ₂	3-yodo-L-tirosina
NO ₂	H	COOH	NH ₂	3-nitro-L-tirosina
H	H	COOH	NH ₂	L-tirosina
I	I	H	NH ₂	3,5-diiodotiramina
H	H	H	NH ₂	tiramina
I	I	COOH	H	ácido 3-(3,5-diiodo-4-hidroxifenil)propiónico
H	H	COOH	H	ácido 3-(p-hidroxifenil)propiónico

Fig. 20D

Ensayo de angiogenesis tridimensional *in vitro*

Etapa I: cultivo de HDMEC en perlas de microvehículo (perlas de EC)

Etapa II: cultivo de perlas de EC en gel de ECM tridimensional $\pm$ factor angiogénico

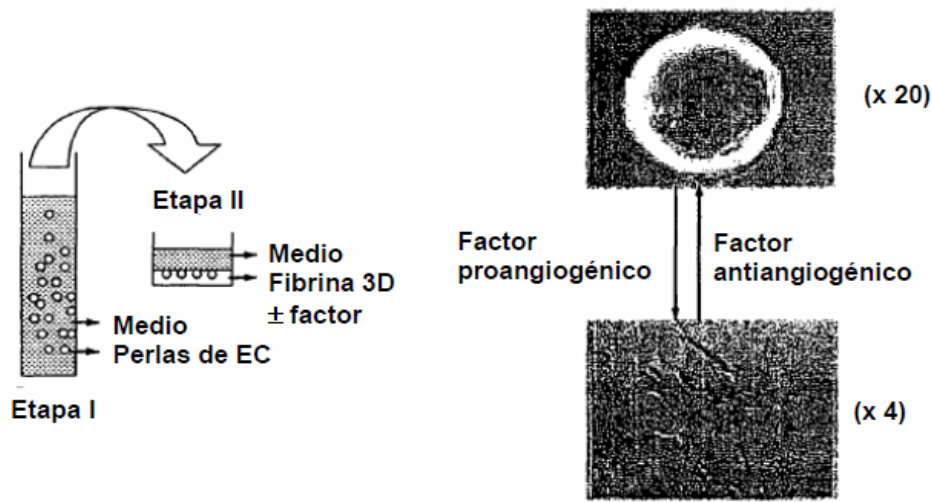


Fig. 21

