

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 134**

51 Int. Cl.:

| | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------|
| A61K 31/198 | (2006.01) A61K 47/48 | (2006.01) |
| A61K 31/195 | (2006.01) A61P 35/00 | (2006.01) |
| A61P 9/10 | (2006.01) | |
| A61P 9/00 | (2006.01) | |
| A61P 17/02 | (2006.01) | |
| A61K 31/78 | (2006.01) | |
| A61K 31/765 | (2006.01) | |
| A61K 31/76 | (2006.01) | |
| A61K 31/729 | (2006.01) | |
| A61K 45/06 | (2006.01) | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2005 E 05796606 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1793814**

54 Título: **Análogos de hormonas tiroideas para inhibir la angiogénesis**

30 Prioridad:

15.09.2004 US 943072
13.04.2005 US 670534 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MOUSA, SHAKER, A.;
DAVIS, FAITH, B. y
DAVIS, PAUL, J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 134 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de hormonas tiroideas para inhibir la angiogénesis

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a hormonas tiroideas, análogos de hormonas tiroideas y sus derivados, y sus formas poliméricas. Se describen también métodos para utilizar dichos compuestos y las composiciones farmacéuticas que los contienen. La invención se refiere también a los métodos para preparar dichos compuestos.

10

Antecedente de la invención

Las hormonas tiroideas, L-tiroxina (T4) y L-triyodotironina (T3), regulan muchos procesos fisiológicos diferentes en diferentes tejidos en vertebrados. La mayoría de las acciones de las hormonas tiroideas están mediadas por el receptor de la hormona tiroidea ("TR"), que es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de los reguladores de la transcripción activados por ligandos. Esta superfamilia incluye también receptores de las hormonas esteroides, retinoides, y 1,25-dihidroxitamina D3. Estos receptores son factores de la transcripción que pueden regular la expresión de genes específicos en diversos tejidos y son dianas de fármacos ampliamente utilizados, tales como tamoxifeno, un antagonista parcial del receptor de estrógeno. Existen dos genes diferentes que codifican dos TR diferentes, TR α y TR β . Estos dos TR se expresan a menudo simultáneamente a diferentes niveles en diferentes tejidos. La mayoría de las hormonas tiroideas no discriminan entre los dos TR y se unen a ambos con similares afinidades.

15

20

25

30

Los estudios de inactivación génica en ratones indican que TR β juega un papel en el desarrollo del sistema auditivo y en la retroalimentación negativa de la hormona estimuladora del tiroides por T3 en la pituitaria, mientras que TR α modula el efecto de la hormona tiroidea en la calorigénesis y en sistema cardiovascular. La identificación de los antagonistas de TR podría jugar un importante papel en el tratamiento futuro del hipotiroidismo. Dichas moléculas podrían actuar rápidamente antagonizando directamente el efecto de la hormona tiroidea en el receptor, una significativa mejora para los individuos con hipotiroidismo que requieren cirugía, tienen enfermedades cardíacas, o están en riesgo de una crisis tirotóxica con riesgo para la vida.

35

Por tanto, sigue existiendo una necesidad de desarrollo de compuestos que modulen selectivamente la acción de las hormonas tiroideas funcionando como agonistas o antagonistas selectivos de las isoformas de los receptores de las hormonas tiroideas (TR) que se demuestren útiles para el tratamiento médico. Los últimos esfuerzos se han centrado en el diseño y en la síntesis de antagonistas de las hormonas tiroideas (T3/T4) como potenciales agentes terapéuticos y sondas químicas. Existe también una necesidad de desarrollo de compuestos tiromiméticos que sean más accesibles que la hormona natural, y que tengan propiedades de unión y activación al receptor potencialmente útiles.

40

45

50

Los receptores de las hormonas tiroideas se unen preferentemente a la 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T3), un análogo de hormona derivado por desyodación tisular de la L-tiroxina circulante (T4). Sin embargo, varios laboratorios han descrito recientemente la capacidad de T4 y de T3 de activar las cascadas intracelulares de transducción de señales, independientemente de TR. Actuando independientemente de TR, la hormona tiroidea modula también la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺ de la membrana plasmática, de la ATPasa estimulable por Ca²⁺, otras bombas o canales iónicos diferentes, y la actividad de la GTPasa de los sinaptosomas. Estudios de varios laboratorios han demostrado la capacidad de la hormona tiroidea de activar la cascada de transducción de la señal de MAPK. Estas rutas se activan normalmente mediante señales físicas y químicas en la superficie celular. Aunque se han notificado repetidamente la cinética y la especificidad de análogos para la unión de la hormona tiroidea a la membrana plasmática, no se había identificado previamente un receptor de la superficie celular que represente estas acciones dependientes de TR para la hormona tiroidea.

55

60

65

El laboratorio de los inventores ha mostrado en la línea celular CV-1 de fibroblastos de mono, que carece de TR funcional, y en otras células que T4 activa la cascada de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK; ERK112) y promueve la fosforilación y la translocación nuclear de MAPK tan pronto como 10 min tras la aplicación de una concentración fisiológica de T4. En fracciones nucleares de células tratadas con hormonas tiroideas, los inventores han descrito complejos de MAPK activados y nucleoproteínas transactivadoras que son sustratos para la actividad de la serina quinasa de MAPK. Estas proteínas incluyen el transductor de la señalización y el activador de la transcripción (STAT)-1 α , STAT3, p53, receptor (ER)- α de estrógeno y, en células que contienen TR, el receptor nuclear de la hormona tiroidea para T3 (TR β 1). La fosforilación de estas proteínas dependiente de MAPK dirigida por la hormona tiroidea potencia sus capacidades de transcripción. Los efectos de la activación de MAPK inducida por T4 queda bloqueada por inhibidores de la ruta de transducción de la señal de MAPK y por el ácido tetrayodotiroacético (tetrac), un análogo de la hormona tiroidea que inhibe la unión de Tq a la superficie celular. MAPK activado por la hormona tiroidea puede actuar también localmente en la membrana superficial, por ejemplo, sobre el antiportador N⁺/H⁺, en lugar de cuando se transloca a los núcleos celulares. No se ha identificado anteriormente un receptor de la superficie celular para T4 que esté vinculado a la activación de la cascada de MAPK.

Las integrinas son una familia de glicoproteínas transmembrana que forman heterodímeros no covalentes. Los dominios extracelulares de las integrinas interactúan con varios ligandos, que incluyen glicoproteínas de la matriz extracelular, y el dominio intracelular se une al citoesqueleto. Se ha mostrado desde hace una década que la hormona tiroidea tiene influencia sobre la interacción de la integrina con la proteína de la matriz extracelular, laminina, pero no se ha conocido el mecanismo. La integrina $\alpha\beta_3$ tiene un gran número de ligandos de proteínas extracelulares, incluyendo factores de crecimiento, y tras la unión del ligando puede activar la cascada de MAPK. Algunas de las integrinas contienen un sitio de reconocimiento Arg-Gly-Asp ("RGD") que es importante para la unión de la matriz y otras proteínas extracelulares que contienen una secuencia Arg-Gly-Asp.

Por tanto, sería deseable identificar y proporcionar un sitio de inicio para la inducción de cascadas de señalización de MAPK en células tratadas con hormonas tiroideas, o sus análogos y polímeros, proporcionando de esta forma métodos para modular los factores de crecimiento y otros polipéptidos cuyos receptores de la superficie celular se agrupan alrededor de este sitio de inicio.

Se estima que cinco millones de personas padecen de angina estable crónica en los Estados Unidos. Cada año, 200.000 personas fallecen con menos de 65 años de edad debido a la "enfermedad cardiaca isquémica prematura". A pesar del tratamiento médico, muchos van a sufrir infarto de miocardio y síntomas debilitantes que dan lugar a la necesidad de revascularización tanto con angioplastia coronaria transluminal percutánea o cirugía de derivación de la arteria coronaria. Se ha postulado que una manera de aliviar la isquemia de miocardio sería potenciar la circulación coronaria colateral.

Se han realizado ahora correlaciones entre la apariencia anatómica de los vasos coronarios colaterales ("colaterales") visualizados en el momento del tratamiento trombolítico intracoronario durante la fase aguda del infarto de miocardio y la curva de tiempo-actividad de la creatina quinasa, tamaño del infarto, y formación del aneurisma. Estos estudios demuestran un papel protector de los colaterales en corazones con enfermedad obstructiva coronaria, que muestra infartos más pequeños, menos formación de aneurismas, y función ventricular mejorada en comparación con pacientes en los que no se visualizan los colaterales. Cuando los miocitos cardiacos se vuelven isquémicos, los colaterales se desarrollan activamente por crecimiento con replicación del ADN y mitosis de las células musculares endoteliales y lisas. Una vez que se desarrolla la isquemia, estos factores se activan y se vuelven disponibles para la ocupación del receptor, que puede iniciar la angiogénesis tras exposición a la heparina exógena. Desafortunadamente, el proceso "natural" por el cual se produce la angiogénesis es inadecuado para invertir la isquemia en casi todos los pacientes con enfermedad de las arterias coronarias.

Durante la isquemia, se libera adenosina a través de la descomposición del ATP. La adenosina participa en muchos acontecimientos biológicos cardioprotectores. La adenosina tiene un papel en los cambios hemodinámicos tales como bradicardia y vasodilatación, y se ha sugerido que la adenosina tiene un papel en fenómenos no relacionados como el preacondicionamiento y posiblemente la reducción en la lesión por reperfusión (Ely y Beme, *Circulation*, 85: 893 (1992).

La angiogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos sanguíneos ya existentes (Mousa, S. A., In *Angiogenesis Inhibitors and Stimulators: Potential Therapeutic Implications*, Landes Bioscience, Georgetown, Texas; Capítulo 1, (2000)). Fisiológicamente, la angiogénesis asegura el desarrollo adecuado de los organismos maduros, prepara el útero para la implantación del óvulo, y juega un papel clave en la cicatrización de las heridas. El desarrollo de redes vasculares durante la embriogénesis o la angiogénesis normal y patológica depende de factores de crecimiento e interacciones celulares con la matriz extracelular (Breier et al., *Trends in Cell Biology* 6:454-456 (1996); Folkman, *Nature Medicine* 1:27-31 (1995); Risau, *Nature* 386:671-674 (1997). Los vasos sanguíneos surgen durante la embriogénesis debido a dos procesos: vasculogénesis y angiogénesis (Blood et al., *Bioch. Biophys. Acta* 1032:89-118 (1990). La angiogénesis es un proceso multietapa controlado por el equilibrio de factores pro y antiangiogénicos. Las últimas etapas de este proceso implican la proliferación y la organización de células endoteliales (EC) en estructuras de tipo tubo. Se piensa que los factores de crecimiento tales como FGF2 y VEGF juegan papeles clave en la promoción del crecimiento y la diferenciación de células endoteliales.

El control de la angiogénesis es un proceso complejo que implica la liberación local de factores de crecimiento vascular (P Carmeliet, *Ann NY Acad Sci* 902:249-260, 2000), matriz extracelular, moléculas de adhesión y factores metabólicos (RJ Tomanek, GC Schatteman, *Anat Rec* 261:126-135, 2000). Las fuerzas mecánicas en el interior de los vasos sanguíneos también tienen un papel (O Hudlicka, *Molec Cell Biochem* 147:57-68, 1995). Las principales clases de factores de crecimiento endógenos implicados en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos son la familia del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Páginas G, *Ann NY Acad Sci* 902:187-200, 2000). La cascada de transducción de la señal de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK ERK1/2) está implicada en la expresión génica de VEGF y en el control de la proliferación de células endoteliales vasculares.

La adenosina intrínseca puede facilitar la respuesta del flujo coronario a las demandas crecientes de oxígeno del miocardio y de esta manera modula la reserva del flujo coronario (Ethier et al., *Am. J. Physiol.*, H131 (1993) demostró que la adición de concentraciones fisiológicas de adenosina a los cultivos de células endoteliales de la vena umbilical humana estimula la proliferación, posiblemente mediante un receptor superficial. La adenosina puede ser un factor del

crecimiento celular endotelial humano y posiblemente de la angiogénesis. La angiogénesis parece ser protectora en pacientes con flujo sanguíneo obstruido tal como enfermedad de las arterias coronarias ("CAD"), pero la velocidad a la cual los vasos sanguíneos crecen naturalmente es inadecuada para invertir la enfermedad. Por tanto, las estrategias para potenciar y acelerar la angiogénesis potencial natural del cuerpo deben ser beneficiosas en pacientes con CAD.

De manera similar, la cicatrización de heridas es un problema principal en muchos países en vías de desarrollo, y las personas diabéticas tienen afectada negativamente la cicatrización de heridas y los trastornos inflamatorios crónicos, con un uso creciente de diversos inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (CoX2). La angiogénesis es necesaria para la reparación de heridas porque los nuevos vasos proporcionan nutrientes para apoyar las células activas, promueven la formación del tejido de granulación y facilita el aclaramiento de los desechos. Aproximadamente un 60 % de la masa del tejido está compuesta de vasos sanguíneos que suministran también el oxígeno necesario para estimular la reparación y el crecimiento de vasos. Está bien documentado que los factores angiogénicos están presentes en el fluido de cicatrización y promueven la reparación mientras que los factores antiangiogénicos inhiben la reparación. La angiogénesis de la cicatrización es un complejo proceso multietapa. A pesar de un conocimiento detallado acerca de muchos factores angiogénicos, se han realizado pocos avances para definir la fuente de estos factores, los elementos reguladores implicados en la angiogénesis de la cicatrización y en el uso clínico de estimulantes angiogénicos para promover la reparación. Complicando adicionalmente la comprensión de la angiogénesis de la cicatrización y reparación de heridas se encuentra el hecho de que los mecanismos y mediadores implicados en la reparación varían probablemente dependiendo de la profundidad de la herida, el tipo de herida (quemadura, trauma, etc.), y la localización (músculo, piel, hueso, etc.). El estado y edad del paciente (diabético, parapléjico, en tratamiento con esteroides, anciano comparado con niño, etc.) pueden determinar también la velocidad de reparación y respuesta a factores angiogénicos. El sexo del paciente y el estado hormonal (premenopáusico, postmenopáusico, etc.) puede influenciar también los mecanismos y respuestas de reparación. Una curación mejorada de la herida afecta particularmente a los ancianos y a muchos de los 14 millones de diabéticos en los Estados Unidos. Debido a que una angiogénesis reducida es a menudo un agente causante de problemas en la cicatrización de heridas en estas poblaciones de pacientes, es importante definir los factores angiogénicos importantes en la reparación de heridas y desarrollar usos clínicos para prevenir y/o corregir la mejora en la cicatrización de heridas.

Por tanto, sigue habiendo una necesidad de un tratamiento eficaz en forma de agentes angiogénicos como tratamiento principal o auxiliar para el estímulo de la cicatrización de heridas, la angiogénesis coronaria, u otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis, con efectos secundarios mínimos. Dicho tratamiento sería particularmente útil para pacientes que tienen trastornos vasculares tales como infartos de miocardio, ictus o enfermedades de las arterias periféricas y podrían utilizarse profilácticamente en pacientes que tienen una mala circulación coronaria, que los coloca en un alto riesgo de isquemia y de infartos de miocardio.

Las hormonas tiroideas, análogos, y las conjugaciones poliméricas juegan importantes papeles en el desarrollo del cerebro. Evidencias crecientes sugieren que la privación de hormonas tiroideas poliméricas en la etapa de desarrollo inicial produce déficits estructurales y funcionales en el SNC, pero el mecanismo preciso subyacente sigue siendo desconocido.

El sistema nervioso de los mamíferos comprende un sistema nervioso periférico (SNP) y un sistema nervioso central (SNC, que comprende el cerebro y la médula espinal), y está compuesto por dos clases principales de células: neuronas y células gliales. Las células gliales rellenan los espacios entre las neuronas, alimentándolas y modulando su función. Determinadas células gliales, tales como las células de Schwann en el SNP y los oligodendrocitos en el SNC, proporcionan también una vaina de mielina que rodea los procesos neurales. La vaina de mielina permite una rápida conducción a lo largo de la neurona. En el sistema nervioso periférico, axones de múltiples neuronas pueden enmarañarse entre sí a fin de formar una fibra nerviosa. Estos, a su vez, pueden combinarse en fascículos o haces.

Durante el desarrollo, la diferenciación de las neuronas desde los sistemas nerviosos central y periférico lanza axones que crecen y hacen contacto con células diana específicas. En algunos casos, los axones deben cubrir enormes distancias; algunos crecen en la periferia, mientras que otros están confinados en el sistema nervioso central. En mamíferos, esta etapa de neurogénesis se completa durante la fase embrionaria de la vida y las células neuronales no se multiplican una vez que se han diferenciado completamente.

Se ha identificado un hospedador de neuropatías que afecta al sistema nervioso central. Las neuropatías, que pueden afectar a las propias neuronas o asociarse con células gliales, pueden ser el resultado de una disfunción metabólica celular, infección, exposición a agentes tóxicos, autoinmunidad, desnutrición, o isquemia. En algunos casos, se piensa que la neuropatía celular induce la muerte celular directamente. En otros casos, la neuropatía puede inducir suficiente necrosis tisular para estimular el sistema inmune/inflamatorio del cuerpo y la respuesta inmune a la lesión neural que destruye a continuación las rutas neurales.

Cuando la ruta neural dañada es resultado de daño axonal en el SNC, se han utilizado injertos de nervios periféricos autólogos para realizar uniones en lesiones en el sistema nervioso central y permitir a los axones retornar posteriormente a su área diana normal. En contraste a las neuronas del SNC, las neuronas del sistema nervioso periférico pueden extender nuevos procesos periféricos en respuesta al daño de los axones. Se piensa que esta propiedad regenerativa de los axones del sistema nervioso periférico es suficiente para permitir injertar estos

segmentos en axones del SNC. El injerto satisfactorio parece estar limitado, sin embargo, por numerosos factores, que incluyen la longitud de la lesión axonal en el SNC que se va a derivar, y la distancia de los sitios del injerto desde los cuerpos de células neuronales del SNC, con injertos satisfactorios que se producen próximos al cuerpo celular.

5 En el sistema nervioso periférico, esta propiedad regenerativa celular de las neuronas tiene una capacidad limitada para reparar la función de una ruta neural dañada. Específicamente, los nuevos axones se extienden aleatoriamente, y se dirigen a menudo de manera incorrecta, entrando en contacto con dianas inapropiadas que pueden producir una función anómala. Por ejemplo, si un nervio motor está dañado, los axones que han vuelto a crecer pueden entrar en contacto con músculos incorrectos, dando como resultado parálisis. Además, cuando los procesos dañados dan como resultado un hueco más largo de unos pocos milímetros, por ejemplo, más de 10 milímetros (mm), no se produce la regeneración nerviosa adecuada, debido tanto a que los procesos no consiguen crecer la distancia necesaria, como debido a un crecimiento axonal dirigido de manera incorrecta. Los esfuerzos para reparar el daño nervioso periférico por medios quirúrgicos han tenido resultados mixtos, particularmente cuando el daño se extiende a una distancia significativa. En algunos casos, las etapas de sutura utilizadas para obtener una alineación adecuada de los extremos nerviosos dañados estimulan la formación de tejido de cicatrización que se piensa que inhibe la regeneración del axón. Incluso cuando se ha reducido la formación de tejido de cicatrización, como con el uso de canales de guiado de nervios u otras prótesis tubulares, la regeneración satisfactoria sigue estando limitada a lesiones nerviosas de menos de 10 milímetros de distancia. Además, la capacidad reparadora de las neuronas periféricas está significativamente inhibida cuando una lesión o neuropatía afecta al propio cuerpo celular o da como resultado una extensa degeneración de un axón distal.

La rutas neurales de mamíferos también están en riesgo debido al daño causado por lesiones neoplásicas. Se han identificado neoplasias de neuronas y células gliales. Las células transformadas de origen neural pierden generalmente su capacidad de comportarse como células normales diferenciadas y pueden destruir las rutas neurales mediante la pérdida de la función. Además, los tumores proliferativos pueden inducir lesiones perturbando la estructura normal del tejido nervioso, inhibiendo las rutas mediante la compresión de los nervios, inhibiendo el fluido cerebroespinal o el suministro de flujo sanguíneo, y/o estimulando la respuesta inmune del cuerpo. Los tumores metastásicos, que son una causa significativa de lesiones neoplásicas en el cerebro y la médula espinal, pueden dañar también de manera similar las rutas neurales e inducir la muerte de células neuronales.

Un tipo de molécula morforreguladora asociada con el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo de células neuronales es la molécula de adhesión celular ("CAM"), de forma más notable, la molécula de adhesión de células nerviosas (N-CAM). Las CAM son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Median las interacciones entre células durante el desarrollo y en los tejidos adultos mediante la unión homofílica, es decir, la unión CAM-CAM en células opuestas. Se han identificado numerosas CAM diferentes. De estas, las más estudiadas son la N-CAM y la L-CAM (moléculas de adhesión a hepatocitos), ambas de las cuales se han identificado en todas las células en las etapas iniciales del desarrollo, así como en diferentes tejidos adultos. En el desarrollo del tejido neural, se cree que la expresión de N-CAM es importante en la organización del tejido, la migración neuronal, la adhesión del tejido muscular a los nervios, la formación de la retina, sinaptogénesis, y degeneración neuronal. Se piensa también que la expresión reducida de N-CAM está asociada con la disfunción nerviosa. Por ejemplo, la expresión de al menos una forma de N-CAM, N-CAM-180, se reduce en un ratón mutante desmielinizado. Bhat, *Brain Res.* 452: 373-377 (1988). Se han asociado también los niveles reducidos de N-CAM con hidrocefalo de presión normal, *Werdelin, Acta Neurol. Scand.* 79: 177-181 (1989), y con esquizofrenia de tipo II. Lyons, et al., *Biol. Psychiatry* 23: 769-775 (1988). Además, los anticuerpos contra N-CAM han demostrado perturbar la recuperación funcional en nervios lesionados. Remsen, *Exp. Neurobiol.* 110: 268-273 (1990).

Actualmente no existe método satisfactorio para reparar el daño producido por lesiones traumáticas en las neuronas motoras y enfermedades de las neuronas motoras. Existen de 15.000 a 18.000 nuevos casos de lesiones de médula espinal cada año en los Estados Unidos. Además, existen aproximadamente 200.000 supervivientes de lesiones de médula espinal. El coste anual de cuidados para estos pacientes excede de 7.000 millones. La patofisiología que sigue al traumatismo agudo de médula espinal es un mecanismo complejo y no se entiende completamente. El daño al tejido primario producido mediante traumatismo mecánico se produce inmediatamente y es irreversible. Allen, *J. Am. Med. Assoc.* 57: 878-880 (1911). La evidencia experimental indica que la mayoría del daño al tejido postraumático es el resultado de un proceso reactivo que comienza minutos después de la lesión y continúa durante días o semanas. Janssen, et al., *Spine* 14: 23-32 (1989) y Panter, et al., (1992). Este proceso autodestructivo progresivo incluye mecanismos patofisiológicos tales como hemorragias, isquemia postraumática, edema, necrosis axonal y neuronal, y desmielinización seguida por formación de quistes e infarto. Para una revisión, véase Tator, et al., *J. Neurosurg.* 75: 15-26 (1991) y Faden, *Crit. Rev. Neurobiol.* 7: 175-186 (1993). Los factores de lesión propuestos incluyen cambios electrolíticos debido a los cuales, el inicio del calcio intracelular inicia una cascada de acontecimientos (Young, *J. Neurotrauma* 9, Supl. 1: S9-S25 (1992) y Young, *J. Emerg. Med* 11: 13-22 (1993)), cambios bioquímicos con liberación descontrolada de transmisores (Liu, et al., *Cell* 66: 807-815 (1991) y Yanase, et al., *J. Neurosurg* 83: 884-888 (1995), liberación de ácido araquidónico, producción de radicales libres, peroxidación lipídica (Braugher, et al., *J. Neurotrauma* 9, Supl. 1: S1-S7 (1992), producción eicosanoide (Demediuk, et al., *J. Neurosci. Res.* 20: 115-121 (1988), opiáceos endógenos (Faden, et al., *Ann Neurol.* 17: 386-390 (1985), cambios metabólicos que incluyen alteraciones en el oxígeno y la glucosa (Faden, *Crit. Rev. Neurobiol.* 7: 175-186 (1993)), cambios inflamatorios (Blight, *J. Neurotrauma* 9, Supl. 1: S83-S91 (1992), y edema astrocítico (Kimelberg, *J. Neurotrauma* 9, Supl. 1: S71-S81

(1992). Durante los últimos 400 años, las soluciones quirúrgicas que incluyen laminectomía y descompresión, acompañadas por fusión, han sido las estrategias de tratamiento más comúnmente practicadas. Hansebout, "Early Management of Acute Spinal Cord Injury", pp. 181-196 (1982) y Janssen, et al., *Spine* 14: 23-32 (1989). Sin embargo, estos procedimientos no han implicado la aplicación de técnicas que aumentan las propiedades regenerativas del tejido de la médula espinal.

Se ha identificado un hospedador de enfermedades de las neuronas motoras, incluyendo las enfermedades desmielinizantes, mielopatías, y las enfermedades de las neuronas motoras tales como la esclerosis lateral amiotrófica ("ALS"). *INTERNAL MEDICINE*, ch. 121-123 (4ª ed., J. H. Stein, ed., Mosby, 1994). La esclerosis múltiple ("EM") es la enfermedad desmielinizante más común del sistema nervioso central, que produce redes esclerotizadas (es decir, placas) en el cerebro y en la médula espinal. La EM tiene manifestaciones clínicas proteicas, dependiendo de la localización y del tamaño de la placa. Los síntomas típicos incluyen pérdida visual, diplopía, nistagmo, disantria, debilidad, parestesias, anomalías de la vejiga, y alteraciones del estado de ánimo. Se han propuesto miles de tratamientos para esta enfermedad variable a largo plazo. La lista de tratamientos propuestos abarca todos desde la dieta a la estimulación eléctrica a la acupuntura, apoyo emocional, y diversas formas de tratamientos inmunosupresores. Ninguno ha demostrado ser satisfactorio.

Se produce la pérdida progresiva de neuronas motoras inferiores y superiores en algunas enfermedades (por ejemplo, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, amiotrofia focal benigna). Sin embargo, La ELA es la más común de la enfermedad de las neuronas motoras. Se produce la pérdida de las neuronas motoras inferiores y superiores en la ELA. Los síntomas incluyen la degeneración progresiva del músculo esquelético, debilidad, fasciculaciones, y calambres. Algunos casos tienen una implicación predominante de motoneuronas del pedúnculo cerebral (parálisis bulbar progresiva). Desafortunadamente, el tratamiento de las neuronas motoras y de las enfermedades relacionadas es paliativo. *INTERNAL MEDICINE*, ch. 123 (4ª ed., J. H. Stein, ed., Mosby, 1994).

Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica de los tratamientos de los trastornos y las lesiones de las neuronas motoras, y los déficits relacionados en funciones neurales. Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones y métodos para estimular la angiogénesis, para inducir la diferenciación neuronal, y para prevenir la muerte o la degeneración de las células neuronales.

Las tirosinas están yodadas en uno (monoyodotirosina) o dos sitios (diyodotirosina) y a continuación se acoplan para formar las hormonas activas (diyodotirosina + diyodotirosina \rightarrow tetrayodotironina [tiroxina, T_4]; diyodotirosina + monoyodotirosina \rightarrow triyodotironina [T_3]). Otra fuente de T_3 en la glándula tiroidea es el resultado de la desyodación del anillo externo de T_4 mediante una selenoenzima: 5'-desyodinasas de tipo I (5'D-I). La tiroglobulina, una glicoproteína que contiene T_3 y T_4 en su matriz, se captura en el folículo como gotículas de coloides por las células tiroideas.

Los lisosomas que contienen proteasas escinden T_3 y T_4 a partir de la tiroglobulina, dando como resultado la liberación de T_3 y T_4 libres. Las yodotirosinas (monoyodotirosina y diyodotirosina) se liberan también a partir de la tiroglobulina, pero solo cantidades muy pequeñas alcanzan el torrente sanguíneo. El yodo se elimina de las mismas mediante desyodinasas intracelulares, y la glándula tiroidea usa este yodo.

La T_4 y la T_3 liberadas desde el tiroides por la proteólisis alcanzan el torrente sanguíneo, donde se unen a las proteínas séricas de unión a las hormonas tiroideas para el transporte. La proteína de unión a la hormona tiroidea mayor es la globulina de unión a tiroxina ("TGB"), que tiene una alta afinidad pero una baja capacidad para T_4 y T_3 . TGB representa normalmente aproximadamente un 75 % de las hormonas unidas. Otras proteínas de unión a hormonas tiroideas--principalmente prealbúmina de unión a tiroxina, denominada también transtiretina ("TTR"), que tiene una alta afinidad pero una baja capacidad para T_4 , y la albúmina, que tiene una baja afinidad pero una alta capacidad por T_4 y T_3 --representan el resto de las hormonas tiroideas séricas unidas. Aproximadamente un 0,03 % de T_4 sérica total y un 0,3 % de T_3 sérica total están libres y en equilibrio con las hormonas unidas. Solo las T_4 y T_3 libres están disponibles en los tejidos periféricos para la acción de las hormonas tiroideas.

Las hormonas tiroideas tienen dos efectos fisiológicos principales: (1) Aumentan la síntesis de proteínas en virtualmente cada tejido corporal. (T_3 y T_4 penetran en las células, donde T_3 , que se deriva de la circulación y de la conversión de T_4 a T_3 en la célula, se une a receptores nucleares discretos y tiene influencia sobre la formación del ARNm). (2) T_3 aumenta el consumo de O_2 aumentando la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa (bomba de Na), principalmente en tejidos responsables del consumo basal de O_2 (es decir, hígado, riñón, corazón, y músculo esquelético). La actividad aumentada de la Na^+ , K^+ -ATPasa es secundaria a la síntesis aumentada de esta enzima; por lo tanto, el aumento en el consumo de O_2 está también probablemente relacionado con la unión nuclear de las hormonas tiroideas. Sin embargo, no se ha descartado un efecto directo de T_3 sobre la mitocondria. Se cree que T_3 es la hormona tiroidea activa, aunque la propia T_4 puede ser biológicamente activa.

El combinado de hormonas tiroideas crítico para las acciones biológicas de las hormonas es el combinado de la hormona tiroidea libre. El tamaño de este combinado se determina durante cortos periodos de tiempo mediante la captación/liberación de hormonas tiroideas en/a partir de células y la unión/liberación de hormonas tiroideas por las proteínas de unión a hormonas tiroideas. Tanto las proporciones como las concentraciones absolutas de estas proteínas difieren en el plasma sanguíneo y en el fluido cerebroespinal ("CSF"). La diferencia más pronunciada se

encuentra para la transtiretina ("TTR"), que es la única proteína plasmática de unión a la hormona tiroidea sintetizada en el cerebro (Schreiber G, Southwell BR, Richardson SJ. Hormone delivery systems to the brain-transthyretin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995;103(2):75-80). TTR es también distinta de las otras dos proteínas plasmáticas de unión a hormonas tiroideas en seres humanos en ausencia de deficiencias genéticas. La expresión génica de TTR se inició durante la evolución mucho antes en el cerebro que en el hígado. Se ha conservado completamente la estructura de los dominios de TTR implicados en la unión de T4 a la tiroxina (TR) durante 350 millones de años. Estas observaciones apuntan a una significancia funcional especial de TTR en el cerebro. Se ha propuesto que esta es la determinación del nivel de T4 libre en el compartimento extracelular del cerebro. T4 puede a continuación convertirse en el cerebro a triyodotironina T3 mediante desyodinasas específicas. Esta T3 puede interactuar con receptores en los núcleos de las células, regulando la transcripción génica.

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo grave, y actualmente, aproximadamente 4 millones de americanos padecen de esta enfermedad. A medida que la población envejece continúa aumentando, este número podría alcanzar 14 millones a la mitad del próximo siglo a no ser que se encuentre una cura o prevención. De hecho, no existe ensayo previo a la muerte sensible y específico para el diagnóstico inicial de esta enfermedad. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica actualmente basándose en la observación clínica del declive cognitivo, vinculada a la eliminación sistemática de otras posibles causas de aquellos síntomas. La confirmación del diagnóstico clínico de "enfermedad de Alzheimer probable" puede solo realizarse mediante el examen del cerebro postmortem. El cerebro de la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la aparición de dos depósitos proteínicos anómalos distintos en regiones del cerebro responsables del aprendizaje y la memoria (por ejemplo, corteza cerebral e hipocampo). Estos depósitos son placas amiloides extracelulares, que son características de la enfermedad de Alzheimer, y de los ovillos neurofibrilares intracelulares ("NFT"), que se pueden encontrar también en otros trastornos neurodegenerativos. Los péptidos amiloides son normalmente tanto de 40 o 42 aminoácidos de longitud ("A¹⁻⁴⁰" o "A¹⁻⁴²", respectivamente) y se forman a partir de un procesamiento anómalo de una proteína más grande asociada a membrana de función desconocida, la proteína precursora amiloide ("APP"). Se piensa que los agregados oligoméricos de estos péptidos son neurotóxicos, dando como resultado eventualmente la degeneración sináptica y la pérdida neuronal. La cantidad de deposición amiloide está correlacionada de manera grosera con la gravedad de los síntomas en el momento de la muerte.

En el pasado, se han hecho algunos intentos para el diseño de agentes radiofarmacéuticos que podrían utilizarse como agentes diagnósticos para un diagnóstico premortem de la enfermedad de Alzheimer. Bornebroek et al. mostró que el componente P amiloide asociado a la proteína amiloide (SAP), marcado con ¹²³I, se acumula a bajos niveles en la corteza cerebral, posiblemente en las paredes del recipiente, de pacientes con amiloidosis cerebral (Bornebroek, M., et al., *Nucl. Med. Commun.* (1996), Volumen 17, págs. 929-933).

Saito et al. propusieron una administración mediada por vector de A¹⁻⁴⁰ marcado con ¹²³I a través de la barrera hematoencefálica. Se ha notificado que A¹⁻⁴⁰ yodado se une a la placa de la proteína amiloide A en las secciones tisulares (Saito, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, Vol. 92, pp.10227-10231). Las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.231.000 describen anticuerpos con especificidad por el polipéptido amiloide A4 que se encuentran en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, no se ha descrito un método para administrar estos anticuerpos a través de la barrera hematoencefálica. Zhen et al. describieron modificaciones del colorante de unión a la proteína amiloide conocido como "Rojo Congo.TM.", y complejos de estas moléculas modificadas con tecnecio y renio. Se han propuesto los complejos con iones radioactivos como potenciales agentes de diagnóstico por imágenes para la enfermedad de Alzheimer (Zhen et al., *J. Med. Chem.* (1999), Vol. 42, págs. 2805-2815). Sin embargo, el potencial de los complejos para cruzar la barrera hematoencefálica es limitado.

Un grupo de la Universidad de Pensilvania en los EE.UU. (Skovronsky, M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, Vol. 97, pp. 7609-7614) ha desarrollado un derivado marcado fluorescentemente de rojo congo que es permeable al cerebro y que no se une específicamente a materiales amiloides (esto es, péptidos en conformación de vaina plegada). Este compuesto necesitaría radiomarcarse y a continuación seguir un procedimiento de cribado preclínico para determinar su farmacocinética y toxicidad antes del ensayo clínico. Por el contrario, la invención de los inventores utiliza derivados de sustancias que se producen naturalmente solas o en combinaciones para el diagnóstico, prevención, pronóstico y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Klunk et al. notificaron experimentos con un derivado de Rojo Congo™, Chrisamina G ("CG"). Se ha notificado que CG se une bien al amiloide sintético *in vitro*, y cruza la barrera hematoencefálica en ratones normales (Klunk et al., *Neurobiol. Aging* (1994), Vol. 15, Nº 6, pp. 691-698). Bergstrom et al. han presentado un compuesto marcado con ¹²³I como un radioligando potencial para la visualización de los receptores M1 y M2 de la acetilcolina muscarínica en la enfermedad de Alzheimer (Bergstrom et al., *Eur. J. Nucl. Med.* (1999), Vol. 26, pp. 1482-1485).

Recientemente, se ha descubierto que determinados receptores de la quimioquina específicos están regulados en exceso en los cerebros de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (Horuk, R. et al., *J. Immunol.* (1997), Vol. 158, pp. 2882-2890); Xia et al., *J. NeuroVirol* (1999), Vol. 5, pp. 32-41). Además, se ha mostrado recientemente que el receptor CCR1 de la quimioquina está regulado en exceso en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer avanzada y ausente en cerebros envejecidos normales (Halks-Miller et al, CCR1 Immunoreactivity in Alzheimer's Disease Brains, Society for Neuroscience Meeting Abstract, Nº 787.6, Volumen 24, 1998). Se describen antagonistas del receptor CCR1 y su uso como agentes antiinflamatorios en la solicitud de patente PCT publicada WO 98/56771.

Ninguno de los anteriores propósitos descritos ha dado como resultado el desarrollo clínico de un agente de diagnóstico por imágenes para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer. Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad clínica de un agente de diagnóstico que podría utilizarse para un diagnóstico fiable y precoz de la enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, las estrategias propuestas podrían ser también útiles para la inhibición de la formación o acumulación de la placa amiloide en pacientes de Alzheimer.

Es interesante señalar que la angiogénesis se produce también en otras situaciones, pero que son indeseables, que incluyen el crecimiento y la metástasis de tumores sólidos; artritis reumatoide; psoriasis; escleroderma; y tres causas comunes de ceguera - retinopatía diabética, fibroplasia retrolental y glaucoma neovascular (de hecho, las enfermedades de los ojos están casi siempre acompañadas por vascularización. El proceso de angiogénesis de la herida tiene realmente muchas características en común con la angiogénesis tumoral. Por tanto, existen algunas dolencias, tales como la retinopatía diabética o la incidencia de tumores primarios o metastásicos, en los que la angiogénesis es indeseable. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de métodos mediante los cuales se inhiba el efecto de los agentes angiogénicos para el tratamiento de cánceres.

El documento WO 2005/027895 se refiere a la hormona tiroidea, a los análogos y los derivados de las hormonas tiroideas y sus formas poliméricas para el uso en la promoción o en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto.

El documento US 6. 740.680 se refiere a tratamientos que utilizan tetrac y/u otros compuestos tiromiméticos. Las composiciones se dirigen a suprimir la secreción de TSH sin inhibir la monodesyododinasa de tipo II específica de pituitaria y reduciendo o evitando a la vez la estimulación tiromimética de los tejidos periféricos en comparación con las dosis de L-tiroxina (T4) equivalentes supresoras de TSH.

El documento WO 00/78815 se refiere a anticuerpos injertados con LM609 potenciado que presentan afinidad de unión selectiva para $\alpha_v\beta_3$ o uno de sus fragmentos funcionales y se refiere a enfermedades mediadas por integrina.

El documento WO 03/075741 se refiere a la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de trastornos que utilizan un antagonista de la integrina $\alpha_v\beta_3$, y se menciona la vitaxina, junto con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa y/o un bifosfonato.

Sumario de la invención

La invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que las hormonas tiroideas, los análogos de las hormonas tiroideas, y sus formas poliméricas, actúan en la membrana celular y tienen propiedades proangiogénicas que son independientes de los efectos de las hormonas tiroideas. Por consiguiente, estos análogos de las hormonas tiroideas y las formas poliméricas (*es decir*, agentes angiogénicos) se pueden usar para tratar varios trastornos. De manera similar, la invención se basa también en el descubrimiento de que los antagonistas de análogos de las hormonas tiroideas inhiben el efecto proangiogénico de dichos análogos, y se pueden usar también para tratar varios trastornos.

Específicamente, la presente invención proporciona un agente antiangiogénesis para el uso en el tratamiento del glioma o el cáncer de mama, en el que el agente antiangiogénesis es ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) o ácido triyodotiroacético (TRIAC), o una de sus combinaciones, y en el que el agente antiangiogénesis actúa en la superficie celular para inhibir un agente proangiogénesis y en el que donde el agente antiangiogénesis se conjuga a un polímero mediante un enlace covalente.

En la presente invención, el agente antiangiogénesis es opcionalmente para la administración parenteral, oral, rectal o tópica, o una de sus combinaciones.

En la presente invención, el agente antiangiogénesis se administra simultáneamente con uno o más tratamientos antiangiogénesis o agentes quimioterapéuticos diferentes.

La presente divulgación proporciona información acerca de cómo tratar una dolencia susceptible de tratamiento promoviendo la angiogénesis administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad de una forma polimérica de la hormona tiroidea, o uno de sus análogos, eficaz para promover la angiogénesis. Se proporcionan ejemplos de dichas dolencias susceptibles de tratamiento para promover la angiogénesis en el presente documento y pueden incluir la enfermedad vascular oclusiva, enfermedad coronaria, disfunción eréctil, infarto de miocardio, isquemia, ictus, trastornos vasculares de las arterias periféricas, y heridas.

Se proporcionan también análogos de hormonas tiroideas en el presente documento y pueden incluir triyodotironina (T3), levotiroxina (T4), ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)-fenoxi acético (GC-1), o ácido 3,5-diyodotiropropiónico (DITPA), ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), y triyodotiroacético (TRIAC). En la Figura 20 hay análogos adicionales Tablas A-D. Estos análogos pueden conjugarse en alcohol polivinílico, copolímero de ácido acrílico etileno, poli(ácido láctico), o agarosa. La conjugación es mediante enlaces covalentes o no covalentes dependiendo del polímero utilizado.

En una realización la hormona tiroidea, los análogos de las hormonas tiroideas, o sus formas poliméricas se

administran mediante medios parenteral, oral, rectal, o tópico, o una de sus combinaciones. Los modos parenterales de administración incluyen, por ejemplo, los modos subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular, o intravenoso, tales como mediante catéter. Los modos tópicos de administración pueden incluir, por ejemplo, una tirita.

5 En otra realización, las hormonas tiroideas, los análogos de las hormonas tiroideas, o sus formas poliméricas pueden encapsularse o incorporarse en una micropartícula, liposoma, o polímero. El polímero puede incluir, por ejemplo, una poliglicolida, polilactida, o sus copolímeros. El liposoma o la micropartícula tienen un tamaño de aproximadamente
10 menos de 200 nanómetros, y se puede administrar mediante una o más rutas parenterales, u otro modo de administración. En otra realización, el liposoma o la micropartícula pueden presentarse en lechos capilares que rodean el tejido isquémico, o aplicarse l interior de un vaso sanguíneo mediante un catéter.

Las hormonas tiroideas, los análogos de las hormonas tiroideas, o sus formas poliméricas de acuerdo con la invención pueden también administrarse simultáneamente con una o más sustancias biológicamente activas que pueden incluir,
15 por ejemplo, factores de crecimiento, vasodilatadores, anticoagulantes, antivíricos, antibacterianos, antiinflamatorios, inmunosupresores, analgésicos, agentes de vascularización, o moléculas de adhesión celular, o una de sus combinaciones. En una realización, el análogo de la hormona tiroidea o la forma polimérica se administra como una inyección en bolo antes de o tras la administración de una o más sustancias biológicamente activas.

Los factores de crecimiento pueden incluir, por ejemplo, factor alfa de crecimiento transformante ("TGF α "), factor beta
20 de crecimiento transformante ("TGF β "), factor básico de crecimiento 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 una de sus combinaciones. Los anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, heparina, derivados de heparina, anti-factor Xa, anti-trombina, aspirina, clopidogrel, o una de sus combinaciones.