Angiogénesis de crecimiento *in vitro* de HDMEC en fibrina tridimensional

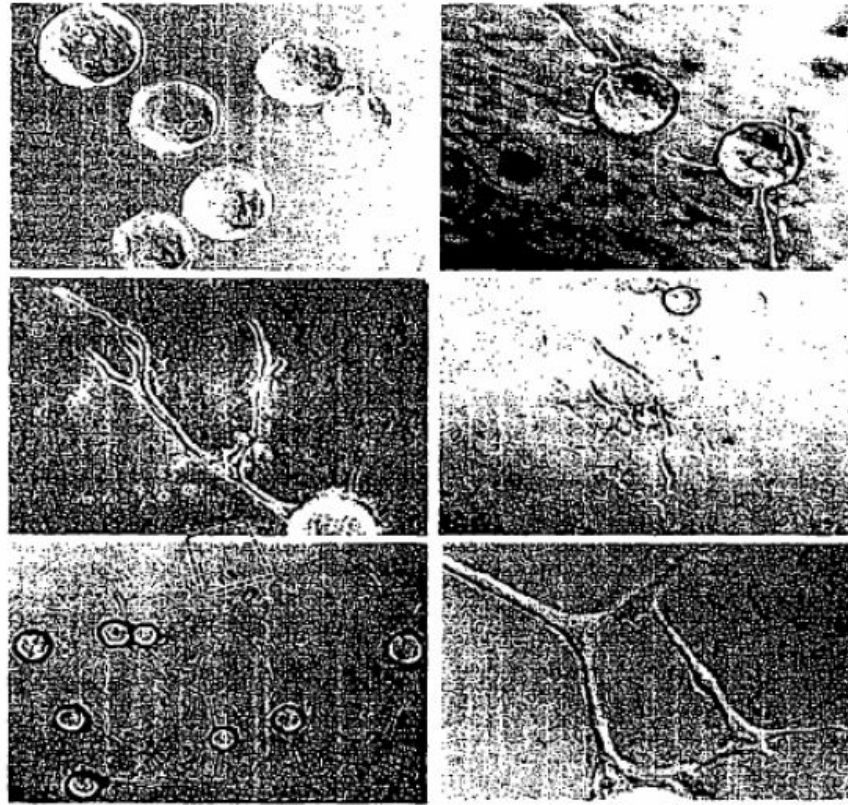


Fig. 22

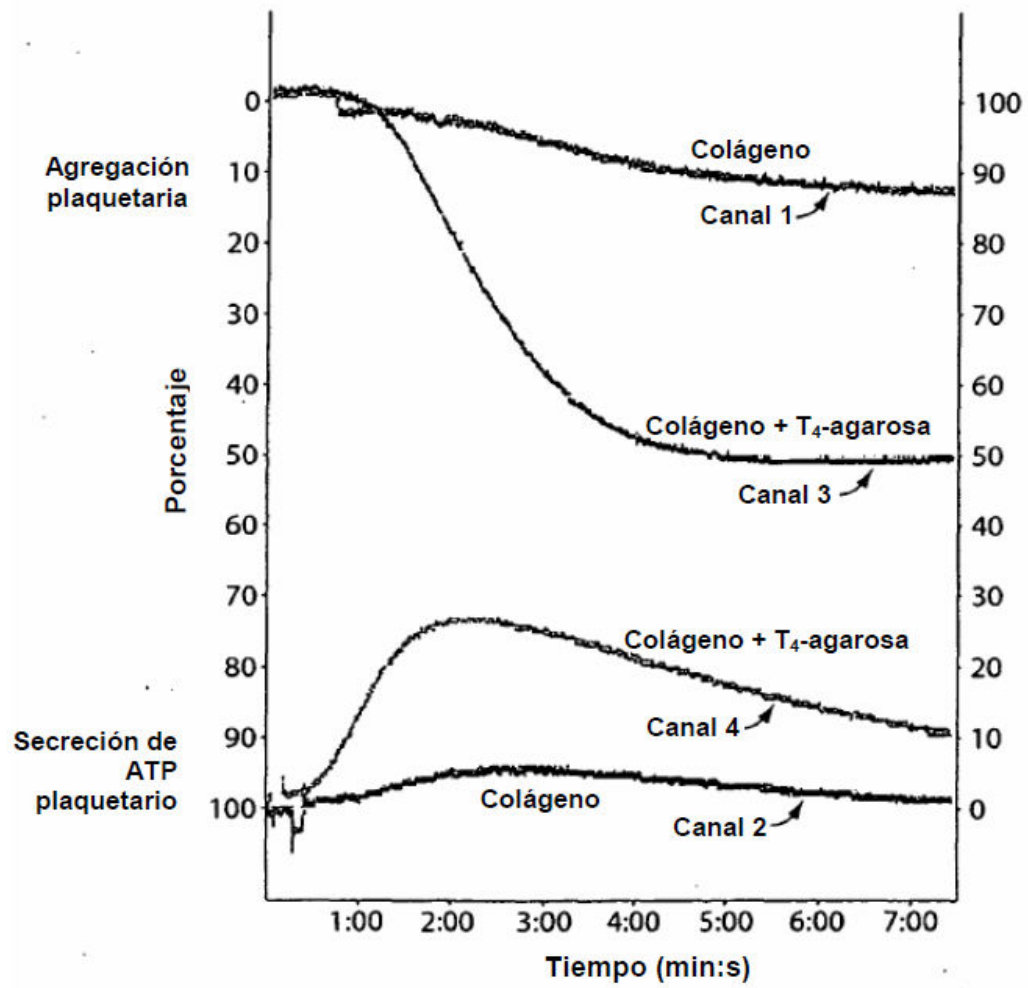


Fig. 23A

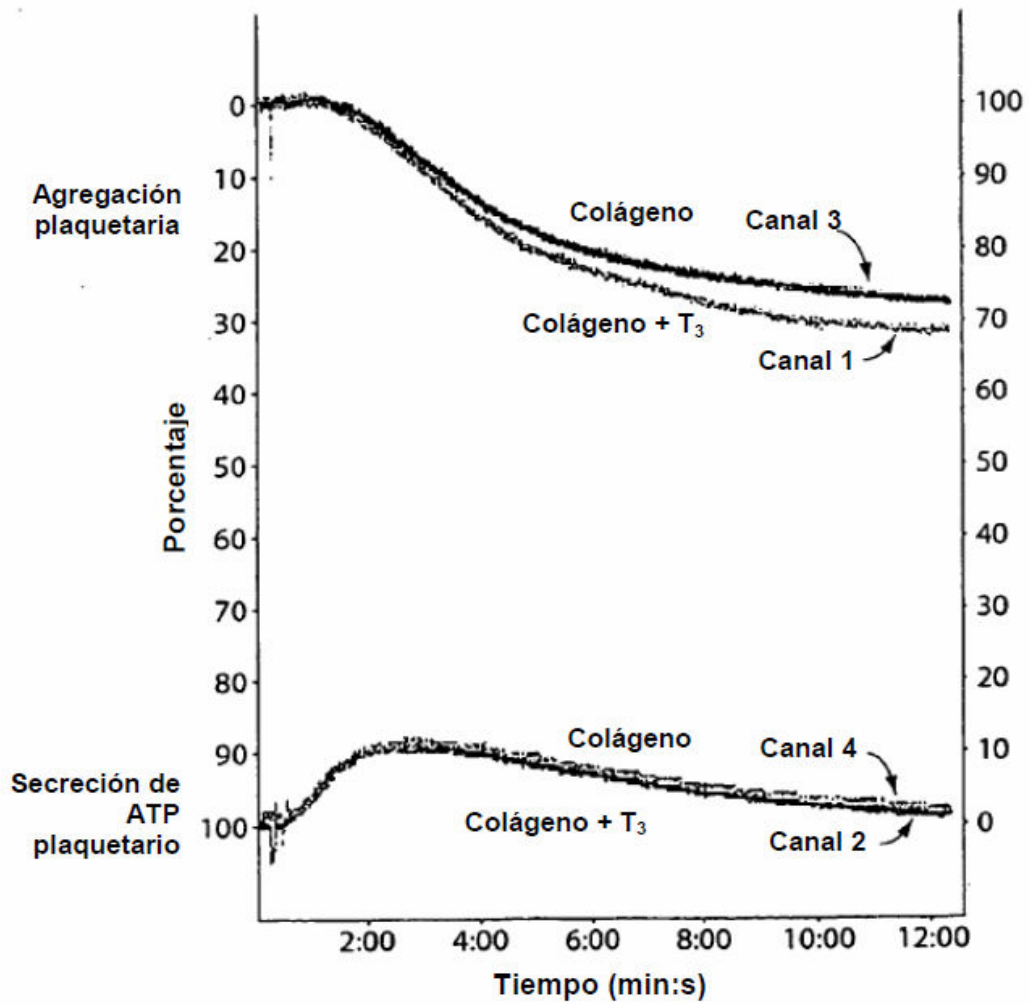


Fig. 23B

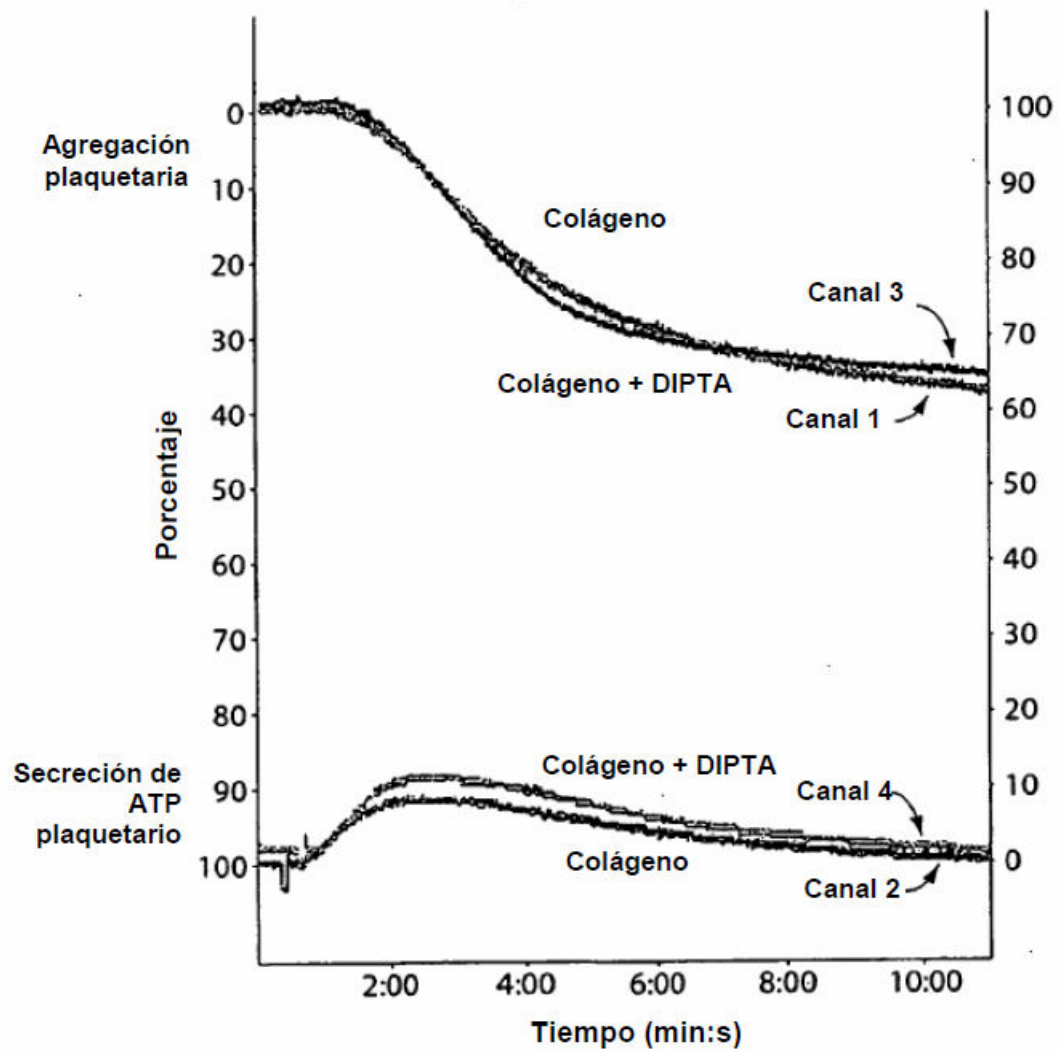


Fig. 23C

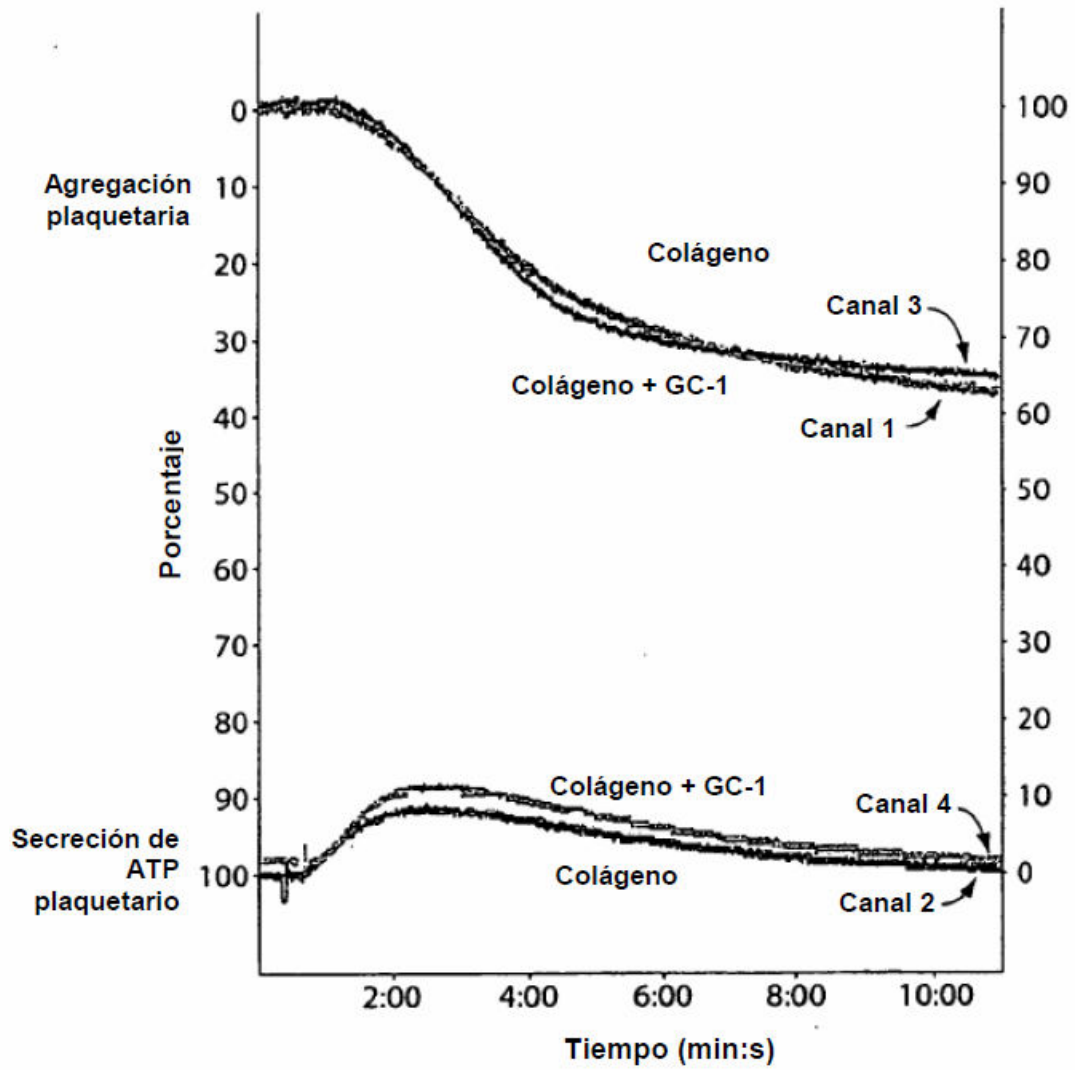


Fig. 23D

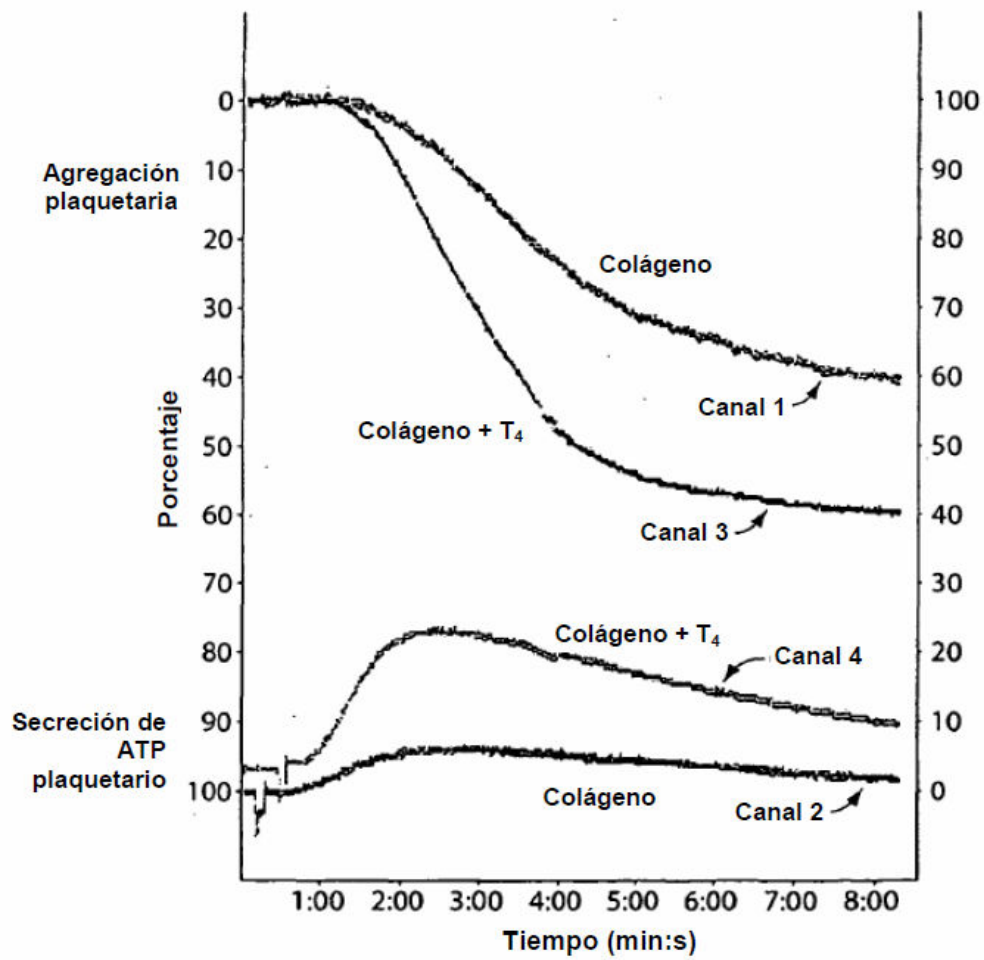


Fig. 23E

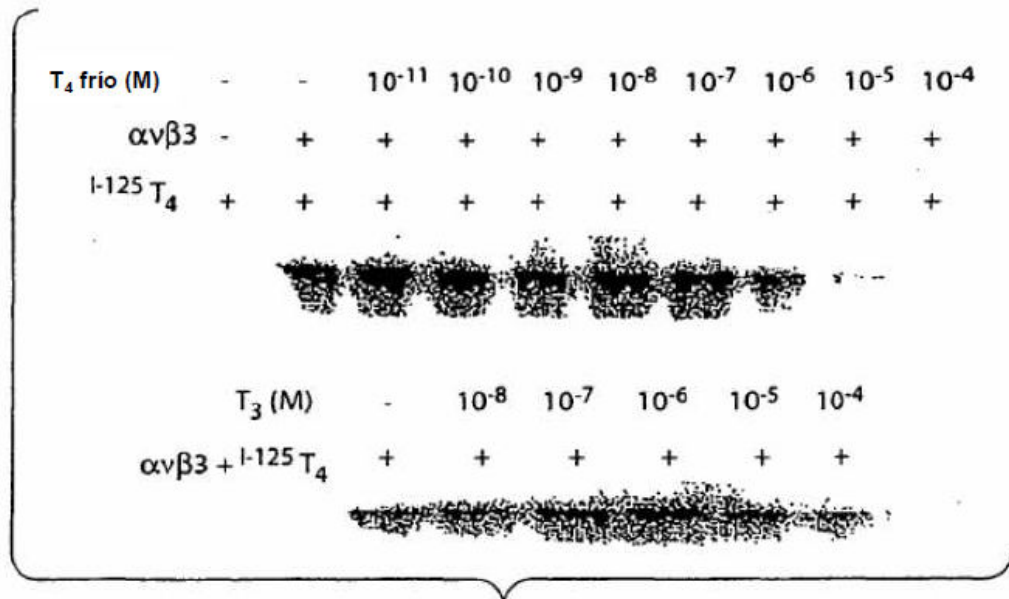


Fig. 24A

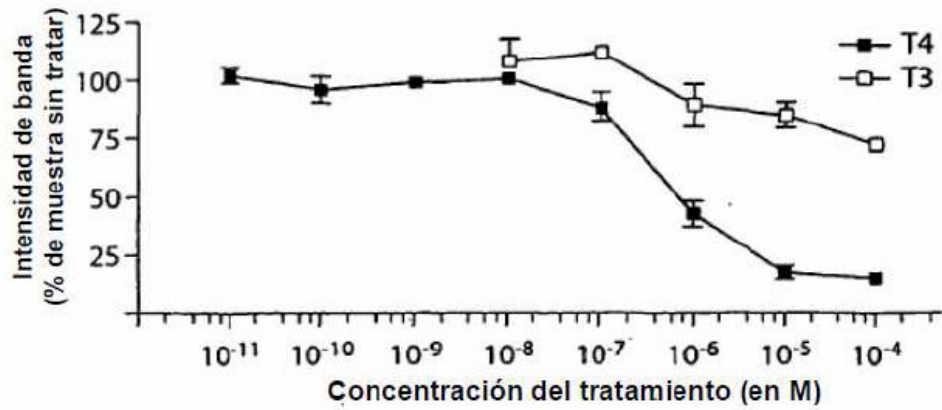


Fig. 24B

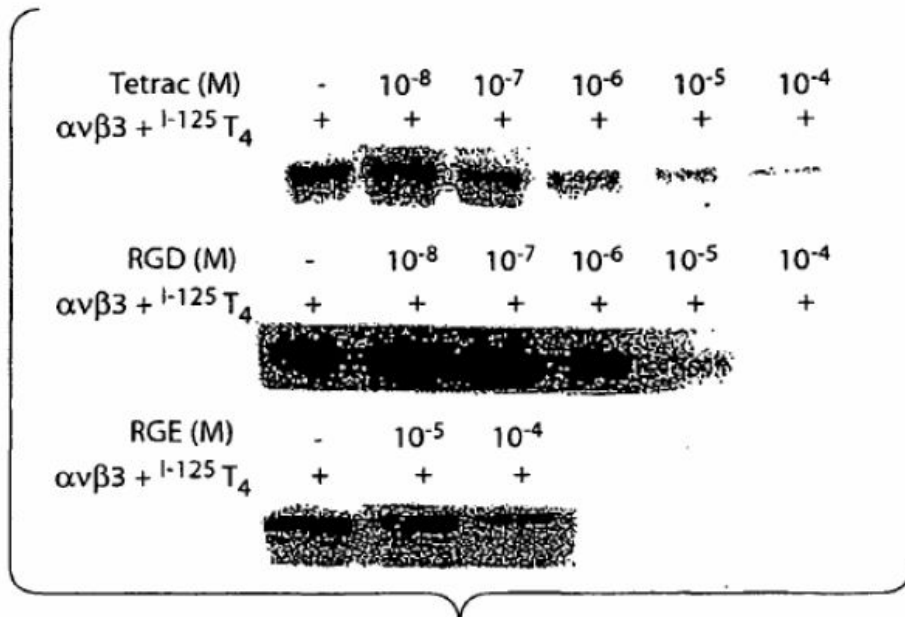


Fig. 25A

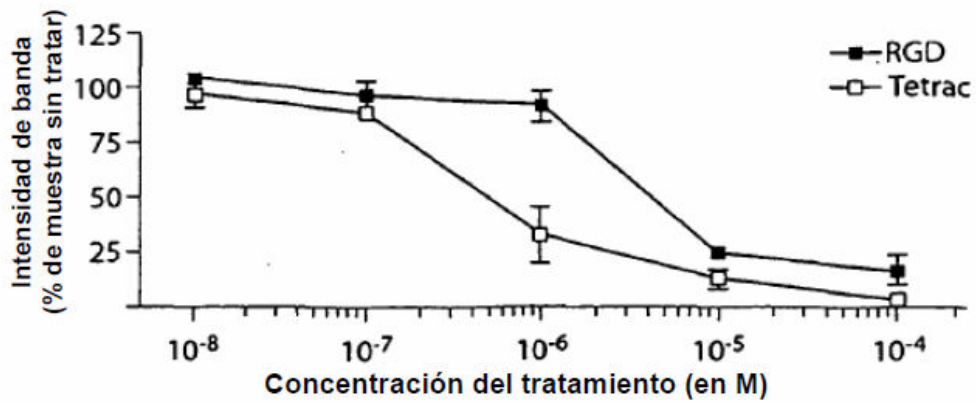