25 En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan métodos para promover la angiogénesis junto o alrededor de un dispositivo médico recubriendo el dispositivo con una hormona tiroidea, un análogo de hormona tiroidea, o un análogo de sus formas poliméricas como se describe aquí antes de insertar el dispositivo en un paciente. La etapa de revestimiento puede incluir además revestir el dispositivo con una o más sustancias biológicamente activas, tales como, pero sin limitación, un factor de crecimiento, un vasodilatador, un anticoagulante, o una de sus combinaciones. Los ejemplos de dispositivos médicos que se pueden revestir con análogos de la hormona tiroidea o las formas poliméricas incluyen prótesis endovasculares, catéteres, cánulas o electrodos.

35 Se describen también métodos para tratar una dolencia susceptible de tratamiento inhibiendo la angiogénesis en un sujeto que lo necesita una cantidad de un agente antiangiogénesis eficaz para inhibir la angiogénesis. Los ejemplos de las dolencias susceptibles de tratamiento que inhiben la angiogénesis incluyen tumores primarios o metastásicos, retinopatía diabética, y dolencias relacionadas. Se proporcionan también ejemplos de los agentes antiangiogénicos utilizados para inhibir la angiogénesis por la invención e incluyen el ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), ácido triyodotiroacético (TRIAC), anticuerpo LM609 monoclonal, XT 199 o sus combinaciones. Dichos agentes antiangiogénesis pueden actuar en la superficie celular para inhibir los agentes pro-angiogénesis.

40 En una realización, el agente antiangiogénesis se administra mediante un modo parenteral, oral, rectal, o tópico, o una de sus combinaciones. En otra realización, el agente antiangiogénesis puede administrarse simultáneamente con uno o más tratamientos o agentes quimioterapéuticos antiangiogénesis .

45 Además, un aspecto adicional proporciona composiciones (*es decir*, agentes angiogénicos) que incluyen hormonas tiroideas, y análogos conjugados a un polímero. La conjugación puede ser a través de un enlace covalente o no covalente, dependiendo del polímero. Se puede producir un enlace covalente a través de un enlace éster o anhídrido, por ejemplo. Se proporcionan también análogos de hormonas tiroideas e incluyen levotiroxina (T4), triyodotironina (T3), ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)-fenoxi acético (GC-1), o ácido 3,5-diyodotiropropiónico (DITPA). En una realización, el polímero puede incluir alcohol polivinílico, copolímero de ácido acrílico etileno, poli(ácido láctico), o agarosa.

50 Se describen formulaciones farmacéuticas que incluyen agentes angiogénicos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir también uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

55 Las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden estar encapsuladas o incorporadas en un liposoma, micropartícula, o polímero. El liposoma o la micropartícula tiene un tamaño de menos de aproximadamente 200 nanómetros. Cualquiera de las formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se puede administrar por medios parenteral, oral, rectal, o tópico, o una de sus combinaciones. En otra realización, las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse simultáneamente a un sujeto que lo necesita con una o más sustancias biológicamente activas que incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, vasodilatadores, anticoagulantes, o una de sus combinaciones.

60 En otros aspectos, esta divulgación se refiere al uso de análogos de las hormonas tiroideas y a las formulaciones

farmacéuticas que contienen dichas hormonas, para la restauración de las funciones neuronales y la potenciación de la supervivencia de las células neurales. Para el fin de esta divulgación, se supone que la función neuronal significa los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y anatómicos colectivos que permiten el desarrollo del sistema nervioso durante los periodos preembrionario y postnatal y que, en el animal adulto, es la base de los mecanismos regenerativos de las neuronas dañadas y de la capacidad adaptativa del sistema nervioso central cuando algunas partes del mismo degeneran y no pueden regenerarse.

Por lo tanto, se producen los siguientes procesos para conseguir funciones neuronales: desnervación, reinervación, sinaptogénesis, represión sináptica, expansión sináptica, la formación de yemas axonales, regeneración neural, desarrollo y organización de rutas y circuitos neurales para sustituir los dañados. Por lo tanto, los pacientes adecuados que se van a tratar con los análogos de las hormonas tiroideas poliméricas o sus combinaciones son pacientes que padecen de patologías degenerativas del sistema nervioso central (enfermedad de Alzheimer de tipo demencia senil, Parkinsonismo, corea de Huntington, adrenoleucodistrofia cerebelar - espinal), trauma e isquemia cerebral.

Se describen también métodos para tratar defectos de las neuronas motoras, que incluyen la esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, y lesión de la médula espinal, que comprende administrar un análogo polimérico de la hormona tiroidea, o una de sus combinaciones, y junto con factores de crecimiento, factores de crecimiento nervioso, u otros factores proangiogénicos o neurogénicos. Las lesiones de la médula espinal incluyen lesiones resultantes de un tumor, trauma mecánico, y trauma químico. Se contemplan los mismos o similares métodos para restaurar la función motora en un mamífero que tiene esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, o una lesión de médula espinal. Administrar uno de los análogos de hormonas tiroideas poliméricas anteriormente mencionados solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos proporciona también 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 médula espinal. También, la administración de análogos de hormonas tiroideas poliméricas solos o junto con factores de crecimiento nervioso o factores neurogénicos preserva la integridad de la ruta nigroestriatal.

Específicamente, los métodos para tratar (pre o postsintómicamente) la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple, o una lesión de médula espinal comprenden administrar un análogo de hormona tiroidea polimérica solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. Opcionalmente, la hormona tiroidea polimérica sola o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos es un complejo soluble, que comprende al menos una hormona tiroidea polimérica sola o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos.

Se describen también composiciones y métodos de tratamiento terapéuticos que comprenden administrar a una mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína morfogénica ("un análogo de la hormona tiroidea polimérica solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos"), tal como se define en el presente documento, tras la lesión de una ruta neural, o como anticipo de dicha lesión, durante un tiempo y a una concentración suficiente para mantener la ruta neural, incluyendo la reparación de las rutas dañadas, o la inhibición adicional del daño de las anteriores.

Se describen también composiciones y métodos de tratamiento terapéuticos para mantener las rutas neurales. Dichos métodos de tratamiento incluyen administrar al mamífero, tras la lesión a una ruta neural o como anticipo de dicha lesión, un compuesto que estimula una concentración terapéuticamente eficaz de un análogo endógeno de hormona tiroidea polimérica. Estos compuestos se denominan en el presente documento como análogos de hormonas tiroideas poliméricas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros agentes estimuladores de factores neurogénicos, o una lesión de médula espinal comprenden administrar un análogo polimérico de hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, y se entiende que incluyen sustancias que, cuando se administran a un mamífero, actúan sobre el/los tejido(s) u órgano(s) que normalmente son responsables de, o capaces de, producir un análogo polimérico de hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos y/o secretar un análogo polimérico de hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, y que ocasionan una alteración en el nivel endógeno de los análogos de la hormona tiroidea polimérica sola o junto con un factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos.

En particular, esta divulgación proporciona métodos para proteger neuronas de los efectos destructores del tejido asociados con la respuesta inmune e inflamatoria del cuerpo a la lesión nerviosa. Se proporcionan también métodos para estimular las neuronas para mantener su fenotipo diferenciado, que incluyen inducir la re diferenciación de las células transformadas de origen neuronal hasta una morfología característica de neuronas no transformadas. En uno, esta divulgación puede proporcionar medios para estimular la producción de moléculas de adhesión celular, particularmente, moléculas de adhesión de células nerviosas ("N-CAM").

Se proporcionan también métodos, composiciones y dispositivos para estimular la reparación celular de las neuronas dañadas y las rutas neurales, incluyendo la regeneración de dendritas o axones dañados. Además, se proporcionan también medios para evaluar el estado del tejido nervioso, y para detectar y vigilar neuropatías controlando las fluctuaciones en los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u

otros niveles de factores neurogénicos.

En un aspecto de la presente divulgación, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son útiles en la reparación de rutas neurales dañadas del sistema nervioso periférico. En particular, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores son útiles en la reparación de rutas neurales dañadas, que incluyen fibras nerviosas seccionadas o dañadas de otra manera. Específicamente, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son capaces de estimular la regeneración nerviosa axonal completa, incluyendo la vascularización y la reformación de la vaina de mielina. Preferentemente, se proporcionan análogos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos en el sitio de lesión en un transportador resorbible biocompatible que pueden mantener los análogos de poliméricos de la hormona tiroidea solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos en el sitio y, según necesidad, medios para dirigir el crecimiento axonal desde los extremos proximales a los distales de una neurona cortada. Por ejemplo, pueden requerirse medios para dirigir el crecimiento axonal cuando se va a inducir la regeneración nerviosa en una distancia mayor, tal como de más de 10 mm. Están abarcados muchos transportadores que pueden proporcionar estas funciones. Por ejemplo, los transportadores útiles incluyen materiales sustancialmente insolubles o soluciones viscosas preparadas tal como se describe en el presente documento que comprenden laminina, ácido hialurónico o colágeno, u otros materiales poliméricos biocompatibles sintéticos adecuados, tales como ácidos polilácticos, poliglicólicos o polibutíricos y/o sus copolímeros. Un transportador preferido comprende una composición de matriz extracelular derivada, por ejemplo, de células de sarcoma de ratón.

Un análogo polimérico de hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros puede estar dispuesto en un canal de guiado de nervios que abarca la distancia de la ruta dañada. El canal actúa como una cubierta protectora y un medio físico para guiar el crecimiento de una neurita. Los canales útiles comprenden una membrana biocompatible, que puede tener una estructura tubular, que tiene una dimensión suficiente para abarcar el hueco en el nervio que se va a reparar, y que tiene aberturas adaptadas para recibir extremos nerviosos cortados. La membrana puede prepararse de cualquier material no irritante biocompatible, tal como un polímero de silicona o biocompatible, tal como polietileno o poliacetato de etilenvinilo. El material colado puede estar compuesto de polímeros bioresorbibles biocompatibles incluyendo, por ejemplo, colágeno, ácido hialurónico, ácidos poliláctico, polibutírico, y poliglicólico. La superficie externa del canal puede ser sustancialmente impermeable.

Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden estar dispuestos en el canal en asociación con un material transportador biocompatible, o puede adsorberse o asociarse de otra manera con la superficie interna del material colado, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos nº 5.011.486, con la condición de que los análogos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nerviosos u otros factores neurogénicos sean accesibles.

Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas, solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son útiles para proteger el daño asociado con la respuesta inmune/inflamatoria del cuerpo a una lesión inicial en el tejido nervioso. Dicha respuesta puede seguir al traumatismo del tejido nervioso, producida, por ejemplo, por una disfunción autoinmune, lesión neoplásica, infección, trauma químico o mecánico, enfermedad, interrupción del flujo sanguíneo a las neuronas o a las células gliales, o por otros traumatismos en los nervios o el material que los rodea. Por ejemplo, se cree que el daño principal resultante de hipoxia o reperfusión por isquemia que sigue a la oclusión de un suministro de sangre neural, como en un ictus embólico, está inmunológicamente asociado. Además, al menos parte del daño asociado con numerosos tumores cerebrales primarios parece también estar inmunológicamente relacionado. La aplicación de un análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos alivia y/o inhibe tanto directa como sistémicamente la respuesta inmunológicamente relacionada con una lesión neural. Como alternativa, también puede usarse la administración de un agente que pueda estimular la expresión y/o la secreción in vivo de análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos de expresión, preferentemente en el sitio de la infección. En el que la lesión que se va a inducir, como durante la cirugía u otro tratamiento clínico agresivo, los análogos poliméricos de las hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores o agentes neurogénicos se pueden proporcionar antes de la inducción de la lesión para proporcionar un efecto neuroprotector al tejido nervioso en riesgo.

En general, los análogos poliméricos de las hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos útiles en los métodos y composiciones de la invención son proteínas diméricas que inducen la morfogénesis de una o más células tejidos u órganos eucariotas (por ejemplo, de mamíferos). La morfogénesis del tejido incluye la formación de tejido de novo o regenerativa, tal como se produce en embriones de vertebrados durante el desarrollo. De particular interés son los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos que inducen la morfogénesis específica del tejido al menos del tejido óseo o el tejido neural. Tal como se ha definido en el presente documento, un análogo polimérico de hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos comprenden una pareja de polipéptidos que, cuando se pliegan, forman una proteína dimérica que estimula respuestas morfogenéticas en células y tejidos que expresan receptores tiroideos. Esto es, los análogos poliméricos

de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos inducen generalmente una cascada de acontecimientos que incluyen los siguientes en un entorno morfogénicamente permisivo: estimulación de la proliferación de células precursoras; estimulando la diferenciación de células precursoras; estimulando la proliferación de células diferenciadas; y, soportando el crecimiento y el mantenimiento de células diferenciadas. Células "precursoras" son células no comprometidas que son competentes para diferenciarse en uno a más tipos específicos de células diferenciadas, dependiendo de su repertorio genómico y de la especificidad del tejido del entorno permisivo en el que se induce la morfogénesis. Una célula precursora ilustrativa es un citoblasto hematopoyético, un citoblasto mesenquimatoso, una célula del epitelio basal, una célula de la cresta neural, o similares. Además, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden retrasar o mitigar el comienzo de la senescencia o quiescencia asociada a la pérdida de fenotipo y/o la función tisular. Adicionalmente además, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden estimular la expresión fenotípica de un tipo de célula diferenciada, incluyendo sus propiedades de expresión metabólica y/o funcional, por ejemplo, secretoria. Además, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden inducir la rediferenciación de células comprometidas (por ejemplo, osteoblastos, neuroblastos, o similares) en condiciones adecuadas. Tal como se ha indicado anteriormente, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos que inducen la proliferación y/o la diferenciación de al menos un tejido óseo o tejido neural, y/o soporten el crecimiento, el mantenimiento y/o las propiedades funcionales del tejido neural, son de particular interés en el presente documento.

De particular interés son los análogos poliméricos de hormonas tiroidea solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos que, cuando se proporcionan a un tejido específico de un mamífero, inducen la morfogénesis específica de tejido o mantiene el estado normal de la diferenciación y el crecimiento de este tejido. El presente análogo polimérico de hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos puede inducir la formación de tejidos corporales de vertebrados (por ejemplo, aves o mamíferos), tales como pero sin limitarse a nervios, ojo, hueso, cartílago, médula ósea, ligamento, dentina de diente, periodonto, hígado, riñón, pulmón, corazón, o revestimiento gastrointestinal. Se pueden llevar a cabo los métodos preferidos en el contexto de desarrollo del tejido embrionario, o en un sitio de herida aséptica no cicatrizada en el tejido post embrionario.

Se describen también composiciones y métodos para utilizar análogos y polímeros de hormonas tiroideas para la obtención de imágenes y el diagnóstico de trastornos neurodegenerativos, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, se describen análogos de T4 que tienen una elevada especificidad para los sitios diana cuando se administran a un sujeto in vivo. Los análogos de T4 preferidos muestran una relación diana a no diana de al menos 4:1, son estables in vivo y se localizan sustancialmente con la diana 1 hora después de la administración. Se describen también composiciones farmacéuticas comprendidas por un enlazador unido a los análogos de T4 para la obtención de imágenes de rayos gamma para tecnecio, indio, utilizando emisión de fotón único ("SPECT") y con agentes de contraste para la obtención de imágenes de RMI. Adicionalmente, los análogos halogenados que se unen a TTR pueden inhibir la formación de fibrillas amiloides y de esta manera se pueden utilizar para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dichos compuestos se pueden usar también con métodos de diagnóstico por imágenes de tomografía de emisión de positrones ("PET").

Esta divulgación incluye también composiciones y métodos para modular acciones de factores de crecimiento y otros polipéptidos cuyos receptores de la superficie celular se agrupan alrededor de la integrina $\alpha\beta3$, 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 de tipo insulina, factores de crecimiento epidérmico, e interferon- γ .

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efectos de L-T4 y L-T3 sobre la angiogénesis cuantificada en el ensayo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM). A, Se expusieron las muestras del control a PBS y las muestras adicionales a 1 nM de T3 o 0,1 $\mu\text{mol/l}$ de T4 durante 3 días. Ambas hormonas produjeron una ramificación creciente de vasos sanguíneos en estas imágenes representativas de 3 experimentos. B, Tabulación del promedio \pm SEM de las nuevas ramificaciones formadas a partir de vasos sanguíneos existentes durante el periodo experimental elaborado de 3 experimentos, cada uno de los cuales incluyó 9 ensayos de membranas corioalantoideas. A las concentraciones que se muestran, T3 y T4 produjeron efectos similares (aumentos de 1,9 veces y 2,5 veces, respectivamente, en la formación de ramificaciones). ** $P < 0,001$ mediante un ANOVA monolateral, comparando las muestras de CAM tratadas con PBS y tratadas con hormonas.

Figura 2. Tetrac inhibe la estimulación de la angiogénesis por T4 y T4 unido a la agarosa (T4-ag). A, Se observa un aumento de 2,5 veces en la formación de ramificaciones de vasos sanguíneos en una preparación de CAM representativa expuesta a 0,1 $\mu\text{mol/l}$ de T4 durante 3 días. En 3 experimentos similares, se produjo un aumento de 2,3 veces. Se inhibió este efecto de la hormona mediante tetrac (0,1 $\mu\text{mol/l}$), un análogo de T4 del que se ha mostrado anteriormente que inhibe las acciones de la membrana plasmática de T4. 13 Tetrac solo no estimulan la angiogénesis (C). B, T4-ag (0,1 $\mu\text{mol/l}$) estimula la angiogénesis 2,3 veces (2,9 veces en los 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 (promedio \pm SEM) de 10 imágenes de cada condición experimental en cada uno de 3 experimentos. ** $P < 0.001$ mediante ANOVA, comparando las muestras tratadas con T4 y las muestras tratadas con T4-agarosa con las muestras del control tratadas con PBS.

Figura 3. Comparación de los efectos proangiogénicos de FGF2 y T4. A, Los efectos en paralelo de T4 (0,05 $\mu\text{mol/l}$) y FGF2 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) en concentraciones submáximas son aditivos en el ensayo de CAM e igualan el nivel de la angiogénesis que se observa con FGF2 (1 $\mu\text{g/ml}$ en ausencia de T4). B, Resumen de resultados de 3 experimentos que examinaron las acciones de FGF2 y T4 en el ensayo de CAM (promedios \pm SEM) como en A. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$, comparando los datos de las muestras tratadas con los de las muestras del control tratadas con PBS en 3 experimentos.

Figura 4. Efecto de anti-FGF2 sobre la angiogénesis producida por T4 o FGF2 exógeno. A, FGF2 produjo un aumento de 2 veces en la angiogénesis en el modelo de CAM en 3 experimentos, un efecto inhibido por el anticuerpo (ab) de FGF2 (8 μg). T4 también estimuló la angiogénesis en 1,5 veces, y este efecto fue bloqueado también por el anticuerpo de FGF2, indicando que la acción de la hormona tiroidea en el modelo CAM está mediado por un efecto autocrino/paracrino de FGF2 debido a que T4 y T3 producen la liberación de FGF2 de las células en el modelo CAM (Tabla 1). Los inventores habían demostrado previamente que un anticuerpo de IgG no específico no tiene efecto sobre la angiogénesis en el ensayo de CAM. B, Resumen de los resultados de 3 experimentos de CAM que estudió la acción de FGF2-ab en presencia de FGF2 o T4. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$, indicando efectos significativos en 3 experimentos que estudian los efectos de la hormona tiroidea y de FGF2 sobre la angiogénesis y la pérdida de estos efectos en presencia del anticuerpo dirigido a FGF2.

Figura 5. Efecto de PD 98059, un inhibidor de la cascada de transducción de la señal de MAPK (ERK1/2), sobre la angiogénesis inducida por T4, T3, y FGF2. A, La angiogénesis estimulada por T4 (0,1 $\mu\text{mol/l}$) y T3 (1 nmol/l) juntos quedó completamente inhibida por PD 98059 (3 $\mu\text{mol/l}$). B, La angiogénesis inducida por FGF2 (1 $\mu\text{g/ml}$) también quedó inhibida por PD 98059, indicando que la acción del factor de crecimiento es también dependiente de la activación de la ruta de ERK1/2. En el contexto de los experimentos que implican T4-agarosa (T4-ag) y tetrac (Figura 2) indicando que T4 inicia su efecto proangiogénico en la membrana celular, los resultados que se muestran en A y B son consistentes con 2 papeles jugados por MAPK en la acción proangiogénica de la hormona tiroidea: ERK1/2 transduce la señal inicial de la hormona que conduce a la elaboración de la señal inicial de la hormona que conduce a la elaboración de FGF2 y transduce la acción posterior de FGF2 sobre la angiogénesis. C, Resumen de resultados de 3 experimentos, representados por A y B, que muestran el efecto de PD98059 sobre las acciones de T4 y FGF2 en el modelo de CAM. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$, indicando los resultados de ANOVA sobre los datos de 3 experimentos.

Figura 6. T4 y FGF2 activan MAPK en células endoteliales ECV304. Se prepararon las células en medio M199 con suero de hormona agotado al 0,25 % y se trataron con T4 (0,1 $\mu\text{mol/l}$) durante 15 minutos a 6 horas. Se recogieron las células y se prepararon las fracciones nucleares como se ha descrito anteriormente. Las nucleoproteínas, separadas mediante electroforesis en gel, se inmunotransfirieron con anticuerpos a MAPK fosforilado (pERK1 y pERK2, 44 y 42 kDa, respectivamente), seguido por un segundo anticuerpo unido a un sistema de detección mediante luminiscencia. La inmunotransferencia de A β -actina de fracciones nucleares sirve como control de la carga del gel en cada parte de esta figura. Cada inmunotransferencia es representativa de 3 experimentos. A, T4 produce un aumento de la fosforilación y la translocación nuclear de ERK1/2 en células ECV304. El efecto es máximo en 30 minutos, aunque el efecto sigue permaneciendo durante ≥ 6 horas. B, Se trataron 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 cual se añadió T4 10^{-7} M 15 minutos a las muestras de células tal como se muestra. Se recogieron los núcleos, y este experimento representativo muestra un aumento de la fosforilación (activación) de ERK1/2 por T4 (banda 4), que se bloqueó por ambos inhibidores (bandas 5 y 6), sugiriendo que la actividad de PKC es un requisito para la activación de MAPK por T4 en células endoteliales. C, Se trataron las células ECV304 tanto con T4 (10^{-7} mol/l), FGF2 (10 ng/ml), o ambos agentes durante 15 minutos. La figura muestra la acumulación de pERK1/2 en núcleos por el tratamiento tanto con hormonas como con los factores de crecimiento y la mejora en la acumulación nuclear de pERK1/2 con ambos agentes juntos.

Figura 7. T4 aumenta la acumulación de ADN de FGF2 en células endoteliales ECV304. Se trataron las células durante 6 a 48 horas con T4 (10^{-7} mol/l) y se aislaron los ADNc de FGF2 y GAPDH de cada alícuota de células. Los niveles de ADNc de FGF2, que se muestran en la transferencia superior, se corrigieron para las variaciones en el ADNc de GAPDH, que se muestran en la transferencia inferior, y se ilustran a continuación en la gráfica los niveles corregidos de FGF2 (promedio \pm SE del promedio; $n = 2$ experimentos). Hubo una mayor abundancia del transcrito de FGF2 en el ARN extraído de las células tratadas con T4 en todos los puntos temporales. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, indicando la comparación mediante ANOVA de los valores en cada punto temporal hasta el valor del control.

Figura 8. Modelo de crecimiento de tumor en embriones de pollo en el día 7. Ilustración del modelo de membrana corioalantoidea de pollo (CAM) de implante tumoral.

Figura 9. T₄ estimula la cicatrización 3D de la herida. Las fotografías de células de fibroblastos dérmicos humanos se expusieron a T₄ y al control, de acuerdo con el ensayo 3D de cicatrización de heridas descrito en el presente documento.

Figura 10. T₄ dependiente de dosis aumenta la cicatrización de heridas, Día 3. Como se indica por la gráfica, T₄ aumenta la cicatrización de heridas (medida por células que emigran) de una manera dependiente a la dosis entre concentraciones de 0,1 μ M y 1,0 μ M. No se observa el mismo aumento en concentraciones de T₄ entre 1,0 μ M y 3,0 μ M.

Figura 11. Efecto de T₄ y T₃ en la unión de ¹²⁵I-T₄ a una integrina purificada. Se añadieron T₄ (10^{-4} M a 10^{-11} M) o T₃ (10^{-4} M a 10^{-8} M) a una integrina α V β 3 purificada (2 μ g/muestra) y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron dos microcurios de T₄ marcado con ¹²⁵I a cada muestra. Las muestras se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente, se mezclaron con un colorante cargado, y se analizaron en un gel Native al 5 % durante 24 horas a 4 °C a 45 mA. Tras la electroforesis, los geles se envolvieron en una envoltura de plástico y se expusieron a una película. ¹²⁵I-T₄ unida a α V β 3 purificada no se vio afectada por T₄ no marcada en el intervalo de 10^{-11} M a 10^{-7} M, pero es competitiva de una manera dependiente de la dosis con una T₄ no marcada a una concentración de 10^{-6} M. La unión de T₄ caliente a la integrina está casi completamente desplazada por la T₄ no marcada a 10^{-4} M. n T₃ es menos eficaz en la unión competitiva de T₄ a α V β 3, reduciendo la señal en un 11 %, 16 %, y 28 % a 10^{-6} M, 10^{-5} M, y 10^{-4} M T₃, respectivamente.

Figura 12. Tetrac y un péptido que contiene RGD, pero no un péptido que contiene RGE, compiten por la unión de T₄ a α V β 3 purificada. A) La adición de tetrac a α V β 3 purificada reduce la unión de T₄ marcada con ¹²⁵I a la integrina de una manera dependiente de la dosis. 10^{-8} M de tetrac es ineficaz en la unión competitiva de T₄ mediante calor a la integrina. La asociación de T₄ y α V β 3 se redujo en un 38 % en presencia de 10^{-7} M de tetrac y en un 90 % con 10^{-5} M de tetrac. La adición de un péptido RGD a 10^{-5} M compite por la unión de T₄ a α V β 3. La aplicación de 10^{-5} M y 10^{-4} M del péptido RGE, como control para el péptido RGD, no pudo disminuir la unión de T₄ mediante calor a α V β 3 purificada. B) representación gráfica de los datos de tetrac y RGD procedentes del panel A. Los datos puntuales se muestran como el promedio \pm S.D. para 3 experimentos independientes.

Figura 13. Efectos del anticuerpo monoclonal LM609 sobre la unión de T₄ a α V β 3. A) Se añadió LM609 a α V β 3 a las concentraciones indicadas. Un μ g de LM609 por muestra reduce la unión de T₄ marcada a la integrina en un 52 %. Se alcanzó la inhibición máxima de la unión de T₄ a la integrina cuando las concentraciones de LM609 son de 2 μ g por muestra y se mantiene con concentraciones de anticuerpo tan elevadas como de 8 μ g. Como control para la especificidad del anticuerpo, se añadieron 10 μ g/muestra de mAB Cox- 2 y 10 μ g/muestra de IgG de ratón a α V β 3 antes de la incubación con T₄. B) representación gráfica de los datos del panel A. Los datos puntuales se muestran como el promedio \pm S.D. para 3 experimentos independientes.

Figura 14. Efecto de RGD, RGE, tetrac, y el mAB LM609 en la activación de MAPK inducida por T₄. A) Células CV-1 (hasta un 50-70 % de confluencia) se trataron durante 30 min. con T₄ 10^{-7} M (10^{-7} M de concentración total, concentración 10^{-10} M en forma libre. Las muestras seleccionadas se trataron durante 16 horas con las concentraciones indicadas de cualquiera de un péptido que contiene RGD, un péptido que contiene RGE, tetrac, o LM609 antes de la adición de T₄. Se separaron las proteínas nucleares mediante SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con anticuerpo dirigido contra fosfo-MAPK (pERK 1/2). La acumulación nuclear de pERK1/2 disminuyó en las muestras tratadas con 10^{-6} M del péptido RGD o más, pero no se alteró significativamente en muestras tratadas con 10^{-4} M de RGE. La acumulación de pERK1/2 disminuyó en un 76 % en células CV1 tratadas con 10^{-6} M de tetrac, mientras que 10^{-5} M y concentraciones mayores de tetrac reducen la acumulación nuclear de pERK1/2 a niveles similares a las muestras del control no tratadas. El anticuerpo monoclonal LM609 dirigido contra α V β 3 disminuye la acumulación de MAPK activado en el núcleo cuando se aplica a cultivos de CV1 a una concentración de 1 μ g/ml. B) Representación gráfica de los datos de RGD, RGE, y tetrac mostrados en el panel A. Los datos puntuales representan el promedio \pm S.D. de 3 experimentos separados.

Figura 15. Efectos del ARNip en α V y β 3 sobre la activación de MAPK inducida por T₄. Se transfectaron células CV1 con ARNip (concentración final 100 nM) de α V, β 3, o α V y β 3 juntos. Dos días después de la transfección, las células se trataron con T₄ 10^{-7} M. A) Se realizó una RT-PCR a partir de ARN aislado procedente de cada grupo de transfección para verificar la especificidad y la funcionalidad de cada ARNip. B) Se aislaron proteínas nucleares de cada transfección y se sometieron a SDS-PAGE.

Figura 16. Efecto inhibitor del mAB (LM609) dirigido contra α V β 3 sobre la angiogénesis estimulada por T₄ en el modelo CAM. A) Se expusieron las muestras a PBS, T₄ (0,1 μ M), o T₄ más 10 mg/ml de LM609 durante 3 días. La angiogénesis estimulada por T₄ quedó sustancialmente inhibida por la adición del anticuerpo monoclonal LM609 dirigido contra α V β 3. B) Tabulación del promedio \pm SEM de las nuevas ramificaciones formadas a partir de vasos sanguíneos existentes durante el periodo experimental. Los datos se obtuvieron de 3 experimentos separados, que contenían cada uno 9 muestras en cada grupo de tratamiento. C, D) La angiogénesis estimulada

por T4 o FGF2 se inhibió también mediante la adición del anticuerpo monoclonal LM609 o XT 199 dirigido contra $\alpha V\beta 3$.

Figura 17. Composiciones poliméricas de análogos de hormonas tiroideas - Conjugación polimérica mediante un enlace éster utilizando alcohol polivinílico. En esta preparación se puede esterificar alcohol polivinílico comercialmente disponible (o los copolímeros relacionados) mediante tratamiento con el cloruro de ácido de análogos de hormonas tiroideas, concretamente la forma del cloruro de ácido. La sal de clorhidrato se neutralizó mediante la adición de trietilamina para dar como resultado clorhidrato de trietilamina que se puede eliminar por lavado con agua tras la precipitación de la forma de éster polimérico de la hormona tiroidea de diferentes análogos. El enlace éster con el polímero puede experimentar hidrólisis *in vivo* para liberar el análogo activo de la hormona tiroidea pro-angiogénesis.

Figura 18. Composiciones poliméricas de análogos de hormonas tiroideas - Conjugación polimérica mediante un enlace anhídrido utilizando copolímero de ácido acrílico etileno. Esto es similar a la conjugación covalente de polímero previa, sin embargo, esta vez se realiza a través de un enlace anhídrido que se deriva de la reacción de un copolímero de ácido acrílico. Este enlace anhídrido es también susceptible a hidrólisis *in vivo* para liberar el análogo de la hormona tiroidea. La neutralización del ácido clorhídrico se consigue mediante tratamiento con trietilamina y el posterior lavado del polímero polianhídrido precipitado con agua elimina el subproducto del clorhidrato de trietilamina. Esta reacción conducirá a la formación de un copolímero de ácido acrílico de la hormona tiroidea + trietilamina. Tras la hidrólisis *in vivo*, el análogo de la hormona tiroidea se liberará en el tiempo que se puede controlar más un copolímero de ácido acrílico etileno.

Figura 19. Composiciones poliméricas de análogos de hormonas tiroideas - Atrapamiento en un polímero de ácido poliláctico.

Los polímeros de poliéster de ácido poliláctico (PLA) experimentan hidrólisis *in vivo* del monómero de ácido láctico y esto se ha aprovechado como vehículo para sistemas de administración de fármacos en seres humanos. A diferencia de los dos métodos covalentes anteriores en los que el análogo de la hormona tiroidea está unido mediante un enlace químico al polímero, este sería un método *no covalente* que encapsularía el análogo de hormona tiroidea en perlas de polímero PLA. Esta reacción conducirá a la formación del análogo de la hormona tiroidea que contiene perlas de PLA en agua. El filtro y el lavado darán como resultado la formación del análogo de la hormona tiroidea que contiene perlas de PLA, que tras hidrólisis *in vivo* conducirá a la generación de niveles controlados de hormona tiroidea más ácido láctico.

Figura 20. Análogos de hormonas tiroideas que se pueden conjugar con diversos polímeros. A-D muestra las sustituciones requeridas para conseguir diversos análogos de hormonas tiroideas que se pueden conjugar para crear formas poliméricas de análogos de hormonas tiroideas de la invención.

Figura 21. Ensayo de angiogénesis tridimensional *in vitro* La Fig. 21 es un protocolo y una ilustración del ensayo de formación de brotes tridimensional *in vitro* para las perlas revestidas de fibrina en el endotelio microvascular humano.

Figura 22. Angiogénesis de la formación de brotes *in vitro* de HOMECEC en la fibrina 3-D. La Fig. 22 es una ilustración de la formación de brotes en células endoteliales microvasculares humanas en tres dimensiones con diferentes aumentos

Figuras 23A-E. Liberación de plaquetas derivadas de factores de cicatrización de heridas en presencia de un bajo nivel de colágeno

Figuras 24A-B. T4 y T3 no marcadas desplazan $[^{125}I]$ -T4 de la integrina purificada. T4 (10^{-11} M a 10^{-4} M) o T3 no marcadas (10^{-8} a 10^{-4} M) se añadieron a la integrina $\alpha V\beta 3$ purificada (2 $\mu\text{g}/\text{muestra}$) antes de la adición de $[^{125}I]$ -T4. **(a)** La unión de $[^{125}I]$ -T4 a la $\alpha V\beta 3$ purificada no se vio afectada por la T4 no marcada en el intervalo de 10^{-11} M a 10^{-7} M, sino que se desplazó de una manera dependiente de la concentración por la T4 no marcada a concentraciones $\geq 10^{-6}$ M. T3 fue menos eficaz al desplazar la unión de T4 a $\alpha V\beta 3$. **(b)** La presentación gráfica de los datos de T4 y T3 muestra el promedio \pm S.D. 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 la $\alpha V\beta 3$ purificada. **(a)** La preincubación de la $\alpha V\beta 3$ purificada con tetrac o un péptido que contiene RGD redujo la interacción entre la integrina y $[^{125}I]$ -T4 de una manera dependiente de la dosis. La aplicación de 10^{-5} M y 10^{-4} M del péptido RGE, como controles para el péptido RGD, no disminuye la unión de T4 marcada a la $\alpha V\beta 3$ purificada. **(b)** La presentación gráfica de los datos de tetrac y RGD indica el promedio de \pm S.D. de los resultados de 3 experimentos independientes.

Figuras 26A-B. Los anticuerpos de la integrina inhiben la unión de T4 a $\alpha V\beta 3$. Los anticuerpos LM609 y SC7312 se añadieron a $\alpha V\beta 3$ a las concentraciones indicadas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 min antes de la adición de $[^{125}I]$ -T4. Se alcanzó la inhibición máxima de la unión de T4 a la integrina cuando la concentración de LM609 fue de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se mantuvo con concentraciones de anticuerpo tan elevadas como 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. SC7312 redujo la unión de T4 a $\alpha V\beta 3$ en un 46 %

a 2 µg/ml de anticuerpo/muestra y en un 58 % cuando estuvieron presentes 8 µg/ml de anticuerpo. Como control para la especificidad del anticuerpo, se añadieron 10 µg/ml de mAb dirigido contra αVβ3 (P1F6) y 10 µg/ml de IgG de ratón a αVβ3 antes de la incubación con T4. La gráfica muestra el promedio ± S.D. de los datos de 3 experimentos independientes.

Figuras 27A-B. Efecto de los péptidos RGD y RGE, tetrac, y el mAb LM609 sobre la activación de T4 inducida por MAPK. **(a)** La acumulación nuclear de pERK1/2 disminuyó en muestras tratadas con 10^{-6} M o más del péptido RGD, pero no se alteró significativamente en muestras tratadas con hasta 10^{-4} M de RGE. La acumulación de pERK1/2 en células CV-1 tratadas con 10^{-5} M de tetrac y T4 fue similar a los niveles observados en las muestras del control sin tratar. LM609, un anticuerpo monoclonal dirigido contra αVβ3, disminuyó la acumulación de MAPK activado en el núcleo cuando se aplicó a cultivos de CV-1 a una concentración de 1 µg/ml. **(b)** La gráfica muestra el promedio ± S.D. de los datos de 3 experimentos independientes. Se incluyeron inmunotransferencias con anticuerpos dirigidos contra la α-tubulina como controles de carga de geles.

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

Figuras 29A-B. Efecto inhibitor del mAb (LM609) dirigido contra αVβ3 sobre la angiogénesis estimulada por T4-en el modelo CAM. Se expusieron las CAM a discos con filtro tratados con PBS, T4 (10^{-7} M), o T4 más 10 µg/ml de LM609 durante 3 días. **(a)** La angiogénesis estimulada por T4 quedó sustancialmente inhibida por la adición del anticuerpo monoclonal LM609 dirigido contra αVβ3. **(b)** Se muestra la tabulación del promedio ± SEM de las nuevas ramificaciones formadas a partir de vasos sanguíneos existentes durante el periodo experimental. ***P<0,001, comparando los resultados de las muestras tratadas con T4/LM609 con las muestras tratadas con T4 en 3 experimentos separados, que contenían cada uno 9 imágenes en cada grupo de tratamiento. Se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA monolateral.

Descripción detallada de la invención

Las características y otros detalles de la invención se describirán ahora más particularmente con referencia a los dibujos que la acompañan, y como se apunta en las reivindicaciones. Por conveniencia, se recogen aquí determinados términos utilizados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones. Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente una persona normalmente experta en la materia a la que pertenece la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "agente angiogénico" incluye cualquier compuesto o sustancia que promueve o estimula la angiogénesis, en solitario o junto con otra sustancia. Los ejemplos incluyen 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, los términos "agente anti-angiogénesis" o "agente anti-angiogénico" se refieren a cualquier compuesto o sustancia que inhibe o perjudica la angiogénesis, en solitario o junto con otra sustancia. Los ejemplos incluyen TETRAC, TRIAC, XT 199, y el mAb LM609.

Tal como se usa en el presente documento, el término "isquemia de miocardio" se define como un suministro de sangre insuficiente al músculo cardíaco producido por una capacidad disminuida de los vasos sanguíneos. Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad coronaria" se define como enfermedades/trastornos de la función cardíaca debidos a un desequilibrio entre la función del miocardio y la capacidad de los vasos coronarios de suministrar suficiente flujo de sangre para la función normal. Las enfermedades/trastornos coronarios específicos asociados con la enfermedad coronaria que se pueden tratar con las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen la isquemia de miocardio, angina de pecho, aneurisma coronario, trombosis coronaria, vasoespasma coronario, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad cardíaca coronaria, oclusión coronaria y estenosis coronaria.

Tal como se usa en el presente documento, "enfermedad vascular periférica oclusiva" (conocida también como trastorno oclusivo arterial periférico) es un bloqueo que implica un trastorno vascular en las arterias carótida o femoral, que incluyen la arteria ilíaca. El bloqueo en las arterias femorales produce dolor y movimiento restringido. Un trastorno específico asociado con enfermedad vascular periférica oclusiva es el pie diabético, que afecta a pacientes diabéticos, dando como resultado a menudo la amputación del pie.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "regeneración de los vasos sanguíneos", "angiogénesis", "revascularización" y "circulación colateral aumentada" (o las palabras que la afectan) se consideran como sinónimos.

El término "farmacéuticamente aceptable", cuando se refiere a sustancias naturales o sintéticas significa que la sustancia tiene un efecto tóxico aceptable a la vista de su efecto mucho más beneficioso, mientras que el término relacionado, "fisiológicamente aceptable" significa que la sustancia tiene una toxicidad relativamente baja. El término, "administrado simultáneamente" significa que se administran dos o más fármacos a un paciente en aproximadamente el mismo momento o en una estrecha secuencia con el fin de que sus efectos se desarrollen aproximadamente de forma simultánea o sustancialmente solapada. Este término incluye la administración de fármaco secuencial así como simultánea.

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

"Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseables, 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 retienen la eficacia y las propiedades biológicas de los ácidos libres, que no son biológicamente o de otro modo indeseables. Estas sales se preparan a partir de la adición de una base inorgánica o de una base orgánica al ácido libre. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, pero no se limitan a, 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 obtenidas a partir de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, las 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 isopropilamina, trietilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína.

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

Se entiende a partir de las definiciones y ejemplos anteriores que en los radicales que contienen un grupo alquilo sustituido se puede producir cualquier sustitución de los anteriores en cualquier carbono del grupo alquilo. Los compuestos de la presente 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 tanto existir como enantiómeros individuales, diastereoisómeros, racematos, y mezclas de enantiómeros y diastereómeros. Está previsto que todos los mencionados enantiómeros individuales, diastereoisómeros, racematos y sus mezclas estén comprendidos en el alcance de la presente invención. Las configuraciones absolutas de determinados átomos de carbono en los compuestos, si se saben, están indicadas por el descriptor R o S absoluto adecuado.

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

Tal como se usa en el presente documento, la frase "factores de crecimiento" o "factores de neurogénesis" se refiere a proteínas, péptidos u otras moléculas que tienen un crecimiento proliferativo diferenciado, o un efecto trófico sobre las células del SNC o del SNP. Dichos factores se pueden utilizar para inducir la proliferación o la diferenciación y pueden incluir, por ejemplo, cualquier factor trófico que permita proliferar a las células del SNC o del SNP, incluyendo cualquier molécula que se una a un receptor sobre la superficie de la célula para ejercer un efecto trófico, o inductor del crecimiento en la célula. Los factores preferidos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento nervioso ("NGF"), factor de crecimiento epidérmico ("EGF"), factor de crecimiento derivado de plaquetas ("PDGF"), factor de crecimiento de tipo insulina ("IGF"), factor ácido de crecimiento de fibroblastos ("aFGF" o "FGF-1"), factor básico de crecimiento de fibroblastos ("bFGF" o "FGF-2"), y factor alfa y beta de crecimiento transformante ("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 a partir de las anteriores, y sus especies transgénicas. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano. Se puede realizar la administración de las composiciones de la

presente invención a un sujeto que se va a tratar utilizando procedimientos conocidos, en las dosificaciones y durante periodos de tiempo eficaces para tratar la dolencia en el sujeto. Una cantidad eficaz del compuesto terapéutico necesaria para conseguir un efecto terapéutico puede variar de acuerdo con factores tales como la edad, sexo, y peso del sujeto, y la capacidad del compuesto terapéutico para tratar los anteriores agentes en el sujeto. Se pueden ajustar regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, varias dosis divididas se pueden administrar diariamente, o la dosis se puede reducir proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

"Administrar" incluye rutas de administración que permitan a las composiciones realizar su función prevista, por ejemplo, promover la angiogénesis. Son posibles varias rutas de administración que incluyen, pero no están necesariamente limitadas a, (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, inyección subcutánea), oral (por ejemplo, alimenticia), vía tópica, nasal, rectal, o mediante microvehículos que se liberan lentamente dependiendo de la enfermedad o de la dolencia que se va a tratar. Se prefieren los modos de administración oral, parenteral e intravenosa. La formulación del compuesto que se va a administrar variará de acuerdo con la ruta de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsiones, geles, aerosoles, cápsula). Se puede preparar una composición adecuada que comprende el compuesto que se va a administrar en un vehículo o transportador fisiológicamente aceptable y auxiliares y conservantes opcionales. Para las soluciones o emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo medios salinos y tamponados, agua estéril, cremas, pomadas, lociones, aceites, pastas y vehículos sólidos. Los vehículos parenterales pueden incluir una solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o fluidos, rellenos de nutrientes o electrolitos (*véase generalmente*, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª edición, Mack, Ed. (1980)).

"Cantidad eficaz" incluye aquellas cantidades de compuestos pro-angiogénicos o anti-angiogénicos que permiten realizar su función prevista, por ejemplo, promover o inhibir la angiogénesis en los trastornos relacionados con la angiogénesis que se describen en el presente documento. La cantidad eficaz dependerá de numerosos factores, incluyendo la actividad biológica, edad, peso corporal, sexo, estado de salud general, la gravedad de la dolencia que se va a tratar, así como las propiedades farmacocinéticas adecuadas. Por ejemplo, las dosificaciones de la sustancia activa pueden ser aproximadamente de 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. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la sustancia activa mediante una ruta adecuada en una única dosis o en múltiples dosis. Además, las dosificaciones de la sustancia activa pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente como se ha 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 de retraso de la absorción, y similares que sean compatibles con la actividad del compuesto y sean fisiológicamente aceptables para el sujeto. Un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable es la solución salina normal tamponada (NaCl 0,15 M). El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto terapéutico, se contempla su uso en las composiciones adecuadas para la administración farmacéutica. Pueden incorporarse también compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Los "ingredientes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes granulantes y desintegrantes; 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 suspensores; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, emolientes; tampones; sales; agentes espesantes; cargas; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Se describen en la técnica otros "ingredientes adicionales" que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de la invención y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Composiciones

Se describen en el presente documento agentes angiogénicos que comprenden hormonas tiroideas, sus análogos, y conjugaciones poliméricas de las hormonas y sus análogos. Se pueden usar las composiciones descritas para promover la angiogénesis para tratar trastornos donde la angiogénesis es beneficiosa. Adicionalmente, se puede usar la inhibición de estas hormonas tiroideas, los análogos y las conjugaciones poliméricas para inhibir la angiogénesis para tratar trastornos asociados con dicha angiogénesis no deseada. Tal como se usa en el presente documento, el término "agente angiogénico" incluye cualquier compuesto o sustancia que promueve o estimula la angiogénesis, en solitario o junto con otra sustancia. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, T3, T4, T3 o T4-agarosa, análogos poliméricos de T3, T4, ácido 3,5-dimetil-4-(4'-hidroxi-3'-isopropilbencil)-fenoxy acético (GC-1), o DITPA.

Se usan conjugaciones poliméricas para mejorar la viabilidad del fármaco. Aunque muchos agentes terapéuticos antiguos y modernos son bien tolerados, muchos compuestos necesitan tecnologías avanzadas de descubrimiento de fármacos para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo en circulación, o modificar la biodistribución. Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Diversos polímeros solubles en agua han mostrado modificar la biodistribución, aumentar el modo de captación celular, cambiar la permeabilidad a través de barreras fisiológicas, y modificar la velocidad de aclaramiento a través del cuerpo. Para conseguir tanto un direccionamiento como un efecto de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte de la estructura, o como grupos pendientes en la cadena polimérica.

Las composiciones representativas de la presente divulgación incluyen hormonas tiroideas o sus análogos conjugados a polímeros. La conjugación con polímeros puede ser tanto con enlaces covalentes como no covalentes. Se puede producir la conjugación polimérica a través de un enlace éster o un enlace anhídrido. Se muestra un ejemplo de conjugación polimérica a través de un enlace éster utilizando alcohol polivinílico en la Figura 17. En esta preparación se puede esterificar alcohol polivinílico comercialmente disponible (o los copolímeros relacionados) mediante tratamiento con el cloruro de ácido de análogos de hormonas tiroideas, incluyendo la forma del cloruro de ácido. La sal de clorhidrato se neutralizó mediante la adición de trietilamina para dar como resultado clorhidrato de trietilamina que se puede eliminar por lavado con agua tras la precipitación de la forma de éster polimérico de la hormona tiroidea de diferentes análogos. El enlace éster con el polímero puede experimentar hidrólisis in vivo para liberar el análogo activo de la hormona tiroidea pro-angiogénesis.

Se muestra en la Figura 18 un ejemplo de conjugación polimérica a través de un enlace anhídrido utilizando copolímero de ácido acrílico etileno. Esto es similar a la conjugación covalente polimérica previa, sin embargo, esta vez se realiza a través de un enlace anhídrido que se deriva de la reacción de un copolímero de ácido acrílico. Este enlace anhídrido es también susceptible a hidrólisis in vivo para liberar el análogo de la hormona tiroidea. La neutralización del ácido clorhídrico se consigue mediante tratamiento con trietilamina y el posterior lavado del polímero polianhídrido precipitado con agua elimina el subproducto del clorhidrato de trietilamina. Esta reacción conducirá a la formación de un copolímero de ácido acrílico de la hormona tiroidea + trietilamina. Tras la hidrólisis in vivo, el análogo de la hormona tiroidea se liberará en el tiempo que se puede controlar más un copolímero de ácido acrílico etileno.

Otra conjugación polimérica representativa incluye la hormona tiroidea o sus análogos conjugados a polietilenglicol (PEG). La unión de PEG a diversos fármacos, proteínas y liposomas ha mostrado mejorar el tiempo de residencia y disminuir la toxicidad. PEG puede acoplarse a los principios activos a través de grupos hidroxilo en los extremos de las cadenas y mediante otros métodos químicos. Peg por sí mismo, sin embargo, se limita a dos agentes activos por molécula. En una solución diferente, se exploraron los copolímeros de PEG y los aminoácidos como novedosos biomateriales que retenían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula y que podrían diseñarse sintéticamente para adaptarse a varias aplicaciones.

Otra conjugación polimérica representativa incluye hormonas tiroideas o sus análogos en conjugación no covalente con polímeros. Esto se muestra en detalle en la Figura 19. Una conjugación no covalente preferida es un atrapamiento de la hormona tiroidea o sus análogos en un polímero de ácido poliláctico. Los polímeros de poliéster de ácido poliláctico (PLA) experimentan hidrólisis in vivo del monómero de ácido láctico y esto se ha aprovechado como vehículo para sistemas de administración de fármacos en seres humanos. A diferencia de los dos métodos covalentes anteriores en los que el análogo de la hormona tiroidea está unido mediante un enlace químico al polímero, este sería un método no covalente que encapsularía el análogo de hormona tiroidea en perlas de polímero PLA. Esta reacción conducirá a la formación del análogo de la hormona tiroidea que contiene perlas de PLA en agua. El filtro y el lavado darán como resultado la formación del análogo de la hormona tiroidea que contiene perlas de PLA, que tras la hidrólisis in vivo conducirá a la generación de niveles controlados de hormona tiroidea más ácido láctico.

Además, las composiciones de la presente divulgación incluyen análogos de hormonas tiroideas o sus análogos conjugados a retinoides (por ejemplo, ácido retinoico (*es decir*, vitamina A), que se une a la proteína de unión a la hormona tiroidea transtirretina ("TTR") y a la proteína de unión al ácido retinoico ("RBP"). Los análogos de hormonas tiroideas pueden conjugarse también con estilbesteroides halogenados, en solitario o junto con ácido retinoico, para uso en la detección y la 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 las placas amiloides, con las propiedades de los sustituyentes halógenos, que incluyen determinados isotipos útiles de halógenos para la obtención de imágenes de PET que incluye flúor-18, yodo-123, yodo-124, yodo-131, bromo-75, bromo-76, bromo-77 y bromo-82.

Además, se puede usar nanotecnología para la creación de materiales y estructuras útiles dimensionadas a escala nanométrica. El inconveniente principal de las sustancias biológicamente activas es la fragilidad. Se pueden combinar materiales nanoescalados con dichas sustancias biológicamente activas para mejorar drásticamente la durabilidad de la sustancia, crear elevadas concentraciones localizadas de la sustancia y reducir costes minimizando las pérdidas. Por lo tanto, las conjugaciones poliméricas adicionales incluyen formulaciones de nanopartículas de hormonas tiroideas y de sus análogos. Se pueden usar nanopolímeros y nanopartículas como matriz para la administración local de hormonas tiroideas y de sus análogos. Esto ayudará a la vez a la administración controlada en la diana celular y

tisular.

Las composiciones de la presente divulgación incluyen hormonas tiroideas, análogos, y derivados tanto solos como en conjugación covalente o no covalente con polímeros. En la Figura 20 se muestran ejemplos de análogos y derivados representativos, Tablas A-D. La Tabla A muestra T2, T3, T4, y bromoderivados. La Tabla B muestra modificaciones en la cadena secundaria de alanilo. La Tabla C muestra grupos hidroxilo, enlaces de difenil éster, y configuraciones D. La Tabla D muestra análogos de tirosina.

Los términos "agente antiangiogénico" o "agente anti-angiogénico" se refieren a cualquier compuesto o sustancia que inhibe o perjudica la angiogénesis, en solitario o junto con otra sustancia. Los ejemplos incluyen TETRAC, TRIAC, XT 199, y el mAb LM609.

El papel de la hormona tiroidea, los análogos, y las conjugaciones poliméricas en la promoción de la angiogénesis

El efecto proangiogénico de los análogos de las hormonas tiroideas o las formas poliméricas depende de un inicio no genómico, como se ensaya por la susceptibilidad del efecto hormonal sobre la reducción de la ruta de transducción de la señal de MAPK mediante inhibidores. 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 un complejo programa de transcripción génica consecuente. Las concentraciones ambientales de la hormona tiroidea son relativamente estables. El modelo CAM, en el momento en que lo ensayaron los autores, era tiroprivador y, por tanto, se puede considerar como un sistema que no reproduce el organismo intacto.

La disponibilidad de un ensayo de una membrana corioalantoidea de pollo (CAM) para la angiogénesis ha proporcionado un modelo en el cual 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 describe un efecto proangiogénico de T₄ que aproxima el modelo CAM de FGF2 y que puede potenciar la acción de dosis subóptimas de FGF2. Se describe además que el efecto proangiogénico de la hormona se inicia en la membrana plasmática y es dependiente de la activación por T₄ de la ruta de transducción de la señal de MAPK. Como se ha proporcionado anteriormente, se describen métodos para el tratamiento de 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. Se describen también composiciones y métodos para promover la angiogénesis y/o reclutar los vasos sanguíneos colaterales en un paciente que lo necesita. Las composiciones incluyen una cantidad eficaz de análogos de hormonas tiroideas, las formas poliméricas, y los derivados. Los métodos implican la administración simultánea de una cantidad eficaz de análogos de hormonas tiroideas, las formas poliméricas, y derivados en dosificaciones diarias bajas, durante una semana o más con otros factores de crecimiento proangiogénicos normalizados, vasodilatadores, anticoagulantes, tratamientos trombolíticos u otros tratamientos vasculares relacionados.

Se ha utilizado el ensayo CAM para validar la actividad angiogénica de varios factores de crecimiento que se cree que promueven el crecimiento. Por ejemplo, se ha mostrado que T₄ en concentraciones fisiológicas es proangiogénica en este modelo *in vitro* y en una base molar que tenga la actividad de FGF2. La presencia de PTU no reduce el efecto de T₄, indicando que la desyodación de T₄ para generar T₃ no fue un prerrequisito en este modelo. En la Tabla 1 se relaciona un resumen de los efectos proangiogénicos de diversos análogos de hormonas tiroideas.

Tabla 1. Efectos proangiogénicos de diversos análogos de hormonas tiroideas en el modelo 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 |
| T4-agarosa (0,1 uM) | 195,5 ± 8,5 |
| T4 (0,1 uM) | 143,8 ± 7,9 |
| FGF2 (1 ug) | 155 ± 9 |
| <i>n</i> = 8 por grupo | |

La aparición de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en este modelo requiere varios días, indicando que el efecto de la hormona tiroidea fue completamente dependiente de la interacción del receptor nuclear para la hormona tiroidea (TR) con la hormona. Las acciones de las yodotironinas que requieren la complejación intranuclear de TR con su ligando natural, T₃, son, por definición, genómicas, y culminan en la expresión génica. Por otra parte, la respuesta preferente de este sistema modelo a T₄ en lugar de a T₃, el ligando natural de TR aumentó la posibilidad de que la

angiogénesis se pueda iniciar no genómicamente en la membrana plasmática por T₄ y culmina en los efectos que requiere la transcripción génica. Las acciones no genómicas de T₄ se han descrito ampliamente, se suelen iniciar en la membrana plasmática y se pueden mediar mediante rutas de transducción de la señal. No necesitan el ligando intranuclear de yodotironina y TR, pero pueden intervenir o modular la transcripción génica. Las acciones no genómicas de los esteroides también se han descrito correctamente, y se sabe que intervienen en las acciones genómicas de los esteroides o de otros compuestos. Los experimentos realizados con T₄ y tetrac o con T₄-agarosa indicaron que el efecto proangiogénico de T₄ se inició a su vez muy probablemente en la membrana plasmática. Tetrac bloquea los efectos de T₄ iniciados en la membrana, pero no activa por sí mismo la transducción de la señal. Por tanto, es una prueba de las acciones no genómicas de la hormona tiroidea. Se piensa que T₄-agarosa no accede al interior de la célula y se ha utilizado para examinar modelos para 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") demuestra que la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos existentes se promovió dos a tres veces tanto por la L-tiroxina (T₄) como por la 3,5,3'-triyodo-L-tironina (T₃) a 10⁻⁷ - 10⁻⁹ M. de forma más interesante, T₄-agarosa, un análogo de hormona tiroidea que no cruza la membrana celular, produjo un potente efecto proangiogénico comparable al obtenido con T₃ o T₄.

En parte, esta divulgación proporciona composiciones y métodos para promover la angiogénesis en un sujeto que lo necesita. Las condiciones sensibles al tratamiento promoviendo 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, ictus, y heridas. Se describen también composiciones y métodos para promover la angiogénesis y/o reclutar los vasos sanguíneos colaterales en un paciente que lo necesita. Las composiciones incluyen una cantidad eficaz de formas poliméricas de análogos y derivados de las hormonas tiroideas y una cantidad eficaz de una adenosina y/o un donante de óxido nítrico. Las composiciones pueden estar en la forma de una formulación farmacéutica inyectable estéril que incluye una cantidad angiogénicamente eficaz de sustancias análogas de hormonas tiroideas y derivados de adenosina en un vehículo fisiológico y farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con uno o más excipientes.

Infarto de miocardio

Un motivo principal para la insuficiencia cardíaca tras infarto de miocardio agudo es una respuesta inadecuada de formación de nuevos vasos sanguíneos, *es decir*, angiogénesis. La hormona tiroidea y sus análogos son beneficiosos en la insuficiencia cardíaca y estimulan la angiogénesis coronaria. Los métodos descritos incluyen, en parte, administrar un único tratamiento de un análogo de hormona tiroidea en el momento del infarto tanto mediante inyección directa en el miocardio, como mediante simulación de la inyección coronaria mediante ligadura aórtica intermitente para producir contracciones isovolúmicas transitorias para conseguir la angiogénesis y/o la remodelación ventricular.

Por consiguiente, se describen métodos para tratar la enfermedad vascular oclusiva, enfermedad coronaria, infarto de miocardio, isquemia, ictus, y/o los trastornos vasculares de la arteria periférica promoviendo la angiogénesis mediante la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad de una forma polimérica de la hormona tiroidea, o uno de sus análogos, eficaz para promover la angiogénesis.

Se proporcionan también en el presente documento ejemplos de formas poliméricas de análogos de hormonas tiroideas y pueden incluir triyodotironina (T₃), levotiroxina (T₄), (GC-1), o ácido 3,5-diyodotiropropiónico (DITPA) conjugado con alcohol polivinílico, copolímero de ácido acrílico etileno, poli(ácido láctico), o agarosa.

Los métodos implican también la administración simultánea de una cantidad eficaz de sustancia análoga a la hormona tiroidea y una cantidad eficaz de adenosina y/o de NO en dosificaciones diarias bajas, durante una semana o más. Uno o ambos componentes se pueden administrar localmente mediante catéter. Los análogos de las hormonas tiroideas, y los derivados in vivo se pueden administrar a los lechos capilares que rodean el tejido isquémico mediante la incorporación de los compuestos en un liposoma o micropartícula dimensionado adecuadamente. Los análogos de las hormonas tiroideas, las formas poliméricas y los derivados se pueden dirigir al tejido isquémico mediante enlace covalente con un anticuerpo adecuado.

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

Cicatrización de heridas

La angiogénesis de las heridas es una parte importante de la fase proliferativa de la cicatrización. La cicatrización de cualquier herida en la piel que no sea muy superficial no se puede producir sin angiogénesis. No solo debe repararse toda la vasculatura dañada, sino que la mayor actividad celular local necesaria para la cicatrización requiere un suministro creciente de nutrientes procedente del torrente sanguíneo. Además, las células endoteliales que forman el

revestimiento de los vasos sanguíneos son importantes por sí mismas como organizadores y reguladores de la cicatrización.

5 Por tanto, la angiogénesis proporciona una nueva microcirculación para apoyar la cicatrización de heridas. Los nuevos vasos sanguíneos vuelven a ser clínicamente visibles en el espacio de la herida cuatro días después de la lesión. Las células endoteliales vasculares, fibroblastos, y las células del músculo liso proliferan en coordinación para apoyar la granulación de la herida. De manera simultánea, se produce la reepitelización para restablecer la cubierta epitelial. Las células epiteliales procedentes del margen de la herida o de los folículos pilosos profundos migran a través de la herida y se establecen por sí mismos sobre el tejido de la granulación y la matriz provisional. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de los queratinocitos (KFG) median en este proceso. Existen algunos modelos de epitelización (células deslizantes frente a células rodantes).

15 A medida que las hormonas tiroideas regulan la tasa metabólica, cuando el metabolismo se ralentiza debido al hipotiroidismo, se ralentiza también la cicatrización de heridas. El papel de los análogos de hormonas tiroideas tópicamente aplicados o las formas poliméricas en la cicatrización de heridas representa por tanto una estrategia novedosa para acelerar la cicatrización de heridas en diabéticos y en no diabéticos con capacidades de cicatrización de heridas aumentadas. La administración tópica puede ser en forma de una tirita. Adicionalmente, se pueden usar nanopolímeros y nanopartículas como una matriz para la administración local de hormonas tiroideas y de sus análogos. Esto ayudará a su vez a la administración controlada en la diana celular y tisular.

20 Por consiguiente, se describen también métodos para tratar las heridas promoviendo la angiogénesis administrando a un sujeto que lo necesita una cantidad de una forma polimérica de hormona tiroidea, o uno de sus análogos, eficaz para promover la angiogénesis. Para los detalles, véanse los Ejemplos 9A y 9B.

25 El papel de la hormona tiroidea, los análogos, y las conjugaciones poliméricas junto con los factores de crecimiento nervioso en la inducción y el mantenimiento de células neuronales

30 De forma contraria a la comprensión tradicional de la inducción neural, esta divulgación está parcialmente basada en el hallazgo inesperado de que los mecanismos que inician y mantienen la angiogénesis son eficaces promotores y sustentadores de la neurogénesis. Estos métodos y composiciones son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de las lesiones de las neuronas motoras y neuropatías en traumatismos, lesiones y trastornos neuronales. Esta divulgación se refiere al uso de diversas estrategias proangiogénicas solas o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. Los factores proangiogénicos incluyen análogos poliméricos de la hormona tiroidea como se ilustra en el presente documento. Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas y sus conjugados poliméricos solos o junto con otros factores de crecimiento proangiogénicos conocidos en la materia y con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se pueden combinar para una neurogénesis óptima.

40 Se describen métodos, composiciones y dispositivos de tratamiento terapéutico para mantener las rutas neurales en un mamífero, que incluyen potenciar la supervivencia de las neuronas en riesgo de muerte, inducir la reparación celular de las neuronas dañadas y de las rutas neurales, y estimular las neuronas para mantener su fenotipo diferenciado. Adicionalmente, una composición que contiene análogos poliméricos de hormonas tiroideas, y sus combinaciones, en presencia de agentes antioxidantes y/o antiinflamatorios demuestra la regeneración y la protección neuronal.

45 Esta divulgación proporciona también hormonas tiroideas, análogos, y conjugaciones poliméricas, solas o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, para potenciar la supervivencia de las neuronas y mantener las rutas neurales. Tal como se describe en el presente documento, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden potenciar la supervivencia de las neuronas, estimular la expresión neuronal de CAM, mantener la expresión fenotípica de las neuronas diferenciadas, inducir la rediferenciación de las células transformadas de origen neural, y estimular el crecimiento axonal sobre las ramificaciones en los procesos neurales, particularmente grandes huecos en los axones. Los morfógenos protegen también frente a la destrucción del tejido asociada con el daño al tejido nervioso inmunológicamente relacionado. Finalmente, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos se pueden usar como parte de un método para controlar la viabilidad del tejido nervioso en un mamífero.

60 Esta divulgación proporciona también efectos de hormonas tiroideas poliméricas en la formación de la sinapsis entre neuronas corticales cultivadas de rata, utilizando un sistema para estimar la formación funcional de sinapsis in vitro. La exposición a 10^{-9} M de hormonas tiroideas poliméricas, 3,5,3'-triyodotironina o tiroxina, produjo un aumento en la frecuencia de cambios oscilatorios sincrónicos espontáneos en la concentración de calcio intracelular, que se correlacionó con el número de sinapsis formadas. La detección mediante análisis inmunohistoquímico y de inmunotransferencia de la proteína sinapsina I asociada a vesículas sinápticas confirmó también que la exposición a la tiroxina facilitó la formación de sinapsis. La presencia de amiodarona, un inhibidor de la 5'-desyodinasas, o amitrol, un herbicida, inhibió la formación de sinapsis en presencia de tiroxina. Por tanto, la presente divulgación proporciona también un sistema de ensayo in vitro útil para el cribado de varios agentes químicos que pueden interferir con la formación de sinapsis en el desarrollo del SNC perturbando el sistema tiroideo polimérico.

De forma general, estos métodos pueden aplicarse al tratamiento de cualquier sujeto mamífero en riesgo o que padece una lesión o neuropatía del tejido neural. Esta divulgación es adecuada para el tratamiento de cualquier primate, preferentemente un primate superior tal como un ser humano. Además, sin embargo, puede emplearse en el tratamiento de mamíferos domesticados que se mantienen como animales de compañía de seres humanos (por ejemplo, perros, gatos, caballos), que tienen un significativo valor comercial (por ejemplo, cabras, cerdos, ovejas, ganado, de competición o animales de tiro), que tienen un valor científico significativo (por ejemplo, especímenes libres o en cautividad de especies en peligro de extinción, o razas animales engendradas por endogamia o diseñadas mediante ingeniería genética), o que tienen valor de otra manera.

Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento potencian la supervivencia celular, particularmente de las células neuronales en riesgo de muerte. Por ejemplo, las neuronas completamente diferenciadas son no mitóticas y mueren in vitro cuando se cultivan en condiciones normalizadas de cultivos de células de mamíferos, utilizando 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 no mitótico de células neuronales con un análogo tiroideo polimérico solo o junto con un factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, la supervivencia de estas células se potencia significativamente. Por ejemplo, se preparó un cultivo primario de ganglios basales estriatales aislado a partir de la sustancia negra de cerebro adulto de rata utilizando procedimientos normalizados, por ejemplo, mediante disociación por trituración con pipeta pasteur de tejido de la sustancia negra, utilizando protocolos normalizados de cultivo de tejidos, y crecimiento en un medio con una concentración baja en suero, por ejemplo, conteniendo un 50 % de DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco), 50 % de medio F-12, suero de caballo inactivado térmicamente suplementado con penicilina/estreptomicina y 4 g/l de glucosa. En condiciones de cultivo normalizadas, estas células experimentan una muerte celular significativa en tres semanas cuando se cultivan en un medio exento de suero. La muerte celular se evidenció morfológicamente por la incapacidad de las células de permanecer adherentes y por los cambios en sus características ultraestructurales, por ejemplo, mediante aglutinación de la cromatina y desintegración de los orgánulos. Específicamente, las células siguieron siendo adherentes y continuaron manteniendo la morfología de las neuronas viables diferenciadas. En ausencia de análogos tiroideos solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otro tratamiento de factores neurogénicos, la mayoría de las células cultivadas se disociaron y experimentaron necrosis celular.

Las disfunciones en los ganglios basales de la sustancia negra se asocian con corea de Huntington y parkinsonismo in vivo. La capacidad de los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos definidos en el presente documento para potenciar la supervivencia de las neuronas indica que estos análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos serán útiles como parte de un tratamiento para potenciar la supervivencia de células neuronales en riesgo de muerte in vivo debido, por ejemplo, a una neuropatía o traumatismo químico o mecánico.

Esta divulgación proporciona además que estos análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos proporcionan un agente terapéutico útil para tratar las neuropatías que afectan a los ganglios basales estriatales, incluyendo la corea de Huntington y la enfermedad de Parkinson. Para las aplicaciones clínicas, se pueden administrar los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o, como alternativa, se puede administrar un análogo polimérico de hormonas tiroideas solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otro agente estimulador de factores neurogénicos.

Los compuestos de hormonas tiroideas descritos en el presente documento se pueden usar también para la protección de tejido nervioso a partir de trauma químico. La capacidad de los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento para potenciar la supervivencia de las células neuronales y para inducir la agregación celular y la adhesión célula-célula en células rediferenciadas, indica que los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos serán útiles como agentes terapéuticos para mantener las rutas neurales protegiendo las células que definen la ruta del daño producido por trauma químico. En particular, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden proteger neuronas, incluyendo neuronas en desarrollo, de los efectos de toxinas conocidas que inhiben la proliferación y la migración de neuronas e interfieren con la adhesión célula-célula. Los ejemplos de dichas toxinas incluyen etanol, una o más de las toxinas presentes en el humo de cigarrillos, y varios opiáceos. Los efectos tóxicos del etanol sobre las neuronas en desarrollo inducen el daño neurológico manifestado en el síndrome alcohólico fetal. Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden proteger las neuronas de los efectos citotóxicos asociados con los aminoácidos excitatorios tales como glutamato.

Por ejemplo, el etanol inhibe los efectos de la adhesión célula-célula inducidos en células NG108-15 tratadas con los análogos poliméricos tiroideos solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos cuando se proporcionan a estas células a una concentración de 25-50 mM. Se puede conseguir la inhibición máxima media con etanol 5-10 mM, la concentración de alcohol en sangre en un adulto tras la ingestión de una única bebida

alcohólica. El etanol interfiere probablemente con la unión homofílica de las CAM entre células, más bien que su inducción, ya que los niveles de N-CAM inducidos por el análogo polimérico tiroideo solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos no se ven afectados por el etanol. Además, el efecto inhibitor es inversamente proporcional a un análogo polimérico tiroideo solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otra concentración de factores neurogénicos. Por consiguiente, se cree que la administración de un análogo polimérico tiroideo solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o análogos poliméricos tiroideo solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros agentes estimuladores de factores neurogénicos dirigidos a neuronas, particularmente neuronas en desarrollo, en riesgo de daño debido a exposición a toxinas tales como etanol, puede proteger estas células del daño a tejido nervioso superando los efectos inhibidores de la toxina. El análogo polimérico tiroideo solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento es también útil en tratamientos para tratar las rutas neurales dañadas resultantes de una neuropatía inducida por exposición a estas toxinas.

Las actividades in vivo de los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento se evalúan también fácilmente en un modelo animal que se describe en el presente documento. Un animal adecuado, que presenta preferentemente daño en el tejido nervioso, por ejemplo, genética o ambientalmente inducido, recibe una inyección intracerebral con una cantidad eficaz de análogos poliméricos de la hormona tiroidea sola o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos en una formulación terapéutica adecuada, tal como suero salino tamponado con fosfato, pH 7. Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso o factores neurogénicos se inyectan preferentemente en el área de las neuronas afectadas. El tejido afectado se corta en un punto temporal posterior y el tejido se evalúa morfológicamente y/o mediante evaluación de un marcador bioquímico adecuado (por ejemplo, mediante análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o la localización de N-CAM; o midiendo el efecto dependiente de la dosis en un marcador bioquímico de la actividad neurotrófica del SNC o del daño en el tejido del SNC, utilizando por ejemplo, proteína ácida fibrilar glial como marcador. La dosificación y el tiempo de incubación variarán con el animal que se va a ensayar. Se pueden determinar los intervalos de dosificación adecuados para diferentes especies mediante comparación con los modelos animales establecidos. Se presenta a continuación un protocolo ilustrativo para un modelo de incisión en cerebro de rata.

En resumen, se anestesiaron ratas Long Evans machos, obtenidas a partir de fuentes comerciales normalizadas, y se preparó el área de la cabeza para cirugía. Se expuso el cráneo utilizando procedimientos quirúrgicos normalizados y se trepanó un agujero hacia el centro de cada lóbulo utilizando un alambre de 0,035K, simplemente perforando el cráneo. Se proporcionaron a continuación soluciones de 25 ml que contenían tanto análogos poliméricos tiroideos solos o junto con factores de crecimiento nervioso como otros factores neurogénicos (por ejemplo, OP-1, 25 mg) o bien se proporcionó PBS a continuación a cada uno de los agujeros mediante una jeringuilla de Hamilton. Se administraron las soluciones 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 suturó la piel y se dejó recuperar el animal.

Tres días después de la cirugía, se sacrificaron las ratas mediante decapitación y se procesaron los cerebros para el corte. Se evaluó la formación de tejido de cicatrización mediante tinción con inmunofluorescencia de la proteína ácida fibrilar glial, una proteína marcadora para la cicatrización glial, para determinar cualitativamente el grado de formación de cicatrices. Están comercialmente disponibles los anticuerpos dirigidos contra la proteína ácida fibrilar glial, por ejemplo, de Sigma Chemical Co., San Luis, Mo. Se sondearon también las secciones con anticuerpos dirigidos contra OP-1 para determinar la presencia de OP-1. Se anticiparon niveles reducidos de proteína ácida fibrilar glial en las secciones de tejido de animales tratados con el análogo polimérico tiroideo solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, evidenciando la capacidad de los análogos poliméricos tiroideos solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos para inhibir la formación de la cicatriz glial y estimular la regeneración nerviosa.

El papel de los análogos de hormonas tiroideas y las conjugaciones poliméricas para el diagnóstico la obtención de imágenes del cerebro, diagnóstico, y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

Esta divulgación se refiere a agentes farmacéuticos y radiofarmacéuticos útiles para el diagnóstico temprano, prevención, y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, tales como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. Esta divulgación incluye también compuestos químicos novedosos que tienen unión específica en un sistema biológico y pueden utilizarse en tomografía de emisión de positrones (PET), métodos de obtención de imágenes diagnóstico por imágenes utilizando emisión de fotón único (SPECT), y métodos de obtención de imágenes mediante resonancia magnética (IRM). La capacidad de T4 y otros análogos de hormonas tiroideas de unirse a ligandos localizados en el interior del cuerpo hace posible utilizar dichos compuestos para la obtención de imágenes in situ de ligandos mediante PET, SPECT, IRM, y métodos similares de obtención de imágenes. En principio, no se tiene que saber nada acerca de la naturaleza del ligando, siempre que se produzca la unión, y dicha unión sea específica de un tipo de células, órganos, tejidos o receptores de interés.

La obtención de imágenes mediante PET se lleva a cabo con la ayuda de compuestos trazadores marcados con isótopos emisores de positrones (Goodman, M. M. Clinical Positron Emission Tomography, Mosby Yearbook, 1992, K.

F. Hubner et al., Capítulo 14). Para la mayor parte de materiales biológicos, son pocos los isótopos adecuados. EL isótopo de carbono, ^{11}C , se ha usado para PET, pero su corta vida media de 20,5 minutos limita su utilidad a compuestos que se pueden sintetizar y purificar rápidamente, y a instalaciones que están próximas a un ciclotrón en el que se genere el material de partida ^{11}C precursor. Otros isótopos tienen incluso vidas medias más cortas. ^{13}N tiene una vida media 10 minutos y ^{15}O tiene una vida media incluso más corta de 2 minutos. Las emisiones de ambos son más energéticas que las de ^{11}C . Sin embargo, se han realizado 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, ^{18}F , tiene una vida media de 110 minutos. Esto permite tiempo suficiente para su incorporación a un trazador radiomarcado, para la purificación y para la administración a un sujeto humano o animal. Además, instalaciones más alejadas de un ciclotrón, hasta aproximadamente un radio de 200 millas (320 km), pueden hacer uso de compuestos marcados con ^{18}F . Las desventajas de ^{18}F son la relativa escasez de análogos fluorados que tienen equivalencia funcional con materiales biológicos que se producen naturalmente, 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 cualquiera de un ion fluoruro o un gas flúor. En el último caso solo un átomo de flúor del gas bimolecular es realmente un radionucleido, de tal manera que el gas se designa $\text{F-}^{18}\text{F}$. Las reacciones que utilizan $\text{F-}^{18}\text{F}$ como material de partida dan como resultado por tanto productos que tienen solo la mitad de abundancia de radionucleidos de las reacciones que utilizan ^{18}F como material de partida. Por otra parte, F^{18} se puede preparar en cantidades curie en forma de ion fluoruro para su incorporación a un compuesto radiofarmacéutico en una actividad muy específica, teóricamente 1,7 Ci/nmol utilizando reacciones de sustitución nucleófila exentas de vehículos. La emisión de energía de ^{18}F es de 0,635 MeV, dando como resultado un intervalo promedio de positrones de 2,4 mm, relativamente corto, en el tejido, lo que permite imágenes PET de alta resolución.

La obtención de imágenes SPECT emplea isótopos trazadores que emiten fotones de alta energía (emisores gamma). La gama de isótopos es mayor que para PET, pero SPECT proporciona una resolución tridimensional más baja. Sin embargo, SPECT se usa ampliamente para obtener información clínicamente significativa acerca de la unión, localización y tasas de aclaramiento de unión a análogos. Un isótopo útil para la obtención de imágenes mediante SPECT es un emisor α -gamma marcado con ^{123}I con una vida media de 13,3 horas. Los compuestos marcados con ^{123}I se pueden marcar hasta aproximadamente 1000 milésimas a partir del sitio de fabricación, o el propio isótopo se puede transportar para la síntesis en el sitio. El ochenta y cinco por ciento de las emisiones de isótopos tienen fotones 159 KeV, que se miden fácilmente mediante la instrumentación SPECT actualmente en uso. Los compuestos de la invención se pueden marcar con tecnecio. Se sabe que Tecnecio-99m es un radionucleido útil para la obtención de imágenes mediante SPECT. Los análogos de T4 se unen a un clúster metálico de Tc-99m mediante una cadena de 4-6 átomos de carbono que puede estar saturada o tener un doble o triple enlace.

El uso de compuestos marcados con ^{18}F en PET se ha limitado a unos pocos compuestos análogos. De forma más notable, se ha usado ampliamente la ^{18}F -fluorodeoxiglucosa en estudios del metabolismo de la glucosa y en la localización de la captación de la glucosa asociada con la actividad cerebral. Se han utilizado también la ^{18}F -L-fluorodopa y otros análogos de receptores de la dopamina en el cartografiado de la distribución de receptores de la dopamina.

Otros isótopos de halógenos pueden servir para la obtención de imágenes mediante PET o SPECT, o para el marcado con trazadores convencionales. Estos incluyen ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br y ^{82}Br que tienen vidas medias y características de emisión útiles. En general, existen los medios químicos para sustituir cualquier resto halógeno de los isótopos descritos. Por lo tanto, las actividades bioquímicas o fisiológicas de cualquier homólogo halogenado de los compuestos descritos están ahora disponibles para el uso por los expertos en la materia, incluyendo homólogos estables de isótopos de halógeno. La astatina se puede sustituir por otros isótopos de halógeno. ^{210}At , por ejemplo, emite partículas alfa con una vida media de 8,3 h. Otros isótopos emiten también partículas alfa con vidas medias razonablemente útiles. Los compuestos sustituidos por At son por tanto útiles para el tratamiento del cerebro, en el que la unión es suficientemente específica del cerebro.

Numerosos estudios han demostrado una creciente incorporación de hidratos de carbono y aminoácidos en células malignas del cerebro. Esta acumulación se asocia con la proliferación acelerada y la síntesis de proteínas de dichas células. Se ha utilizado el análogo de glucosa ^{18}F -2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (2-FDG) para distinguir células del cerebro con elevada malignidad de crecimientos de tejido cerebral normales o benignos (DiChiro, G. et al. (1982) Neurology (NY) 32:1323-1329. Sin embargo, 2-FDG marcado con flúor-18 no es el agente de elección para detectar células cerebrales de baja calidad debido a que su elevada captación en tejido normal puede enmascarar la presencia de células del cerebro. Además, 2-FDG marcado con flúor 18 no es el agente radiofarmacéutico ideal para distinguir células de pulmón de un tejido infeccioso o para detectar carcinoma de ovario debido a su elevada captación de la radioactividad de 2-FDG en tejido infeccioso y en la vejiga, respectivamente. Se ha utilizado también el aminoácido metionina que se produce naturalmente, marcado con carbono-11, para distinguir tejido maligno de tejido normal. Pero este tiene también una captación relativamente elevada en tejido normal. Además, la vida media del carbono-11 es solo de 20 minutos; por tanto, la metionina ^{11}C no se puede almacenar durante un largo periodo de tiempo.

La transtirretina ("TTR") del líquido cefalorraquídeo ("CSF"), la principal proteína portadora de tirosina del CSF (T4) en la rata y el ser humano se sintetiza en el plexo coroideo ("CP"). Tras la inyección de ^{125}I -T4 en la rata, la T4 radioactiva se acumula primero en el CP, a continuación en el CSF y posteriormente en el cerebro (Chanoine JP, Braverman LE.

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 proporcionan una obtención de imágenes PET sustancialmente mejoradas para las zonas del cuerpo que tienen proteína amiloide, especialmente del cerebro. Todos los isótopos emisores de positrones disponibles que podrían incorporarse a un compuesto biológicamente activo tienen vidas medias cortas. La utilidad práctica de dichos compuestos marcados depende por tanto de lo rápidamente que se puede sintetizar el compuesto marcado, del rendimiento sintético y de la pureza radioquímica del producto final. Incluso el tiempo de envío desde la fuente de isótopos, una instalación de ciclotrones, al hospital o al laboratorio en el que va a tener lugar la obtención de imágenes PET, está limitado. Un cálculo grosero de la distancia útil es aproximadamente de dos millas (3,22 km) por minuto de vida media. Por tanto, C^{11} , con una vida media de 20,5 m está restringido a aproximadamente un radio de 40 millas (64,4 km) desde una fuente mientras que los compuestos marcados con F^{18} se pueden usar en un radio de aproximadamente 200 millas (322 km). Los requerimientos adicionales de un compuesto marcado con F^{18} son que tenga la especificidad de unión por el receptor o molécula diana a la que se pretende que se una, que la unión no específica a otras dianas sea suficientemente baja para permitir distinguir entre la unión a la diana y a la no diana, y que la marca sea estable en las condiciones del ensayo para evitar el intercambio con otras sustancias en el entorno del ensayo. Más particularmente, los compuestos deben mostrar una unión adecuada a la diana deseada a la vez que no se unen en ningún grado comparable con otros tejidos o células.

Una solución parcial a los estrictos requisitos para la obtención de imágenes PET es emplear isótopos emisores de rayos gamma en la obtención de imágenes SPECT. I^{121} es un marcador isotópico comúnmente usado en SPECT, que tienen una vida media de 13 horas para un rango útil de 1000 millas (1610 km) desde el punto de síntesis. Los compuestos de la divulgación pueden marcarse rápida y eficazmente con I para su uso en el análisis SPECT como alternativa a la obtención de imágenes PET. Además, debido al hecho de que el mismo compuesto se puede marcar con cualquier isótopo, es posible por primera vez comparar los resultados obtenidos mediante PET y SPECT usando el mismo trazador.

La especificidad de la unión al cerebro proporciona también utilidad para los compuestos sustituidos con I de la invención. Dichos compuestos se pueden marcar con I^{123} para la obtención de imágenes mediante SPECT o con I^{125} de vida más larga para estudios a largo plazo como la vigilancia de la evolución de un tratamiento. Se pueden sustituir otros isótopos de yodo y bromo por los ilustrados.

Los compuestos de la divulgación proporcionan por tanto métodos mejorados para la obtención de imágenes del cerebro utilizando PET y SPECT. Los métodos implican administrar a un sujeto (que puede ser un ser humano o animal, a fines experimentales y/o de diagnóstico) una cantidad generadora de imágenes de un compuesto de la invención, marcados con el isótopo adecuado y medir a continuación la distribución del compuesto mediante PET si se emplea F^{18} u otro emisor de positrones, o SPECT si se emplea I^{123} u otro emisor de rayos gamma. Una cantidad generadora de imágenes es aquella cantidad que al menos puede proporcionar una imagen en un escáner de PET o SPECT, teniendo en cuenta la sensibilidad de detección del escáner y el nivel de ruido, la edad del isótopo, el tamaño corporal del sujeto y la ruta de administración, siendo las mencionadas variables ilustrativas de las conocidas y representativas para los cálculos y medidas conocidos por los expertos en la materia sin recurrir a experimentación innecesaria.

Se entenderá que los compuestos de la invención pueden marcarse con un isótopo de cualquier átomo o combinación de átomos en la estructura. Aunque que se hace hincapié en que F^{18} , I^{123} , e I^{125} en el presente documento son particularmente útiles para PET, SPECT y el análisis de trazadores, se contemplan otros usos que incluyen los que se derivan de propiedades fisiológicas o farmacológicas de homólogos de isótopos estables y serán evidentes a los expertos en la materia.

Esta divulgación proporciona también el marcado con tecnecio (Tc) mediante aductos de Tc. Se han usado isótopos de Tc, de forma notable Tc^{99m} , para la obtención de imágenes del cerebro. Esta divulgación proporciona aductos complejados con Tc de los compuestos descritos, que son útiles para la obtención de imágenes del cerebro; Los aductos son complejos de coordinación con Tc unidos al aminoácido cíclico mediante una cadena de 4-6 átomos de carbono que puede estar saturada o poseer un doble o triple enlace. Cuando está presente un doble enlace, se pueden sintetizar isómeros tanto E (trans) como Z (cis), y se puede emplear cualquier isómero. Se describe la síntesis para incorporar el isótopo ^{99m}Tc como última etapa, para maximizar la vida útil del isótopo.

Se emplearon los siguientes métodos en los procedimientos notificados en el presente documento. El F^{18} -fluoruro se produjo a partir de un ciclotrón Siemens utilizando la reacción $^{18}O(p,n)^{18}F$ con 11 MeV de protones en agua enriquecida con un 95 % de ^{18}O . Todos los disolventes y compuestos químicos eran de calidad analítica y se utilizaron sin purificación adicional. Se determinaron los puntos de fusión en tubos capilares utilizando un equipo Buchi SP. Se realizó el análisis cromatográfico en capa fina (TLC) utilizando capas de un espesor de 250- μ m de gel de sílice G PF-254 revestidas con aluminio (obtenido de Analtech, Inc.). Se realizó la cromatografía en columna utilizando un gel de sílice de malla 60-200 μ m (Aldrich Co.). Se registró el espectro de infrarrojos (IR) en un espectrofotómetro Beckman 18A con placas de NaCl. Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de protones (RMN 1H) a 300 MHz con un instrumento de alta resolución.