Fig. 25B

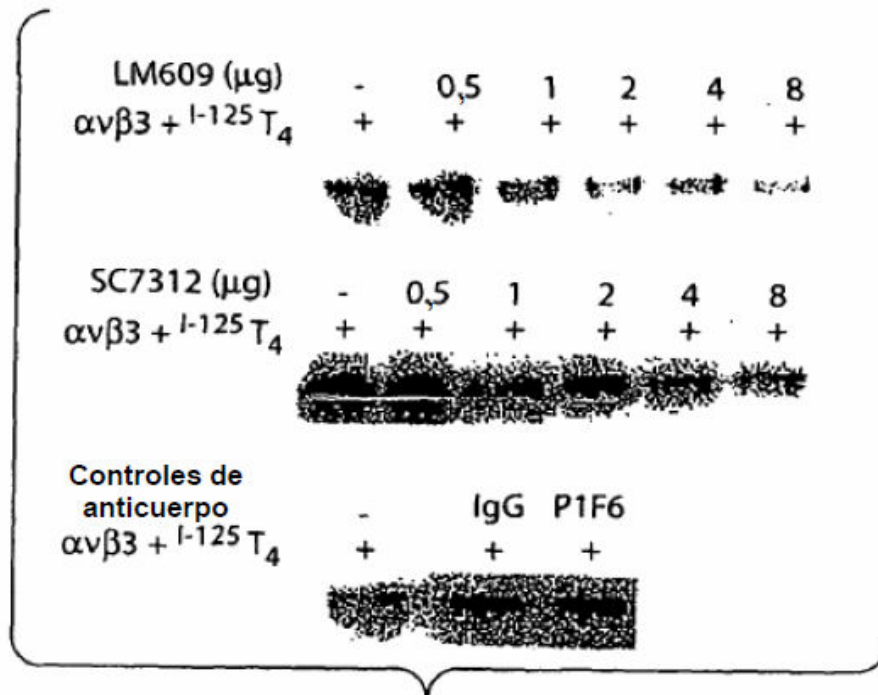


Fig. 26A

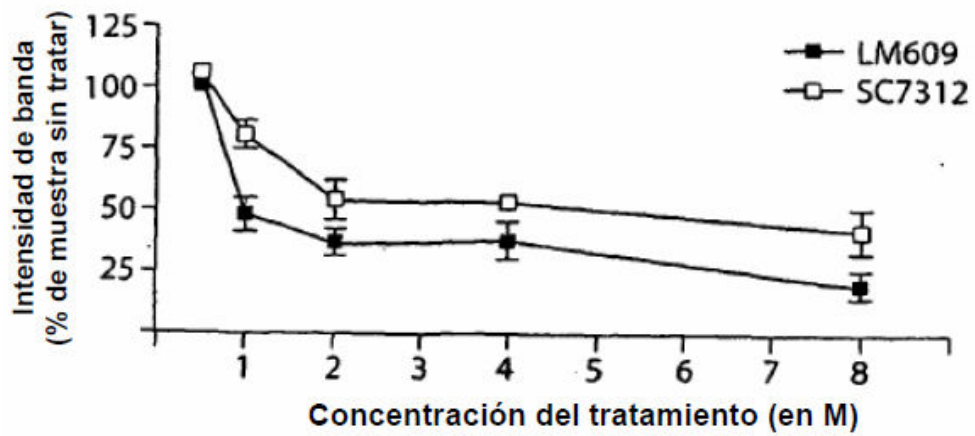


Fig. 26B

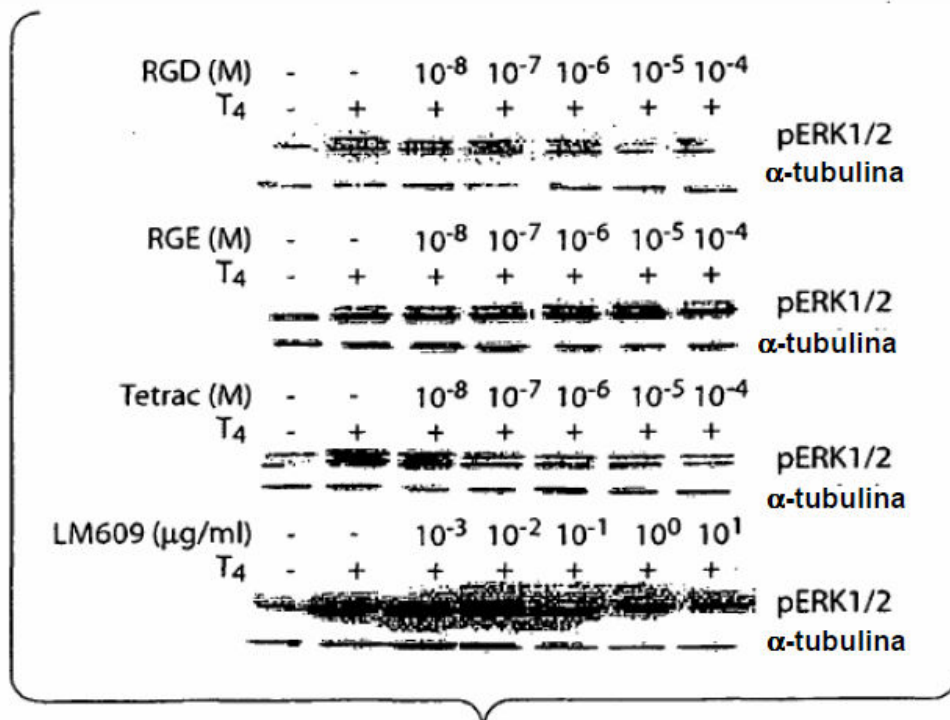


Fig.27A

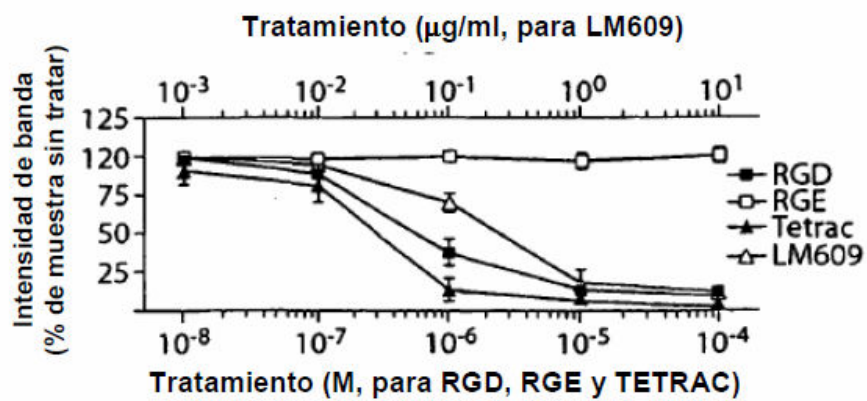


Fig.27B

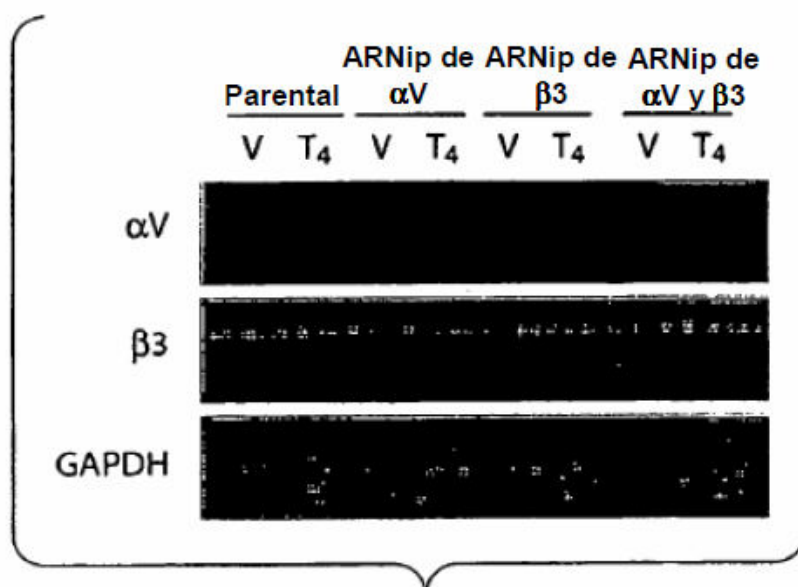


Fig. 28A

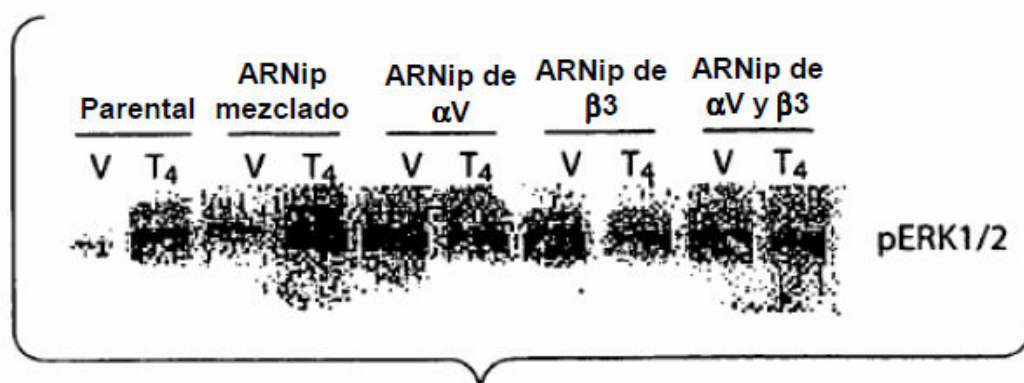


Fig. 28B

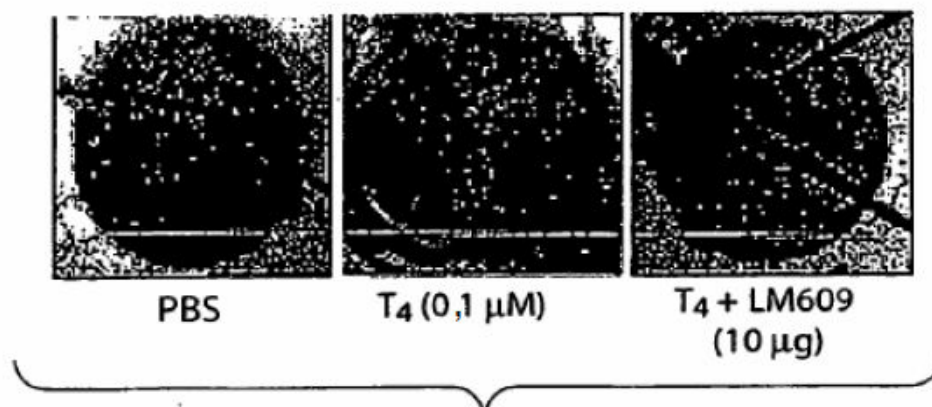


Fig. 29A

Tratamiento de CAM	Nº de ramificaciones ± ETM	% de inhibición ± ETM
PBS	73 ± 8	-
T ₄ (0,1 μM)	170 ± 16	0
T ₄ + LM609 (10 μg)	109 ± 9	64 ± 9***