En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método para usar un compuesto para la fabricación de un agente radiofarmacéutico para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer en un ser humano. Otro aspecto se dirige a un método para preparar los compuestos de esta divulgación.

5 Los compuestos que se describen en el presente documento son análogos de las hormonas tiroideas u otros ligandos de unión a TTR, que se unen a TTR y tienen la capacidad de pasar a través de la barrera hematoencefálica. Los compuestos son por tanto adecuados como agentes diagnósticos in vivo para la obtención de imágenes de la enfermedad de Alzheimer. La detección de la radioactividad se realiza con procedimientos bien conocidos en la materia, utilizando cualquiera de una cámara de rayos gamma o mediante tomografía de emisión de positrones (PET).

10 Preferentemente, la forma de base libre o una forma de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de monocloruro o de dicloruro, de un compuesto de la divulgación se utiliza en una formulación galénica como agente diagnóstico. La formulación galénica que contiene el compuesto de la invención contiene opcionalmente adyuvantes conocidos en la materia, por ejemplo, tampones, cloruro sódico, ácido láctico, tensioactivos, etc. Es posible una esterilización mediante filtración de la formulación galénica en condiciones estériles antes de la utilización.

15 La dosis radioactiva debe estar en el intervalo de 1 a 100 mCi, preferentemente 5 a 30 mCi, y de forma más preferente 5 a 20 mCi por aplicación.

20 De los diversos aspectos de la divulgación, se prefieren determinados compuestos (por ejemplo, los compuestos descritos en los Ejemplos 16-20). Se prefieren especialmente dichos compuestos para su uso como agentes diagnósticos en tomografía de emisión de positrones (PET).

25 Los compuestos se pueden administrar mediante cualquier ruta adecuada, preferentemente en la forma de una composición farmacéutica adaptada a la mencionada ruta, y en una dosis eficaz para unirse a TTR en el cerebro y por tanto detectarse mediante una cámara de rayos gamma o PET. Normalmente, la administración es parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, o intramuscular. Se prefiere la administración intravenosa. Por tanto, por ejemplo, la presente divulgación proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden una solución de medios de contraste disuelta o suspendida en un transportador aceptable, por ejemplo, suero o una solución fisiológica de cloruro de sodio.

30 Los transportadores acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, suero salino, 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. Se describen otros transportadores farmacéuticamente aceptables, excipientes no tóxicos incluyendo sales, conservantes, tampones y similares, por ejemplo, en REMMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15^a Ed. Easton: Mack Publishing Co., pp. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y THE NATIONAL FORMULARY XIV., 14^a Ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). Se prefieren transportadores acuosos.

40 Se produjeron composiciones farmacéuticas de una manera conocida por se suspendiendo o disolviendo los compuestos de la presente invención -combinados opcionalmente con los aditivos individualizados en la farmacoepa galénica- en un medio acuoso y a continuación esterilizando opcionalmente la suspensión o solución. Los aditivos adecuados son, por ejemplo, tampones fisiológicamente aceptables (tales como, por ejemplo, trometamina), adiciones de agentes complejantes (por ejemplo, ácido dietilentriamina pentaacético) o -si se requiere- electrolitos, por ejemplo, cloruro de sodio o -si es necesario- antioxidantes, tales como ácido ascórbico, por ejemplo.

50 Si las suspensiones o soluciones de los compuestos en agua o solución salina fisiológica son deseables para la administración entérica u otros fines, se mezclan con uno o varios agentes auxiliares (por ejemplo, metilcelulosa, lactosa, manitol) y/o tensioactivos (por ejemplo, lecitinas, "Tween", "Myrj") y/o agentes aromatizantes para mejorar el sabor (por ejemplo, éteres de petróleo), como es habitual en la farmacoepa galénica.

55 Las composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden filtrarse para esterilizarlas. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso como tales, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para ajustar el pH y agentes tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

60 Para los compuestos descritos en el presente documento que tienen halógenos radioactivos, estos compuestos pueden enviarse como compuestos "calientes", es decir, con el halógeno radioactivo en el compuesto y administrarse en, por ejemplo, una solución salina fisiológicamente aceptable. En el caso de los complejos metálicos, estos compuestos pueden enviarse como compuestos "fríos", es decir, sin el ion radioactivo, y a continuación mezclarse con el eluato generador de Tc o el eluato generador de Re.

65

El papel de la hormona tiroidea, los análogos, y las conjugaciones poliméricas en la modulación de las acciones de los polipéptidos cuyos receptores de la superficie celular se agrupan alrededor de la integrina $\alpha\beta 3$, u otros compuestos que contienen RGD

5 La integrina $\alpha\beta 3$ es una proteína heterodimérica de la membrana plasmática con algunos ligandos de proteínas de la matriz extracelular y una secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp ("RGD"). Utilizando la integrina purificada, los inventores han descubierto que la integrina $\alpha\beta 3$ se une a T4 y que esta interacción está perturbada por los antagonistas de $\alpha\beta 3$. Los estudios de unión a radioligando han desvelado que $\alpha\beta 3$ purificada se une a T4 con elevada afinidad (CE50, 371 pM), y parece unirse a T4 preferentemente sobre T3. Esto es consistente con los informes
10 previos que muestran la activación de MAPK y la translocación nuclear, así como la angiogénesis inducida por hormonas, por T4, en comparación con T3. Los antagonistas de la integrina $\alpha\beta 3$ inhiben la unión de T4 a la integrina y, de forma importante, evitan la activación por T4 de la cascada de señalización de MAPK. Esta consecuencia funcional -activación de MAPK- de la unión de la hormona a la integrina, junto con la inhibición de la acción proangiogénica dependiente de MAPK de la hormona tiroidea por los antagonistas de la integrina $\alpha\beta 3$, permite a los inventores describir el sitio de unión a la yodotironina en la integrina como un receptor. Debe indicarse que la 3-yodotironamina, un derivado de hormona tiroidea, se une a trazas de un receptor de amina (TAR I) según han indicado Scanlan et al., pero de forma interesante, las acciones de este análogo son antitéticas de las de T4 y T3.

20 Los ligandos tradicionales de las integrinas son proteínas. Que una molécula pequeña, una hormona tiroidea, sea también un ligando de una integrina es un hallazgo novedoso. Se describe también que resveratrol, un polifenol con cierta actividad estrogénica, se une a la integrina $\alpha\beta 3$ con una consecuencia funcional celular, la apoptosis, diferente del que resulta de la unión de la hormona tiroidea. El sitio de la integrina al cual se une T4 está en o próximo a la ranura de unión de RGD de la integrina heterodimérica. Es posible, sin embargo, que $\alpha\beta 3$ se una a T4 en otra parte de la proteína y que la ocupación del sitio de reconocimiento de RGD por tetrac o por los péptidos que contienen RGD
25 bloquee alostéricamente el sitio de unión a T4 o produzca un cambio conformacional en la integrina que convierta el sitio T4 en no disponible. Por consiguiente, la modulación por T4 de la interacción laminina-integrina de los astrocitos puede ser una consecuencia de la unión de la hormona a la integrina. Existe por tanto la posibilidad de que las hormonas tiroideas en el exterior de las células puedan afectar la unión mediante la integrina $\alpha\beta 3$ de las proteínas de la matriz extracelular además de la laminina.

30 En los últimos años se han documentado bien las acciones de T4 que no tienen un mecanismo genómico. Numerosas de estas actividades están mediadas por MAPK. Los inventores han demostrado que las etapas iniciales de la activación de la cascada de MAPK por las hormonas tiroideas, incluyendo la activación de la proteína quinasa C, son sensibles a GTP γ S y a la toxina de la tosferina, indicando que el receptor de la membrana plasmática para la hormona tiroidea es sensible a la proteína G. Debe señalarse que otros autores han demostrado que determinadas funciones celulares mediadas por la integrina $\alpha\beta 3$ están moduladas por la proteína G. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio del dominio de unión a RGD anula la capacidad del receptor de nucleótidos P2Y2 de activar G $_0$, aunque no se haya visto afectada la activación de Gq. Wang *et al.* han demostrado que una proteína asociada a la integrina, IAP/CD47, indujo la migración de células del músculo liso mediante la inhibición mediada por la activación de MAPK.

40 Además de vincular la unión de T4 y otros análogos mediante la integrina $\alpha\beta 3$ a la activación de una ruta específica de transducción de la señal intracelular, se describe que la ligadura de la hormona por la integrina es fundamental para la inducción mediante T4 de la angiogénesis dependiente de MAPK. En el modelo CAM se produce un crecimiento significativo de vasos después de 48-72 h de tratamiento con T4, indicando que el efecto de T4 sobre la membrana plasmática puede dar como resultado cambios transcripcionales complejos. Por tanto, lo que se inició como una acción no genómica de la hormona -transducción de la señal de T4 en la superficie celular- interacciona con los efectos genómicos de la hormona que culminan en la neovascularización. Se han descrito anteriormente interfaces de acciones no genómicas y genómicas de las hormonas tiroideas, por ejemplo, la fosforilación dependiente de MAPK en Ser-142 de TR $\beta 1$ que inicia T4 en la superficie celular y que da como resultado la replicación de las proteínas r por TR y el reclutamiento de coactivadores.

50 Se ha descrito también que T4 estimula el crecimiento de células gliales C-6 mediante un mecanismo dependiente de MAPK que se inhibe mediante el péptido RGD, y que la hormona tiroidea produce la fosforilación de la serina mediada por MAPK del receptor de estrógenos nucleares (ER α) en células MCF-7 mediante un proceso que los inventores saben ahora que se inhibe mediante un péptido RGD. Estos hallazgos en algunas líneas de células respaldan la participación de la integrina en las respuestas funcionales de las células a las hormonas tiroideas.

60 La identificación de $\alpha\beta 3$ como un receptor de membrana para las hormonas tiroideas indica una significancia clínica de la interacción entre la integrina y la hormona y la consecuencia en la dirección descendente de la angiogénesis. Por ejemplo, $\alpha\beta 3$ se expresa en exceso en muchos tumores y esta expresión en exceso parece jugar un papel en la invasión y el crecimiento tumoral. Niveles en circulación relativamente constantes de la hormona tiroidea pueden facilitar la angiogénesis asociada a tumor. Además de demostrar la acción proangiogénica de T4 en el modelo CAM en la presente memoria y en otros sitios, se describe también que las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas forman también nuevos vasos sanguíneos cuando se exponen a hormonas tiroideas. La administración local de antagonistas de $\alpha\beta 3$ o tetrac alrededor de células tumorales puede inhibir la angiogénesis estimulada por hormonas tiroideas. Aunque tetrac carece de muchas de las actividades biológicas de las hormonas tiroideas,

consigue acceder al interior de determinadas células. El anclado de tetrac, o de antagonistas específicos de RGD, a sustratos no inmunógenos (agarosa o polímeros) excluiría la posibilidad de que los compuestos pudieran cruzar la membrana plasmática, pero que retengan, como se muestra en la presente memoria descriptiva, la capacidad de prevenir la angiogénesis inducida por T4. La agarosa-T4 utilizada en los presentes estudios es de esta manera un prototipo de una nueva familia de análogos de hormonas tiroideas que tienen efectos celulares específicos, pero que no pueden acceder al interior de la célula.

Por consiguiente, los Ejemplos del presente documento identifican la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ como un receptor de la superficie celular para las hormonas tiroideas (L-tiroxina, T4) y como sitio de inicio para la activación inducida por T4 de las cascadas de señalización intracelular. $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se une de manera dissociable a T4 con elevada afinidad; la unión al radioligando está desplazada por el ácido tetrayodotiroacético (tetrac), los anticuerpos $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ y por un péptido del sitio de reconocimiento de la integrina RGD. Las células CV-1 carecen de receptores nucleares de hormonas tiroideas pero la membrana plasmática soporta el tratamiento de estas células con $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ a concentraciones fisiológicas de T4 que activan la ruta de MAPK, un efecto inhibido por tetrac, el péptido RGD y los anticuerpos $\alpha\text{V}\beta\text{3}$. Los inhibidores de la unión de T4 a la integrina bloquean también la acción proangiogénica de T4 mediada por MAPK. La fosforilación de MAPK inducida por T4 queda bloqueada por la inactivación de αV y β3 mediante el ARNip. Estos hallazgos indican de T4 se une a $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ cerca del sitio de reconocimiento de RGD y demuestran que la unión de la hormona con $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ tiene consecuencias fisiológicas.

El papel de la hormona tiroidea, los análogos, y las conjugaciones poliméricas en la inhibición de la angiogénesis

La divulgación proporciona composiciones y métodos para inhibir la angiogénesis en un sujeto que lo necesita. Las condiciones sensibles al tratamiento por inhibición de la angiogénesis incluyen, por ejemplo, tumores primarios o metastásicos y retinopatía diabética. Las composiciones pueden incluir una cantidad eficaz de TETRAC, TRIAC o del mAb LM609. La composición puede estar en la forma de o una formulación farmacéutica inyectable estéril, la formulación farmacéutica incluye una cantidad antiangiogénicamente eficaz de una sustancia antiangiogénica en un transportador fisiológica y farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con uno o más excipientes.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona métodos para tratar una dolencia susceptible de tratamiento inhibiendo la angiogénesis en un sujeto que lo necesita una cantidad de un agente antiangiogénesis eficaz para inhibir la angiogénesis.

Se proporcionan también en la invención ejemplos de los agentes antiangiogénicos utilizados para inhibir la angiogénesis entre los que se incluyen, pero sin limitación, ácido tetrayodotiroacético (TETRAC), ácido triyodotiroacético (TRIAC), anticuerpo LM609 monoclonal, o una de sus combinaciones. Dichos agentes antiangiogénesis pueden actuar en la superficie celular para inhibir los agentes pro-angiogénesis.

Crecimiento de nuevos vasos sanguíneos relacionados con el cáncer

Los ejemplos de las dolencias susceptibles de tratamiento que inhiben la angiogénesis incluyen tumores primarios o metastásicos, incluyendo, glioma y cáncer de mama. En dicho método se usan compuestos que inhiben el efecto angiogénico inducido por la hormona tiroidea para inhibir la angiogénesis. Se ilustran detalles de dicho método en el Ejemplo 12.

Retinopatía diabética

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

Se sabe que la retinopatía proliferativa inducida por hipoxia (más que por diabetes) depende de la expresión de la integrina alfaV (αV) (E Chavakis et al., Diabetologia 45:262-267, 2002). Se propone en el presente documento que la acción de la hormona tiroidea sobre una integrina alfa Vbeta-3 ($\alpha\text{V}\beta\text{3}$) específica sea permisiva del desarrollo de la retinopatía diabética. La integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ se identifica en el presente documento como el receptor de la superficie celular de la hormona tiroidea. Las hormonas tiroideas, sus análogos, y las conjugaciones poliméricas, actúan mediante este receptor para inducir la angiogénesis.

Métodos de tratamiento y formulaciones

Los análogos de las hormonas tiroideas, las formas poliméricas, y los derivados se pueden usar en un método para promover la angiogénesis en un paciente que lo necesita. El método implica la administración simultánea de una cantidad eficaz de análogos de hormonas tiroideas, formas poliméricas y derivados en dosificaciones diarias bajas, durante una semana o más. El método se puede usar como tratamiento para restaurar la función cardíaca tras un infarto de miocardio. El método se puede usar también para mejorar el flujo sanguíneo en pacientes con enfermedad de la arteria coronaria que padecen de isquemia de miocardio o de flujo sanguíneo inadecuado en áreas diferentes que el corazón, por ejemplo, enfermedad vascular periférica, por ejemplo, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas,

en la que un flujo sanguíneo disminuido es un problema.

Los compuestos se pueden administrar mediante cualquier medio médicamente aceptable que sea adecuado para el compuesto que se va a administrar, incluyendo la administración oral, rectal, tópica o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular e intravenosa). Por ejemplo, la adenosina tiene una vida media muy corta. Por este motivo, es preferible administrar por vía intravenosa. Sin embargo, se han desarrollado agonistas de adenosina A₂ que tienen vidas medias mucho más largas, y que se pueden administrar mediante otros medios. Se pueden administrar los análogos de las hormonas tiroideas, formas poliméricas y derivados, por ejemplo, mediante administración intravenosa, oral, tópica, e intranasal.

En algunas realizaciones, los análogos de las hormonas tiroideas, formas poliméricas y sus derivados se administran mediante diferentes medios.

La cantidades de las hormonas tiroideas, sus análogos, formas poliméricas y derivados necesarias para ser eficaces en la estimulación de la angiogénesis, variarán, por supuesto, con el individuo que se está tratando y en última instancia a la discreción del médico a cargo del tratamiento. Los factores que se van a considerar incluyen el estado del paciente que se está tratando, la eficacia del agonista del receptor A₂ de adenosina concreto que se está utilizando, la naturaleza de la formulación, y el peso corporal del paciente. Las dosificaciones de los análogos de hormonas tiroideas o sus formas poliméricas, y sus derivados para tratar oclusiones cualquier dosificación que proporcione el efecto deseado.

Los compuestos descritos anteriormente se administran preferentemente en una formulación que incluye análogos de hormonas tiroideas o sus formas poliméricas, y sus derivados junto con un transportador aceptable para el modo de administración. Se puede utilizar cualquier formulación o sistema de administración de fármacos que contenga los principios activos, que sea adecuada para el uso previsto, como saben generalmente los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica conocen los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración oral, rectal, tópica o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e intravenosa). El transportador 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.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen convenientemente preparaciones acuosas estériles del compuesto activo, que es preferentemente isotónico con la sangre del receptor. Por tanto, dichas formulaciones pueden contener convenientemente agua destilada, dextrosa al 5 % en agua destilada o solución salina. Las formulaciones útiles incluyen también soluciones concentradas o sólidos que contienen el compuesto de fórmula (I), que tras dilución con un disolvente adecuado proporciona una solución adecuada para la anterior administración parenteral.

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

Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, de manera opcional con uno o más ingredientes auxiliares. Se pueden preparar comprimidos preparados mediante compresión del principio activo en una máquina adecuada en forma de flujo libre, por ejemplo, un polvo o gránulos, mezclados opcionalmente con los ingredientes auxiliares, por ejemplo, aglutinantes, lubricantes, diluyentes inertes, tensioactivos o agentes dispersantes. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto activo en polvo con un transportador adecuado.

Se puede preparar un jarabe o suspensión añadiendo el compuesto activo a una solución acuosa concentrada de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, al cual se pueden añadir también ingredientes auxiliares. Dichos ingredientes auxiliares pueden incluir aromatizantes, un agente para retrasar 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 administración rectal se pueden presentar como un supositorio con un transportador convencional, por ejemplo, manteca de cacao o Witepsol S55 (marca comercial 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 su administración a un paciente son bien conocidos por los expertos en la materia. La Patente de los Estados Unidos N^o 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 adecuados, junto con los tensioactivos si se requiere, y el material se somete a diálisis o sonicación, según sea necesario. Se proporciona una revisión de los métodos conocidos por G.Gregoriadis, Capítulo 14, "Liposomes," Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341 (Academic Press, 1979).

Son bien conocidas de los expertos en la materia las microesferas formadas de polímeros o proteínas, y se pueden acondicionar para su paso a través del tracto gastrointestinal directamente al torrente sanguíneo. Como alternativa, el compuesto puede incorporarse y las microesferas, o materiales compuestos de microesferas, implantarse para una liberación lenta durante un periodo de tiempo que varía de días a meses. Véanse, por ejemplo, las patentes Patente de los Estados Unidos N^{os} 4.906.474, 4.925.673 y 3.625.214, y Jein, TIPS 19:155-157 (1998), los análogos de las hormonas tiroideas o sus formas poliméricas, y los derivados de adenosina se pueden formular en un liposoma o micropartícula que está dimensionado de manera adecuada para alojarse en lechos capilares tras su administración intravenosa. Cuando el liposoma o la micropartícula se alojan en los lechos capilares que rodean el tejido isquémico, los agentes se pueden administrar localmente en el sitio en el cual pueden ser más eficaces. Los liposomas adecuados para dirigirse al tejido isquémico tienen generalmente menos de aproximadamente 200 nanómetros y son también normalmente vesículas unilamelares, según se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N^o 5.593.688 de Baldeschweiler, titulada "Liposomal targeting of ischemic tissue".

Las micropartículas preferidas son las preparadas a partir de polímeros biodegradables, tales como poliglicolidas, polilactidas y sus copolímeros. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente un sistema de vehículo adecuado dependiendo de diversos factores, que incluyen la velocidad deseada de liberación del fármaco y la dosificación deseada.

Las formulaciones se administran mediante catéter directamente al interior de los vasos sanguíneos. Se puede producir la administración, por ejemplo, a través de agujeros en el catéter. En aquellas realizaciones donde los compuestos activos tienen una vida media relativamente larga (del orden de 1 día a una semana o más), se pueden incluir las formulaciones en hidrogeles poliméricos biodegradables, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos N^o 5.410.016 de Hubbell et al. Estos hidrogeles poliméricos se pueden administrar al interior de la luz del tejido y los compuestos activos liberarse en el tiempo a medida que el polímero se degrada. Si es deseable, los hidrogeles poliméricos pueden tener micropartículas o liposomas que incluyen el compuesto activo dispersado en el anterior, lo que proporciona otro mecanismo para la liberación controlada de los compuestos activos.

Las formulaciones se pueden presentar de forma cómoda en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la farmacopea. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar compuesto activo con un transportador, que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima el compuesto activo con un transportador líquido o un transportador sólido finamente dividido y a continuación, si es necesario, conformar el producto en una forma farmacéutica unitaria deseada.

Las formulaciones pueden incluir opcionalmente componentes adicionales, tales como diversas sustancias biológicamente activas como factores de crecimiento (que incluyen TGF- β , factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF2), factores de crecimiento epitelial (EGF), factores alfa y beta de crecimiento transformante, (TGF alfa. y beta.), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF)), antivíricos, antibacterianos, antiinflamatorios, inmunosupresores, analgésico, agentes de vascularización, y moléculas de adhesión celular.

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

Formulaciones y métodos de tratamiento

Los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros inductores de factores neurogénicos, o los agonistas de análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros receptores de factores neurogénicos de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta que sea compatible con el análogo concreto de la hormona tiroidea polimérica solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores, o agonistas empleados. Por tanto, según sea apropiado, la administración puede ser oral o parenteral, incluyendo rutas de administración intravenosa e intraperitoneal. Además, la administración puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo del análogo polimérico de la hormona tiroidea solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas, o se pueden preparar de una forma más continua mediante la administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa i.v.) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable, o una colonia de análogos tiroideos poliméricos implantados solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otras células productoras de factores neurogénicos).

Los agentes terapéuticos de la divulgación (es decir, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, los inductores o agonistas de análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos) se pueden proporcionar a un individuo mediante cualquier medio adecuado, de forma directa (por ejemplo, local, como mediante inyección, implante o administración tópica a un locus de tejido) o sistémicamente (por ejemplo, de forma parenteral u

oral). 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 en aerosol, el agente comprende preferentemente parte de una suspensión o solución acuosa de fluido fisiológicamente compatible. Por tanto, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros transportadores o vehículos de factores neurogénicos son fisiológicamente aceptables de tal manera que además de administrar el agente deseado al paciente, no afectan sin embargo de forma adversa a los electrolitos y/o al equilibrio volumétrico del paciente. El medio fluido para el agente puede comprender por tanto solución salina fisiológica normal (por ejemplo, una solución acuosa al 9,85 % de NaCl, 0,15 M, pH 7-7,4).

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

Se pueden preparar soluciones útiles para la administración parenteral mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, como se ha descrito, 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 elevada viscosidad para ayudar a mantener el agente en el locus deseado. Los polímeros biocompatibles, preferentemente bioresorbibles, incluyendo, por ejemplo, polímeros de ácido hialurónico, colágeno, fosfato tricálcico, polibutirato, lactida, y glicolida y copolímeros de lactida/glicolida, pueden ser excipientes útiles para controlar la liberación de agente in vivo. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para estos agentes incluyen partículas de copolímero de acetato de etilenvinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para su administración mediante inhalación contienen como excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, lauril éter-9-polioxitilenado, glicocolato y desoxicocolato, o soluciones oleosas para su administración en la forma de gotas nasales, o como un gel que se va a aplicar intranasalmente. Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir también glicocolato para la administración bucal, metoxisalicilato para la administración rectal, o ácido cítrico para la administración vaginal. Pueden prepararse también supositorios para la administración rectal mezclando los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas con un excipiente no irritante tal como manteca de cacao u otras composiciones que son sólidas a temperatura ambiente y líquidas a temperaturas corporales.

Se pueden preparar formulaciones para su administración tópica a la superficie de la piel dispersando los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas con un vehículo dermatológicamente aceptable tal como una loción, crema, pomada o jabón. Particularmente útiles son los transportadores capaces de formar una película o capa sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir la eliminación. Para la administración tópica a las superficies internas de tejidos, el agente se puede dispersar en un tejido líquido adhesivo u otra sustancia conocida para potenciar la adsorción de una superficie de tejido. Por ejemplo, se pueden usar de forma ventajosa hidroxipropilcelulosa o soluciones de fibrinógeno/trombina. Como alternativa, se pueden usar soluciones para revestir tejidos, tales como formulaciones que contienen pectina.

Como alternativa, los agentes descritos en el presente documento se pueden administrar por vía oral. No se practica generalmente la administración oral de proteínas como agentes terapéuticos, dado que la mayoría de proteínas se degradan fácilmente por enzimas y ácidos digestivos en el sistema digestivo de mamíferos antes de que se puedan absorber en el torrente sanguíneo. Sin embargo, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son normalmente estables a ácidos y resistentes a la proteasa (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N° 4.968.590). Además, se ha identificado OP-1 en el extracto de glándulas de mamíferos, calostro y leche de 57 días. Además, OP-1 purificada de extractos de glándulas mamarias es morfogenéticamente activo y se detecta también en el torrente sanguíneo. La administración materna, mediante leche ingerida, puede ser una ruta de administración natural de proteínas de la superfamilia TGF- β . Letterio, et al., Science 264: 1936-1938 (1994), informan que TGF- β está presente en leche de murino, y que TGF- β radiomarcado se absorbe por la mucosa gastrointestinal de lactantes juveniles. TGF- β marcada, ingerida, aparece rápidamente en forma intacta en tejidos corporales juveniles, incluyendo pulmón, corazón e hígado. Finalmente, las formas solubles de análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, por ejemplo, maduran análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos con o sin agentes antioxidantes o antiinflamatorios. Estos hallazgos, así como los descritos en los ejemplos siguientes, indican que la administración oral y parenteral son medios viables para administrar proteínas de la superfamilia TGF- β , incluyendo análogos poliméricos tiroideos solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, a un individuo. Además, aunque las formas maduras de algunos análogos tiroideos poliméricos solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos descritos en el presente documento son normalmente rara vez solubles, el análogo tiroideo polimérico solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otras formas de factores neurogénicos que se encuentran en la leche (y en extractos de glándulas mamarias y calostro) es fácilmente soluble, probablemente por asociación de la forma activa morfológicamente 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 pueden también asociarse con moléculas capaces de potenciar su solubilidad in vitro o in vivo.

5 Cuando los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos están previstos para su uso como agente terapéutico para los trastornos del SNC, debe resolverse un problema adicional: superar la barrera hematoencefálica, la estructura de paredes capilares del cerebro que filtran eficazmente todas las categorías seleccionadas de sustancias presentes en la sangre, evitando su paso al cerebro. La barrera hematoencefálica puede derivarse eficazmente mediante la infusión directa de análogos poliméricos de hormonas tiroideas en el cerebro, o mediante la administración intranasal o inhalación de formulaciones adecuadas para la captación y el transporte retrógrado por neuronas olfatorias. Como alternativa, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas se pueden modificar para potenciar su transporte a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, las formas truncadas de análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos o un análogo polimérico de hormonas tiroideas solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otro agente estimulador de factores neurogénicos pueden ser más satisfactorias. Como alternativa, los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas proporcionados en el presente documento se pueden derivatizar o conjugar a un resto lipófilo a una sustancia que se transporta activamente a través de la barrera hematoencefálica, utilizando medios normalizados conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Pardridge, *Endocrine Reviews* 7: 314-330 (1986) y la patente de los Estados Unidos N° 4.801.575.

Los compuestos proporcionados en el presente documento pueden también asociarse con moléculas capaces de dirigirse a los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas del tejido deseado. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, u otra proteína de unión que interactúa específicamente con una molécula superficial en las células del tejido deseado. Se pueden diseñar moléculas directoras útiles, por ejemplo, utilizando la tecnología del sitio de unión de cadena única descrita en la patente de los Estados Unidos N° 5.091.513. Las moléculas directoras se pueden asociar de forma covalente o no covalente con análogos poliméricos de las hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas.

Como apreciarán los expertos en la materia, las composiciones formuladas contienen cantidades terapéuticamente eficaces de análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, sus inductores o agonistas. Esto es, contienen una cantidad que proporciona concentraciones adecuadas del agente al tejido afectado del sistema nervioso durante un tiempo suficiente para estimular una restauración detectable de la función afectada del sistema nervioso central o periférico, hasta e incluir una restauración completa del mismo. Como apreciarán los expertos en la materia, estas concentraciones variarán dependiendo de numerosos factores, incluyendo la eficacia biológica del agente seleccionado, las características químicas (por ejemplo, la hidrofobicidad) del agente específico, la formulación del mismo, incluyendo una mezcla con uno o más excipientes, la vía de administración, y el tratamiento abarcado, incluyendo cualquier principio activo que se administrará directamente en un sitio del tejido, o cualquiera que se administre sistémicamente. La dosificación preferida que se va a administrar es también probable que dependa de variables tales como el estado de los tejidos enfermos o dañados, y el estado global de salud del mamífero concreto. De forma general, son suficientes dosis únicas, diarias, dos veces a la semana o semanales de 0,0001-1000 mg de un análogo tiroideo polimérico solo o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos en presencia de agentes antioxidantes y / o antiinflamatorios, siendo preferible 0,0001-100 mg, y siendo incluso más preferible 0,001 a 10 mg. Como alternativa, se pueden emplear de forma ventajosa dosis únicas, diarias, dos veces a la semana o semanales de 0,01-1000 µg/kg de peso corporal, de forma más preferente 0,01-10 mg/kg de peso corporal. Se puede administrar la dosis eficaz presente en una dosis única o en una pluralidad (dos o más) de dosis aplazadas, según se desee o se considere adecuado en las circunstancias específicas. Se puede usar una inyección en bolo de una formulación para infusión difundible. Si se desea facilitar infusiones repetidas o frecuentes, el implante de una prótesis endovascular semipermanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) puede ser aconsejable.

Los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos, inductores o agonistas de la invención pueden, por supuesto, administrarse solos o junto con otras moléculas conocidas por ser beneficiosas en el tratamiento de las dolencias descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden administrar diversos factores de crecimiento bien conocidos, hormonas, enzimas, composiciones terapéuticas, antibióticos, u otros agentes bioactivos con los análogos poliméricos de hormonas tiroideas solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos. Por tanto, se pueden incluir diversos factores de crecimiento conocidos tales como NGF, EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α , y TGF- β , así como enzimas, inhibidores enzimáticos, antioxidantes, agentes antiinflamatorios, agentes secuestrantes con radicales libres, antibióticos y/o factores quimioattractivos/quimiotácticos, en los análogos poliméricos de hormonas tiroideas presentes solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otras formulaciones de factores neurogénicos.

Materiales y métodos

Reactivos: Todos los reactivos eran de calidad química y se adquirieron de Sigma Chemical Co. (San Luis, MO) o a través de VWR Scientific (Bridgeport, NJ). Se adquirieron acetato de cortisona, albúmina de suero bovino (BSA) y solución de gelatina (2 % de tipo B procedente de piel de bovino) de Sigma Chemical Co. Se adquirieron huevos de pollo fertilizados de Charles River Laboratories, SPAFAS Avian Products & Services (North Franklin, CT). T4,3,5,3'-triyodo-L-tironina (T3), ácido tetrayodotiroacético (tetrac), T4-agarosa, 6-N-propil-2-tiouracilo (PTU), péptidos que contienen RGE, y péptidos que contienen RGE se obtuvieron de Sigma; PD 98059 de Calbiochem; y CGP41251 fue un regalo de Novartis Pharma (Basel, Suiza). Se obtuvieron anticuerpos policlonales dirigidos contra FGF2 y anticuerpos monoclonales dirigidos contra la β -actina de Santa Cruz Biotechnology y FGF2 y VEGF recombinantes humanos de Invitrogen. Los anticuerpos policlonales contra ERK1/2 fosforilada eran de New England Biolabs y el anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de conejo, de DAKO. Se adquirieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra α V β 3 (SC73 12) y α -tubulina (E9) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Se adquirieron IgG de ratón normal y anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de conejo de Dako Cytomation (Carpinteria, CA). Se adquirieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra α V β 3 (LM609) y α V β 3 (P1F6), así como α V β 3 purificado, de Chemicon (Temecula, CA). Se obtuvieron L-[¹²⁵I]-T4 (actividad específica, 1250 μ Ci/ μ g) de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA).

Modelo de Angiogenesis en la membrana corioalantoidea (CAM): Se examinó la neovascularización *in vivo* mediante los métodos descritos previamente. 9-12 Embriones de pollo de diez días de edad se adquirieron de SPAFAS (Preston, CT) y se incubaron a 37 °C con una humedad relativa del 55 %. Se utilizó una aguja hipodérmica para practicar un pequeño orificio en el extremo romo del huevo implicando el saco aéreo, y se practicó un segundo orificio en el lado ancho del huevo, directamente sobre una parte avascular de la membrana embrionaria que se identificó a la luz de una vela. Se creó un falso saco de aire bajo el segundo orificio mediante la aplicación de presión negativa al primer orificio, haciendo que CAM se separara de la cáscara. Se recortó una ventana de aproximadamente 1,0 cm² en la cáscara sobre CAM caído con una rueda amoladora de marquetería (Dremel, división de Emerson Electric Co.), permitiendo el acceso directo a la CAM subyacente. FGF2 (1 μ g/ml) se utilizó como agente proangiogénico normalizado para inducir nuevas ramas de vasos sanguíneos en la CAM de los embriones de 10 días de edad. Se pretrataron discos estériles de papel de filtro n^o 1 (Whatman International) con 3 mg/ml de acetato de cortisona y 1 mM/l de PTU y se secaron al aire en condiciones de esterilidad. La hormona tiroidea, los análogos de hormona, FGF2 o disolventes de control y los inhibidores se aplicaron a continuación a los discos, que se dejaron secar. Después, los discos se suspendieron en PBS y se colocaron sobre CAM en crecimiento. Los filtros tratados con T4 o FGF2 se colocaron el primer día en una incubación de 3 días, con adición del anticuerpo de FGF2 30 minutos después a las muestras seleccionadas, tal como se indica. A las 24 horas, el inhibidor de la cascada de MAPK, PD 98059, también se añadió a los CAM de forma tópica mediante los discos filtrantes.

Análisis microscópico de secciones de CAM: Tras incubación a 37 °C con una humedad relativa del 55 % durante 3 días, se extirpó el tejido de CAM directamente por debajo de cada disco de filtro a partir del control y se trataron las muestras de CAM. Se lavaron los tejidos 3X con PBS, se colocaron en placas Petri de 35-mm (Nalge Nunc), y se examinaron bajo un estereomicroscopio SV6 (Zeiss) a un aumento de X50. Se recogieron imágenes digitales de secciones de CAM expuestas a filtros utilizando un sistema de videocámara de color con un dispositivo acoplado de 3 cargas (Toshiba) y se analizaron con el software Image-Pro (media Cybernetics). Se contaron el número de puntos de ramificación de los vasos incluidos en una región circular igual al área del disco filtrante. Se contó una imagen en cada preparación de CAM, y se analizaron los hallazgos de 8 a 10 preparaciones de CAM para cada estado de tratamiento (hormona o análogos tiroideos, FGF2, anticuerpo de FGF2, PD 98059). Además, se realizó cada experimento 3 veces. El índice de angiogénesis resultante es el promedio \pm SEM de nuevos puntos de ramificación en cada conjunto de muestras.

Ensayos FGF2: Se cultivaron células endoteliales ECV304 en medio M199 suplementado con suero de feto bovino al 10 %. Se sembraron en placas células ECV304 (10⁶ células) en placas de 24 pocillos revestidas con gel al 0,2 % en medio completo durante la noche, y a continuación se lavaron las células con medio libre de suero y se trataron con T4 o T3 como se ha indicado. Después de 72 horas, Se recogieron los sobrenadantes y se realizaron los ensayos de FGF sin dilución utilizando un sistema ELISA comercial (R&D Systems).

Activación de MAPK: Se cultivaron células ECV304 endoteliales en medio M199 con un 0,25 % de suero 13 con hormonas agotadas durante 2 días. A continuación las células se trataron con T4 (10⁻⁷ mol/l) durante 15 minutos a 6 horas. En experimentos adicionales, se trataron las células con T4 o FGF2 o con T4 en presencia de PD 98059 o CGP41251. Se prepararon fracciones nucleares de todas las muestras mediante un método de los inventores notificado anteriormente, se separaron las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, y se transfirieron a membranas para la inmunotransferencia con anticuerpos dirigidos a ERK 1/2 fosforilado. La aparición de ERK1/2 nuclear fosforilado significa la activación de estas isoformas de MAPK mediante T4.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa: Se trataron células ECV304 confluentes en placas de 10-cm con T4 (10⁻⁷ mol/l) durante 6 a 48 horas y se extrajo el ARN total utilizando isotiocianato de guanidino (Biotecx Laboratories). Se sometió el ARN (1 μ g) a reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) utilizando el sistema Access RT-PCR (Promega). Se transcribió de manera inversa el ARN total en ADNc a 48 °C durante 45 minutos, a continuación se desnaturalizó a 94 °C durante 2 minutos. Se realizó la síntesis de la

segunda hebra y la amplificación mediante la PCR 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 una extensión final durante 7 minutos a 68 °C tras el agotamiento de todos los ciclos. Los cebadores de la PCR para FGF2 fueron como sigue: FGF2, hebra de sentido directo 5'-TGGTATGTGGCACTGAAACG-3' (SEC ID N°:1), hebra de sentido contrario 5' CTCAATGACCTGGCGAAGAC-3' (SEC ID N°:2); la longitud del producto de la PCR fue de 734 pb. Los cebadores de GAPDH incluían la hebra de sentido directo 5'-AAGGTCATCCCTGAGCTGAACG-3' (SEC ID N°:3), y la hebra de sentido contrario 5'-GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGA-3' (SEC ID N°:4); la longitud del producto de la PCR fue de 218 pb. Se separaron los productos de la RT-PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se cuantificaron las bandas diana del gel utilizando el software LabImage (Kapelan), y se calculó el valor de [FGF2/GAPDH]X10 para cada punto temporal.

Análisis estadístico: Se realizó el análisis estadístico mediante el análisis de varianza monolateral (ANOVA) comparando el grupo experimental con el grupo control respectivo y se calculó la significancia estadística basándose en $P < 0,05$.

Angiogénesis *in vivo* en Matrigel FGF₂ o en implantes de líneas de células cancerosas en ratones: Modelo *in vivo* de angiogénesis en murino: Se realizó el modelo matrigel de murino de acuerdo con los métodos anteriormente descritos (Grant et al., 1991; Okada et al., 1995) y que se implementó en el laboratorio de los inventores (Powel et al., 2000). En resumen, matrigel exenta de factor de crecimiento (Becton Dickinson, Bedford MA) se descongelará durante la noche a 4 °C y se colocó en hielo. Se colocaron alícuotas de matrigel en tubos de polipropileno frío y FGF₂, se añadirán análogos de hormonas tiroideas o células cancerosas (1×10^6 células) al matrigel. Matrigel con solución salina, FGF₂, los análogos de hormonas tiroideas o las células cancerosas se inyectarán por vía subcutánea en la línea media ventral de los ratones. En el día 14, los ratones se sacrificarán y los geles solidificados se retirarán y se analizarán para determinar la presencia de nuevos vasos. Se inyectarán los compuestos A-D por vía subcutánea a diferentes dosis. El control y los implantes de geles experimentales se colocarán en un tubo de microcentrífuga que contiene 0,5 ml de solución de lisis celular (Sigma, San Luis, MO) y se aplastaron con una mano de mortero. Posteriormente, se dejó incubar los tubos durante la noche a 4 °C y se centrifugaron a 1.500 x g durante 15 minutos al día siguiente. Se añadirá una alícuota de 200 µl de lisado celular a 1,3 ml de una solución de reactivo de Drabkin (Sigma, San Luis, MO) para cada muestra. La solución se analizará 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 membrana corioalantoidea de pollo (CAM) de implante tumoral: El protocolo es tal como se ha descrito anteriormente (Kim et al., 2001). En resumen, se colocaron 1×10^7 células tumorales sobre la superficie de cada CAM (embriones de 7 días de edad) y se incubaron durante una semana. Los tumores resultantes se escindieron y se cortaron en fragmentos de 50 mg. Estos fragmentos se colocarán en 10 CAM por grupo adicionales y se trataron tópicamente el siguiente día con 25 µl de compuestos (A-D) disueltos en PBS. Siete días después, los tumores se escindirán a continuación a partir de los pesos de los huevos y tumorales para cada CAM. La Figura 8 es un bosquejo diagramático que muestra las etapas implicadas en el modelo de crecimiento tumoral *in vivo* en el CAM.

Los efectos de TETRAC, TRIAC, y los antagonistas de las hormonas tiroideas en la velocidad de crecimiento tumoral, la angiogénesis tumoral, y se puede determinar la metástasis tumoral de líneas de células cancerosas.

Crecimiento y metástasis tumoral -Modelo de xenoinjerto tumoral en ratones: El modelo es tal como se describe en las publicaciones de los inventores por Kerr et al., 2000; Van Waes et al., 2000; Ali et al., 2001; y Ali et al., 2001, cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). Puede determinarse y compararse la eficacia anticancerosa de TETRAC, TRIAC, y otros antagonistas de hormonas tiroideas a diferentes dosis y contra diferentes tipos de tumores.

Crecimiento y metástasis tumoral - Modelo experimental de metástasis: El modelo es tal como se describe en las publicaciones recientes de los inventores (Mousa, 2002; Amirkhosravi et al., 2003 a y 2003b, cada una de las cuales se ha incorporado en su totalidad en el presente documento). En resumen, células B16 de melanoma maligno de murino (ATCC, Rockville, MD) y otras líneas cancerosas se cultivarán en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, penicilina y estreptomycin (Sigma, San Luis, MO). Se cultivarán las células hasta una confluencia del 70 % y se cosecharán con tripsina-EDTA (Sigma) y se lavarán dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se volverán a suspender las células en PBS a una concentración de cualquiera de 2.0×10^5 células/ml para la metástasis experimental. Animales: se utilizarán ratones C57/BL6 (Harlan, Indianápolis, Indiana) que pesaban 18-21 gramos para este estudio. Todos los procedimientos están de acuerdo con la IACUC y las directrices institucionales. Puede determinarse y compararse la eficacia anticancerosa de TETRAC, TRIAC, y otros antagonistas de hormonas tiroideas a diferentes dosis y contra diferentes tipos de tumores.

Efecto de análogos de hormonas tiroideas sobre la angiogénesis.

T4 indujo un aumento significativo en el índice de la angiogénesis (aumento de veces por encima del inicial) en el modelo CAM. T3 a 0,001-1,0 µM o T4 a 0,1-1,0 µM alcanzó el efecto máximo en la producción de un aumento de 2-2,5 veces en el índice de angiogénesis en comparación con 2-3 veces de aumento en el índice de angiogénesis por 1 µg

de FGF2 (Tabla 1 y Figura 1a y 1b). El efecto de T4 en la promoción de la angiogénesis (2-2,5 veces de aumento en el índice de la angiogénesis) se alcanzó en presencia o ausencia de PTU, que inhibe la conversión de T4 a T3. La propia T3 a 91-100 nM indujo un potente efecto proangiogénico en el modelo CAM. La T4 agarosa produjo un efecto proangiogénico similar al alcanzado por T4. El efecto proangiogénico tanto de T4 como de T4-agarosa se bloqueó en un 100 % por TETRAC o TRIAC.

Potenciación o mejora de la actividad proangiogénica de FGF2 mediante concentraciones submáximas de T₄.

La combinación de T4 y FGF2 en concentraciones submáximas dio como resultado un aumento aditivo en el índice de angiogénesis hasta un nivel similar al efecto pro-angiogénesis máximo de cualquiera de FGF2 o T4 (Figura 2).

Efectos de los inhibidores de la cascada MAPK sobre las acciones pro-angiogénicas de T₄ y FGF2 en el modelo CAM. El efecto pro-angiogénesis de cualquiera de FGF2 o T4 quedó completamente bloqueado por PD 98059 a 0,8 - 8 µg (Figura 3).

Efectos de los antagonistas específicas de la integrina αVβ3 sobre las acciones pro-angiogénicas de T₄ y FGF2 en el modelo CAM. El efecto pro-angiogénesis de cualquiera de FGF2 o T4 quedó completamente bloqueado por el anticuerpo monoclonal específico LM609 a 10 µg (Figura 4a y 4b).

El ensayo CAM se ha utilizado para validar la actividad angiogénica de varios factores de crecimiento y otros promotores o inhibidores de la angiogénesis. En los presentes estudios, se ha demostrado que T₄ en concentraciones fisiológicas era pro-angiogénico, con 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 de este modelo. Puesto que la aparición de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en este modelo necesita varios días, los autores asumen que el efecto de la hormona tiroidea fue completamente dependiente de la interacción del receptor nuclear de la hormona tiroidea (TR). Las acciones de las yodotironinas que requieren la complejación intranuclear de TR con su ligando natural, T₃, son, por definición, genómicas, y culminan en la expresión génica. Por otra parte, la respuesta preferente de este sistema modelo a T₄ en lugar de a T₃, el ligando natural de TR, suscita la posibilidad de que la angiogénesis pudiera iniciarse de forma no genómica en la membrana plasmática mediante T₄ y culminar con efectos que requieren la transcripción génica. Las acciones no genómicas de T₄ se han descrito ampliamente, se suelen iniciar en la membrana plasmática y se pueden mediar mediante rutas de transducción de la señal. No necesitan la unión del ligando intranuclear de yodotironina y TR, pero pueden intervenir o modular la transcripción génica. Las acciones no genómicas de los esteroides también se han descrito correctamente, y se sabe que intervienen en las acciones genómicas de los esteroides o de otros compuestos. Los experimentos realizados con T₄ y tetrac o con agarosa-T₄ indicaron que el efecto proangiogénico de T₄, muy probablemente, se iniciaba en la membrana plasmática. Los autores han demostrado en otra parte que el tetrac bloquea los efectos de T₄ iniciados por la membrana, pero no activa por sí mismo la transducción de la señal. Por tanto, es una prueba de las acciones no genómicas de la hormona tiroidea. Se cree que agarosa-T₄ no consigue penetrar en el interior celular, y los autores y otros investigadores la han utilizado para examinar posibles acciones de la hormona iniciadas en la superficie celular.

Estos resultados sugieren 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 un complejo programa de transcripción génica consecuente.

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

Ensayo de angiogénesis tridimensional

Brotos de angiogénesis tridimensional in vitro de células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) cultivadas sobre microperlas portadores recubiertas de fibrina:

HDMEC confluentes (pasos 5-10) se mezclaron con perlas Cytodex-3 recubiertas de gelatina con una relación de 40 células por perla. Células y perlas (150-200 perlas por pocillos y placa de 24 pocillos) se suspendieron en 5 ml de EBM + suero humano normal al 15 %, se mezclaron suavemente cada hora durante las primeras 4 horas, después se dejaron en cultivo en una incubadora con CO₂ durante la noche. Al día siguiente, se añadieron 10 ml de EBM + SH al 5 % reciente, y la mezcla se cultivó durante 3 horas más. Antes de los experimentos, se comprobó el cultivo de EC-perlas; a continuación se añadieron 500 u de PBS a un pocillo de la placa de 24 pocillos, t se añadieron al PBS 100 u del cultivo de EC-perlas. Se contó el número de perlas, y se calculó la concentración de EC/perlas.

Se preparó una solución de fibrinógeno (1 mg/ml) en medio EBM con o sin factores de angiogénesis o factores de ensayo. Para el control positivo, se utilizaron 50 ng/ml de VEGF + 25 ng/ml de FGF2. Las EC-perlas se lavaron dos veces con medio EBM, y las EC-perlas se añadieron a la solución de fibrinógeno. El experimento se realizó por triplicado para cada condición. Las EC-perlas se mezclaron suavemente en la solución de fibrinógeno, y se añadieron

2,5 ul de trombina humana (0,05 U/ul) a 1 ml de solución de fibrinógeno; 300 ul se transfirieron inmediatamente a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. La solución de fibrinógeno polimeriza en 5-10 minutos; transcurridos 20 minutos, los inventores añadieron EBM + suero humano normal al 20 % + 10 ug/ml de aprotinina. La placa se incubó en una incubadora de CO₂. Las HDMEC tardaron aproximadamente 24-48 horas en invadir el gel de fibrina y formar tubos.

5 Un ensayo de angiogénesis in vitro con microportadores previamente diseñado para investigar el comportamiento angiogénico de las células endoteliales de la arteria pulmonar bovina en geles de fibrina bovina [Nehls y Drenckhahn, 1995 a, b] se modificó para el estudio de la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas en entornos ECM tridimensionales (Figuras 1 y 2). En resumen, fibrinógeno humano, aislado tal como se ha descrito
10 anteriormente [Feng et al, 1999], se disolvió en medio M199 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 colágeno 1,5 mg/ml por mezcla de Vitrogen 100 estéril en medio 5X M199 y agua destilada. El pH se ajustó a 7,4 mediante NaOH 1 N. En algunos experimentos, se añadieron factores de crecimiento y proteínas ECM (tales como VEGF, bFGF, PDGF-BB, suero, gelatina, y fibronectina) a las soluciones de fibrinógeno o colágeno. A continuación se añadieron
15 aproximadamente 500 EC-perlas a las soluciones de fibrinógeno 1 mg/ml o colágeno 1,5 mg/ml. Posteriormente, la suspensión de EC-perlas-colágeno o EC-perlas-fibrinógeno (500 EC-perlas/ml) se sembró en placa de 24 pocillos a 300 ul/pocillo. Los cultivos EC-perla-colágeno se incubaron a 37 °C para formar un gel. La gelificación de los cultivos de EC-perla-fibrina se produjo en menos de 5 minutos a temperatura ambiente después de 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 reciente
20 (EBM suplementado con suero humano normal al 20 % para HDMEC o EBM suplementado con suero de feto de ternera al 10 %). La respuesta angiogénica se controló visualmente y se registró mediante captura de imagen de video. Específicamente, se observó la formación de brotes de capilares, que se registró con un microscopio invertido Nikon Diaphot-TMD (Nikon Inc.; Melville, NY), provisto de un alojamiento de incubadora con un termostato Nikon NP-2 y un mezclador de flujo de dióxido de carbono Sheldon nº 2004. El microscopio estaba conectado directamente a un sistema de video compuesto por una cámara de video Dage-MTI CCD-72S y un monitor de video Sony 12" PVM-122
25 conectado a un ordenador Macintosh G3. Las imágenes se capturaron a diferentes aumentos mediante Adobe Photoshop. El efecto de los factores angiogénicos sobre la angiogénesis de los brotes se cuantificó visualmente mediante la determinación del número y porcentaje de EC-perlas en los brotes capilares. Se contaron cien perlas (de cinco a seis campos aleatorios de baja potencia) en cada uno de los pozos triplicados para cada condición
30 experimental. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces.

Cultivo celular.

35 La línea celular de fibroblastos de mono verde africano, CV-1 (ATCC, Manassas, VA), que carece del receptor nuclear de la hormona tiroidea, se sembró a 5000 células/cm² y se mantuvo en DMEM, suplementado con FBS térmicamente inactivado 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 obtuvieron de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). Los cultivos se mantuvieron en una cámara humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio se cambió cada tres días y las líneas celulares se pasaron a una
40 confluencia del 80 %. Para el tratamiento experimental, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 10 cm (Coming Incorporated, Coming, NY) y se dejaron crecer durante 24 h en medio que contiene FBS al 10 %. A continuación las células se lavaron dos veces con suero salino tamponado con fosfato (PBS) y se alimentaron con DMEM exento de suero suplementado con penicilina, estreptomycin, y HEPES. Después de 48 h de incubación en medio exento de suero, las células se trataron con un vehículo de control (concentración final de KOH 0,004 N KOH con polietilenglicol al 0,4 % [v/v]) o T4 (concentración final 10⁻⁷ M) durante 30 min; a continuación se recogieron los
45 medios, y se determinaron los niveles de T4 libre mediante inmunoensayo enzimático. Los cultivos incubados con una concentración total de 10⁻⁷ M de T4 tienen 10⁻⁹ a 10⁻¹⁰ M de T4 libre. Tras el tratamiento, las células se recogieron y las proteínas nucleares se prepararon tal como se ha descrito anteriormente.

Transfecciones transitorias con ARNip.

50 Células -1 se sembraron en placas de 10 cm (150.000 células/placa) y se incubaron durante 24 h en DMEM suplementado con FBS al 10 %. Las células se lavaron con OPTI-MEM (Ambion, Austin, TX) y se transfectaron con ARNip (concentración final 100 nM) hasta αV, β3, o αV y β3 juntos usando siPORT (Ambion) de acuerdo con las directrices del fabricante. Se transfectaron conjuntos adicionales de células CV-1 con un ARNip codificado para servir
55 como control negativo. Cuatro horas después de la transfección, se añadieron a las placas 7 ml de medio que contenía FBS al 10 % y se dejó incubar los cultivos durante la noche. A continuación, las células se lavaron con PBS y se colocaron en DMEM exento de suero durante 48 antes de su tratamiento con T4.

Aislamiento del ARN y RT-PCR.

60 El ARN total se extrajo de los cultivos 72 h después de la transfección usando el kit RNeasy de Qiagen (Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Doscientos nanogramos del ARN total se sometieron a transcripción inversa con el sistema Access RT-PCR (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores se basaban en secuencias publicadas específicas de la especie: αV (número de acceso NM-002210)
65 F-5'-TGGGATTGTGGAAGGAG y R-5'-AAATC-CCTGTCCATCAGCAT (producto de 319 pb), β3 (NM000212) F-5'-GTGTGAGTGCTCAGAGGAG y R-5'-CTGACT- CAATCTCGTCACGG (producto de 515 pb), y GAPDH

(AF261085) F-5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT y R-5'- TGAGCTTGACMGTGGTTCG (producto de 212 pb). La RT-PCR se realizó en el ciclador término Flexigene eom TECHNE (Burlington, NJ). Después de una incubación de 2 minutos 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. Los productos de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,8 % (p/v) teñido con bromuro de etidio.

Transferencia Western.

Alícuotas de proteínas nucleares (10 µg/banda) se mezclaron con el tampón de muestra Laemmli y se separaron mediante SDS-PAGE (gel de resolución al 10 %) y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Tras bloquear con leche desnatada al 5 % en suero salino tamponado con Tris que contenía Tween 20 al 1 % (TBST) durante 30 min, las membranas se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo monoclonal dirigido a la quinasa MAP p44/42 fosforilada (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) en TBST con leche al 5 % durante la noche a 4 °C. Después de 3 lavados de 10 min con TBST, las membranas se incubaron con anticuerpo de cabra dirigido contra Ig de conejo conjugado con HRP (dilución 1:1000) de DakoCytomation (Carpintería, CA) en TBST con leche al 5 % durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min con TBST y las proteínas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham). La intensidad de la banda se determinó usando el sistema de captura de imagen VersaDoc 5000 (Bio-Rad, Hercules, CA).

Ensayo de unión a radioligando.

Dos µg de αVβ3 purificado se mezcló con las concentraciones indicadas de compuestos de ensayo y se dejaron incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió a continuación [¹²⁵I]-T4 (2 µCi) y la mezcla se dejó incubar durante 30 min más a 20 °C. Las muestras se mezclaron con tampón de muestra (glicerol al 50 %, Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, y azul de bromofenol) y se analizaron en gel nativo básico al 5 % durante 24 h a 45 mA en frío. El equipo se desmontó, y los geles se colocaron sobre el papel filtrante, se envolvieron con una envoltura de plástico, y se expusieron a la película. La intensidad de la banda se determinó usando el sistema de captura de imagen VersaDoc 5000.

Ensayo en la membrana corioalantoidea de pollito (CAM) (estudios con αVβ3).

Embriones de pollo de diez días de edad se adquirieron de SPAFAS (Preston, CT) y se incubaron a 37 °C con una humedad relativa del 55 %. Se utilizó una aguja hipodérmica para practicar un pequeño orificio en el extremo romo del huevo, y se practicó un segundo orificio en el lado ancho del huevo, directamente sobre una parte avascular de la membrana embrionaria. Se aplicó una succión suave al primer orificio para desplazar el saco de aire y sacar la CAM de la cáscara. Con un perfilador modelo Dremel (Dremel, Racine, WI), se recortó una ventana de aproximadamente 1,0 cm² en la cáscara sobre el falso saco de aire, permitiendo el acceso a la CAM. Se pretrataron discos estériles de papel de filtro nº 1 (Whatman, Clifton, NJ) con 3 mg/ml de acetato de cortisona y propiltiouracilo 1 mM y se secaron al aire en condiciones de esterilidad. Se aplicaron la hormona tiroidea, los disolventes de control y el mAb LM609 a los discos que se secaron a continuación. Después, los discos se suspendieron en PBS y se colocaron sobre CAM en crecimiento. Después de incubar durante 3 días, la CAM bajo el disco filtrante se reseco y se lavó con PBS. Cada membrana se colocó en una placa Petri de 35 mm y se examinó con un estereomicroscopio SV6 con un aumento de 50X. Las imágenes digitales se capturaron y se analizaron con el programa informático Image-Pro (Mediacybetmics). Se contaron el número de puntos de ramificación de los vasos incluidos en una región circular igual a la del disco filtrante. Se contó una imagen de cada una de las preparaciones de 8-10 CAM para cada condición de tratamiento, y además, cada experimento se realizó 3 veces.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto de la hormona tiroidea sobre la angiogénesis: Tal como se observa en la Figura 1A y se resume en la Figura 1B, tanto L-T4 como L-T3 potenciaron la angiogénesis en el ensayo CAM. T4, a una concentración fisiológica total en el medio de 0,1 µmol/l, aumentó la formación de ramificaciones en los vasos sanguíneos en 2,5 veces (P<0,001). T3 (1 nmol/l) también estimuló la angiogénesis en 2 veces. La posibilidad de que T4 solamente fuera eficaz debido a la conversión de T4 en T3 mediante la 5'-monodeyodinasas celular se descartó por el hallazgo de que el inhibidor de la deyodinasas PTU no tenía efecto inhibitorio sobre la angiogénesis producida mediante T4. PTU se aplicó a todos los discos filtrantes en el modelo CAM. Por tanto, T4 y T3 estimulan la formación de nuevas ramas en los vasos sanguíneos en un modelo CAM normalizado anteriormente para el ensayo de factores de crecimiento.

Ejemplo 2. Efectos de T4-agarosa y Tetrac: Los inventores habían demostrado anteriormente que T4-agarosa estimula las rutas celulares de transducción de la señal iniciadas en la membrana plasmática de la misma manera que T4, y que las acciones de T4 y T4-agarosa quedan bloqueadas mediante el análogo de yodotironina desaminado, tetrac, que se sabe que inhibe la unión de T4 a las membranas plasmáticas. En el modelo CAM la adición de tetrac (0,1 µmol/l) inhibió la acción de T4 (Figura 2A), pero el tetrac en solitario no tuvo efectos sobre la angiogénesis (Figura 2C). La acción de T4-agarosa, añadido a una concentración de hormona de 0,1 µmol/l, fue comparable a la de T4 en el

modelo CAM (Figura 2B), y el efecto de T4-agarosa también quedó inhibido por la acción del tetrac (Figura 2B; resumido en 2C).

Ejemplo 3. Potenciación de la actividad proangiogénica de FGF2 mediante una concentración submáxima de T4:

La angiogénesis es un proceso complejo que habitualmente requiere la participación de factores de crecimiento polipeptídicos. El ensayo CAM requiere al menos 48 horas para que se manifieste el crecimiento de vasos; por lo tanto, es probable que los efectos aparentes sobre la membrana plasmática de la hormona tiroidea en este modelo sean resultado de una respuesta transcripcional compleja a la hormona. Por tanto, los inventores determinaron si FGF2 estaba implicado en la respuesta a la hormona y si la hormona podría potenciar el efecto de niveles subfisiológicos de este factor de crecimiento. T4 (0,05 $\mu\text{mol/l}$) y FGF2 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) estimularon individualmente la angiogénesis en un grado modesto (Figura 3). El efecto angiogénico de esta concentración submáxima de FGF2 quedó potenciado mediante una concentración subfisiológica de T4 hasta el nivel producido por 1,0 μg de FGF2 en solitario. Por tanto, los efectos de las concentraciones submáximas de la hormona y del factor de crecimiento parecen ser aditivos. Para definir con más precisión el papel de FGF2 en la estimulación de la angiogénesis por la hormona tiroidea, se añadió un anticuerpo policlonal dirigido contra FGF2 a los filtros tratados con FGF2 o T4, y se midió la angiogénesis después de 72 horas. La Figura 4 demuestra que el anticuerpo de 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 CAM estuvo mediado por una mayor expresión de FGF2. El anticuerpo IgG de control no tuvo efecto estimulador o inhibidor en el ensayo CAM.

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

Los niveles de FGF2 se midieron en el medio de células endoteliales ECV304 tratadas bien con T4 (0,1 $\mu\text{mol/l}$) o T3 (0,01 $\mu\text{mol/l}$) durante 3 días. Como puede observarse en la Tabla 2, T3 estimuló la concentración de FGF2 3,6 veces en el medio, mientras que T4 causó un aumento de 1,4 veces. Este hallazgo indica que la hormona tiroidea puede potenciar el efecto angiogénico de FGF2, al menos en parte, mediante un aumento en la concentración de factor de crecimiento disponible para las células endoteliales.

Tabla 2. Efecto de T4 y T3 sobre la liberación de FGF2 desde las células endoteliales ECV304

| Tratamiento de la célula | FGF2 (pg/ml/10 ⁶ células) |
|---|--------------------------------------|
| Control | 27,7 \pm 3,1 |
| T3 (0,01 $\mu\text{mol/l}$) | 98,8 \pm 0,5* |
| T3 + PD 98059 (2 $\mu\text{mol/l}$) | 28,4 \pm 3,2 |
| T3 + PD 98059 (20 $\mu\text{mol/l}$) | 21,7 \pm 3,5 |
| T4 (0,1 $\mu\text{mol/l}$) | 39,2 \pm 2,8† |
| T4 +PD 98059 (2 $\mu\text{mol/l}$) | 26,5 \pm 4,5 |
| T4 + PD 98059 (20 $\mu\text{mol/l}$) | 23,2 \pm 4,8 |
| *P<0,001, comparación de las muestras tratadas con T3 con las muestras de control mediante ANOVA; | |
| †P<0,05, comparación de las muestras tratadas con T4 con las muestras de control mediante ANOVA. | |

Ejemplo 5. Papel de la ruta de transducción de la señal ERK1/2 en la estimulación de la angiogénesis mediante la hormona tiroidea y FGF2: Una ruta mediante la cual T4 ejerce un efecto no genómico sobre las células es la cascada de transducción de la señal MAPK, específicamente la de la activación de ERK1/2. Se sabe que T4 potencia la activación de ERK1/2 mediante el factor de crecimiento epidérmico. El papel de la ruta MAPK en la estimulación de la expresión de FGF2 mediante la hormona tiroidea se examinó mediante el uso de PD 98059 (2 a 20 $\mu\text{mol/l}$), un inhibidor de la activación de ERK1/2 mediante las tirosina-treonina quinasas MAPK quinasa-1 (MEK1) y MEK2. Los datos de la tabla demuestran que PD 98059 bloquea eficazmente el aumento de la liberación de FGF2 desde las células endoteliales ECV304 tratadas con cualquiera de T4 o T3. Se realizaron estudios paralelos sobre la inhibición de ERK1/2 en los ensayos CAM, y los resultados representativos se muestran en la Figura 5. Una combinación de T3 y T4, cada uno en concentraciones fisiológicas, produjo un aumento de 2,4 veces en la ramificación de los vasos sanguíneos, un efecto que quedó completamente bloqueado mediante 3 $\mu\text{mol/l}$ de PD 98059 (Figura 5A). La estimulación mediante FGF2 de la formación de ramificaciones (2,2 veces) también quedó bloqueada de forma eficaz mediante este inhibidor de la activación de ERK1/2 (Figura 5B). Por tanto, el efecto proangiogénico de la hormona tiroidea se inicia en la membrana plasmática e implica la activación de la ruta ERK1/2 para estimular la liberación de FGF2 desde las células endoteliales. La activación de ERK1/2 se requiere de nuevo para transducir la señal FGF2 y ocasionar la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Ejemplo 6. Acción de la hormona tiroidea y FGF2 sobre la activación de MAPK La estimulación de la fosforilación y la translocación nuclear de los MAPK de ERK1/2 se estudiaron en células ECV304 tratadas con T4 (10⁻⁷ mol/l) durante 15 minutos a 6 horas. La aparición del ERK1/2 fosforilado en los núcleos celulares se produjo a los 15 minutos del tratamiento con T4, alcanzó un nivel máxima a los 30 minutos, y siguió siendo evidente a las 6 horas (Figura 6A). Este efecto de la hormona quedó inhibido por PD 98059 (Figura 6B), un resultado a esperar porque este compuesto bloquea la fosforilación de ERK1/2 mediante la quinasa MAPK. El inhibidor tradicional de la proteína quinasa C (PKC)- α , PKC- β , y PKC- γ , CGP41251, también bloqueó el efecto de la hormona sobre la activación de MAPK en estas células, como los inventores han observado con T4 en otras líneas celulares. La hormona tiroidea potencia la acción de varias citoquinas y factores de crecimiento, tal como el interferón- γ 13 y el factor de crecimiento epidérmico. En las

células ECV304, T4 potenció la activación de MAPK causada por FGF2 tras una incubación simultánea de 15 minutos (Figura 6C). Aplicando las observaciones realizadas con las células ECV304 al modelo CAM, los inventores proponen que el complejo mecanismo mediante el cual la hormona induce la angiogénesis incluye la liberación de FGF2 por las células endoteliales y la potenciación del efecto autocrino del FGF2 liberado sobre la angiogénesis.

Ejemplo 7. RT-PCR en células ECV304 tratadas con la hormona tiroidea: La cuestión final abordada en los estudios del mecanismo de la acción proangiogénica de T4 fue si la hormona puede inducir la expresión génica de *FGF2*. Las células endoteliales se trataron con T4 (10^{-7} mol/l) de 6 a 48 horas, y realizó la estimación del ARN de *FGF2* y *GAPDH* según la RT-PCR (inferido a partir de las medidas de ADNc, Figura 7). Fue evidente un aumento en el ADNc de *FGF2*, corregido para el contenido de *GAPDH*, a las 6 horas del tratamiento con la hormona que se potenció adicionalmente a las 48 horas.

Ejemplo 8A. Modelo de neovascularización retinal en ratones (diabéticos y no diabéticos): Para evaluar la actividad farmacológica de un artículo de ensayo sobre la neovascularización retinal, se expusieron crías de ratón a un entorno con alto contenido en oxígeno durante 7 días y se dejaron recuperar, estimulando de esta manera la formación de nuevos vasos en la retina. Se evaluaron los artículos de ensayo para determinar si la neovascularización retinal quedaba suprimida. Las retinas se examinaron con tinción de hematoxilina-eosina y con al menos un tinte, lo que demuestra la neovascularización (normalmente un tinte de Selectin). Otros tintes (tal como PCNA, PAS, GFAP, marcadores de la angiogénesis, etc.). Se indica a continuación un resumen del modelo:

Modelo animal

- Crías de ratón (P7) y sus madres se colocaron en un entorno hiperoxigenado (70-80 %) durante 7 días.
- En P12, los ratones se retiraron del entorno oxigenado y se colocaron en un entorno normal
- Se dejó durante 5-7 días que los ratones se recuperaran.
- Después, los ratones se sacrificaron y se recogieron los ojos.
- Los ojos bien se congelaron o se fijaron según fue adecuado
- Los ojos se tiñeron con tintes histoquímicos adecuados
- Los ojos se tiñeron con tintes inmunohistoquímicos adecuados
- Se pueden recoger la sangre, el suero u otros tejidos
- Los ojos, con referencia especial a las alteraciones microvasculares, se examinaron para descubrir todos y cada uno de los hallazgos. El crecimiento neovascular se puntuó de forma semicuantitativa. El análisis por imágenes también está disponible.

Ejemplo 8B: Hormona tiroidea y retinopatía diabética

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

Ejemplo 9 A. Cicatrización de heridas y tratamiento hemostático usando la formulación farmacéutica polimérica novedosa de hormona tiroidea y sus análogos

La divulgación incluye también un tratamiento hemostático y de cicatrización de heridas novedoso que incluye un análogo de hormona tiroidea inmovilizado, preferentemente análogos de T4, cloruro de calcio, y colágeno. Esta formulación novedosa controla de forma significativa las hemorragias tanto venosas como arteriales, reduce el tiempo de sangrado, genera un tapón de fibrina/plaquetas, libera factores de cicatrización de heridas derivados de plaquetas de manera sostenida en presencia de un bajo nivel de colágeno, y seguro. El desarrollo de dicho apósito hemostático y de cicatrización de heridas puede ser muy valioso para uso a corto y largo plazo en la atención sanitaria de bajas en combate. Se puede optimizar la formulación farmacéutica de la L-tiroxina inmovilizada (T4) y el hexasacárido globular en un hidrogel o apósito que contiene colágeno y cloruro de calcio. Este tratamiento hemostático y de cicatrización de heridas (formulación WH) en hidrogel o apósito también puede incluir la adición de un microbicida.

La L-tiroxina conjugada con un polímero o inmovilizada sobre agarosa ha demostrado una estimulación potente de la angiogénesis mediante la activación de los receptores de adhesión en la superficie celular (integrina $\alpha\beta 3$) que conduce a la activación de un evento de señalización intracelular, que a su vez conduce a una regulación en exceso de varias producciones de factor de crecimiento. Además, el T4 inmovilizado induce la migración celular epitelial de fibroblastos y de queratinocitos. El T4 inmovilizado, pero no el T3 u otros análogos, potencian la agregación y secreción de plaquetas inducidas por colágeno, que estimularía la formación del tapón plaquetario del propio sujeto. Además, el T4 inmovilizado también estimula la migración de células sanguíneas, lo que podría ser fundamental para luchar contra las infecciones. De este modo, el T4 inmovilizado puede ayudar al organismo a fabricar más de un compuesto utilizado para regenerar los vasos sanguíneos dañados, y también aumenta la cantidad de leucocitos que producen radicales libres en el sitio de la herida. Los radicales libres ayudan a eliminar las bacterias potencialmente patógenas de una herida.

Por tanto, T4 o T4-agarosa (10-100 nM), pero no T3, DIPTA, o GC-1, es eficaz para potenciar la agregación y la secreción de plaquetas (desgranulación). Por consiguiente, T4 (o sus análogos y conjugaciones poliméricas, por ejemplo, T4-agarosa), junto con cloruro de calcio 10 mM, y con o sin colágeno, se prefiere para la cicatrización de heridas. Véanse las Figs. 23A-E.

5

TROMBOELASTOGRAFÍA:

La tromboelastografía (TEG) se ha utilizado en varios escenarios hospitalarios desde su desarrollo por Hartert en 1948. El principio de la TEG se basa en la medición de la propiedad física viscoelasticidad del coágulo sanguíneo. La formulación del coágulo se sigue a 37 °C en una cubeta cilíndrica oscilante de plástico ("copa") y un pistón estacionario suspendido de forma estacionaria ("púa") con 1 mm de separación entre las superficies, usando un tromboelastógrafo informatizado (TEG Modelo 3000, Haemoscope, Skokie, IL). La copa oscila en cualquier dirección cada 4,5 segundos, con un periodo estacionario en la parte intermedia del ciclo de 1 segundo; que da como resultado una frecuencia de 0,1 Hz y una velocidad de cizalla máxima de 0,1 por segundo. La púa está suspendida mediante un alambre de torsión que actúa como transducción del par de giro. Cuando se forma el coágulo, las fibrillas de fibrina unen físicamente la copa a la púa y la rotación de la copa se ve afectada por la viscoelasticidad del coágulo (que se transmite a la púa), lo que se visualiza en línea mediante un ordenador personal IBM compatible y un programa informático personalizado (Haemoscope Corp., Skokie, IL). El par de giro que experimenta la púa (con respecto a la oscilación de la copa) se representa gráficamente en función del tiempo.

20

TEG evalúa la coagulación midiendo varios parámetros tales como la latencia de tiempo para la iniciación inicial del coágulo (R), el tiempo hasta la iniciación de un coágulo de firmeza fija (k) de aproximadamente 20 mm de amplitud, la cinética del desarrollo del coágulo medida a partir del ángulo (α), y la amplitud máxima del coágulo (MA). El parámetro A mide la anchura de la trazada en cualquier punto del MA. La amplitud A en mm es función de la resistencia o elasticidad del coágulo. La amplitud de la trazada del TEG es una medida de la rigidez del coágulo; la resistencia máxima o el módulo elástico de cizalla que alcanza el coágulo, G, es función de la rigidez del coágulo y se puede calcular a partir de la amplitud máxima (MA) de la trazada del TEG.

25

Se midieron los siguientes parámetros a partir de la trazada del TEG:

30

- R, el *tiempo de reacción* (tiempo de gelificación) representa el periodo latente antes del establecimiento de una red tridimensional de gel de fibrina (con una rigidez mensurable de aproximadamente 2 mm de amplitud).
- *Amplitud máxima* (MA, en mm), es la rigidez máxima manifestada por el coágulo.
- *Módulo elástico de cizalla o resistencia del coágulo* (G, dinas/cm²) está definido por: $G = (5000A) / (100-A)$.

35

La firmeza del coágulo es un parámetro importante de la trombosis y hemostasia in vivo ya que el coágulo debe soportar la tensión de cizalla en el punto de la lesión vascular. El TEG puede evaluar la eficacia de diferentes intervenciones farmacológicas sobre diferentes factores (activación de la coagulación, generación de trombina, formación de fibrina, activación de plaquetas, interacción plaquetas-fibrina, y polimerización de la fibrina) implicados en la formación y retracción del coágulo. El efecto de la endotoxina (0,63 ug), Xa (0,25 nM), trombina (0,3 mU), y TF (25 ng) sobre los diferentes parámetros del coágulo medidos mediante TEG informatizado sobre sangre humana completa se muestra en la Tabla 3.

40

Extracción de muestras de sangre: Se extrajo sangre de voluntarios que otorgaron su consentimiento según un protocolo aprobado por el Human Investigations Committee del William Beaumont Hospital. Usando el método de las dos jeringas, se extrajeron las muestras mediante una aguja de mariposa calibre 21, y se descartaron los primeros 3 ml de sangre. La sangre completa (WB) se recogió en tubos Vacutainer siliconados (Becton Dickinson, Rutherford, NJ que contenían citrato trisódico al 3,8 % de tal forma que se mantuvo la relación de citrato a sangre completa de 1:9 (v/v). El TEG se realizó en las 3 horas posteriores a la extracción de sangre. Se volvió a añadir calcio a 1-2,5 mM seguido por la adición de diferentes estímulos. El cloruro de calcio por sí mismo a la concentración utilizada demostró solamente un efecto mínimo sobre la formación del coágulo y la resistencia del coágulo.

50

La formación de coágulo se inició mediante escisión del Fibrinopéptido A a partir de fibrinógeno. Los monómeros de fibrina resultantes polimerizan espontáneamente para formar hebras de fibrillas que experimentan 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 reticulares es que se comportan como sólidos elásticos sólidos, que pueden resistir esfuerzos de corte deformantes. Esta resistencia a la deformación se puede medir mediante el módulo elástico, un índice de la resistencia del coágulo. A diferencia de los ensayos de coagulación convencionales (como el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial) que están basados solamente en el tiempo hasta el principio de la formación del coágulo, el TEG permite la adquisición de información cuantitativa que permite la medida de la resistencia máxima alcanzada por los coágulos. Mediante el receptor GPIIb/IIIa, las plaquetas se unen a fibrina (fibrinógeno) y modulan las propiedades viscoelásticas de los coágulos. Los resultados de los inventores demuestran que la resistencia del coágulo en TF-TEG es claramente una función de la concentración de plaquetas y las plaquetas aumentaron la resistencia del coágulo ~8 veces bajo cizalla. Diferentes antagonistas plaquetarios de GPIIb/IIIa (clase I comparada con la clase II) se comportan con diferente eficacia en la inhibición de la resistencia del coágulo mediada profibrina usando TF-TEG bajo cizalla.

65

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como promedio ± SEM. Los datos se analizaron mediante parejas o análisis de grupo con el test de la t de Student o ANOVA cuando fue aplicable; se consideraron diferencias significativas a P <0,05.

5 **Tabla 3: Efecto del cloruro de calcio comparado con el factor tisular sobre la dinámica del coágulo en sangre completa humana citrada usando TEG**

| Parámetros de TEG | 25 ng TF + Ca ²⁺ 2,25 mM (Promedio ± SEM) | Ca ²⁺ 10 mM (Promedio ± SEM) |
|-------------------|--|---|
| r (min) | 29,7 ± 2,3 | 14,5 ± 2,5* |
| K (min) | 5,8 ± 1,0 | 7,0 ± 0,7 |
| α (ángulo) | 45,0 ± 2,6 | 47,3 ± 2,7 |
| MA (mm) | 58,2 ± 1,7 | 56,5 ± 2,2 |

Los datos representan promedio ± SEM, n = 4, *P<0,01.

10 Agregación plaquetaria y desgranulación en sangre completa usando la técnica de la impedancia: Se usaron en el estudio el agregómetro de sangre completa Modelo 560 y el programa informático asociado Aggro-Link de Chrono-Log Corporation. Se colocaron dos electrodos en sangre diluida y se envió un impulso eléctrico de uno al otro. A medida que las plaquetas se agregan alrededor de los electrodos, el Chrono-Log mide la impedancia de la señal eléctrica en ohmios de resistencia .

15 **Extracción de muestras de sangre:**

Se extrajo diariamente sangre completa de donantes sanos con edades comprendidas entre 17 y 21 en viales Vacutainer de 4,5 mililitros con citrato de sodio tamponado al 3,8 % (Becton Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey). La sangre se mantuvo en un agitador oscilante para aumentar la vida de las plaquetas, y los experimentos se realizaron en las 5 horas posteriores a la flebotomía. Procedimiento: Para el control, 500 microlitros de sangre completa, 500 microlitros de suero salino al 0,9 %, y una barrita agitadora magnética se mezclaron en una cubeta, y se calentaron durante cinco minutos a 37 grados centígrados. Se indujo la agregación sub-umbral con 5 microlitros de colágeno 1-2 µg/ml, con medidas de 6-7 minutos del agregómetro. Los efectos de T4, T4-agarosa comparado con T3 y otros análogos de la hormona tiroidea sobre la agregación y secreción inducidas por colágeno. Ingerman-Wojenski C, Smith JB, Silver MJ. Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets. J Lab Clin Med. 1983 Jan;101(1):44-52.

Ensayo de migración celular.

30 Los granulocitos humanos se aislaron de sangre de oveja por el método de Mousa et al., y los ensayos de migración celular se realizaron 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 resumen, se usará una cámara de quimiotaxia desechable de 96 pocillos Neuroprobe 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 añadió la suspensión celular (45 µl de 2 x 10⁶) a una placa de polipropileno que contiene 5 µl de agentes de ensayo tales como flavonoides o derivados de la hormona tiroidea y se incubó durante 10 minutos a 22 °C. Se añadió IL8 (0,1 -100 ng) con o sin T3/ T4 (33 µl) a 0,001 - 0,1 µM a los pocillos inferiores de una cámara de quimiotaxia desechable, y después se ensambla la cámara con el filtro previamente incluido en la carcasa. Se añaden 25 µl de suspensión de células/agente de ensayo a los pocillos superiores del filtro, a continuación se incubó durante la noche (22 horas a 37 °C, CO2 al 5 %) en una incubadora de cultivo celular humidificada. Tras la incubación durante la noche, las células no migradas y el exceso de medio se eliminaron suavemente usando una pipeta de 12 canales y un rascador celular. A continuación, los filtros se lavaron dos veces con suero salino tamponado con fosfato (PBS) y se fijaron con formaldehído al 1 % en tampón PBS. Las membranas de las células migradas se permearon con Triton X-100 (0,2 %) y a continuación se lavaron 2-3 veces con PBS. Los filamentos de actina de las células migradas se tiñeron con rodamina faloidina (12,8 IU/ml) durante 30 minutos (22 °C). La rodamina faloidina se preparó nueva cada semana y se reutilizó un máximo de 3 días, y se almacenó protegida de la luz a 4 °C. La quimiotaxia se determinó cuantitativamente mediante detección de fluorescencia usando un fluorímetro Cytofluor II con microfiltro (530 excitación / 590 emisión). Todos los tratamientos celulares y los lavados posteriores se realizaron usando una estación de tratamiento/lavado diseñada de forma única (Methods In Cell Science, 19 (3): 179-187, 1997). Esta técnica permite la cuantificación precisa de la migración celular y proporciona resultados reproducibles con una variabilidad mínima inter e intraensayo.

Ensayos de migración celular:

55 Estos ensayos se realizaron usando una cámara de quimiotaxia desechable de 96 pocillos Neuroprobe con un tamaño de poro de 8 µm. Esta cámara permite la cuantificación de la migración celular hacia un gradiente de vitronectina u osteopontina. Las células cultivadas se retiraron siguiendo un método normalizado usando EDTA / Tripsina (0,01 % / 0,025 %). Tras la retirada, las células se lavaron dos veces y se resuspendieron (2x10⁶/ml) en EBM (medio basocelular endotelial, Clonetics Inc.). Se añadió vitronectina u osteopontina (33 µl) a 0.0125 -100 µg/ml a los pocillos inferiores de

una cámara de quimiotaxia desechable, ay después se ensambla la cámara con el filtro previamente incluido en la carcasa. Se añadió la suspensión celular (45 µl) a una placa de polipropileno que contiene 5 µl de agente de ensayo a diferentes concentraciones y se incubó durante 10 minutos a 22 °C. Se añaden 25 µl de suspensión de células/agente de ensayo a los pocillos superiores del filtro, a continuación se incubó durante la noche (22 horas a 37 °C) en una incubadora de cultivo celular humidificada. Tras la incubación durante la noche, las células no migradas y el exceso de medio se eliminaron suavemente usando una pipeta de 12 canales y un rascador celular. Los filtros se lavaron dos veces en PBS (sin Ca⁺² o Mg⁺²) y se fijaron con formaldehído al 1 %. Las membranas de las células migradas se permearon con Triton X-100 (0,2 %) y a continuación se lavaron 2-3 veces con PBS. Los filamentos de actina de las células migradas se tiñeron con rodamina faloidina (12,8 IU/ml) durante 30 minutos (22 °C). La rodamina faloidina se preparó nueva cada semana y se reutilizó un máximo de 3 días, y se almacenó protegida de la luz a 4 °C. La quimiotaxia se determinó cuantitativamente mediante detección de fluorescencia usando un equipo Cytofluor II (530 excitación / 590 emisión). Todos los tratamientos celulares y los lavados posteriores se realizaron usando una estación de tratamiento/lavado diseñada de forma única. Esta estación estaba compuesta de seis unidades de reactivo independientes, cada una de ellas con una capacidad de 30 ml de volumen. Las unidades individuales se llenaron con uno de los siguientes reactivos: PBS, formaldehído, Triton X-100, o rodamina-faloidina. Usando esta técnica, los filtros se sumergieron suavemente en la solución adecuada, minimizando de esta forma la pérdida de células. Esta técnica permitió la cuantificación máxima de la migración celular y proporciona resultados reproducibles con una variabilidad mínima inter e intraensayo (1,2).

20 **Migración hacia la vitronectina de la proteína de la matriz extracelular**

| Tratamientos (Unidades de fluorescencia) + SD | Migración EC promedio |
|--|-----------------------|
| A. Migración no específica Sin matriz en LC | 270 ± 20 |
| B. Vitronectina (25 ug) en LC | 6.116 ± 185 |
| C. T3 (0,1 uM) UC / Vitronectina (25 ug) en LC | 22.016 ± 385 |
| D. T4 (0,1 uM) UC / Vitronectina (25 ug) en LC | 13.083 ± 276 |
| C + XT199 (10 uM) | 4.550 ± 225 |
| D + XT199 (10 uM) | 3.890 ± 420 |
| C + PD (0,8 ug) | 7.555 ± 320 |
| D + PD (0,8 ug) | 6.965 ± 390 |

LC = cámara inferior, UC = cámara superior

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

25 **Ejemplo 9B. Cicatrización de heridas *in vitro* en epitelio y fibroblastos humanos:** El método bidimensional de cicatrización de heridas *in vitro* es como se ha descrito en Mohamed S, Nadjicka D, Hanson, V. Wound healing properties of cimetidine *in vitro*. Drug Intell Clin Pharm 20: 973-975; 1986. Adicionalmente, se utilizará un método tridimensional de cicatrización de heridas ya establecido en el laboratorio de los inventores (véase *más adelante*). Los datos muestran una potente estimulación de la cicatrización de heridas mediante la hormona tiroidea.

30 Ensayo tridimensional *in vitro* de cicatrización de heridas en células de fibroblastos dérmicos humanos:

Etapa 1: Preparar geles de colágeno contraídos:

- 35 1) Revestir una placa de 24 pocillos con 350 ul de BSA al 2 % a TA durante 2 h,
 2) NHDF confluentes al 80 % (células de fibroblastos dérmicos normales humanos, Paso 5-9) se tripsinizaron y neutralizaron con medio de crecimiento, se centrifugaron y lavaron una vez con PBS
 3) Preparar una mezcla de colágeno-célula, mezclar suavemente y siempre sobre hielo:

| Solución madre | Concentración final |
|---------------------|-------------------------------|
| 5xDMEC | 1xDMEM |
| 3 mg/ml de vitrogén | 2 mg/ml |
| ddH2O | óptimo |
| NHDF | 2x10 ⁻⁵ células/ml |
| FBS | 1 % |

40 4) Aspirar BSA al 2 % de la placa de 24 pocillos, añadir la mezcla de colágeno-célula 350 ul/pocillo, e incubar la placa en una incubadora a 37° C con CO2.