Fig. 29B

Potencial Zeta

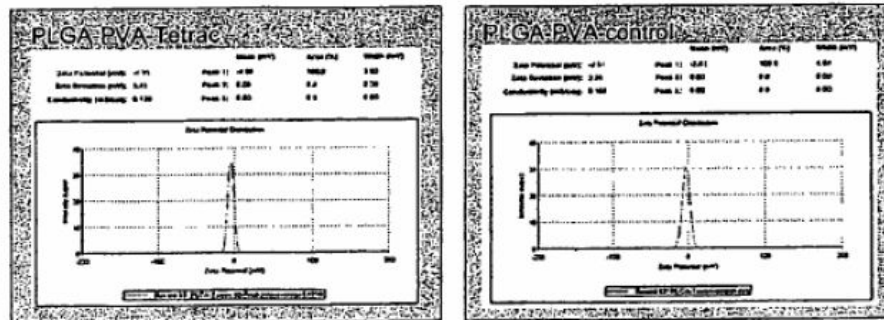


Figura 30 A

Determinación de tamaño por DLS

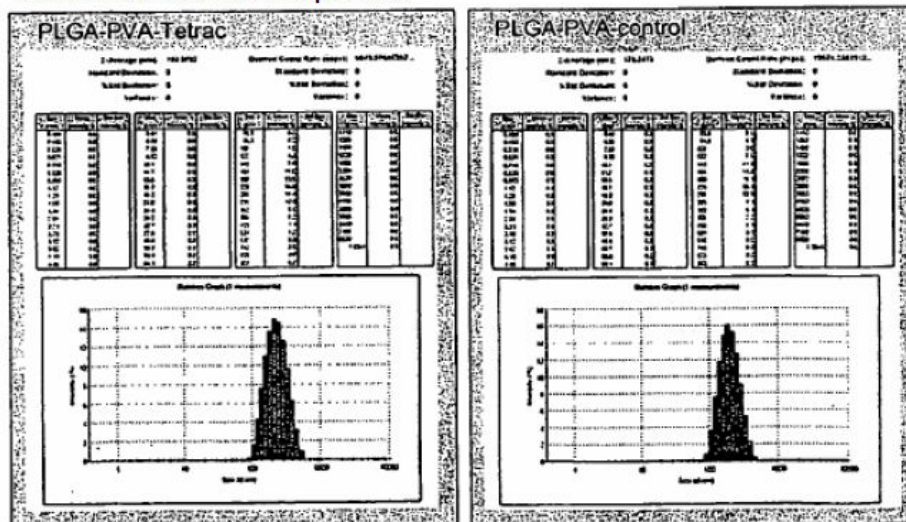
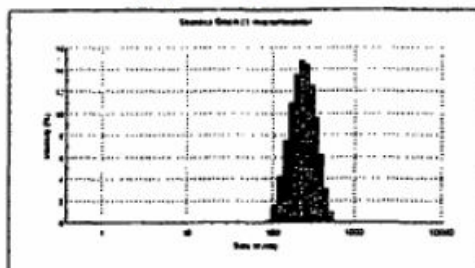


Figura 30 B

Informe de estadísticas de tamaño por intensidad

Z-Tamaño (nm): 193,5892



Informe de potencial Zeta

	Medida (mV)	Área (%)	Medida (mV)
Punto 1: -0.95	100.0	100.0	
Punto 2: 0.00	0.0	0.0	
Punto 3: 0.00	0.0	0.0	