45 5) Después de 1 h, añadir medio DMEM+FBS al 5 %, 0,5 ml/pocillo, con una punta de 10 ul. Despegar el gel de colágeno del borde de cada pocillo, incubar después durante 2 días. Las células de fibroblastos contraerán el gel de colágeno

Etapa 2: Preparar el coágulo tridimensional de fibrina de la herida, y embeberlo en el cultivo de colágeno dañado

- 1) Preparar la 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.

| Solución madre | Concentración final |
|---------------------|----------------------|
| 5xDMEC | 1xDMEM |
| Fibrinógeno | 1 mg/ml |
| ddH2O | óptimo |
| reactivos de ensayo | concentración óptima |
| FBS | 1 % o 5 % |

2) Recortar cada gel de colágeno contraído en su parte central con unas tijeras. Lavar el gel con PBS y transferir el gel al centro de cada pocillo de la placa de 24 pocillos

5 3) Añadir 1,5 ul de trombina humana (0,25 U/ul) a cada tubo, mezclar bien y después añadir la solución alrededor del gel de colágeno, la solución polimerizará en 10 min.

Después de 20 min, añadir DMEM+FBS al 1 % (o 5 %) con o sin agente de ensayo, 450 ul/pocillo e incubar la placa en una incubadora a 37° C con CO2 durante un máximo de 5 días. Tomas fotografías cada día.

10

Cicatrización de heridas *in vivo* en ratas diabéticas:

Los efectos de los análogos de la hormona tiroidea y sus formas conjugadas se ensayaron usando un modelo de herida aguda mediante incisión en ratas diabéticas. La tasa de cierre de heridas, análisis de resistencia a la rotura e histología se realizaron de forma periódica en los días 3-21.

15

Métodos:

Los animales (ratones y ratas) del estudio recibieron dos heridas punzantes pequeñas - se aplicó WH a una de las heridas, y la otra se cubrió con un suero salino como control. Por otra parte, las heridas se dejaron cicatrizar de forma natural.

20

Los animales se sometieron a eutanasia cinco días después de resultar heridos. Se extirpó una pequeña área de la piel -de 1 a 1,5 milímetros- de los bordes de las heridas tratadas y no tratadas.

25

Se determinó el cierre de la herida y el tiempo hasta el cierre de la herida. Adicionalmente, se determinaron los niveles de tenascina, una proteína que ayuda a construir tejido conectivo, en el tejido de granulación de las heridas. También se determinó la calidad del tejido de granulación (es decir, tejido rugoso de color rosado que normalmente se forma a medida que cicatrizan las heridas, nuevos capilares y tejido conectivo).

30

Materiales y métodos

Se prepararon heridas en granulación crónica por métodos bien conocidos en la técnica. Ratas Sprague Dawley macho que pesaban de 300 a 350 gramos se aclimataron durante una semana en la instalación de los inventores antes de su uso. Mediante anestesia intraperitoneal con Nembutal (35 mg/kg), el dorso de la rata se afeitó y se depiló. Los animales se enjaularon individualmente y se recibieron alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del Animal Care and Use Committee del Department of Veterans Affairs Medical Center, Albany, NY.

35

Se había realizado anteriormente la caracterización histológica de esta herida, en comparación con una herida humana en granulación crónica. A continuación, sesenta y cuatro ratas se dividieron en ocho grupos de tratamiento (n=8 / grupo). Los animales se trataron con aplicación tópica de vehículo (controles de vehículo) en los días 5, 9, 12, 15, y 18. El control de vehículo puede ser bien agarosa (Grupo 1) o la forma polimérica (Grupo 2) que se usará en la conjugación de L-tiroxina. Las heridas tratadas con T4-agarosa (Grupos 3-5) o T4-polímero (Grupos 6-8) a 1, 10, 100 µg/cm² en presencia de 10 µg de hexasacárido globular, 10 µg de colágeno, y cloruro de calcio 10 mM a aplicar por vía tópica en los días 5, 9, 12, 15, y 18. Todas las heridas se dejaron expuestas. Cada 48 se trazó sobre láminas de acetato el perfil de las heridas, y se pueden realizar cálculos de área con planimetría digital informatizada.

45

Tres tiras transversales de espesor completo de tejido de granulación se recogieron a continuación de los extremos cefálico, intermedio y caudal de las heridas en el día 19 y se fijaron en formalina tamponada al 10 por ciento. Se tomaron secciones transversales (5 µm) de cada espécimen, que se tiñeron con hematoxilina y eosina. El espesor del tejido de granulación se puede estimar con un micrómetro óptico a bajo aumento. Los campos a aumento elevado se examinaron inmediatamente por debajo de la capa inflamatoria superficial del tejido de granulación. En cada tira de tejido de granulación, cinco campos adyacentes de alto aumento se pueden fotografiar y codificar. Copias ampliadas de estas exposiciones se utilizaron a continuación para el análisis histométrico de forma enmascarada. Los fibroblastos, células "redondas" (macrófagos, linfocitos, y neutrófilos), y capilares se contaron. Además, la celularidad de cada sección se puntuó según la celularidad en una escala de 1 (recuento celular bajo) a 5 (muy celular).

55

Análisis estadístico:

Las medidas seriadas del área se representaron gráficamente frente al tiempo. Con los datos de cada animal se ajustó una ecuación de Gompertz (r^2 típico = 0,85). Usando esta curva se puede estimar la semivida de la herida. La comparación entre grupos se realiza usando las tablas de análisis del ciclo de vida y la prueba de rango de Wilcoxon. Estos análisis estadísticos se realizaron usando los paquetes informáticos SAS (SAS/STAT Guide for Personal Computers, Versión 6 Edición, Cary, Carolina del Norte, 1987, p 1028) y BMDP (BMDP Statistical Software Manual, Los Angeles, BMDP Statistical Software, Inc. 1988) en un ordenador personal.

Los recuentos celulares de los diferentes grupos de tratamiento se combinaron y se analizaron usando un análisis monolateral de la varianza. Los análisis *post-hoc* de las diferencias entre grupo se pueden llevar a cabo con la prueba de Tukey (ensayo de comparación múltiple completamente emparejado) donde $p < 0,05$ se considera significativo. El programa informático de estadística Sigma Stat (Jandel Scientific, Corte Madera, California) se utilizará para el análisis de los datos.

Ejemplo 10. Modelo de infarto de miocardio en roedores: El modelo de ligadura de la arteria coronaria del infarto de miocardio se utilizó para investigar la función cardiaca en ratas. La rata se anestesió inicialmente con xilazina y ketamina, y después de obtenerse la anestesia adecuada, la tráquea se intubó y se inició la ventilación con presión positiva. El animal se colocó en posición supina con sus extremidades ligeramente sujeto con cinta adhesiva y se practicó una esternotomía mediana. El corazón se extrajo del cuerpo suavemente y se ató firmemente una sutura 6-0 alrededor de la arteria coronaria descendente izquierda anterior. El corazón se sustituyó rápidamente en el pecho y se cerró la incisión de la toracotomía con una sutura en forma de bolsa 3-0 seguido por el cierre de la piel con suturas interrumpidas o clips quirúrgicos. Los animales se colocaron sobre una manta calefactora con temperatura regulada y se observaron estrechamente durante la recuperación. Se administraron en caso necesario oxígeno suplementario y resucitación cardiopulmonar. Tras la recuperación, la rata se devolvió a la instalación de cuidado animal. Dicha ligadura de la arteria coronaria produce infartos de miocardio importantes en la pared anterior. La mortalidad a las 48 h de dicho procedimiento puede ser incluso del 50 %, y existe cierta variabilidad en el tamaño del infarto producido mediante este procedimiento. Basándose en estas consideraciones, y en la experiencia anterior, para obtener 16-20 ratas con infartos importantes de forma que se puedan comparar los dos modelos de administración de la hormona tiroidea se necesitan aproximadamente 400 ratas.

Estos experimentos se diseñaron para mostrar que la administración sistémica de hormona tiroidea bien antes o después de la ligadura de la arteria coronaria conduce a efectos beneficiosos en animales intactos, incluyendo la extensión de anomalías hemodinámicas evaluadas mediante ecocardiografía y mediciones hemodinámicas, y reducción en el tamaño del infarto. Se proponen medidas de los resultados a las tres semanas del infarto. Aunque algunas ratas puede que no hayan tenido infartos, o solamente se producen infartos pequeños, estas ratas se pueden identificar mediante ecocardiogramas normales y hemodinámicas normales (presión diastólica fina LV < 8 mm Hg).

Administración de la hormona tiroidea

Existen dos enfoques para administración. En el primero, la hormona tiroidea se inyectó directamente en el peri-infarto de miocardio. Como la demarcación entre el miocardio normal e isquémico se identifica fácilmente durante la oclusión aguda del tórax abierto, este enfoque proporciona suficiente administración de la hormona para detectar los efectos angiogénicos.

Aunque el primer modelo es útil en pacientes que se han sometido a cirugía de derivación de la arteria coronaria, y constituye la prueba de principio de que una inyección local induce la angiogénesis, también se puede usar un enfoque más amplio usando un segundo modelo. En el segundo modelo, se colocó un catéter retrógrado en el ventrículo izquierdo vía una arteria carótida en la rata anestesiada antes de inducir el infarto de miocardio. Como alternativa, se realiza una punción directa de la aorta con aguja, justo por encima de la válvula aórtica. La inyección intracoronaria de la hormona tiroidea se simuló a continuación por oclusión abrupta de la aorta por encima del origen de los vasos coronario durante varios segundos, produciendo de esta forma contracciones isovolúmicas. A continuación se inyectó la hormona tiroidea en el interior del ventrículo izquierdo o la aorta inmediatamente después de la constricción aórtica. Las contracciones isovolúmicas resultantes impulsan la sangre a lo largo de los vasos coronarios perfundiendo la totalidad del miocardio con la hormona tiroidea. Este procedimiento se puede realizar tantas veces como sea necesario para conseguir la eficacia. El número de inyecciones depende de la dosis usada y la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Ecocardiografía:

Se ha desarrollado un método para obtener ecocardiogramas bidimensionales y multimodales en ratas no anestesiadas. Las dimensiones del ventrículo izquierdo, función, espesor de la pared y movimiento de la pared se pueden medir de forma reproducible y fiable. La medición se realiza de forma enmascarada para eliminar el sesgo con respecto a la administración de la hormona tiroidea.

Hemodinámica:

Las mediciones hemodinámicas se utilizan para determinar el grado de afectación del ventrículo izquierdo. Las ratas se anestesiaron con isoflurano. Mediante una incisión a través del lado derecho anterior del cuello, la arteria carótida derecha y la vena yugular izquierda se aislaron y se canularon con un catéter transductor de presión (Millar, SPR-612, 1.2 Fr). A continuación se realizaron las siguientes medidas: frecuencia cardiaca, PA sistólica y diastólica, presión arterial media, presión sistólica y diastólica final del ventrículo izquierdo, y + y -dP/dt. Son de especial utilidad las mediciones de la presión sistólica y diastólica final del ventrículo izquierdo, cuya elevación progresiva se correlaciona con el grado de daño del miocardio.

Tamaño del infarto:

Las ratas se sacrificaron para medir el tamaño del infarto usando la metodología TTC.

Morfometría

La densidad de microvasos [microvasos/mm²] se medirá en la zona infartada, zona peri-infartada, y en el miocardio no afectado opuesto al infarto, normalmente la pared posterior. De cada rata se registraron digitalmente 7-10 imágenes microscópicas de alto campo [x400] con miocitos seccionados de forma transversal usando un programa informático de análisis de imagen. Un investigador enmascarado cuenta los microvasos. La microcirculación se definirá como los vasos más allá de las arteriolas de tercer orden con un diámetro de 150 micrómetros o menos, que alimentan al tejido comprendido entre las arteriolas y las vénulas. Para corregir las diferencias debidas a la hipertrofia ventricular izquierda, la densidad de microvasos se dividirá por el peso de LV corregido según el peso corporal. El miocardio de ratas sometidas a una operación quirúrgica simulada se utilizará como control.

Ejemplo 11: Efectos de los antagonistas de $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ sobre el efecto proangiogénico de T4 o FGF2: El inhibidor de $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, LM609, inhibió completamente los efectos proangiogénicos inducidos por FGF2 o T4 en el modelo CAM a 10 microgramos (Figura 16).

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

Un protocolo descrito en J. Bennett, Proc Natl Acad Sci USA 99:2211-2215, 2002, se utilizó para la administración de ácido tetrayodotiroacético (Tetrac) a ratones SCID que habían recibido implantes de células de cáncer de mama humano (MCF-7). El tetrac se proporcionó en agua potable para aumentar 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 inhibitoria del tetrac sobre la angiogénesis alrededor de los tumores implantados.

Ejemplo 13: Efecto estimulante de la proangiogénesis de la hormona tiroidea y sus análogos en niveles subumbral de VEGF y FGF2 en un modelo de brotes tridimensional *in vitro* de tejido endotelial microvascular

Tanto T₃, T₄, T₄-agarosa, como el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) junto con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) produjeron un efecto pro-angiogénesis comparable en el modelo de brotes tridimensional *in vitro* de tejido endotelial microvascular. El efecto pro-angiogénesis de los análogos de la hormona tiroidea quedaron bloqueados por PD 98059, un inhibidor de la cascada de transducción de la señal de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK; ERK1/2). Adicionalmente, un antagonista (XT199) específico de la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ inhibió el efecto pro-angiogénesis de cualquiera de los análogos de la hormona tiroidea o de T₄-agarosa. Los datos también demuestran que el antagonista de la hormona tiroidea Tetrac inhibe la respuesta pro-angiogénesis del análogo del tiroideo. Por tanto, estos análogos de la hormona tiroidea ensayados son pro-angiogénicos, una acción que se inicia en la membrana plasmática y que implica a los receptores de la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, y es dependiente de MAPK.

Esta divulgación describe un efecto estimulante de la pro-angiogénesis de T₃, T₄, o T₄-agarosa en niveles subumbral de VEGF y FGF2 en un modelo de brotes tridimensional *in vitro* de tejido endotelial microvascular. Esta divulgación también proporciona evidencia de que el efecto de la hormona se inicia en la membrana plasmática de la celular endotelial y que está mediada por la activación de la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ y la ruta de transducción de la señal ERK1/2.

Se demostró la potenciación mediante T₃, T₄ o T₄-agarosa de la actividad de angiogénesis de bajas concentraciones de VEGF y FGF2 en el modelo de ensayo de brote tridimensional. Tanto T₃, T₄ a 10^{-7} - 10^{-8} M, o T₄-agarosa a 10^{-7} M de concentración de hormona total fue comparable, en su actividad pro-angiogénesis, con el efecto de las concentraciones máximas de VEGF y FGF2 en este modelo *in vitro*. Aunque se ha notificado que el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en el corazón de la rata se produce en paralelo con la inducción de la hipertrofia del miocardio mediante una dosis alta de T₄, no se ha considerado a la hormona tiroidea como un factor angiogénico. El presente ejemplo establece que la hormona en concentraciones fisiológicas es pro-angiogénica en un escenario diferente al corazón.

T₄-agarosa reprodujo los efectos de T₄, y se cree que este derivado de la hormona tiroidea no consigue acceder al interior de la célula; se ha utilizado en el laboratorio de los inventores para examinar modelos de acción de la hormona

para determinar posibles acciones de las yodotironinas iniciadas en la superficie celular. Además, los experimentos realizados con T₄ y tetrac también respaldan la conclusión de que la acción de la T₄ en este modelo se inició en la membrana plasmática. Tetrac bloquea los efectos de T₄ iniciados en la membrana.

5 Como la hormona tiroidea activa de forma no genómica la ruta de transducción de la señal MAPK (ERK1/2), la acción de la hormona sobre la angiogénesis puede estar mediada por MAPK. Cuando se añade al modelo CAM un inhibidor de la cascada MAPK, PD 98059, inhibió la acción pro-angiogénica de la T₄. Aunque este resultado es consistente 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 mediante un mecanismo dependiente de MAPK. T₄ y FGF2
10 ocasionan individualmente la fosforilación y la translocación nuclear de ERK1/2 en células endoteliales y, cuando se utiliza en dosis submáximas, se combina para potenciar aún más la activación de ERK1/2. Para examinar la posibilidad de que solamente el componente dependiente de MAPK de la estimulación hormonal de la angiogénesis esté relacionado 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 en la concentración del factor de crecimiento e indicó que la activación de MAPK está implicada en la acción de la T₄ sobre la liberación de FGF2 desde las células endoteliales, así como el consiguiente efecto de FGF2 sobre la angiogénesis.
15

Efecto de la hormona tiroidea sobre la angiogénesis

20 Tanto T₄, T₃, o T₄-agarosa a 0,01-0,1 μM dieron como resultado una estimulación significativa (P < 0,01) de la angiogénesis (Tabla 4). Se demuestra que esto es comparable a la eficacia pro-angiogénica de FGF2 (50 ng/ml) más VEGF (25 ng/ml).

Tabla 4. Efecto de los factores de crecimiento, hormona tiroidea, y sus análogos sobre la pro-angiogénesis en el ensayo de brotes tridimensional in vitro de tejido endotelial microvascular

| Grupos de tratamiento | Longitud media del tubo del vaso (mm) ± SD |
|-----------------------------|--|
| Control | 0,76 ± 0,08 |
| FGF2 (25 ng) + VEGF (50 ng) | 2,34 ± 0,25* |
| T3 (20 ng) | 1,88 ± 0,21* |
| T4 (23 ng) | 1,65 ± 0,15* |
| T4-agarosa (23 ng) | 1,78 ± 0,20* |

25 *Los datos (promedio ±SD) se obtuvieron de 3 experimentos. Las células se pretrataron con un nivel subumbral de FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Los datos representan promedio + SEM, n = 3, *P < 0,01 mediante ANOVA, comparación del tratado con el control.*

Efectos del Tetrac sobre la acción pro-angiogénica del tiroides:

30 T₃ estimula las rutas de transducción de la señal celular iniciadas en la membrana plasmática. Estas acciones pro-angiogénicas quedan bloqueadas por un análogo desaminado de la yodotironina, tetrac, que se sabe que inhibe la unión de T₄ a las membranas plasmáticas. La adición de tetrac (0,1 μM) inhibió la acción pro-angiogénica de cualquiera de T₃, T₄, o T₄-agarosa (Tablas 5-7). Esto se demuestra por la inhibición del número de células del tejido endotelial microvascular que migran y la longitud de los vasos (Tabla 5-7).

35 Papel de la ruta de transducción de la señal ERK1/2 en la estimulación de la angiogénesis mediante la hormona tiroidea:

Se realizaron en paralelo estudios sobre la inhibición de ERK1/2 en los ensayos de formación de brotes microvasculares tridimensionales. La hormona tiroidea y su análogo a 0,01-0,1 μM ocasionaron un aumento significativo en la longitud del tubo y el número de células que migran, un efecto que quedó significativamente bloqueado (P < 0,01) mediante PD 98059 (Tablas 5-7). Esto se demuestra por la inhibición del número de células del tejido endotelial microvascular que migran y la longitud de los vasos (Tabla 5-7).
40

45 Papel de la integrina αvβ3 en la estimulación de la angiogénesis mediante la hormona tiroidea:

La pro-angiogénesis mediada por cualquiera de T₃, T₄ o T₄-agarosa a 0,01-0,1 μM en presencia de niveles sub-umbral de VEGF y FGF2 quedó bloqueada (P < 0,01) significativamente mediante el antagonista de la integrina αvβ3, XT199 (Tablas 5-7). Esto se demuestra por la inhibición del número de células del tejido endotelial microvascular que migran y la longitud de los vasos (Tabla 5-7).
50

Por tanto, el efecto pro-angiogénico de la hormona tiroidea y sus análogos comienza en la membrana plasmática con la integrina αvβ3 e implica la activación de ERK1/2.

Tabla 5: Mecanismo de la pro-angiogénesis de la hormona tiroidea T₃ en el ensayo de brotes tridimensional in vitro de tejido endotelial microvascular

| Tratamiento con HDMEC | Número medio de células migradas ± SD | Longitud media del vaso (mm) ± SD |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 88 ± 14 | 0,47 ± 0,06 |
| T ₃ (0,1 uM) | 188 ± 15* | 0,91 ± 0,04* |
| T ₃ (0,1 uM) + PD98059 (3 ug) | 124 ± 29 | 0,48 ± 0,09 |
| T ₃ (0,1 uM) + XT199 (2 ug) | 118 ± 18 | 0,47 ± 0,04 |
| T ₃ (0,1 uM) + tetrac (0,15 ug) | 104 ± 15 | 0,58 ± 0,07 |

*Se utilizaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC). Las células se pretrataron con FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Se obtuvieron imágenes a 4 y 10X, día 3. Los datos representan promedio + SD, n = 3, * P < 0,01.*

Tabla 6: Mecanismo de la pro-angiogénesis de la hormona tiroidea T₄ en el ensayo de brotes tridimensional in vitro de tejido endotelial microvascular

| Tratamiento con HDMEC | Número medio de células migradas ± SD | Longitud media del vaso (mm) ± SD |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 88 ± 14 | 0,47 ± 0,06 |
| T ₄ (0,1 uM) | 182 ± 11* | 1,16 ± 0,21* |
| T ₄ (0,1 uM) + PD98059 (3 ug) | 110 ± 21 | 0,53 ± 0,13 |
| T ₄ (0,1 uM) + XT199 (2 ug) | 102 ± 13 | 0,53 ± 0,05 |
| T ₄ (0,1 uM) + Tetrac (0,15 ug) | 85 ± 28 | 0,47 ± 0,11 |

*Se utilizaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC). Las células se pretrataron con FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Se obtuvieron imágenes a 4 y 10X, día 3. Los datos representan promedio + SD, n = 3, * P < 0,01.*

Tabla 7: Mecanismo de la pro-angiogénesis de la hormona tiroidea T₄-agarosa en el ensayo de brotes tridimensional in vitro de tejido endotelial microvascular

| Tratamiento con HDMEC | Número medio de células migradas ± SD | Longitud media del vaso (mm) ± SD |
|---|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 88 ± 14 | 0,47 ± 0,06 |
| T ₄ -agarosa (0,1 uM) | 191 ± 13* | 0,97 ± 0,08* |
| T ₄ -agarosa (0,1 uM) + PD98059 (3 ug) | 111 ± 8 | 0,56 ± 0,03 |
| T ₄ -agarosa (0,1 uM) + XT199 (2 ug) | 106 ± 5 | 0,54 ± 0,03 |
| T ₄ -agarosa (0,1 uM) + Tetrac (0,15 ug) | 87 ± 14 | 0,45 ± 0,09 |

*Se utilizaron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC). Las células se pretrataron con FGF2 (1,25 ng/ml) + VEGF (2,5 ng/ml). Se obtuvieron imágenes a 4 y 10X, día 3. Los datos representan promedio + SD, n = 3, * P < 0,01.*

10 Ejemplo 14: Modelo in vitro para evaluar el transporte de los análogos poliméricos tiroideos a través de la barrera hematoencefálica

Se describe a continuación un método in vitro para evaluar la facilidad con la que un análogo polimérico tiroideo, solo o junto con factor de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos pueden atravesar la barrera hematoencefálica. Se proporciona una descripción detallada del modelo y el protocolo en Audus, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci 507: 9-18 (1987).

En resumen, las células endoteliales de los microvasos se aislaron de la materia gris cerebral de cerebros de bovino frescos. Los cerebros se obtuvieron de un matadero local y se transportaron hasta el laboratorio en medio mínimo esencial ("MEM") con antibióticos y hielo. En condiciones de esterilidad se retiraron los vasos sanguíneos superficiales grandes y las meninges usando procedimientos de disección convencionales. La materia gris cortical se eliminó mediante aspiración, y después se trituró en cubos de aproximadamente 1 mm. La materia gris triturada se incubó con dispasa al 0,5 % (BMB, Indianápolis, Ind.) durante 3 horas a 37 °C en un baño de agua con agitación. Después de la digestión de 3 horas, la mezcla se concentró por centrifugación (1000x g durante 10 min.), se resuspendió a continuación en dextrano al 13 % y se centrifugó durante 10 min. a 5800x g. La grasa sobrenadante, residuos celulares y mielina se descartaron, y el aglomerado bruto de microvasos se resuspendió en colagenasa/dispasa 1 mg/ml y se incubó en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 5 h. Después de la digestión de 5 horas, la suspensión de microvasos se aplicó a un gradiente de Percoll al 50 % ya establecido y se centrifugó durante 10 min a 1000x g. La banda que contenía las células endoteliales purificadas (segunda banda desde la parte superior del gradiente) se retiró y se lavó dos veces con medio de cultivo (por ejemplo, 50 % MEM/50 % mezcla nutriente F-12). Las células se congelaron (-80° C) en medio que contenía DMSO al 20 % y suero de caballo al 10 % para uso posterior.

Tras el aislamiento, aproximadamente 5×10^5 células/cm² se sembraron en placas de cultivo o filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 5-12 mm que estaban recubiertos con colágeno de rata y fibronectina. 10-12 días tras la siembra de las células, se inspeccionaron las monocapas de células al microscopio para determinar la confluencia.

5 La caracterización de las propiedades morfológicas, histoquímicas y bioquímicas de estas células ha demostrado que estas células tienen muchos de los rasgos más importantes de la barrera hematoencefálica. Estos rasgos incluyen: uniones intercelulares estancas, falta de aperturas en las membranas, bajos niveles de actividad pinocítica, y la presencia de gamma-glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina, y actividades del antígeno del Factor VIII.

10 Las células cultivadas se pueden usar en una amplia variedad de experimentos en los que se necesita un modelo de unión o transporte polarizado. Al sembrar las células en placas multipocillos, se puede realizar la unión al receptor y al no receptor de moléculas tanto grandes como pequeñas. Para realizar las medidas del flujo celular transendotelial, las células se hicieron crecer sobre filtros de membrana de policarbonato poroso (por ejemplo, de Nucleopore, Pleasanton, Calif.). Se usaron filtros de tamaño de poro grande (5-12 mm) para evitar la posibilidad de que el filtro se
15 convierta en una barrera limitante de la velocidad para el flujo molecular. El uso de estos filtros de tamaño de poro grande no permite el crecimiento celular bajo el filtro y permite la inspección visual de la monocapa de células.

20 Cuando las células alcanzaron la confluencia, se colocan en un equipo de difusión celular en paralelo (por ejemplo, de Crown Glass, Somerville, N.J.). Para las medidas de flujo, la cámara donante de la celdilla de difusión se pulsa con una sustancia de ensayo, a continuación en varios momentos posteriores al pulso, se toma una alícuota de la cámara receptora para su análisis. Las sustancias marcadas de forma radioactiva o fluorescente permite la cuantificación fiable del flujo molecular. La integridad de la monocapa se mide simultáneamente por la adición de una sustancia de ensayo no transportable tal como sacarosa o inulina y se midieron réplicas de al menos 4 determinaciones con el fin de
25 garantizar la significancia estadística.

25

Ejemplo 15: Modelo de lesión traumática

30 El modelo de lesión cerebral por percusión de fluido se utilizó para evaluar la capacidad de los análogos poliméricos de la hormona tiroidea solos o junto con factores de crecimiento nervioso u otros factores neurogénicos para restaurar las funciones del sistema nervioso central después de una lesión cerebral traumática significativa.

I. Procedimiento de lesión cerebral por percusión de fluido

35 Los animales usados en este estudio fueron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 250-300 gramos (Charles River). La preparación quirúrgica básica para la lesión cerebral por percusión de fluido ya se ha descrito. Dietrich, et al., Acta Neuropathol. 87: 250-258 (1994) que se incorpora al presente documento por referencia. En resumen, las ratas se anestesiaron con halotano al 3 %, oxígeno al 30 %, y resto de óxido de nitroso. Se realizó la intubación traqueal, y las ratas se colocaron en bastidor esterotáctico. A continuación se realizó una craneotomía de 4,8 mm en el la corteza parietal derecha, 3,8 mm posterior respecto a la bregma y 2,5 mm lateral respecto a la línea central. Se instaló un tubo de lesión sobre la dura expuesta y se pegó con adhesivo. Se vertió acrílico dental alrededor del tubo de lesión, y el tubo de lesión de obturó a continuación con una esponja de espuma de gel. El cuero cabelludo se cerró mediante sutura y el animal volvió a su jaula y se dejó recuperar durante la noche.

40

45 Al día siguiente, la lesión cerebral por percusión de fluido se realizó esencialmente como se ha descrito en 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 consistió en un cilindro de plexigás lleno de suero salino provisto de un alojamiento para transductor y un tornillo de lesión adaptado para el cráneo de la rata. El tornillo de metal se conectó firmemente al tubo de lesión de plástico de la rata intubada anestesiada (óxido de nitroso al 70 %, halotano al 1,5 %, y oxígeno al 30 %), y la lesión se indujo mediante el descenso de un péndulo que golpea el pistón. Las ratas experimentaron una lesión leve a moderada en la cabeza, en el intervalo de 1,6 a 1,9 atm (162,3 a 192,5 kPa). La temperatura cerebral se controló indirectamente mediante una sonda termistor insertada en el músculo temporal derecho y que se mantuvo a 37-37,5 °C. También se midió la temperatura rectal, que se mantuvo a 37 °C antes y durante el periodo de monitorización.

50

Ensayo conductual:

55 Se utilizaron tres ensayos funcionales/conductuales normalizados para evaluar la función sensorimotora y de reflejos después de la lesión cerebral. Los ensayos se han descrito completamente en la bibliografía, 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.

60

A. Ensayo de colocación de la extremidad anterior

65 La colocación de la extremidad anterior frente a tres estímulos separados (visual, táctil, y propioceptivo) se midió para evaluar la integración sensorimotora. DeRyck, et al., Brain Res. 573:44-60 (1992). Para el subensayo de colocación visual, el investigador sostuvo al animal en posición vertical y se puso cerca de la superficie de una mesa. La

colocación normal de la extremidad sobre la mesa recibió una puntuación de "0," la colocación retrasada (<2 s) recibió una puntuación de "1," y la no colocación o la colocación muy retrasada (>2 s) recibió una puntuación de "2". Se obtuvieron puntuaciones separadas en primer lugar cuando el animal se acerca y de nuevo cuando el animal se acerca de forma lateral a la tabla (puntuación máxima por extremidad =4; en cada caso, los números más altos denotan mayores déficits.). Para el subensayo de colocación táctil, el animal se sujetó de forma que no pudiera ver o tocar la parte superior de la mesa con sus bigotes. La pata delantera dorsal toca ligeramente la parte superior de la mesa cuando el animal se acerca y después y después se acerca de forma lateral a la mesa. Cada tiempo de colocación se puntuó como anteriormente (puntuación máxima por extremidad =4). Para el subensayo de colocación propioceptiva, el animal solamente se acercó a la mesa y se aplicó mayor presión a la pata delantera dorsal; la colocación se puntuó como anteriormente (puntuación máxima por extremidad =2). Finalmente, se ensayó la capacidad de los animales para colocar la extremidad anterior en respuesta a la estimulación del bigote con la parte superior de la mesa (puntuación máxima por extremidad =2). Después se sumaron las subpuntuaciones para obtener la puntuación total de colocación de la extremidad anterior para cada extremidad (intervalo 0-12).

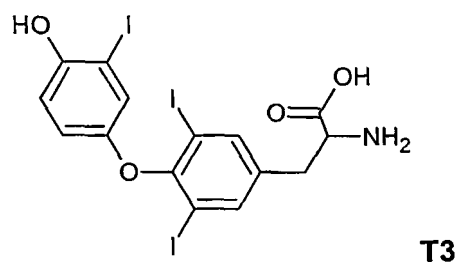
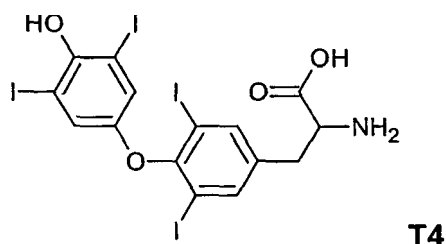
15 *B. El ensayo de equilibrio sobre una viga*

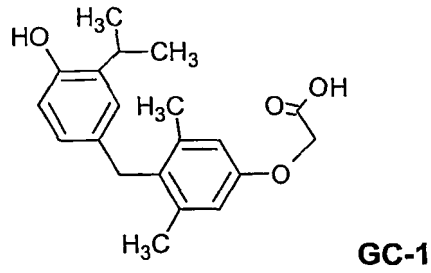
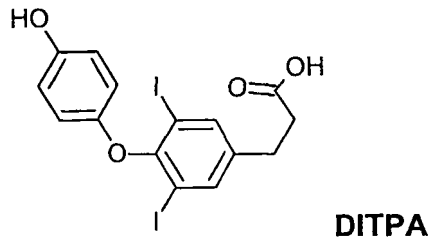
El equilibrio en viga es sensible a los ataques a la corteza motora. Esta tarea se utilizó para evaluar la función vestibulomotora grosera y requirió que una rata se balanceara de forma estacionaria sobre una viga estrecha. Feeney, et al., Science, 217: 855-857 (1982); Goldstein, et al., Behav. Neurosci. 104: 318-325 (1990). El ensayo implicó tres ensayos de prueba de 60 segundos 24 horas antes de la cirugía para adquirir los datos iniciales. El aparato consistió en una viga de 3/4 de pulgada (1,91 cm, 10 pulgadas (25,4 cm) de longitud, suspendida 1 pie (0,31 cm) por encima de la parte superior de una mesa. La rata se colocó sobre la viga y tuvo que mantener una postura estacionaria con todas las extremidades sobre la parte superior de la viga durante 60 segundos. El comportamiento del animal se puntuó con la escala de Clifton, et al., J. Cereb Blood Flow Metab. 11:1114-121 (1991), con un intervalo de 1 a 6, donde una puntuación de 1 es normal y una puntuación de 6 indica que el animal fue incapaz de sostenerse sobre la viga.

B. El ensayo de deambulación sobre una viga

Se trata de un ensayo de integración sensorimotora que examina específicamente la función de la extremidad anterior. El equipo de ensayo y los procedimientos de puntuación se adaptaron de Feeney, et al., Science, 217: 855-857 (1982). Una viga de 1 cm de longitud, 4 pies (124 cm) de longitud, se suspendió 3 pies (93 cm) por encima del suelo en una habitación iluminada por una luz tenue. En el extremo más alejado de la viga se colocó una caja meta oscurecida con una entrada estrecha. Equidistantes a lo largo de la viga se colocaron cuatro tornillos de metal de 3 pulgadas (7,62 cm), en angulación desde el centro de la viga. Un generador de ruido blanco y una fuente de luz brillante al inicio de la viga motivaron al animal a atravesar la viga y entrar en la caja meta. Una vez en el interior de la caja meta, los estímulos finalizaron. La latencia de la rata hasta alcanzar la caja meta (en segundos) y el comportamiento de la extremidad anterior a medida que atraviesa la viga (basándose en una escala de puntuación de 1 a 7). Una puntuación de 7 indica una deambulación normal con menos de dos resbalones, y una puntuación de 1 indica que la rata fue incapaz de atravesar la viga en menos de 80 segundos. Cada rata se entrenó durante tres días antes de la cirugía para adquirir la tarea y conseguir un comportamiento normal (una puntuación de 7) sobre tres ensayos consecutivos. Se realizaron tres ensayos iniciales 24 horas antes de la cirugía, y se realizaron tres ensayos de prueba el día posterior. Se calcularon los valores de la latencia y la puntuación de cada día.

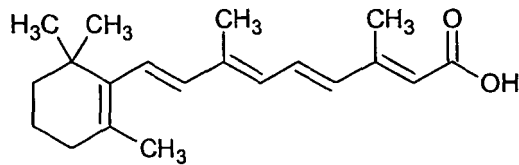
Ejemplo 16: Análogos de la hormona tiroidea





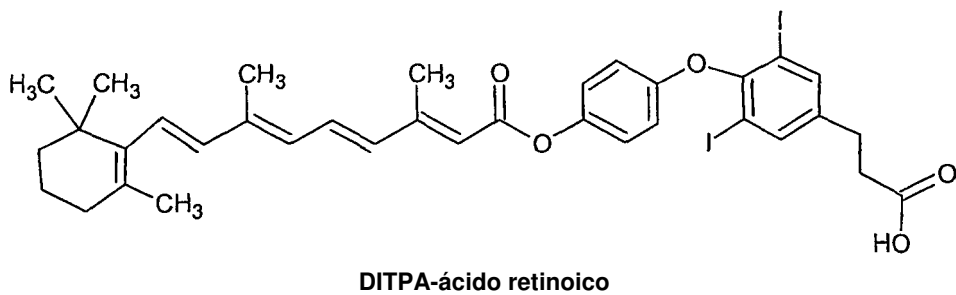
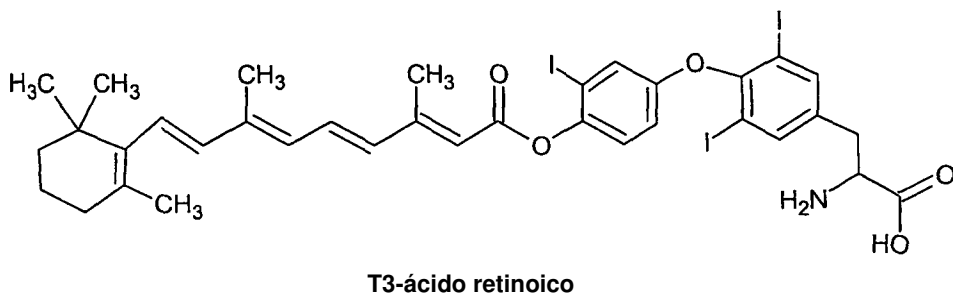
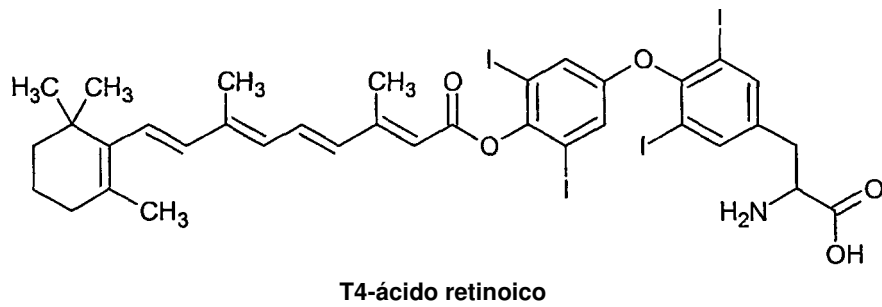
Ejemplo 17: Análogos de ácido retinoico

5

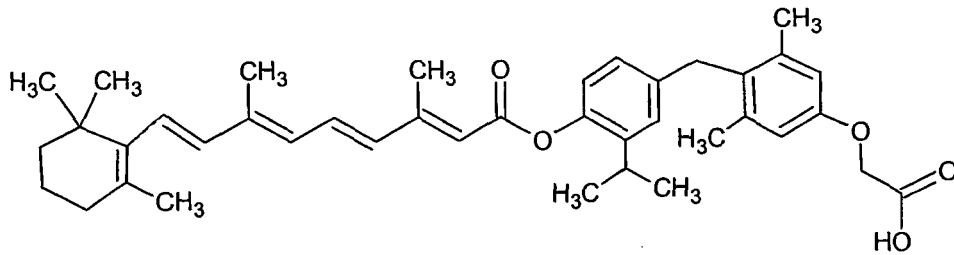


Ejemplo 18: Análogo de la hormona tiroidea conjugado con ácido retinoico

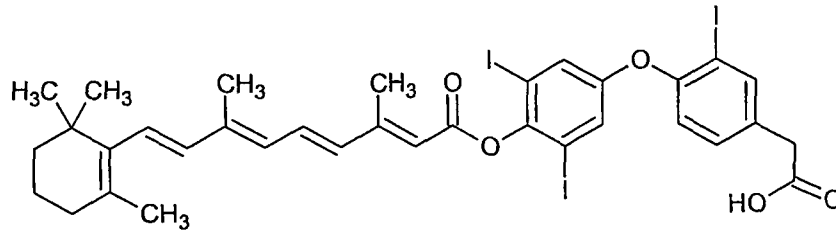
10



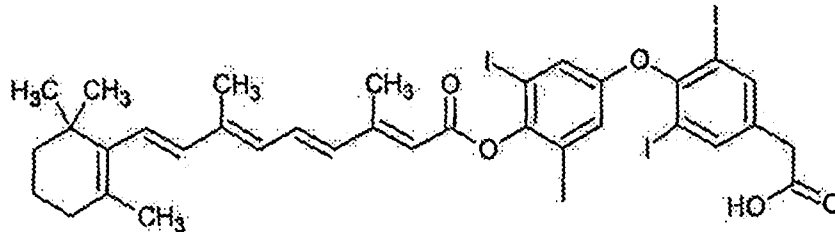
15



GC-1- ácido retinoico



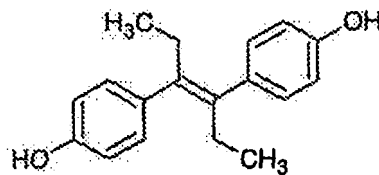
TRIAC-ácido retinoico



TETRAC-ácido retinoico

5

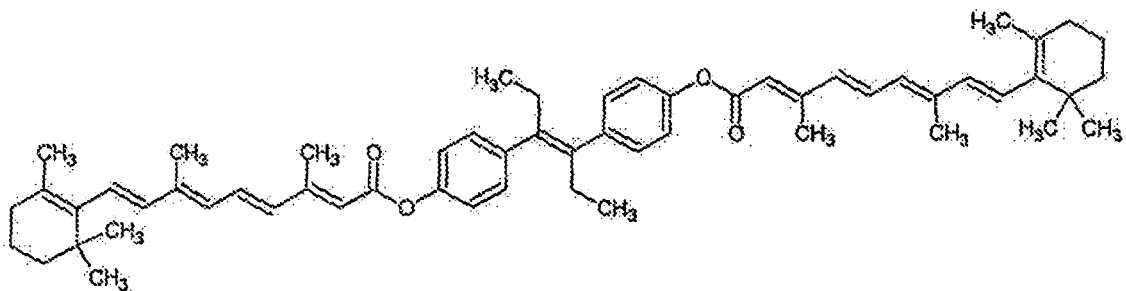
Ejemplo 19: Análogos de estibestrol halogenados



Dietil estibestrol

10

Ejemplo 20: Composiciones de análogos de T4, Estilbesteroles halogenados, y ácido retinoico



Ácido retinoico-Dietilestilbestrol-ácido retinoico

15

Ejemplo 21: Preparaciones de compuestos para obtención de imágenes PET

En general, los agentes radiactivos para obtención de imágenes (Ejemplos 16-20) se preparan haciendo reaccionar derivados de 4-halobencilo radiactivos con derivados de piperazina. Los preferidos son los derivados de 4-fluorobencilo marcados con F-18 para obtención de imágenes PET. Un método general para la preparación de haluros de 4-fluoro-¹⁸F-bencilo se describe en Iwata et al., Applied Radiation and Isotopes (2000), Vol. 52, págs. 87-92.