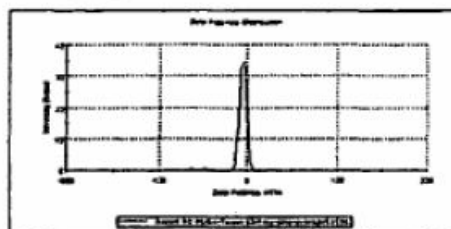


Figura 31 A- B

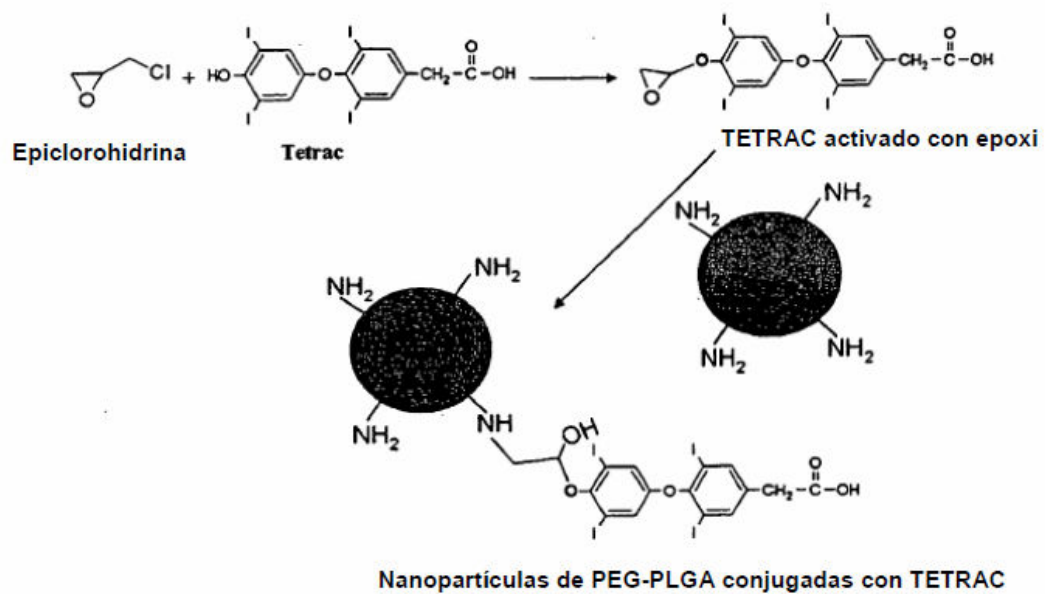


Figura 32

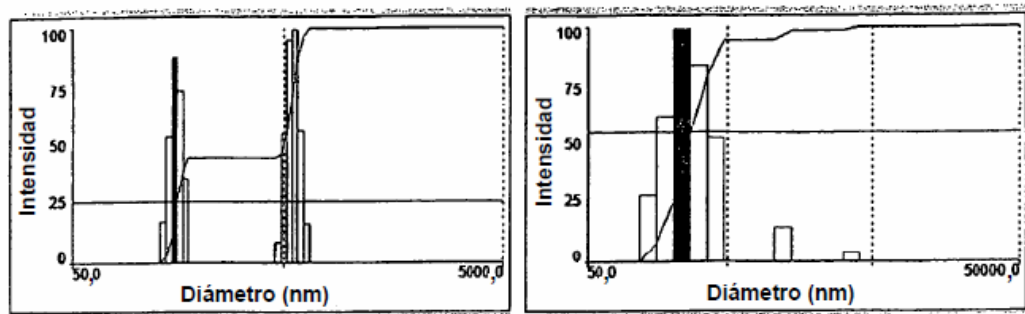


Figura 33

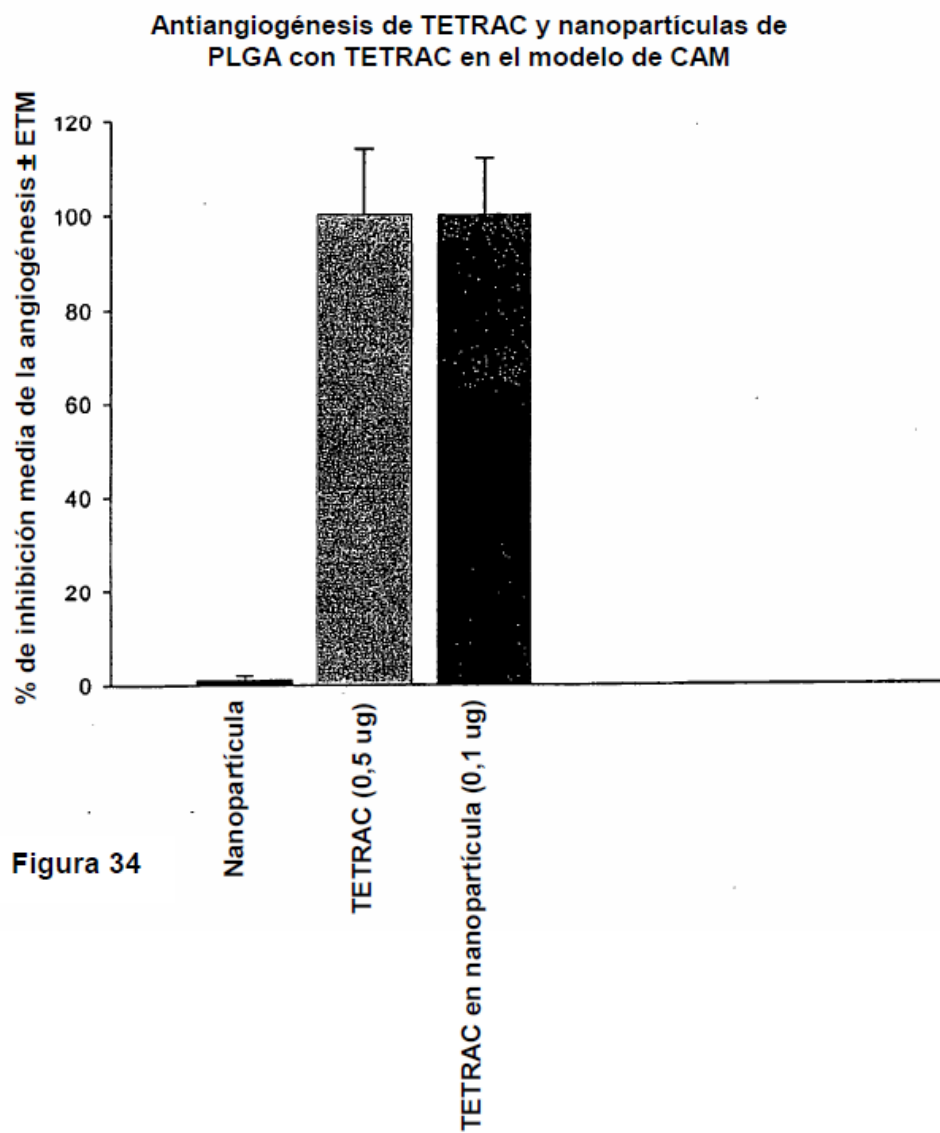


Figura 34

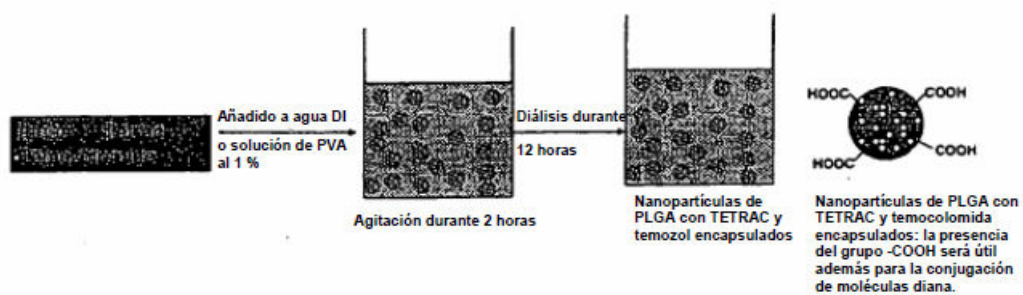


Figura 35

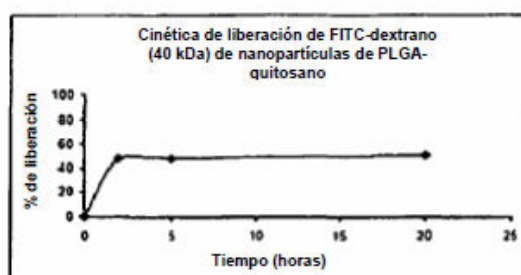
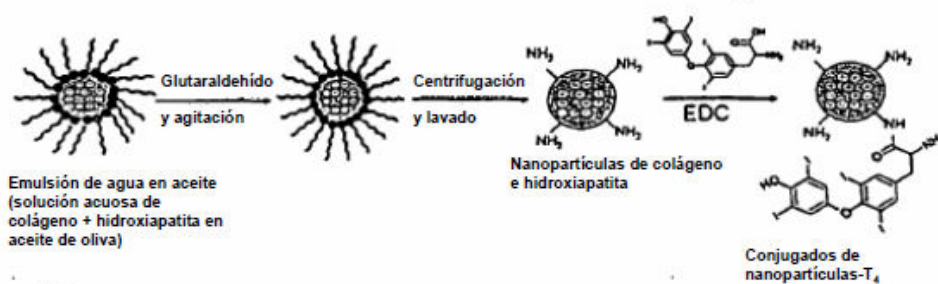


Figura 36A y B

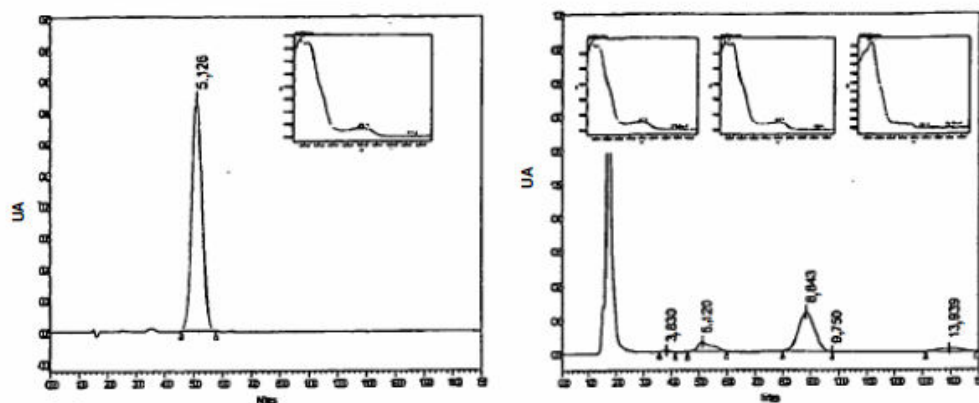


Figura 37A y B

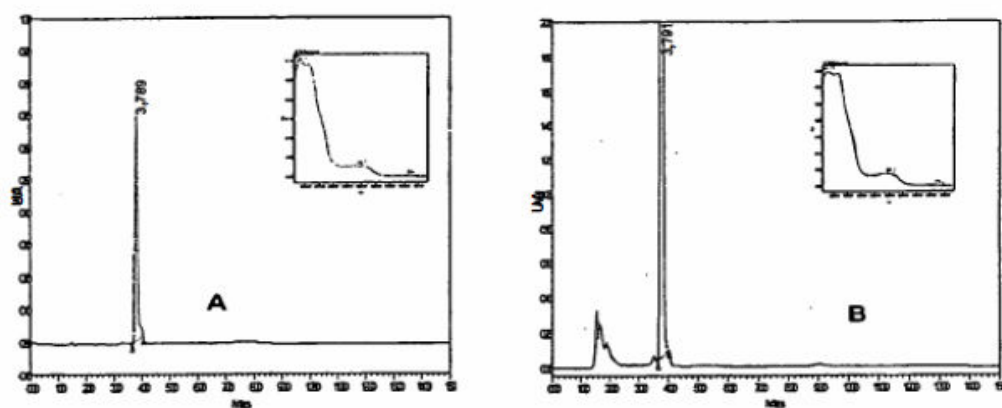


Figura 38A y B

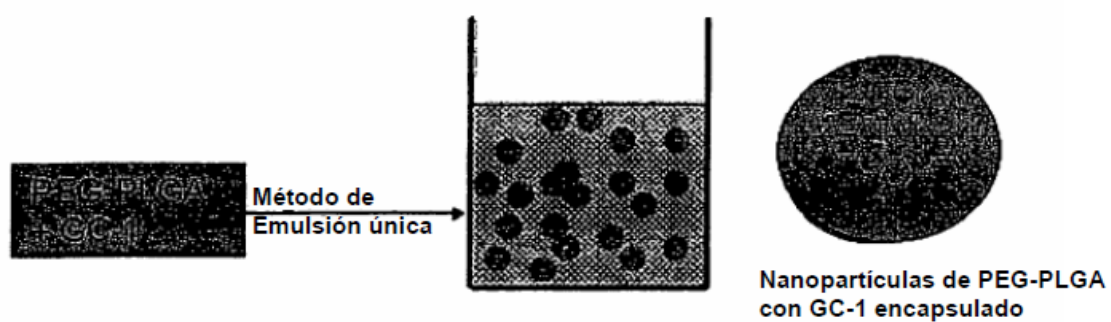


Figura 39

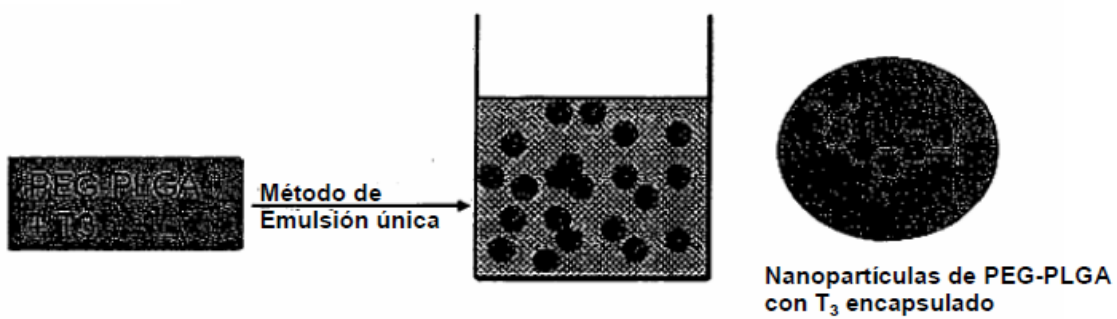


Figura 40

Resultados

		Diam. (nm)	% intensidad	Ancho (nm)
Z medio (d.nm):	209	Pico 1: 231	100,0	71,1
Pd: 0,998		Pico 2: 0,00	0,0	0,00
Intercept: 0,958		Pico 3: 0,00	0,0	0,00

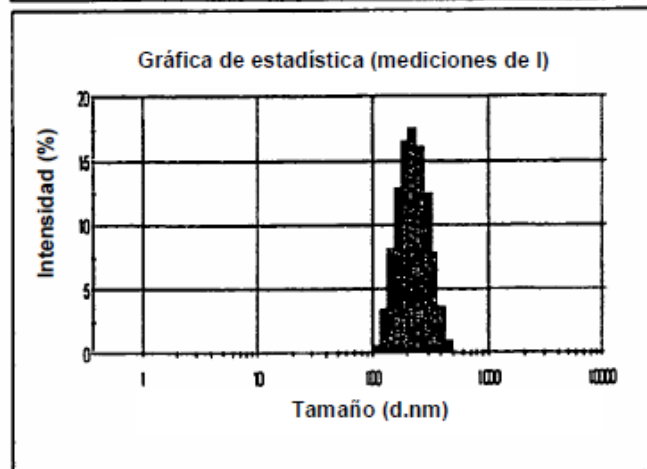
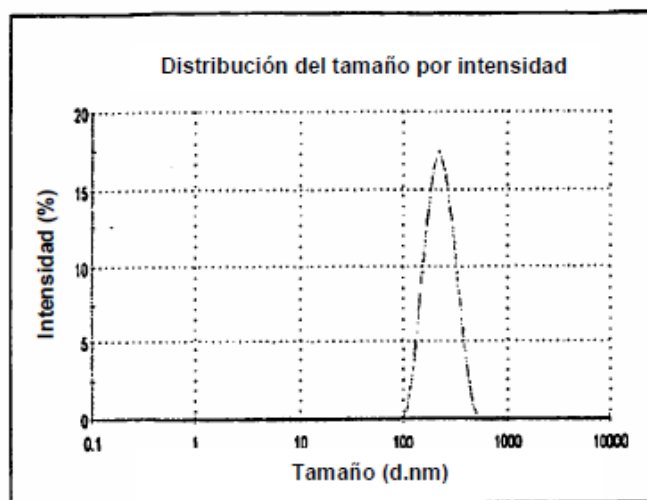
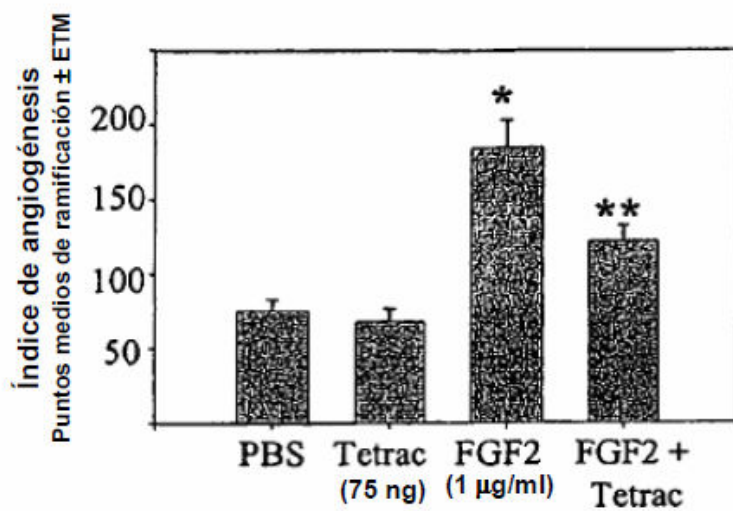


Figura 41A-B



Tratamiento	Pto. ramificación $\pm$ ETM	% de inhibición $\pm$ ETM
PBS	75,6 $\pm$ 7,3	
Tetrac (75 ng)	68,2 $\pm$ 8,5	
FGF2 (1 μ g/ml)	184,6 $\pm$ 18,5	
FGF2 (1 μ g/ml) + Tetrac (75 ng)	122,2 $\pm$ 10,3	57,3 $\pm$ 9,4