25

Ejemplo 22: Preparación de compuestos para obtención de imágenes SPECT

Para la tomografía de emisión de fotón único (SPECT), se prefieren los compuestos marcados con ^{99m}Tc . Una ruta sintética general para este tipo de compuestos comienza con análogos no radiactivos de los compuestos de acuerdo con los Ejemplos 16-20 que se hacen reaccionar con quelantes de unión a ^{99m}Tc , por ejemplo quelantes N_2S_2 . La síntesis de quelantes sigue procedimientos normalizados, por ejemplo, los procedimientos descritos en Mahmood et al., A N_2S_2 - Tetradentate Chelate for Solid-Phase Synthesis: Technetium, Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine (1999), Vol. 5, p. 71, o en Z. P. Zhuang et al., Bioconjugate Chemistry (1999), Vol. 10, p. 159.

Uno de los quelantes se une directamente al nitrógeno del grupo $-\text{N}(\text{R}^4)\text{R}^5$ de los compuestos no radiactivos de acuerdo con los Ejemplos 16-20, o mediante 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 $-\text{C}(\text{O})-$, uno a diez grupos $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R})-$, uno a diez grupos $-\text{N}(\text{R})\text{C}(\text{O})-$, uno a diez grupos $-\text{N}(\text{R})-$, uno a diez grupos $-\text{N}(\text{R})_2$, uno a diez grupos hidroxilo, uno a diez grupos $-\text{C}(\text{O})\text{OR}-$, uno a diez átomos de oxígeno, uno a diez átomos de azufre, uno a diez átomos de nitrógeno, uno a diez átomos de halógeno, uno a diez grupos arilo, y uno a diez anillos heterocíclicos saturados o insaturados en el que R es hidrógeno o alquilo. Un resto enlazador preferido es $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-$.

Ejemplo 23: T4 es un ligando de la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$

Para determinar si T4 es un ligando de la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$, 2 μg de proteína purificada comercialmente disponible se incubó con ^{125}I T4, y la mezcla se analizó en un gel de poliacrilamida no desnaturante. $\alpha\text{V}\beta 3$ se une a T4 radiomarcado y esta interacción es perturbada de forma competitiva por T4, que se añadió a $\alpha\text{V}\beta 3$ antes de la incubación con ^{125}I T4, de una forma dependiente de la concentración (Fig. 24). La adición de T4 no marcado redujo la unión de la integrina al ligando radiomarcado en un 13 % para una concentración total de T4 de 10^{-7} M total (3×10^{-10} M de T4 libre), 58 % a 10^{-6} M total ($1,6 \times 10^{-9}$ M libre), y la inhibición de la unión fue máxima para 10^{-5} M de T4 no marcado. Mediante una regresión no lineal se determinó la interacción de la $\alpha\text{V}\beta 3$ con T4 libre para tener un valor de K_d de 333 pM y un valor de CE_{50} de 371 pM. T3 no marcado fue menos eficaz para desplazar la unión de ^{125}I T4 a $\alpha\text{V}\beta 3$, reduciendo la señal en un 28 % a 10^{-4} M total de T3.

Ejemplo 24: La unión de T4 a $\alpha\text{V}\beta 3$ queda bloqueada mediante tetrac, el péptido RGD y el anticuerpo de la integrina

Los inventores habían demostrado anteriormente que las rutas de señalización estimuladas por T4 que se activan en la superficie celular se pueden inhibir mediante el análogo de la yodotironina tetrac, que es la forma de evitar la unión de T4 a la membrana plasmática. En el ensayo de unión de radioligando, aunque tetrac 10^{-8} M no tuvo efecto sobre la unión de ^{125}I T4 a $\alpha\text{V}\beta 3$ purificada, la asociación de T4 y $\alpha\text{V}\beta 3$ se redujo en un 38 % en presencia de tetrac 10^{-7} M y en 90 % con tetrac 10^{-5} M (Fig. 25). Para determinar la especificidad de la interacción, un péptido RGD, que se une al sitio de unión de la matriz extracelular de $\alpha\text{V}\beta 3$, y un péptido RGE, que tiene un resto ácido glutámico en lugar de un resto ácido aspártico y por lo tanto no se une a $\alpha\text{V}\beta 3$, se añadieron a lo anterior en un intento de desplazar T4 de su unión con la integrina. La aplicación de un péptido RGD, pero no de un péptido RGE, redujo la interacción de ^{125}I T4 con $\alpha\text{V}\beta 3$ de una forma dependiente de la dosis (Fig. 25).

Para caracterizar adicionalmente la interacción de T4 con $\alpha\text{V}\beta 3$, se añadieron anticuerpos dirigidos contra $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$ a $\alpha\text{V}\beta 3$ purificado antes de la adición de ^{125}I T4. La adición de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo monoclonal de $\alpha\text{V}\beta 3$, LM609, redujo la formación del complejo entre la integrina y T4 en 52 %, en comparación con las muestras de control no tratadas. El aumento de la cantidad de LM609 a 2 μg , 4 μg , y 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ disminuyó la intensidad de la banda en 64 %, 63 % y 81 %, respectivamente (Fig. 26). Se observaron resultados similares cuando un anticuerpo monoclonal de $\alpha\text{V}\beta 3$ diferente, SC7312, se incubó con la integrina. SC7312 redujo la capacidad de T4 para unirse a $\alpha\text{V}\beta 3$ en 20 % con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo presente, 46 % con 2 μg , 47 % con 4 μg , y en 59 % cuando estuvieron presentes 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo. La incubación con anticuerpos monoclonales de αV y $\beta 3$, independientemente, no afectó a la unión de ^{125}I T4 a $\alpha\text{V}\beta 3$, lo que sugiere que la asociación requiere que el bolsillo de unión generado a partir del complejo heterodimérico de $\alpha\text{V}\beta 3$ y no necesariamente una región específica de cualquiera de los monómeros. Para verificar que la reducción en la intensidad de la banda se debía al reconocimiento específico de $\alpha\text{V}\beta 3$ por los anticuerpos, se incubó $\alpha\text{V}\beta 3$ purificado con un anticuerpo monoclonal de $\alpha\text{V}\beta 5$ (P1F6) o IgG de ratón antes de la adición de ^{125}I T4, ninguno de los cuáles tuvo influencia sobre la formación del complejo entre la integrina y el radioligando (Fig. 26).

Ejemplo 25: La activación de MAPK estimulada por T4 está bloqueada por inhibidores de la unión de hormonas y de la integrina $\alpha\text{V}\beta 3$

Se estudió la translocación nuclear de MAPK fosforilado (pERK1/2) en células CV-1 tratadas con niveles fisiológicos de una concentración total de hormonas de 10^{-7} M de T4, 10^{-10} M de hormonas libres) durante 30 min. Consistente con los resultados que los inventores habían notificado previamente, T4 indujo la acumulación nuclear de MAPK fosforilado en células CV-1 en 30 min (Fig. 27). La preincubación de células CV-1 con las concentraciones indicadas de antagonistas de $\alpha\text{V}\beta 3$ durante 16 h redujo la capacidad de T4 de 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 los cultivos del control y la

activación se redujo máximamente cuando estuvieron presentes 10^{-5} M de RGD (85 % de reducción) y 10^{-4} M de RGD (87 % de reducción) en el medio de cultivo. La adición del péptido RGE no específico al medio de cultivo no tuvo efecto sobre la fosforilación de MAPK y la translocación nuclear tras el tratamiento con T4 en células CV-1.

- 5 Tetrac, que evita la unión de T4 a la membrana plasmática, es un inhibidor eficaz de la activación de MAPK inducida por T4. Cuando estuvo presente a una concentración de 10^{-6} M con T4, tetrac redujo la fosforilación y la translocación de MAPK en un 86 % cuando se comparó con cultivos tratados con T4 solo (Fig. 27). La inhibición aumentó en un 97 % cuando se añadieron 10^{-4} M de tetrac al medio de cultivo durante 16 h antes de la aplicación de T4. La adición del anticuerpo monoclonal LM609 dirigido contra $\alpha\beta 3$ al medio de cultivo 16 h antes de la estimulación con T4 redujo también la activación de MAPK inducida por T4. LM609 a 0,01 y 0,001 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo no afecta la activación de MAPK tras el tratamiento con T4. Aumentando la concentración de anticuerpo en el medio de cultivo a 0,1, 1, y 10 $\mu\text{g/ml}$ redujeron los niveles de MAPK fosforilado que se encuentran en las fracciones nucleares de las células en un 29 %, 80 %, y 88 %, respectivamente, cuando se compararon con células tratadas solo con T4.
- 15 Se transfectaron transitoriamente células CV1 con ARNip de αV , $\beta 3$ o αV y $\beta 3$ y se dejaron recuperar durante 16 h antes de colocarse en medio exento de suero. Tras el tratamiento con T4 durante 30 min, Se recogieron las células y cualquier proteína nuclear o se extrajo el ARN. La Figura 28A demuestra la especificidad de cada ARNip para la subunidad de la integrina diana. Las células CV-1 transfectadas tanto con ARNip de αV o ARNip αV y $\beta 3$ mostró una disminución de productos de la RT-PCR de la subunidad αV , pero no hubo diferencia en la expresión del ARNm de αV cuando se transfectaron las células con el ARNip específico de $\beta 3$, o cuando se expone al reactivo de transfección en ausencia de ARNip exógeno. De manera similar, las células transfectadas con ARNip de $\beta 3$ tienen niveles reducidos de ARNm de $\beta 3$ pero niveles relativamente inalterados de ARNip de αV . La adición de T4 durante 30 min no altera los niveles de ARNm tanto para αV o $\beta 3$, sin tener en cuenta el ARNip transfectado en las células.
- 25 Los niveles de MAPK activados se midieron mediante transferencia western en células CV-1 transfectadas con ARNip a αV y $\beta 3$, tanto individualmente como en combinación (Fig. 28B). Células CV-1 tratadas con ARNip del control negativo codificado tuvieron niveles ligeramente elevados de MAPK activado indujeron T4 cuando se compararon con la línea de células precursoras. Las células expuestas al reactivo de transfección muestran solo niveles y modelos similares de fosforilación de MAPK como las células CV-1 no transfectadas. Cuando cualquiera entre ARNip de αV o ARNip de $\beta 3$, solo o en combinación, se transfectó en células CV-1, se elevó el nivel de MAPK fosforilado en cultivos tratados con vehículos, pero se inhibió la capacidad de T4 de inducir una elevación adicional de los niveles de MAPK.

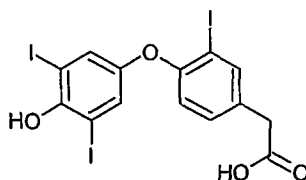
Ejemplo 26: La angiogénesis inducida por hormonas queda bloqueada por anticuerpos dirigidos contra $\alpha\beta 3$

- 35 La angiogénesis está estimulada en el ensayo CAM mediante la aplicación de concentraciones fisiológicas de T4 (Fig. 29A y resumida en la Fig. 29B). T4 10^{-7} M colocado en el disco de filtro CAM indujeron la formación de ramificaciones en 2,3 veces ($P < 0,001$) cuando se compararon con membranas tratadas con PBS. Propiltiouracilo, que evita la conversión de T4 a T3, no tiene efecto sobre la angiogénesis producida por T4. La adición de un anticuerpo monoclonal, LM609 (10 $\mu\text{g/disco}$ de filtro), dirigido contra $\alpha\beta 3$, inhibió la respuesta proangiogénica a T4.

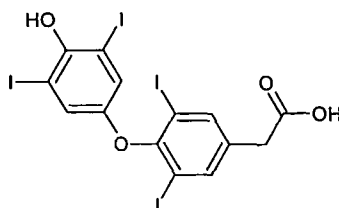
Ejemplo 27: Conjugados de polímeros biocompatibles de análogos de hormonas tiroideas para la administración a corto y largo plazo

Bosquejo 1:

45 Análogos de hormonas tiroideas:



Triac



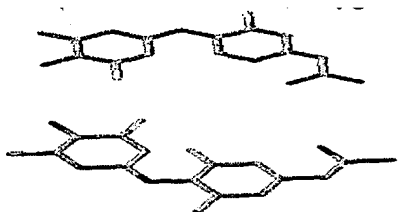
Tetrac

Bosquejo 2: Modelos moleculares que muestran la vista en 3 D de la topografía y geometría y molecular en modelos de barras, bolas y barras, disco y espacio sólido para su evaluación comparativa.

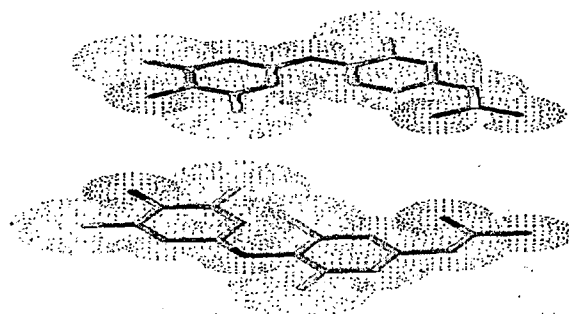
5 *Modelo de barra:* Moléculas en dos conjuntos que muestran la densidad molecular en el conjunto inferior.

Conjunto 1: Triac y Tetrac (yodos en amarillo, oxígenos en rojo)

10



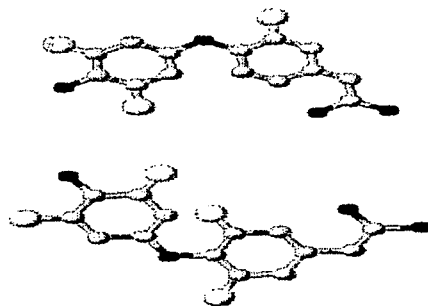
Conjunto 2



15

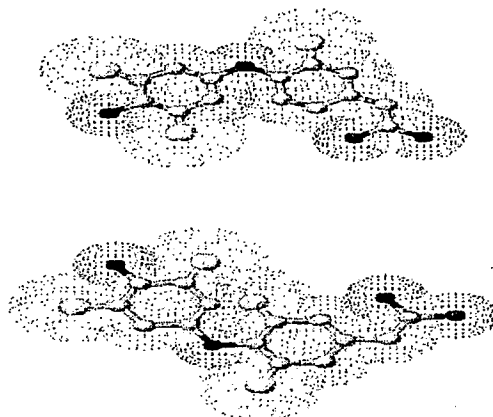
Modelo de bolas y barras: Triac y Tetrac -conjunto inferior que muestra la densidad molecular y la alineación topográfica.

20 Conjunto 1

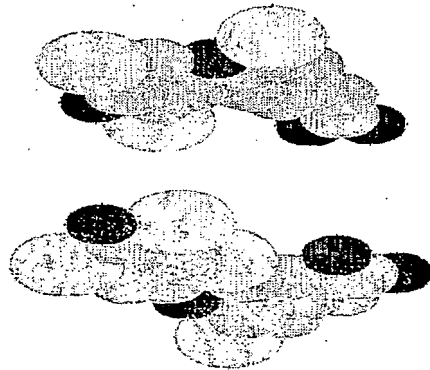


25

Conjunto 2

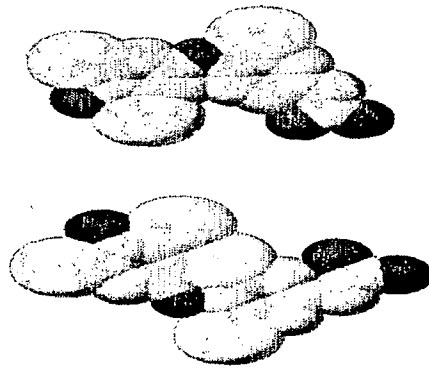


Modelo de disco: Triac y Tetrac



5

Modelo de espacio sólido: Triac y Tetrac



10

Análogos de hormonas tiroideas y actividad anticancerosa:

Los metabolitos de las hormonas tiroideas Triac y Tetrac se usan en el tratamiento del cáncer de tiroides para el enriquecimiento y como tratamiento sustituto para sus necesidades.

15

Hormonas tiroideas comercialmente disponibles y sus análogos:

Existen algunos nombres comerciales de hormonas tiroideas sintéticas disponibles en el mercado que incluyen Unithroid®, Levothroid®, Synthroid® y Levoxyl®. Existen formulaciones genéricas del tipo Levo-T®, Levothyroxine Sodium® y Novothyrox®.

20

Las hormonas tiroideas naturales se comercializan como suplementos alimenticios en forma seca y en polvo obtenidos a partir de glándulas tiroideas de animales sacrificados. Esta píldora de producto desecado puede contener proteína animal no deseada, un equilibrio inadecuado de los compuestos T3 y T4 y los aglutinantes sintéticos que es menos recomendado para el consumo humano. La relación de T3 a T4 puede variar entre lotes dependiendo de la glándula del animal y no se ha encontrado que sea constante para ninguna administración correcta en sujetos humanos. La complicación en la dosis, la administración y la disponibilidad en el sistema es un argumento para una dosis normalizada, constante, limitada y un régimen de liberación temporal para un consumo humano seguro y otros usos tópicos.

25

30

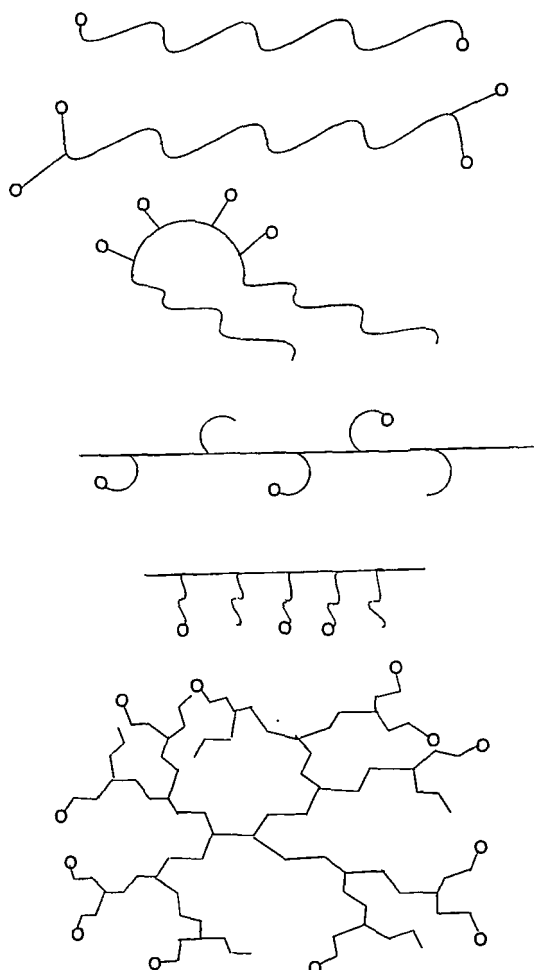
Sistema de liberación regulada de hormonas tiroideas:

Hasta el momento no está disponible un régimen específico y normalizado de tratamiento para el tratamiento de sustitución de hormonas tiroideas en pacientes estadounidenses. Los inventores están proponiendo un sistema de liberación lenta permanente a largo plazo de los constituyentes tiroideos individuales basado en las necesidades personalizadas preclasificadas para la dosis, el perfil de actividad y respuesta deseados en los sistemas de ensayo. Los inventores conseguirán esto a través de la administración de constituyentes tiroideos unidos a polímeros en el sitio de estos productos para definir la dosis y en una distribución limitada. Los conjugados (Fig. 3 - un bosquejo) tendrán una capacidad de liberación a corto y largo plazo conseguida a través de características hidrolizables y no hidrolizables. Esto conseguirá la administración del nivel mínimo de dosis para las propiedades cardiovasculares y de cicatrización de heridas específicas.

35

40

Bosquejo 3: Conjugados poliméricos ordenados y aleatorios -



O = Fármaco/Compuesto orgánico/ Entidad que se conjuga
Plantillas poliméricas usuales para el fármaco/API del conjugado

5

Sistemas de Administración de conjugados:

Entre los sistemas de administración en desarrollo, están ganando terreno las entidades químicas conjugadas a polímeros sintéticos. Están disponibles varios grupos secundarios de origen sintético; natural y biopolimérico con polímeros con una estructura biodegradable eficaz y están en uso en el mercado. Están disponibles polialquil glicoles, poliésteres, polianhídridos, polisacáridos, y poliaminoácidos para la conjugación dependiendo de la característica final del producto conjugado en términos de su hidrofiliidad, naturaleza hidrófoba, hidrólisis por enzimas, cofactores y ácidos biológicamente disponibles in vivo así como en sistemas in vitro a tal fin.

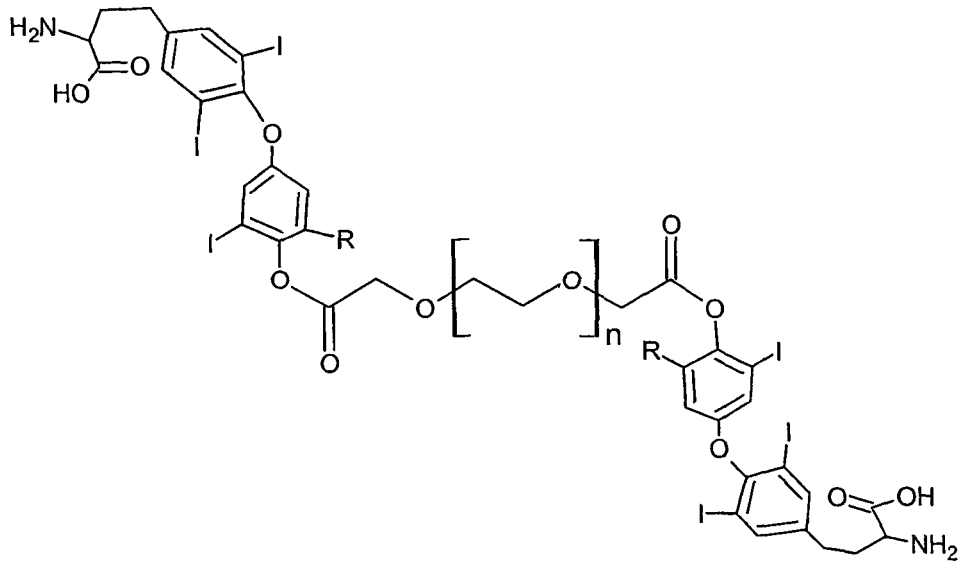
15

Conjugación Polimérica-Síntesis y Purificación:

Los inventores están proponiendo una biblioteca de productos conjugados (véase la Fig. 6 y la Tabla 1) para los productos conjugados de polímeros controlados, hidrolizables así como no hidrolizables incluyendo los biopolímeros. Se derivará un caso de ensayo a partir de cada categoría de productos poliméricos para su estudio detallado en términos de su administración que cubre la farmacocinética, el transporte, la vida media y la degradación y/o los datos de la erosión. Se intentará también preparar la serie como un diseño simultáneo o de biblioteca de síntesis combinatoria ajustado a la clase de reacción química similar para el sustrato y los polímeros variables que utilizan DCC, DCC/HOBt y otros reactivos solubles en agua que incluyen la colocación de un enlazador y estrategias sintéticas basadas en ésteres de NHS comúnmente utilizados con vistas a desarrollos futuros en la conjugación polimérica combinatoria de síntesis paralela. Las instalaciones disponibles del sintetizador en PRI se utilizarán dirigidas hacia este efecto y cada producto se purificará individualmente para la adecuabilidad de los sistemas de ensayos biológicos.

Bosquejo 4: Estructuras representativas de conjugados poliméricos procedentes de cadenas de polímeros naturales, sintéticos y polipeptídicos.

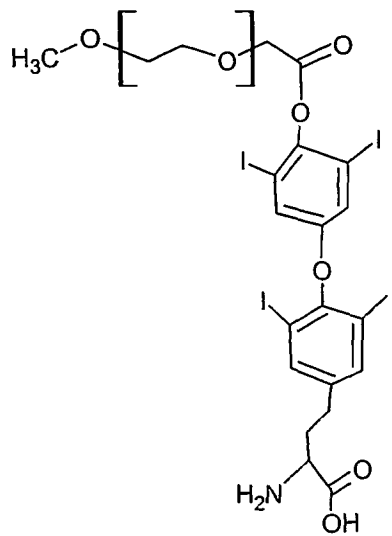
30



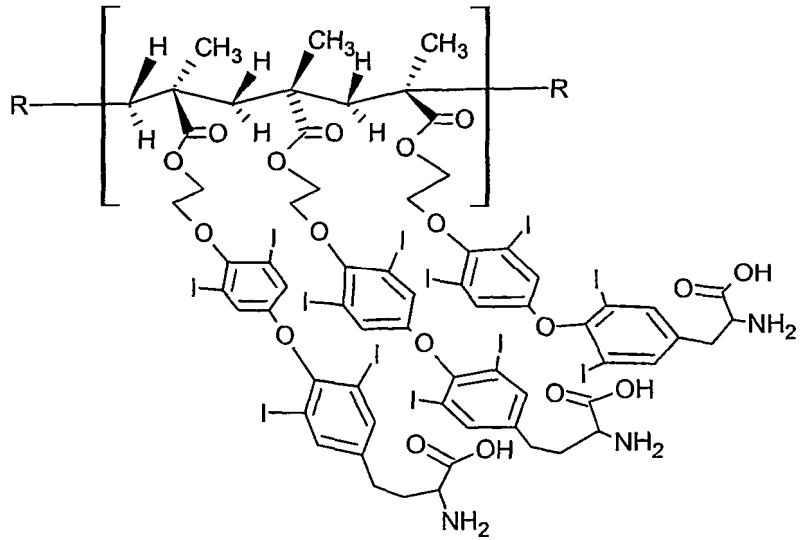
n = longitudud de la cadena
 R=H, PEG bifuncional-unido a T3
 R=I, PEG bifuncional unido a T4

5

PEG basado en compuestos tiroideos Sistemas de administración conjugados a polímeros



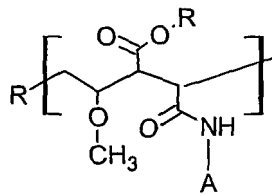
Metoxi-PEG unido a T4 Conjugado polimérico de producto tiroideo



R = Unidad de repetición de cadena de HEMA

Conjugado de T4 unido a Poli (HEMA)

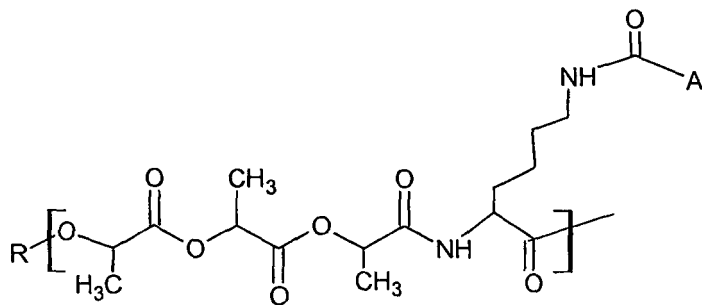
5



Conjugado inmobilizado Poli-(anhídrido vinil-co-maleico)

A = Constituyente tiroideo (conjugado a través del extremo amina)

10

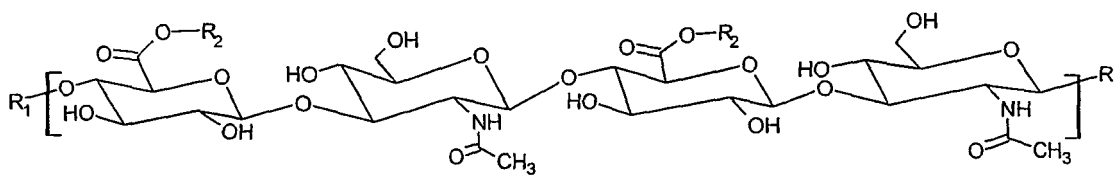


R = Unidad de repetición de cadena

A = Constituyente tiroideo (conjugado a través del extremo carboxilo)

15

Conjugado inmobilizado a poli-(lactida-co-lisina)

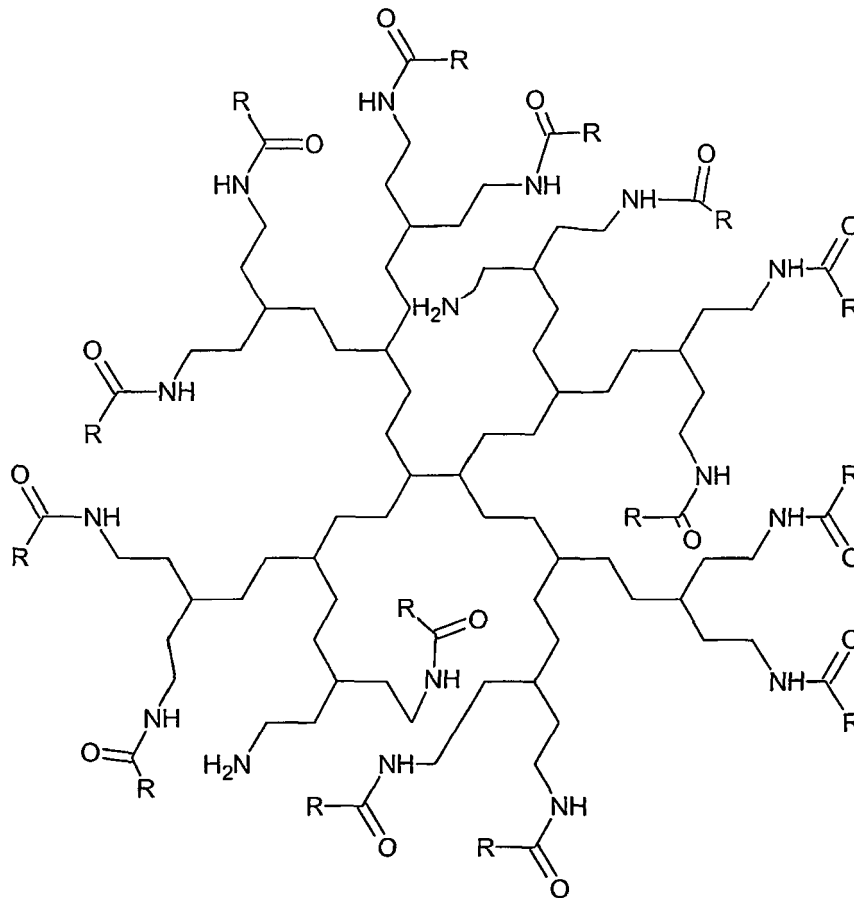


R1 = Cadena de monómeros de sacárido

R2 = Constituyentes tiroideos

20

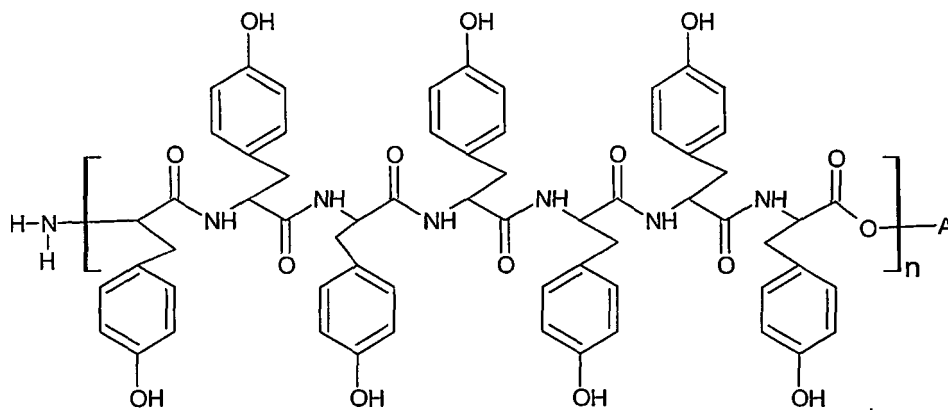
Conjugados unidos a ácido hialurónico



R = Constituyentes tiroideos T3/T4/DITPA/GC-1

Constituyentes tiroideos inmovilizados en poliamidoamina multifuncional

5



A = Constituyente tiroideo seleccionado conjugado

Conjugado polipeptídico tiroideo movilizado

10

Conjugados poliméricos- Caracterización física y química:

15 Se realizará mediante un análisis espectro-analítico y cromatográfico de los compuestos unidos a polímero utilizando RMN(Campo alto y bajo Protones y carbono, DEPT, HOMOCOSY & HETEROCOSY/HETCOR donde sea aplicable), IR, EM, HPLC, análisis de degradación térmica y ambiental para la adecuabilidad de la estabilidad y perfil de la velocidad de degradación.

Estudios de liberación y estabilidad:

5 Se realizará un análisis de HPLC detallado para los análisis de liberación cuantitativos basándose en el protocolo establecido por los inventores para los productos tiroideos individuales, es decir, GC-1, T3, T4 y DITPA así como Triac y Tetrac junto con el polímero individual y el perfil cromatográfico y espectroanalítico del producto conjugado a polímero.

Criterios de compatibilidad de polímeros para la conjugación:

10 Se han diseñado polímeros biodegradables y biocompatibles como vehículos probables para vehículos de administración a largo plazo y corto plazo que incluyen conjugados poliméricos no hidrolizables (tabla 1). Los PEG y PEO son los polímeros con extremos hidroxilo más comunes con una amplia gama de pesos moleculares a seleccionar a fines de solubilidad (modo de vehículo fácil), tiempos de degradación y velocidad de conjugación. Se empleará también un extremo protegido con metoxi-PEG como un vehículo de cadena lineal capaz de hincharse y reducir por tanto los estímulos para obtener la proteína unida o de adherirse durante el transporte subcelular. 15 Determinados copolímeros de etileno y acetato de vinilo, es decir, EVAc que tienen una biocompatibilidad excepcionalmente buena, cristalinidad baja y naturaleza hidrófoba son candidatos ideales para la encapsulación mediada por un vehículo de administración de fármacos.

20 Se utilizarán polímeros con una vida media demostrada alta y propiedades de retención en el sistema a fines de conjugación. Entre los polímeros biodegradables más comunes y recomendados se usarán polímeros procedentes de ácido láctico y glicólico. Los copolímeros de L-lactida, y L-lisina son útiles debido a su disponibilidad de grupos funcionales amina para la formación del enlace amida y esto sirve como un sitio de unión covalente duradero del vehículo y el compuesto tiroideo transportable unidos juntos a través del resto carboxi en todos los constituyentes tiroideos. 25

Los polisacáridos se producen naturalmente a partir de celulosa, quitina, dextrano, ficol, pectina, carragenato (todos los subtipos), y alginato y algunos de sus derivados semisintéticos son vehículos ideales debido a su elevada biocompatibilidad, biosistemas familiares de productos de degradación (monosacáridos de glucosa y fructosa), 30 naturaleza hidrófila, solubilidad, inmovilización de proteínas/interacción para estabilidad a largo plazo de la matriz polimérica. Esto proporciona una cubierta para la protección extra de la matriz polimérica procedente de la degradación en el tiempo y la adición a la vida media del conjugado.

35 Las proteínas y polipéptidos procedentes de albúmina de suero, colágeno, gelatina y poli-L-lisina, poli-L-alanina, poli-L-serina y aminoácidos naturales basados en transportadores de fármacos con ventaja de biodegradación, biocompatibilidad y tiempos de liberación moderados de la molécula transportadora. La poli-L-serina es de interés adicional debido a sus derivados de cadena diferentes, por ejemplo, éster de poliserina, poliserina imina y estructuras poliméricas de poliserina convencionales con sitios disponibles para la conjugación covalente específica.

40 Se han usado con frecuencia hidrogeles sintéticos procedentes de polímeros derivados de metacrilato en aplicaciones biomédicas debido a su similitud en tejidos vivos. Los hidrogeles sintéticos más ampliamente usados son polímeros de ácido acrílico, acrilamida y 2-hidroxietil metacrilato (HEMA). Los poli HEMA son baratos, biocompatibles, con funcionalidad de alargamiento de la cadena secundaria del alcohol primario disponible para la conjugación y configurada para aplicaciones oculares, intraoculares y otras aplicaciones oftálmicas que las convierten en perfectos 45 materiales de administración de fármacos. Los pHEMA son inmunes a la unión celular y proporcionan una motilidad celular cero que los convierten en candidatos ideales para sistemas de administración interna.

50 Se ha conseguido la conjugación del análogo tiroideo sintético DITPA mediante un programa de diseño de bibliotecas dando como resultado el desarrollo de productos conjugados de DITPA bruto. Se está realizando en la actualidad el acoplamiento de los polímeros hidrófilos PVA y PEG mediado por la dicolhexil carbodiimida y por otros reactivos de acoplamiento de naturaleza hidrófila e hidrófoba.

55 El diseño para la evolución de síntesis de bibliotecas en un sintetizador en fase sólida está en sus etapas finales y se implantará un modelo para su cribado de alto rendimiento (HTS) basándose en la coincidencia del sistema de ensayo y en criterios paramétricos. Se acumularán los análisis estadísticos para el tiempo de administración, la vida media y la estabilidad concebida de los conjugados a fines del análisis de administración de estructuras (SDA). Lo que sigue es una lista de conjugados poliméricos previstos para la preparación (Tabla 8).

Tabla 8: Biblioteca de conjugados poliméricos diseñados para posibles preparaciones basándose en reactividades por clase química y datos de estabilidad.

| Nº de serie | Polímero | Propiedades (H hidrolizable, NH no hidrolizable, RR Liberación retardada) |
|-------------|----------|---|
| 1 | PEO | H |
| 2 | m-PEG | H |
| 3 | PVA | Hidrófilo, H |

ES 2 535 134 T3

| | | |
|----|--|-------------------|
| 4 | PLLA | Hidrófilo, H |
| 5 | PGA | Hidrófilo, H |
| 6 | Poli L-Lisina | NH |
| 7 | Seroalbúmina humana | Proteína, NH |
| 8 | Derivados de celulosa (Carbometoxi/ etil/ hidroxipropil) | Polisacárido, RR |
| 9 | Ácido hialurónico | Polisacárido, RR |
| 10 | Folato unido a ciclodextrina/dextrano | RR |
| 11 | Sarcosina/ polímero separado por aminoácido | RR |
| 12 | Alginato/ carragenato | Polisacárido, RR |
| 13 | Pectina/ Quitosán | Polisacárido, RR |
| 14 | Dextrano | Polisacárido, RR |
| 15 | Colágeno | Proteína, NH |
| 16 | Poliamina | Amínico, NH |
| 17 | Polianilina | Amínico, NH |
| 18 | Polialanina | Peptídico, RR |
| 19 | Politriptófano | Peptídico, NH/ RR |
| 20 | Politirosina | Peptídico, NH/ RR |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente antiangiogénesis para su uso en el tratamiento del glioma o el cáncer de mama, en donde el agente antiangiogénesis es ácido tetrayodotiroacético (TETRAC) o ácido triyodotiroacético (TRIAC), o una de sus combinaciones, y en donde el agente antiangiogénesis actúa en la superficie celular para inhibir un agente proangiogénesis y en donde el agente antiangiogénesis se conjuga con un polímero mediante un enlace covalente.
- 10 2. Un agente antiangiogénesis para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el agente antiangiogénesis es para su administración por vía parenteral, oral, rectal o tópica, o una de sus combinaciones.
- 15 3. Un agente antiangiogénesis para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que el agente antiangiogénesis se administra simultáneamente con uno o más tratamientos antiangiogénesis o agentes quimioterapéuticos diferentes.