Figura 42

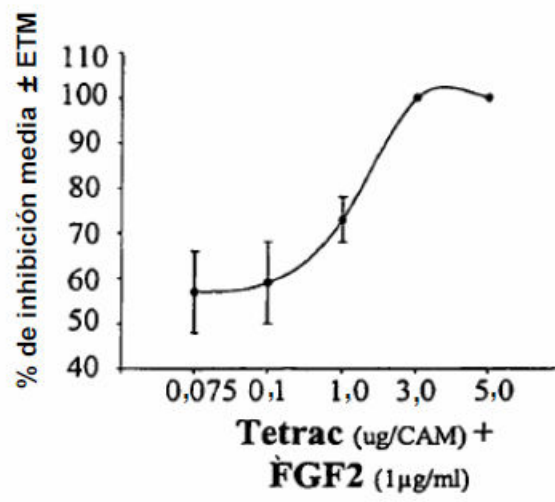


Figura 43

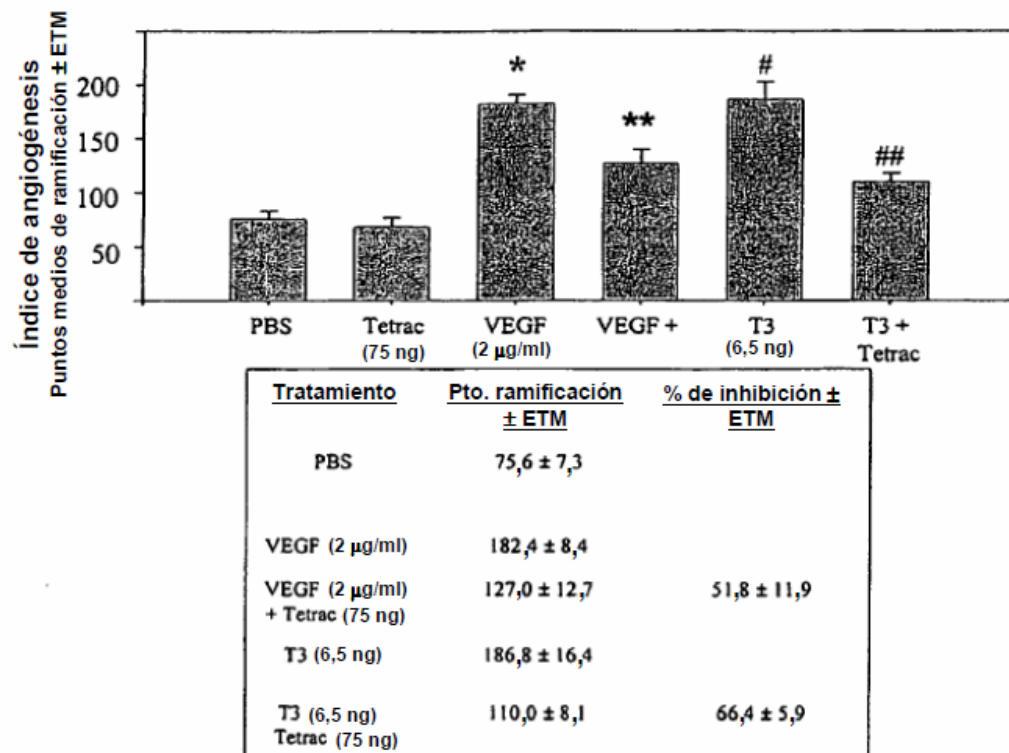


Figura 44

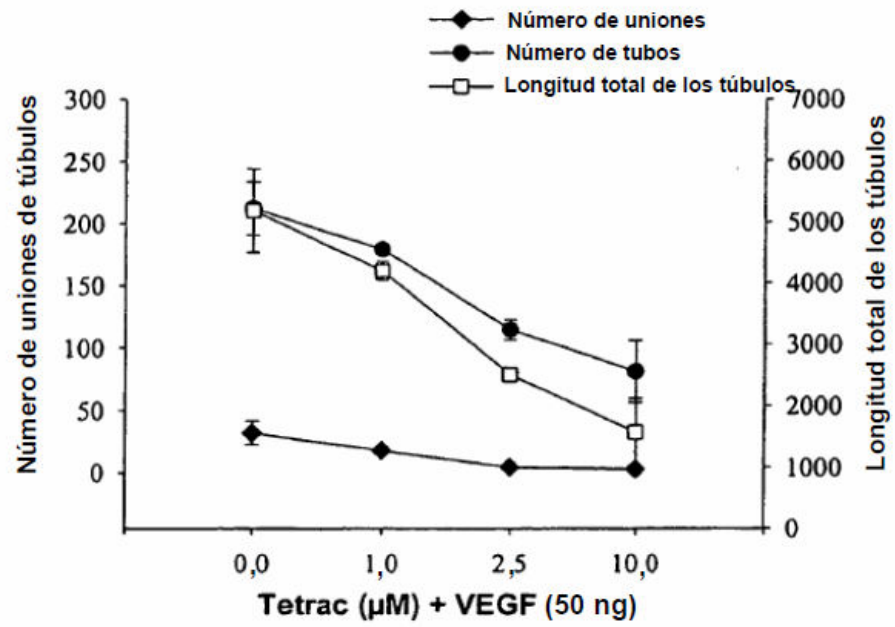


Figura 45

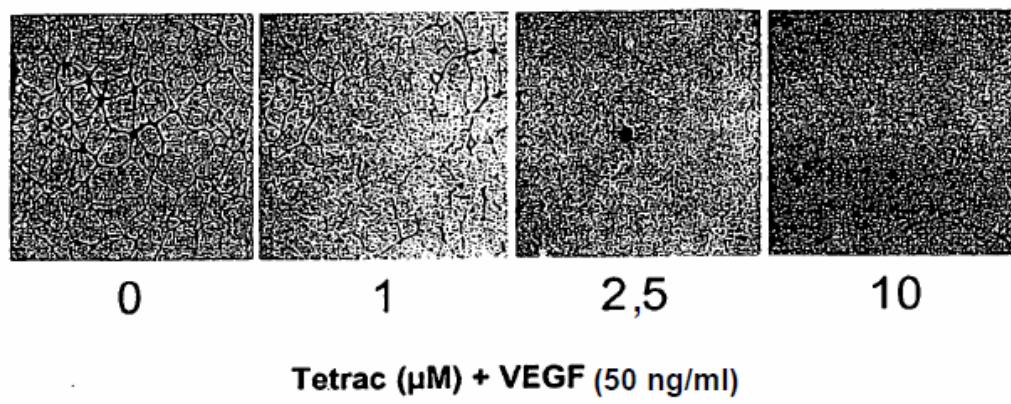


Figura 46

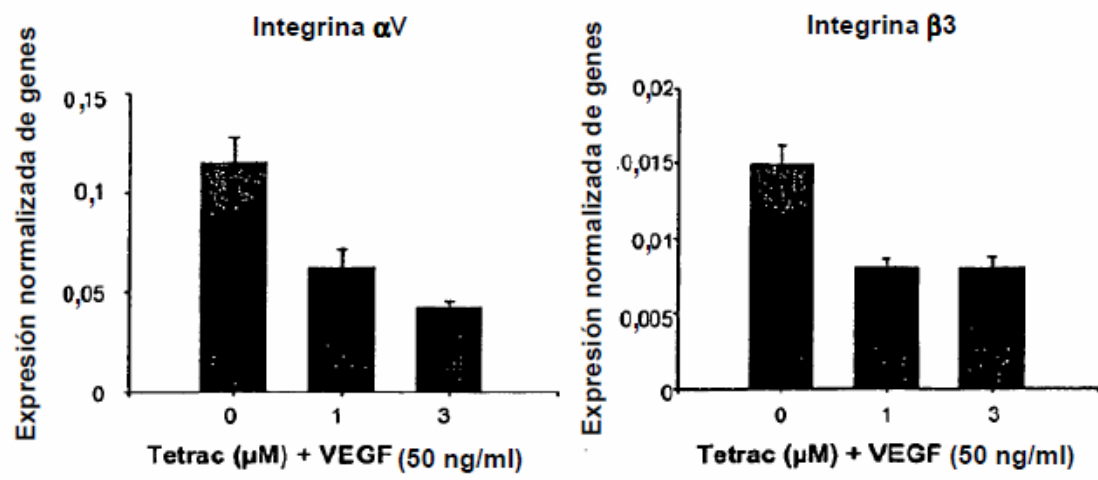


Figura 47A-B

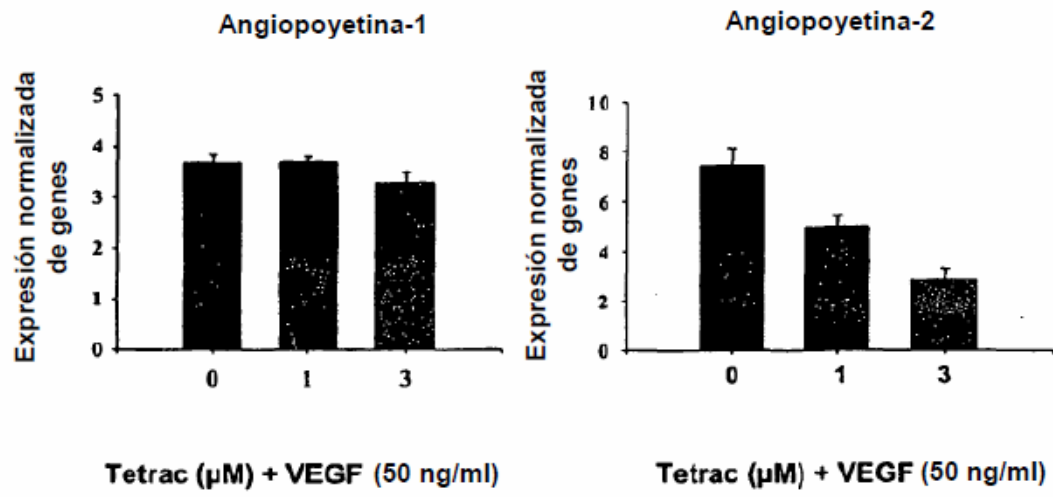


Figura 48A-B

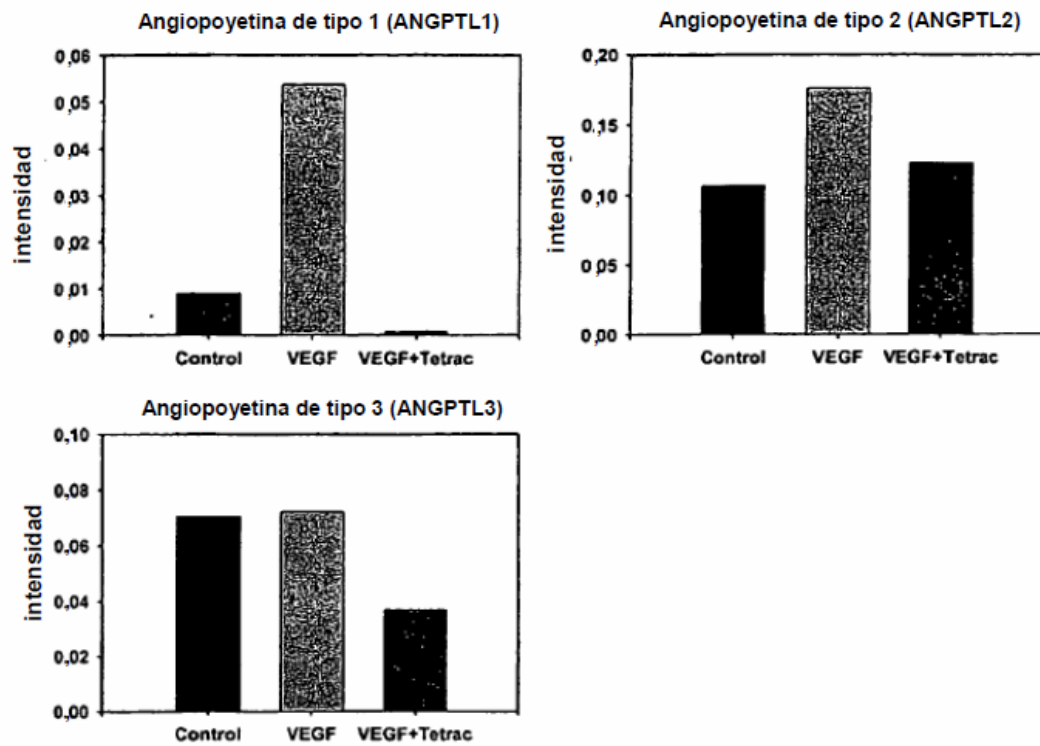


Figura 49A-C

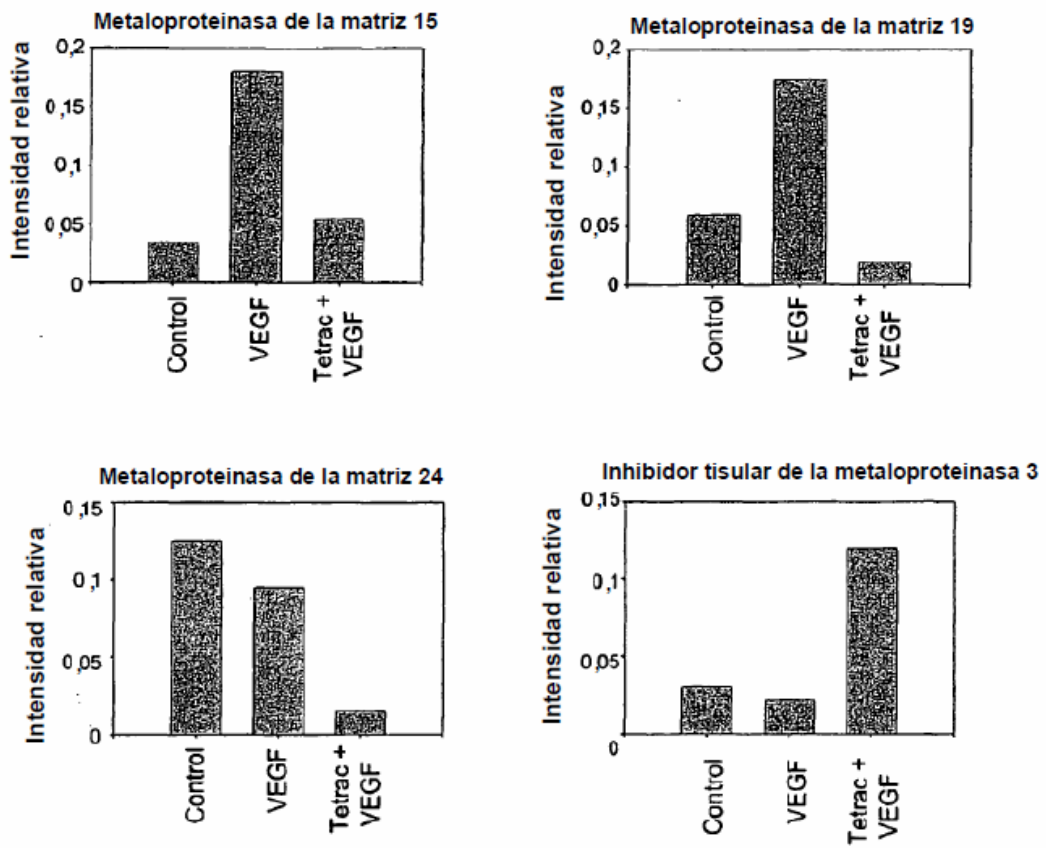


Figura 50A-D

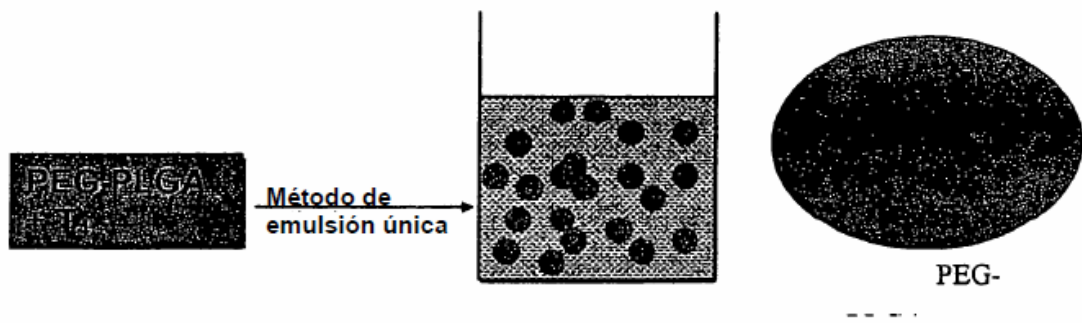


Figura 51

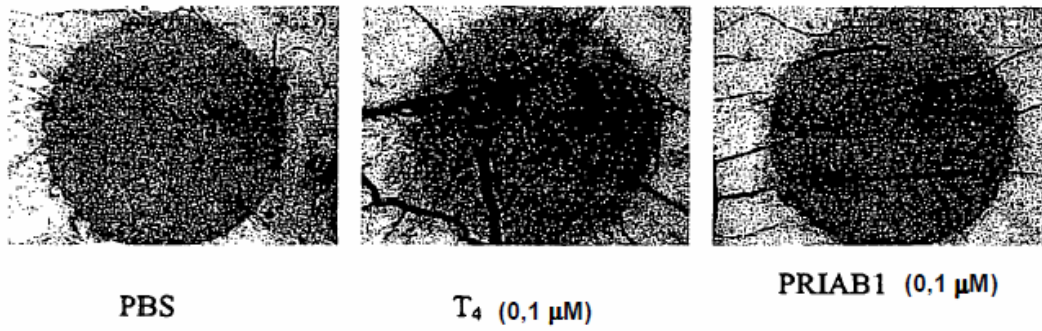


Figura 52

Figura 53

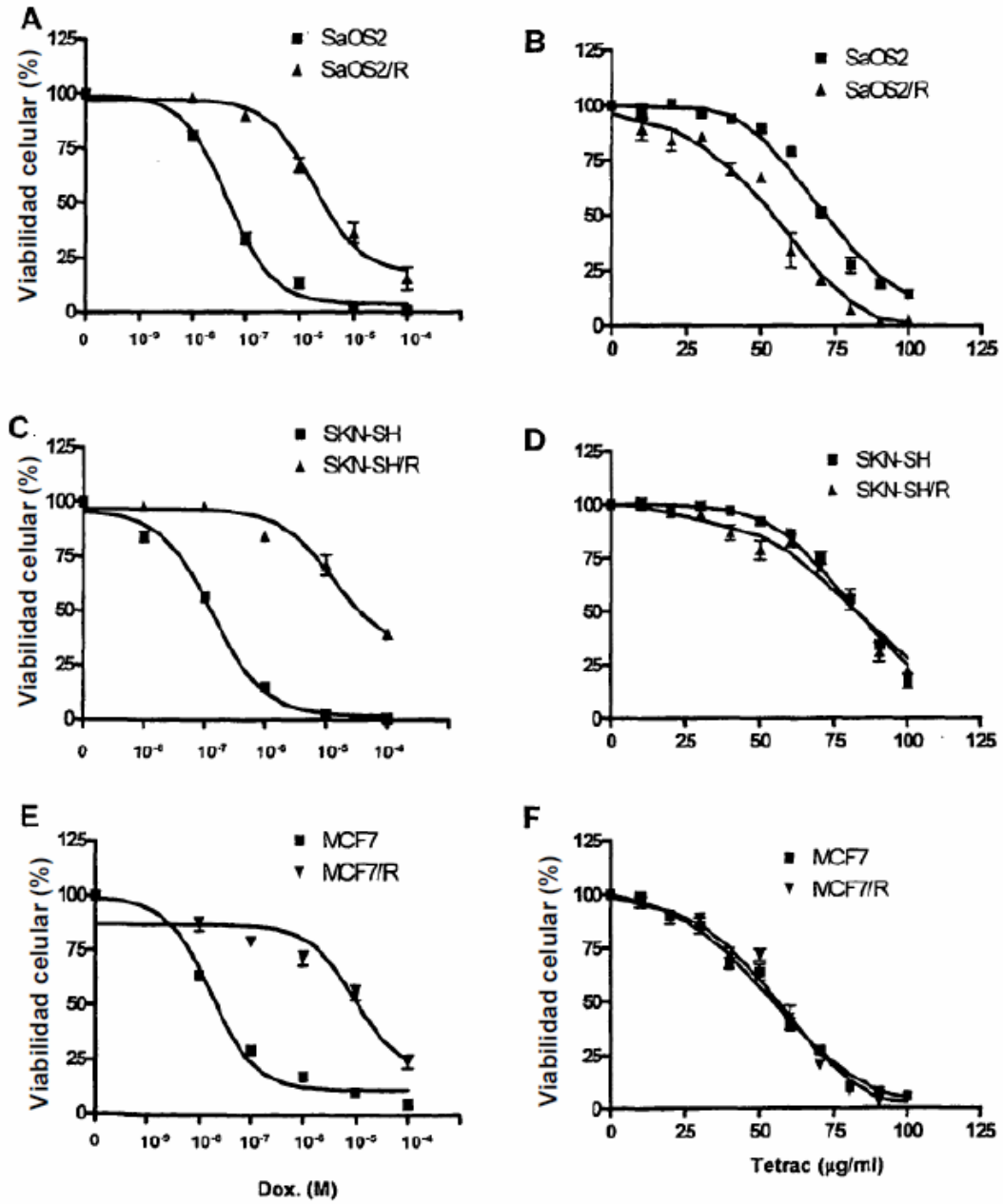


Figura 54

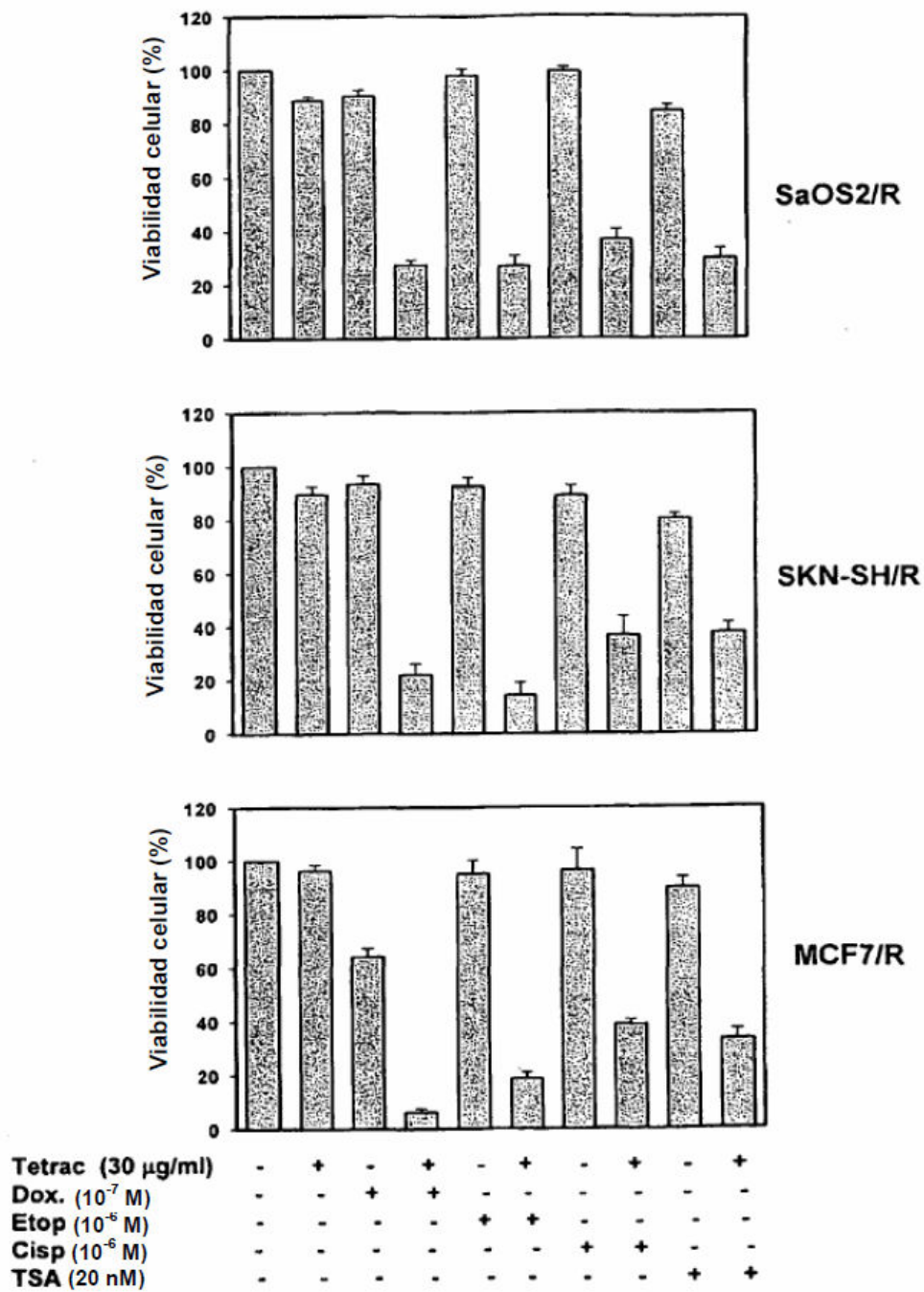


Figura 55

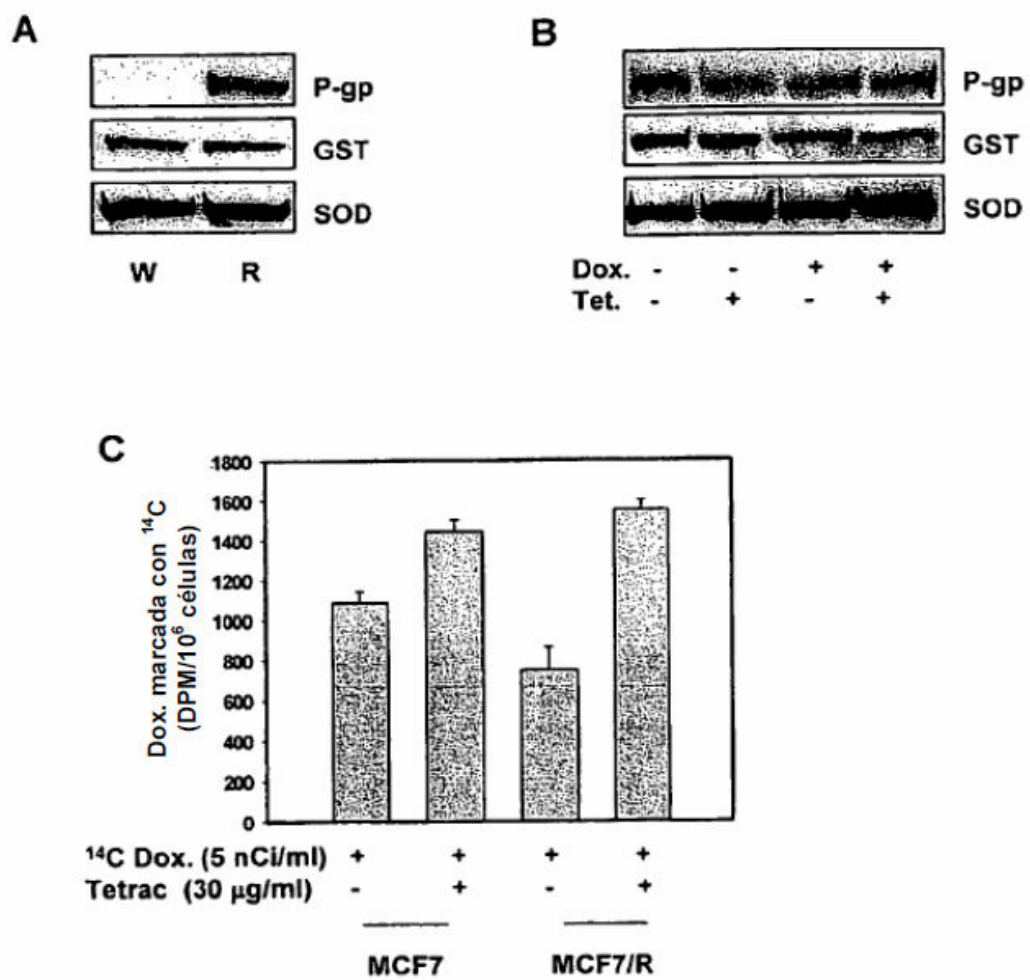


Figura 56

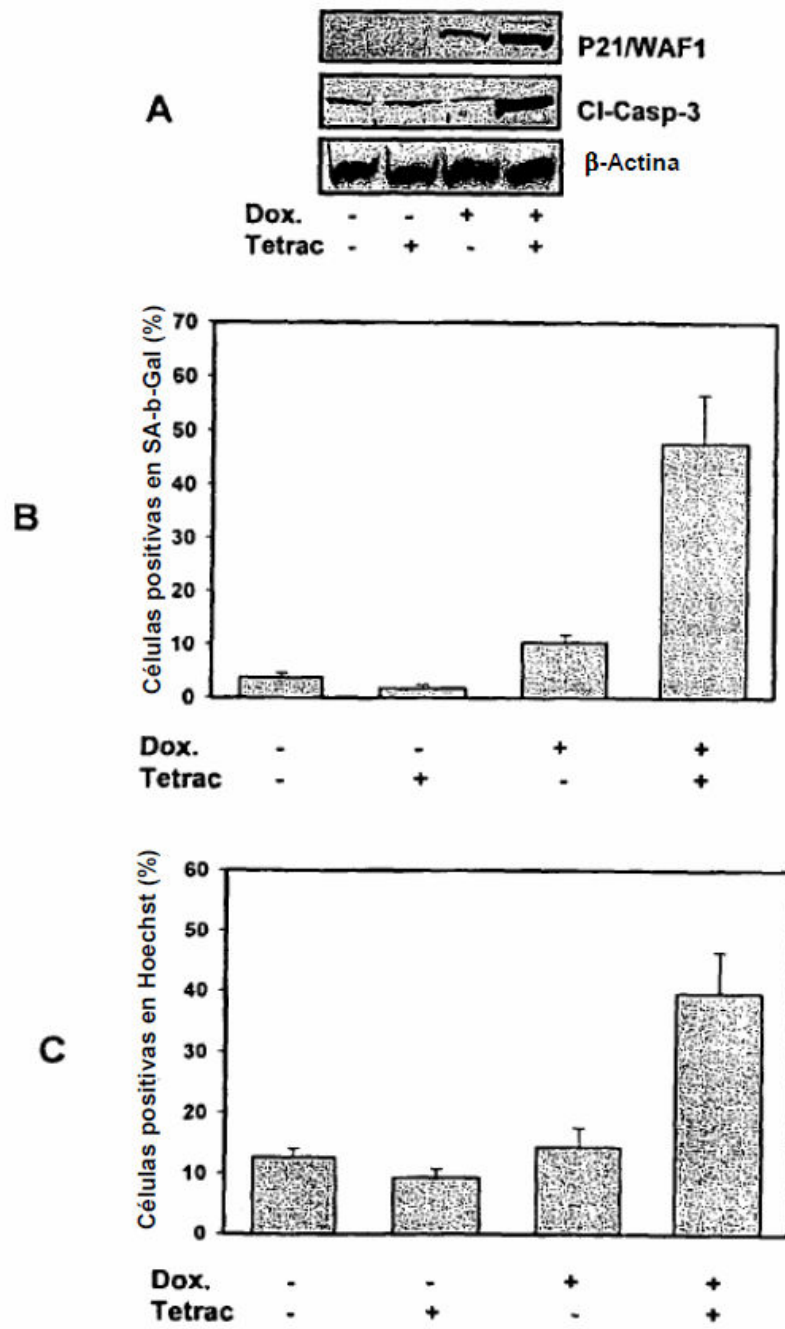


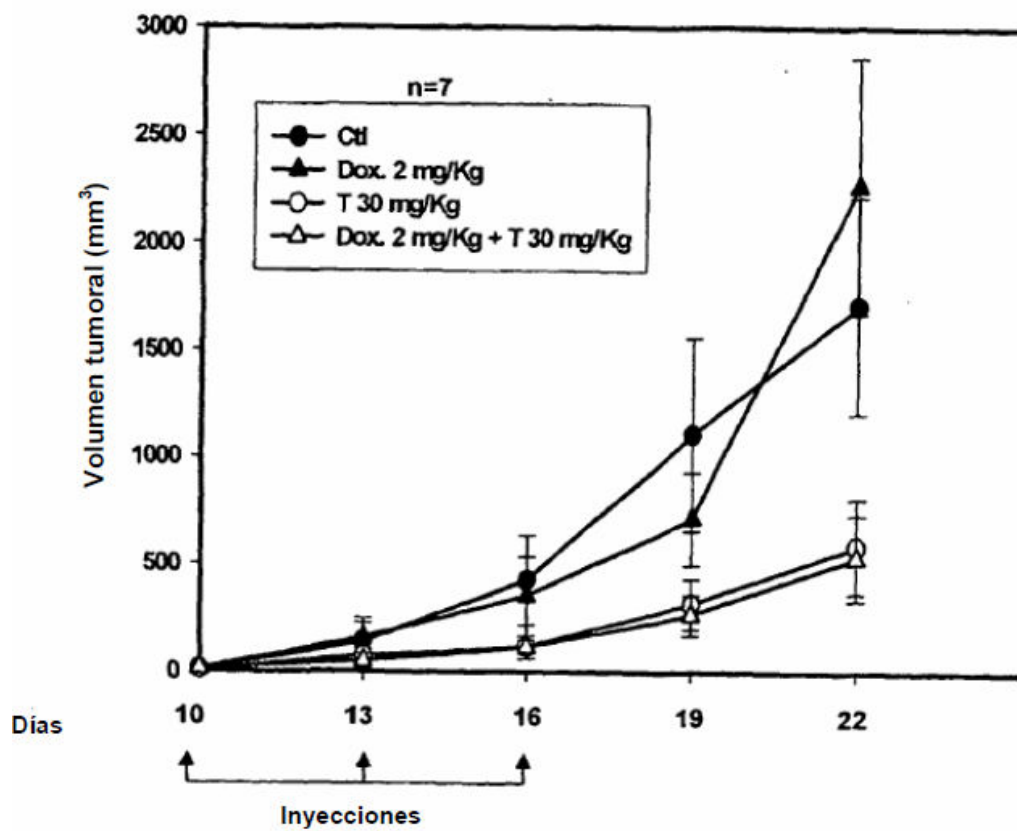
Figura 57

Figura 58

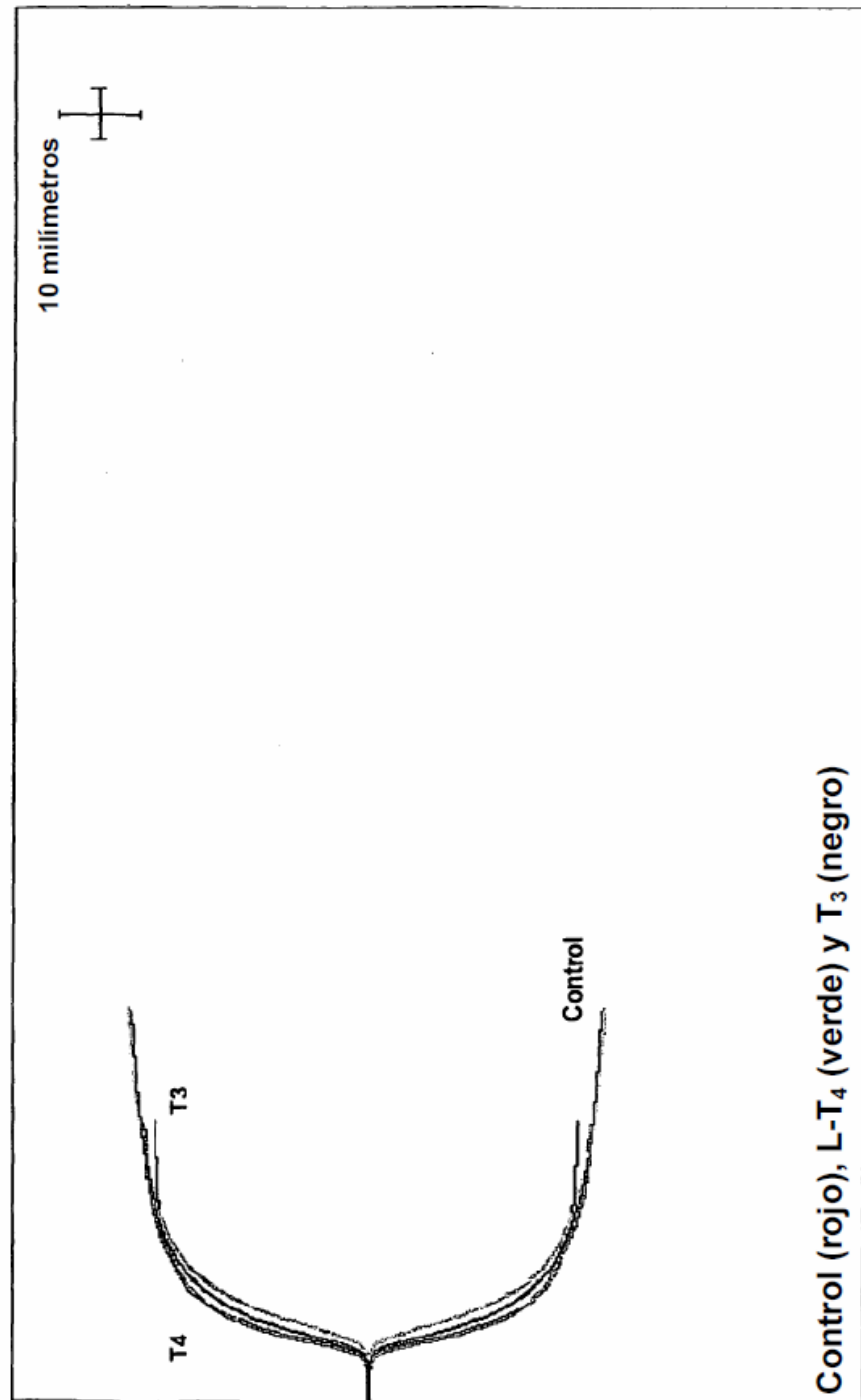


Figura 59