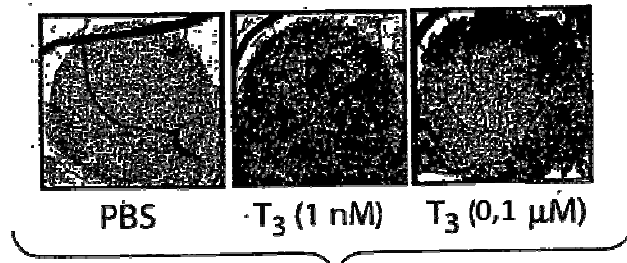


Fig. 1A

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

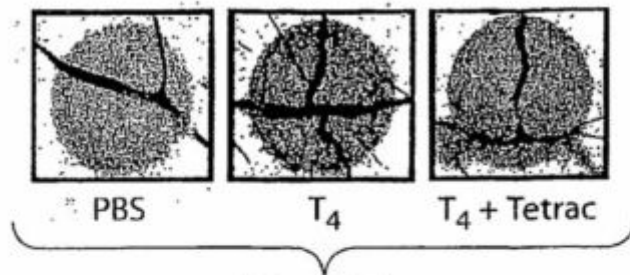


Fig. 2A



Fig. 2B

Resumen de los efectos de T_4 y T_3 –
 agarosa y tetrac sobre la angiogénesis

| <u>Tratamiento</u> | <u>Índice de angiogénesis</u> |
|------------------------------|-------------------------------|
| PBS | 67 9 |
| T_4 (0,1 μ M) | 156 16** |
| Tetrac (0,1 μ M) | 76 9 |
| T_4 + tetrac | 66 6 |
| T_4 -agarosa (0,1 μ M) | 194 28** |
| T_4 -agarosa + tetrac | 74 7 |

Fig. 2C

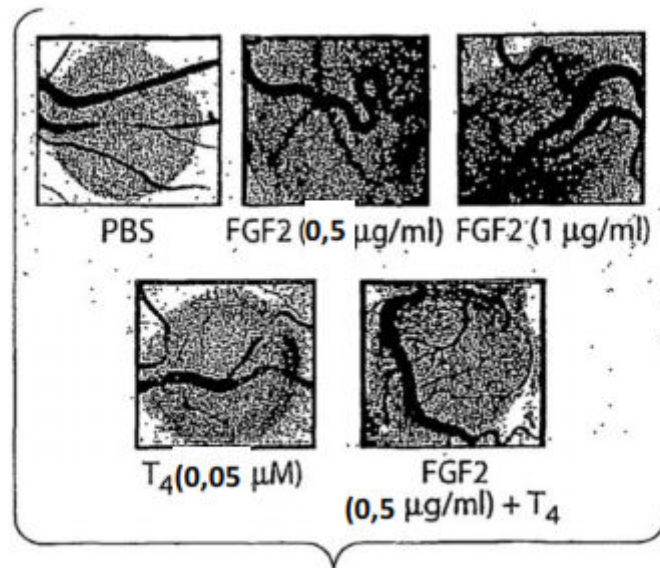


Fig. 3A

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 (0,1 µg/ml) | 172 9** |
| T ₄ (0,5 µM) | 115 4* |
| T ₄ + FGF2 (0,5 µg/ml) | 167 10** |

Fig. 3B

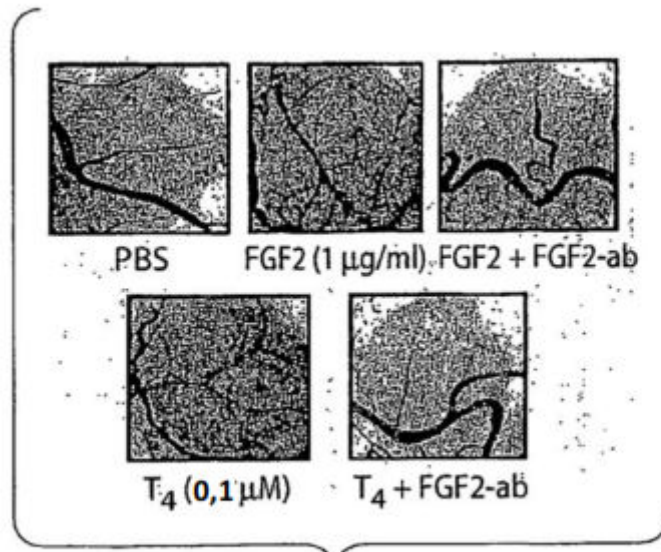


Fig. 4A

Efectos del anticuerpo de FGF2 sobre la angiogénesis estimulada por T_4 y FGF2

| <u>Tratamiento</u> | <u>Índice de angiogénesis</u> |
|--------------------|-------------------------------|
| 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

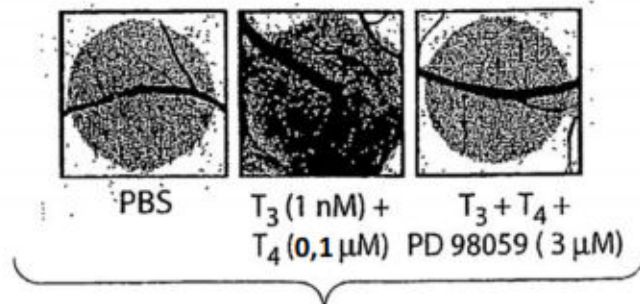


Fig. 5A

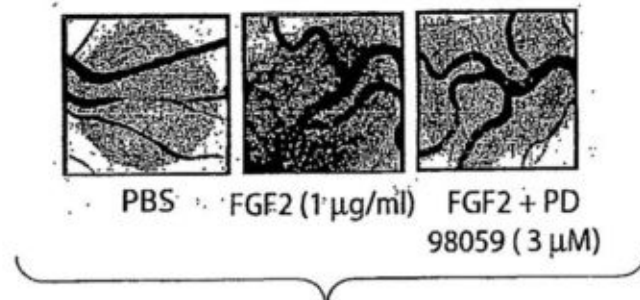
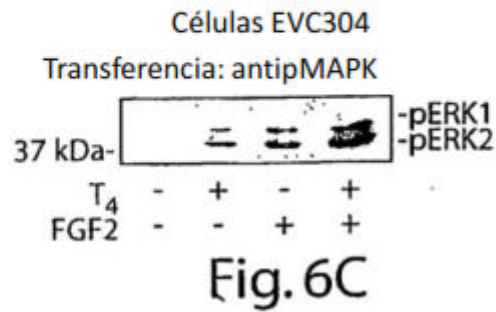
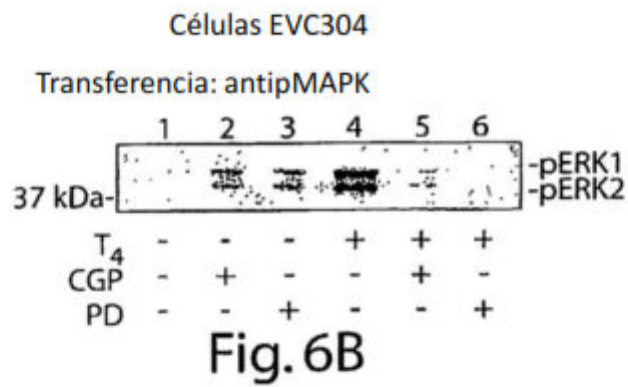
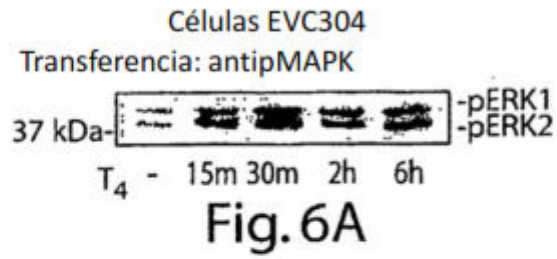


Fig. 5B

Efectos de PD 98059 sobre la angiogénesis estimulada por T₄ y FGF2

| <u>Tratamiento</u> | <u>Índice de angiogénesis</u> |
|---|-------------------------------|
| PBS | 63 10 |
| T ₃ (1 nM) + T ₄ (0,1 μM) | 153 15* |
| T ₃ + T ₄ + PD 98059 (3 μM) | 50 10 |
| PBS | 86 11 |
| FGF2 (1 μg/ml) | 191 15** |
| FGF2 + PD 98059 (3 μM) | 110 16 |

Fig. 5C



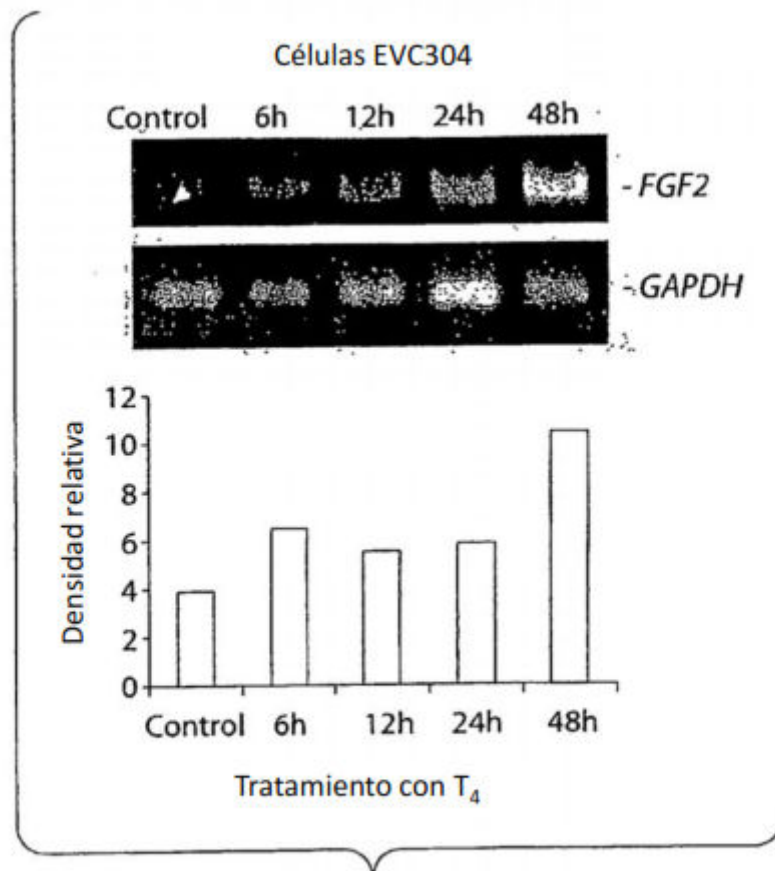


Fig. 7

Modelo de crecimiento de tumor en embriones de pollo de 7 días

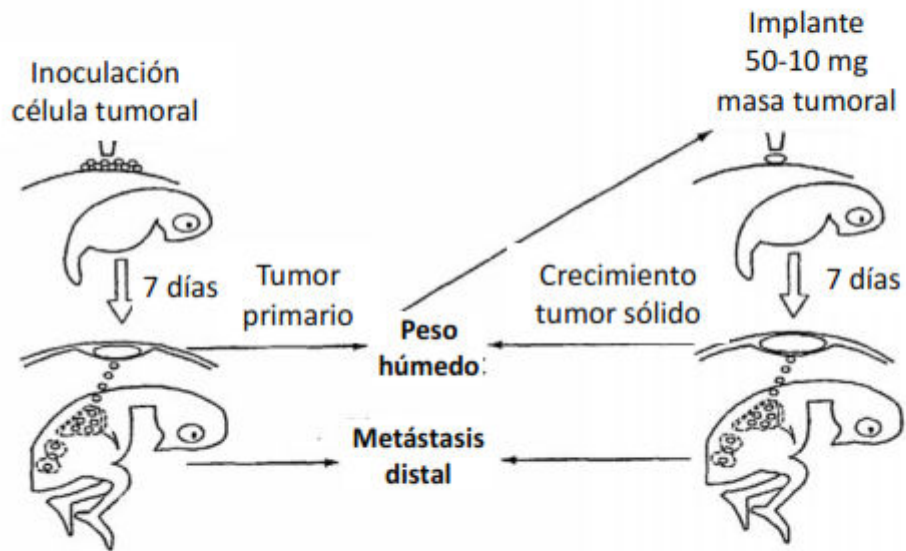


Fig. 8

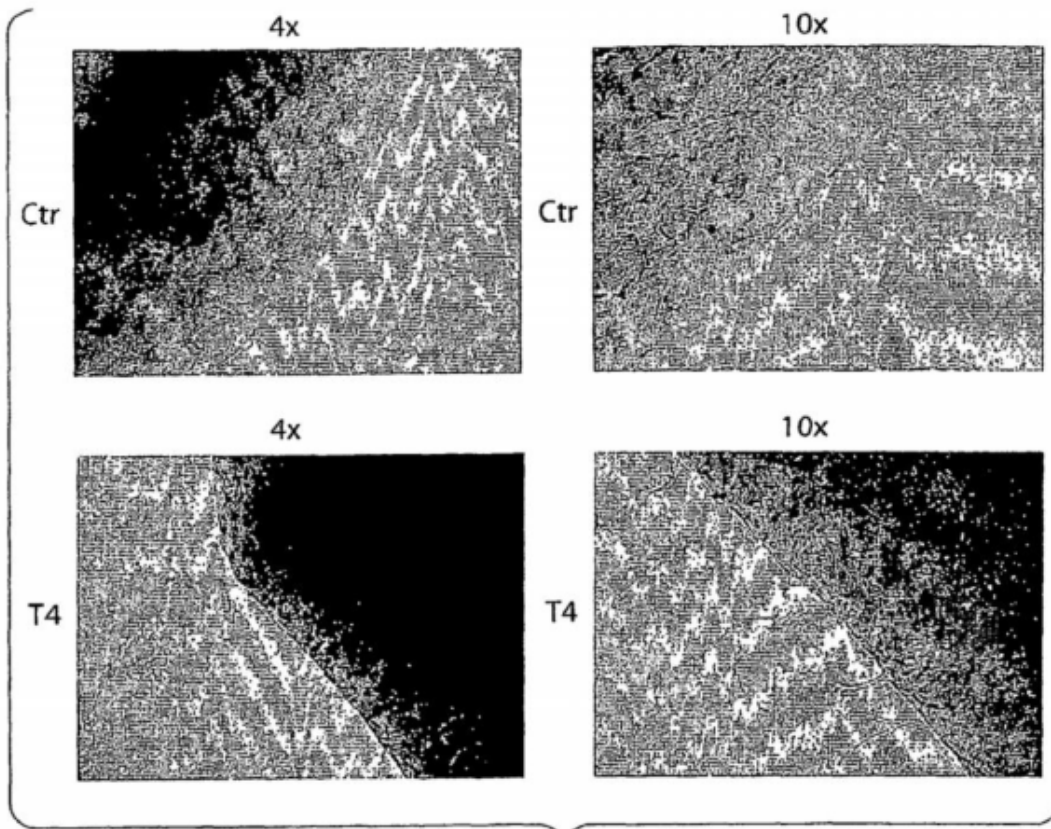


Fig. 9

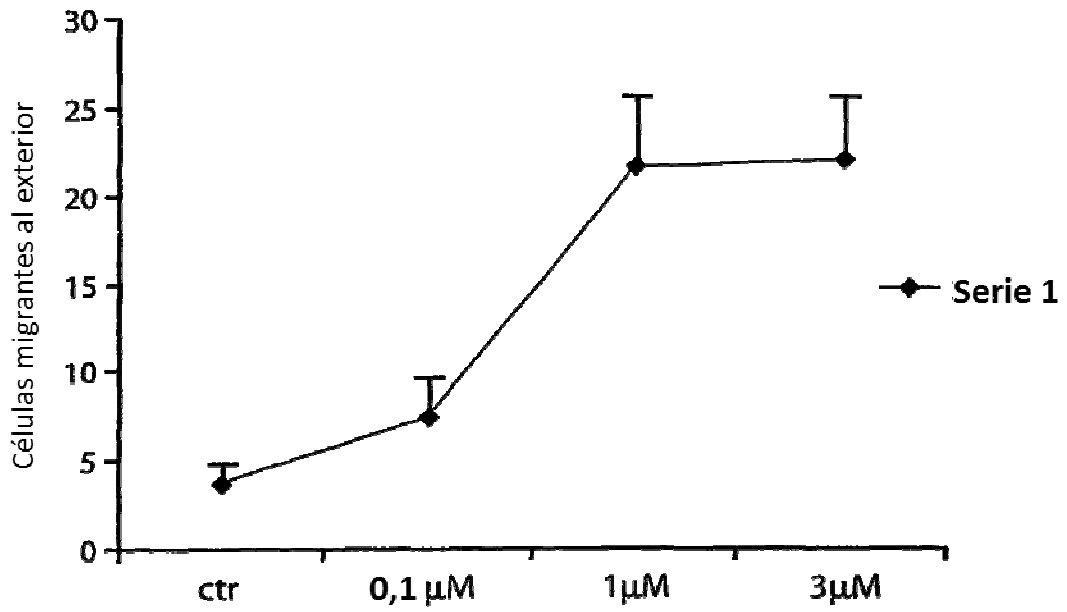


Fig. 10

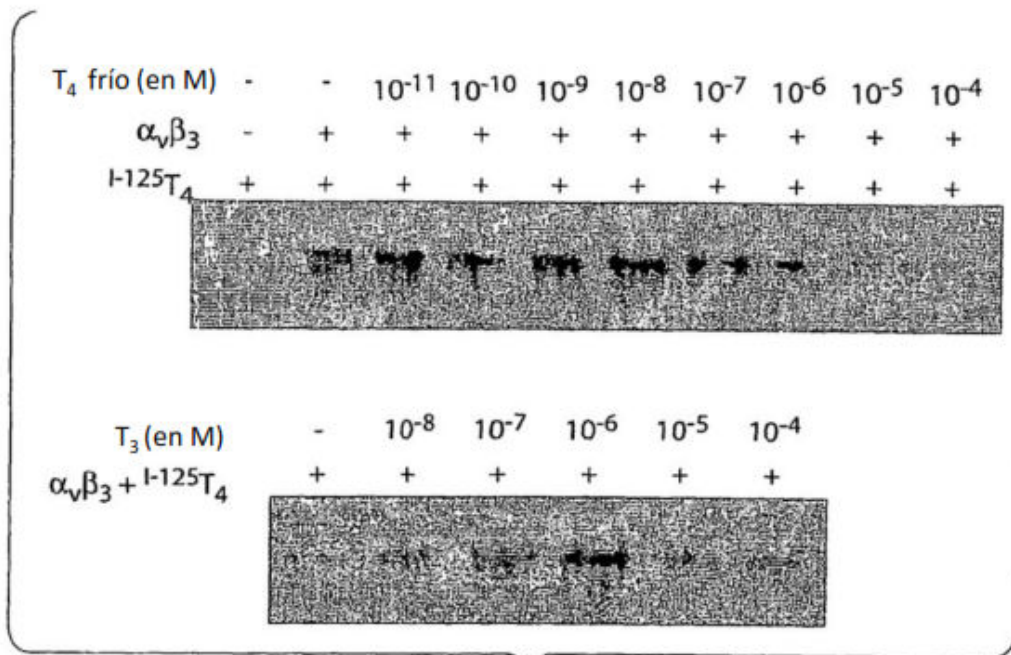


Fig. 11A

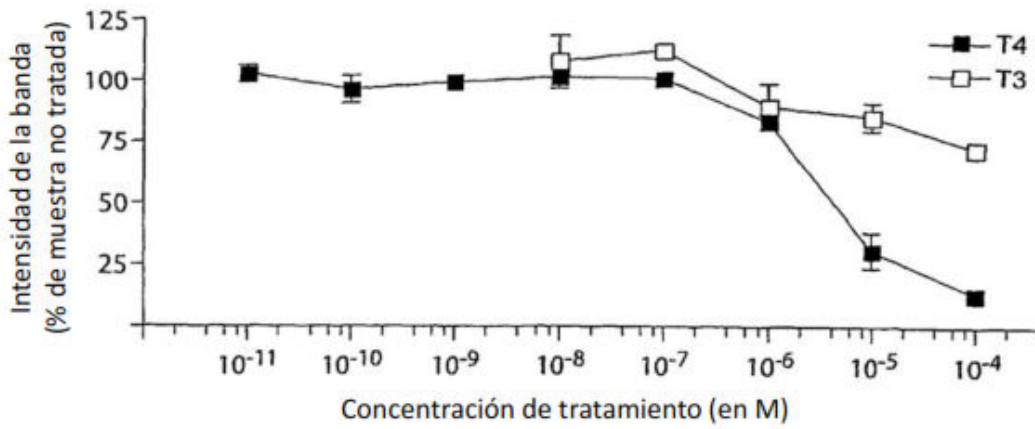


Fig. 11B

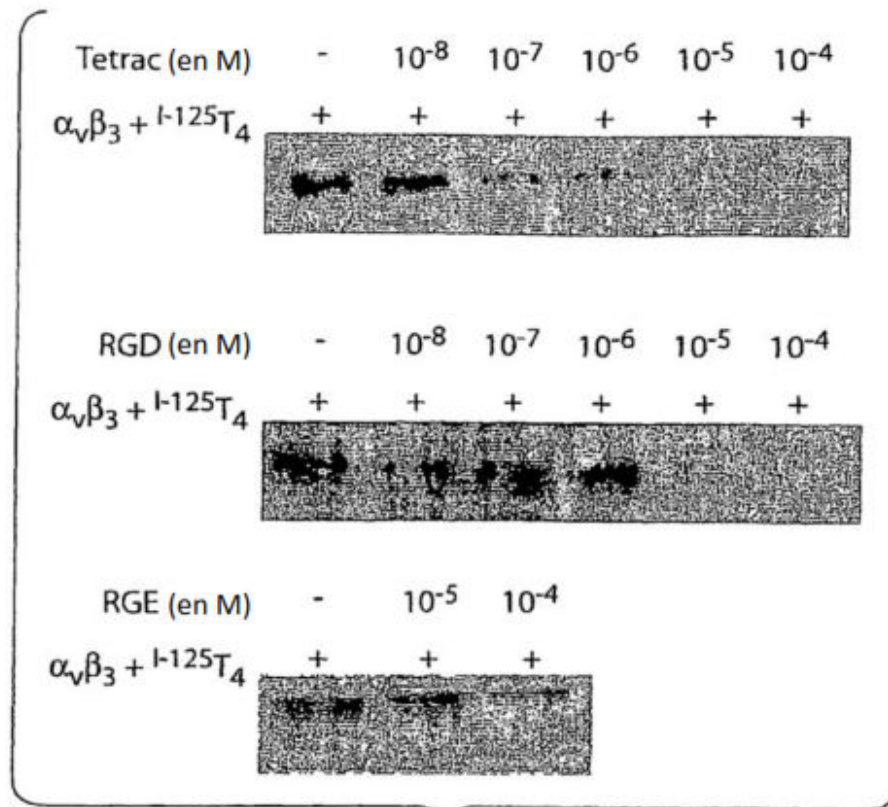


Fig. 12A

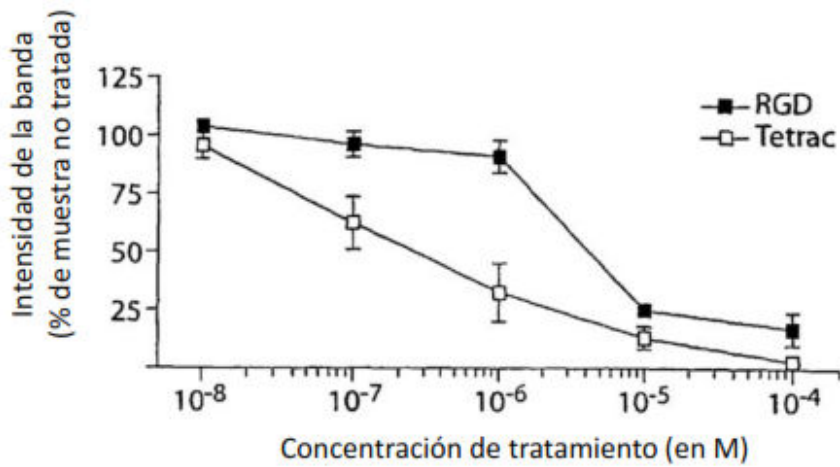


Fig. 12B

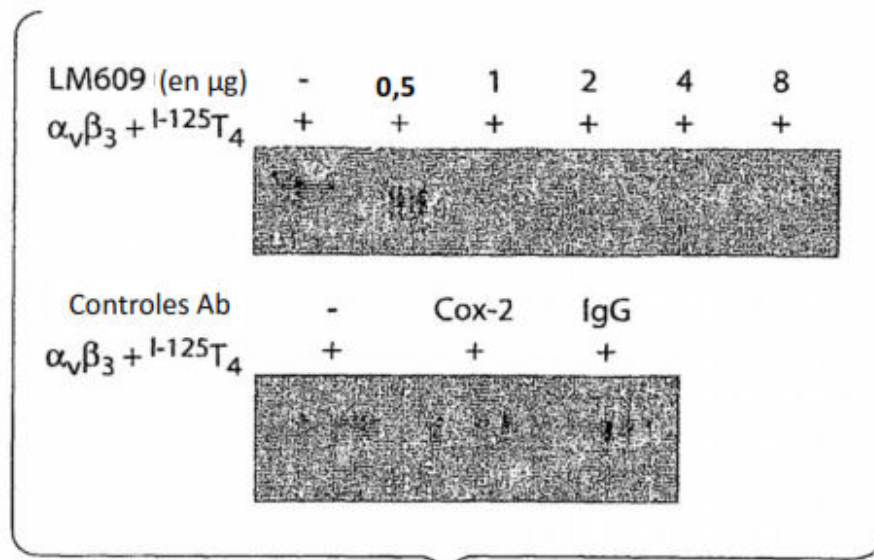


Fig. 13A

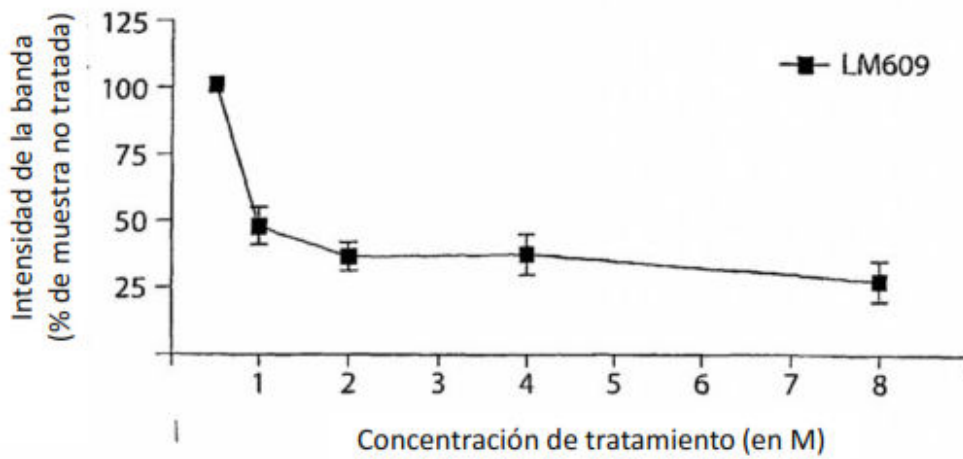


Fig. 13B

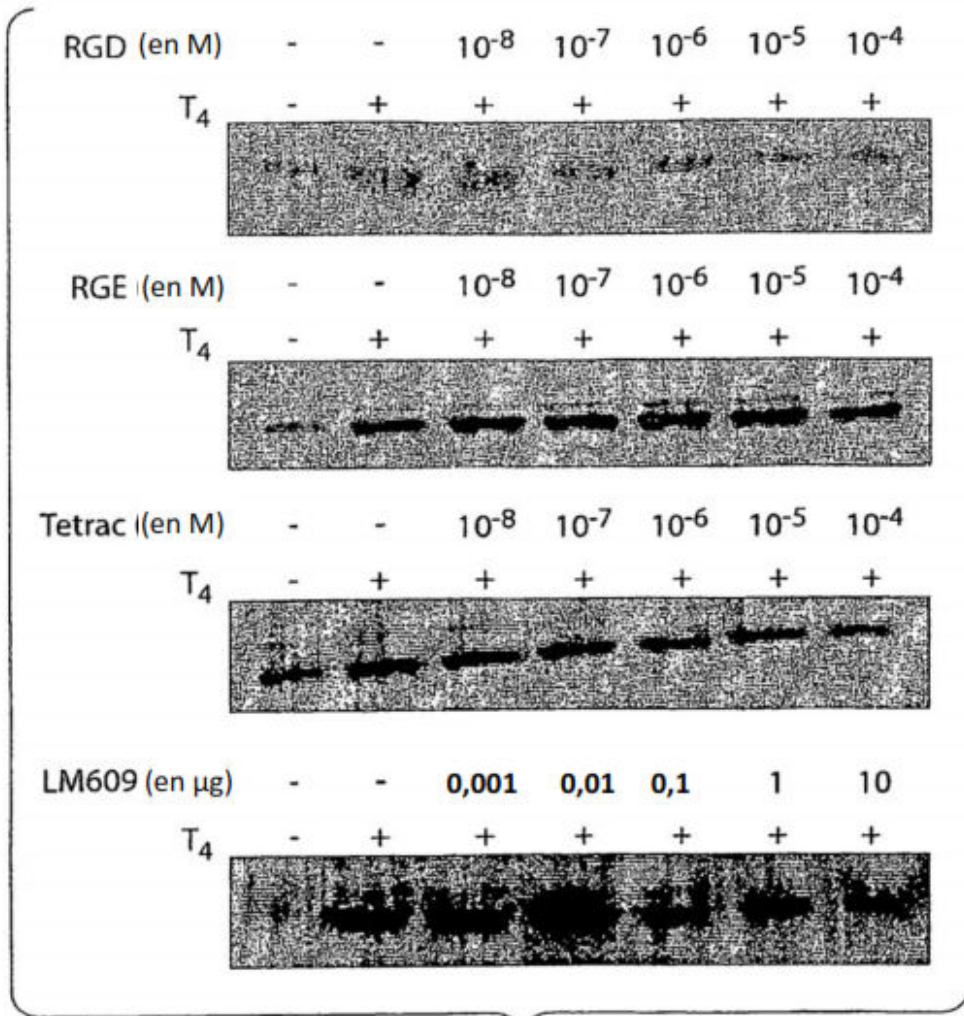


Fig. 14A

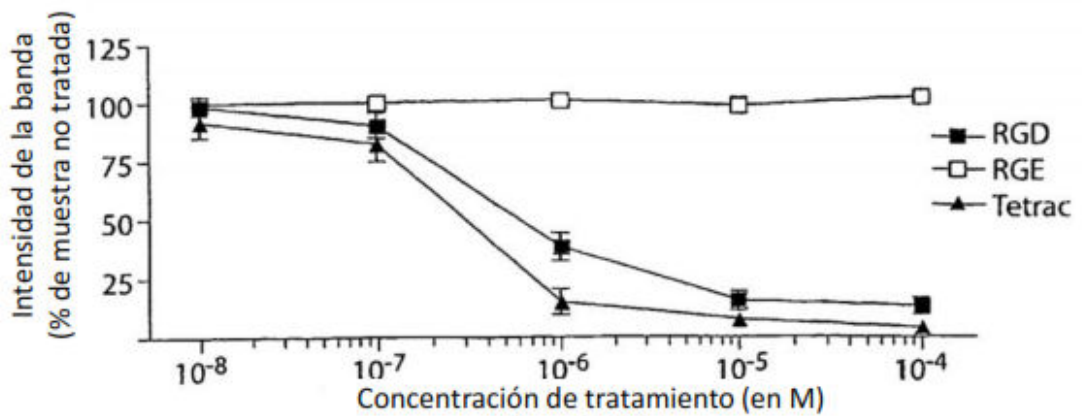


Fig. 14B

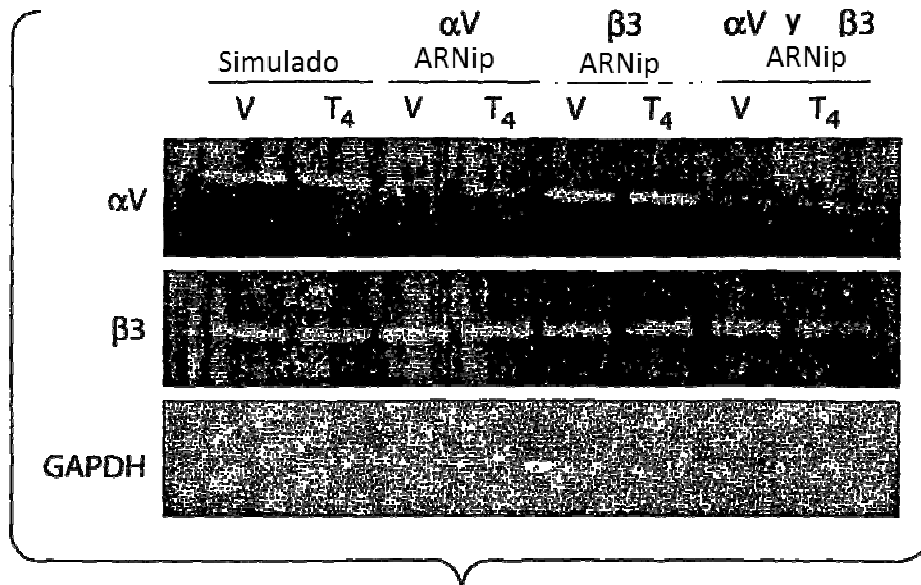


Fig. 15A

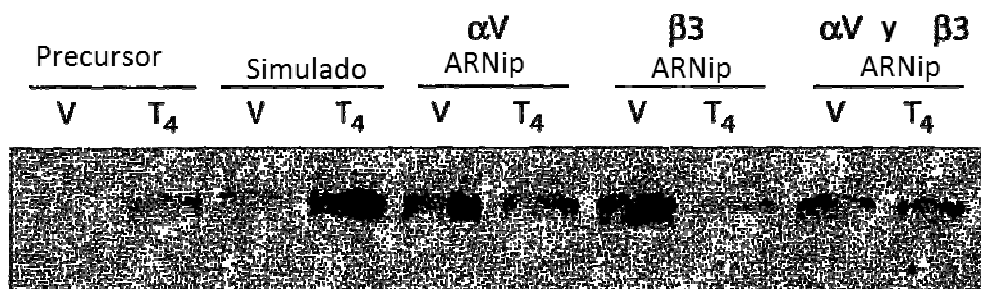
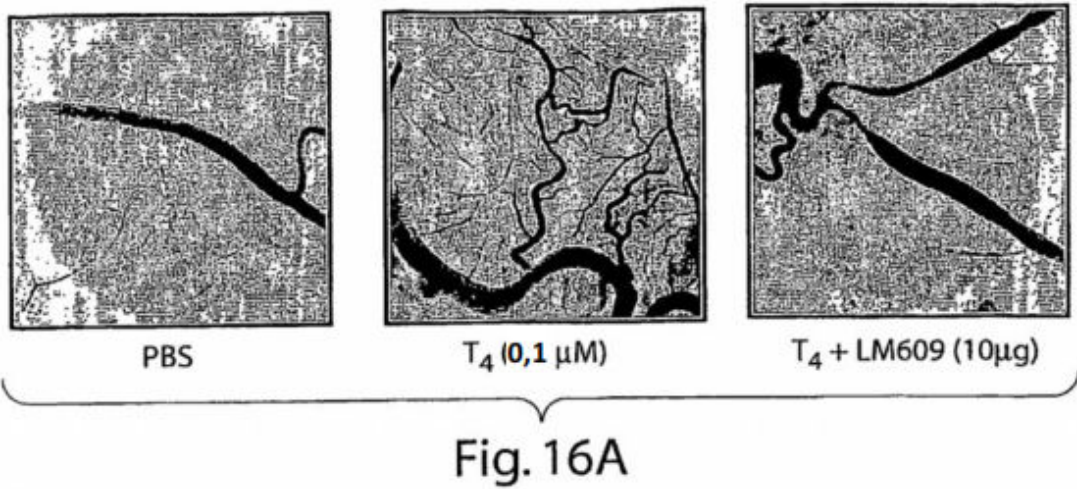


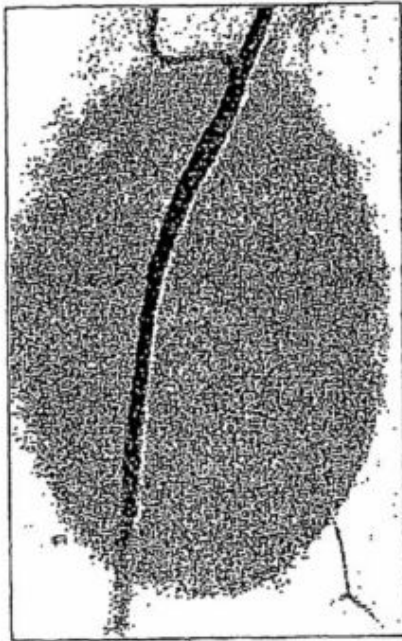
Fig. 15B



| Tratamiento CAM | nº de ramas SEM | % inhibición SEM |
|--------------------------------|-----------------|------------------|
| PBS | 73 8 | |
| T ₄ (0,1 μM) | 170 16 | 0 |
| T ₄ + LM609 (10 μg) | 109 9 | 64 9 |

Fig. 16B

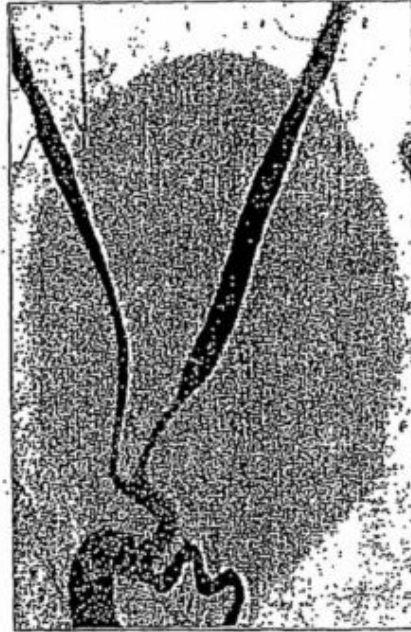
Efecto inhibitor del MAB $\alpha v \beta 3$ (LM609) y XT 199 sobre la angiogenesis inducida por T_4 en el modelo CAM



PBS



T_4 0,1 μ M



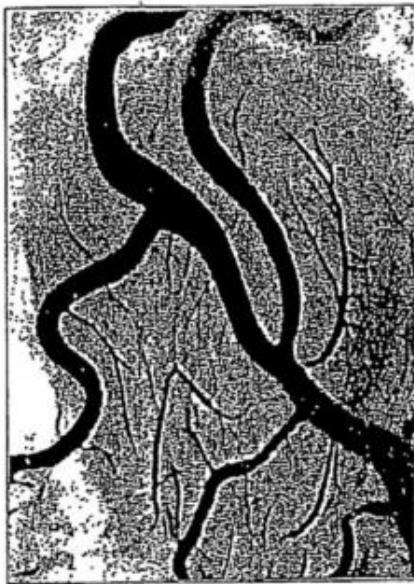
T_4 + LM609 (10 μ g)



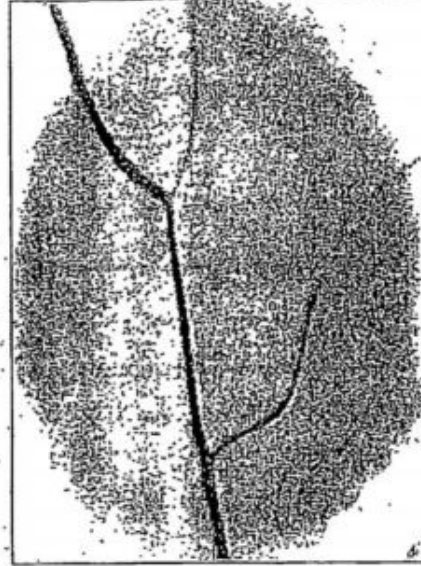
T_4 + XT199 (5 μ g)

Fig.16C

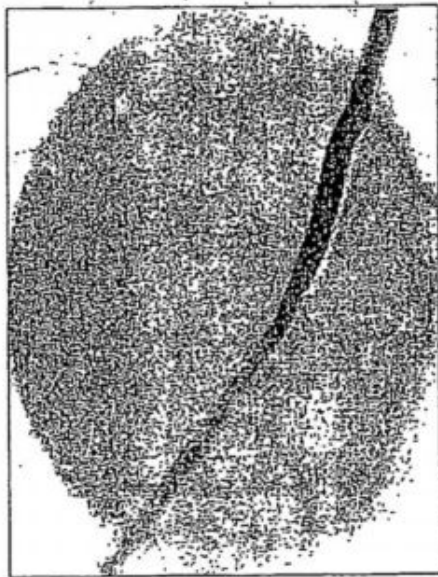
Efecto inhibitor de los antagonistas de la integrina $\alpha\beta3$ sobre la angiogenesis inducida por FGF2 en el modelo CAM



FGF2 (1 μg)



FGF2 + XT199



PBS



FGF2 + LM609

Fig. 16D

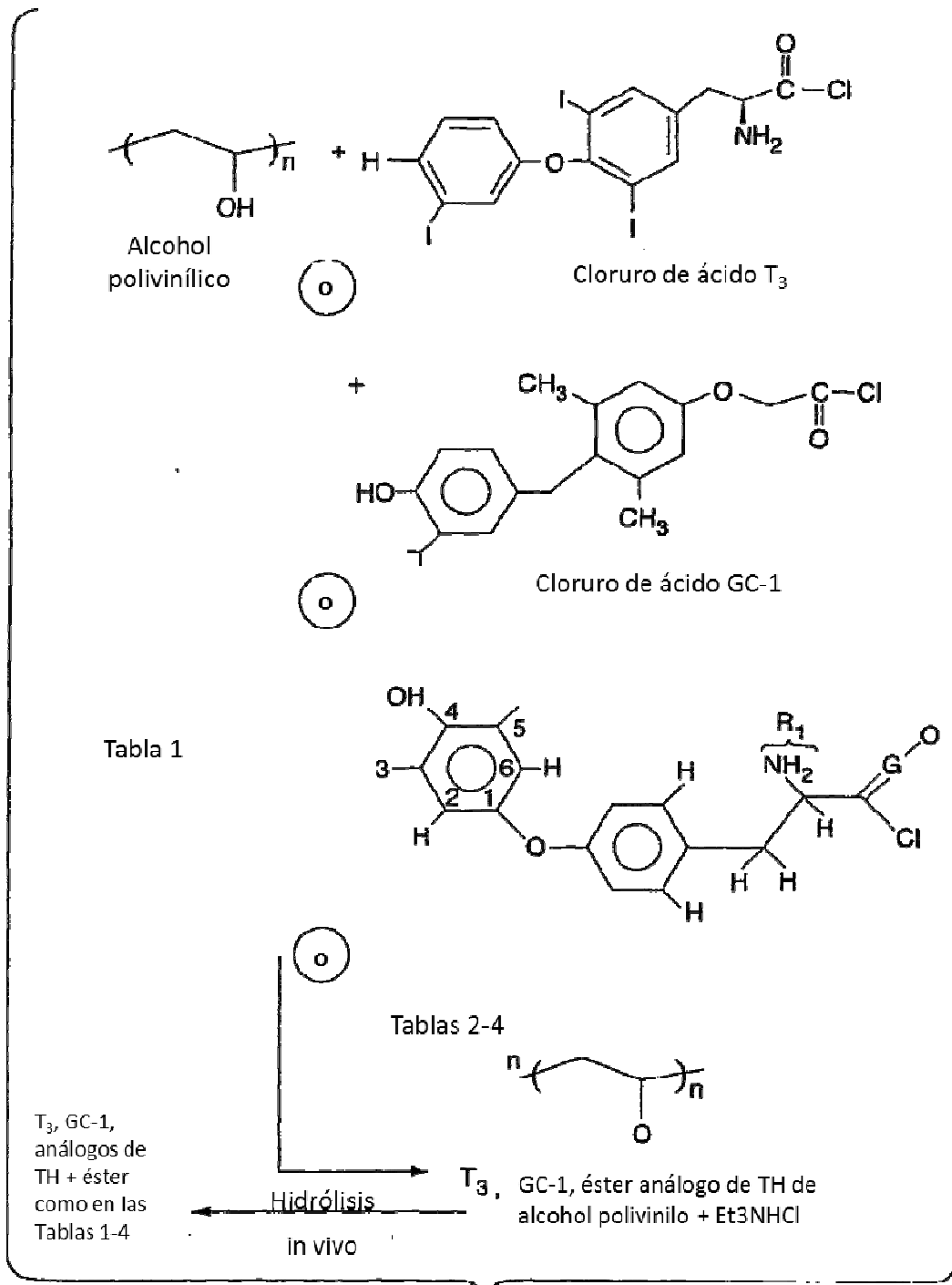


Fig. 17

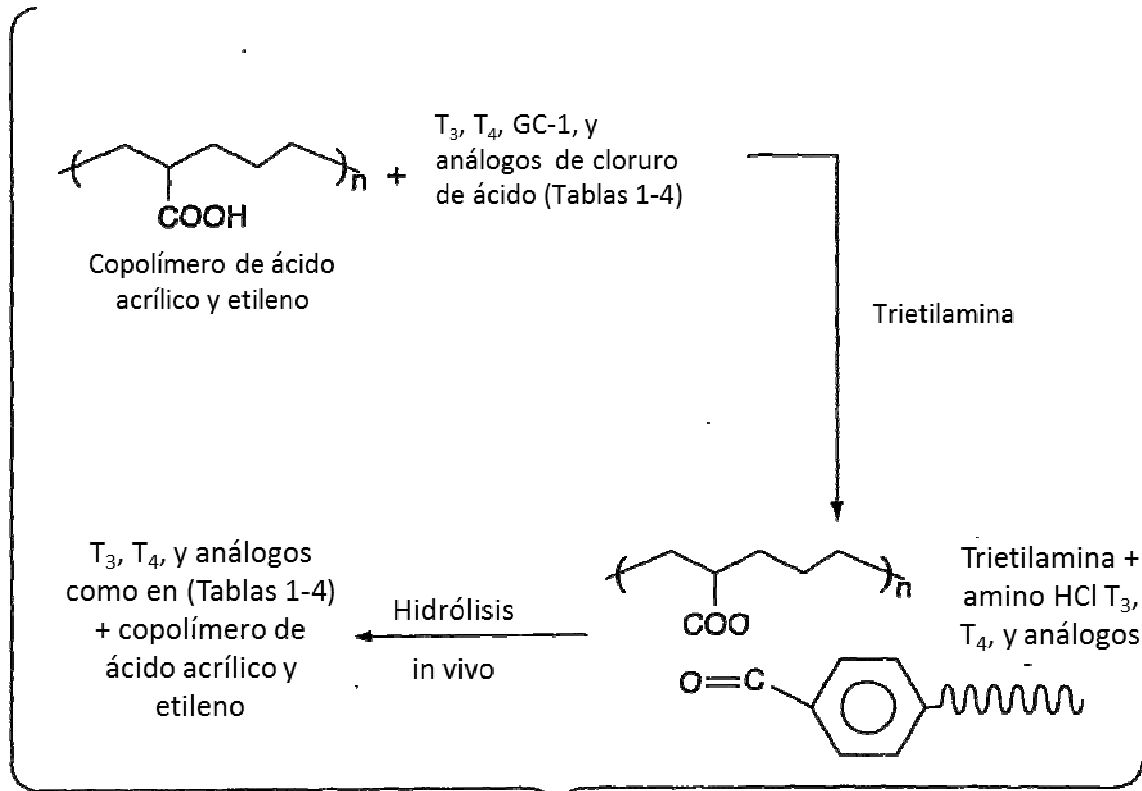


Fig. 18

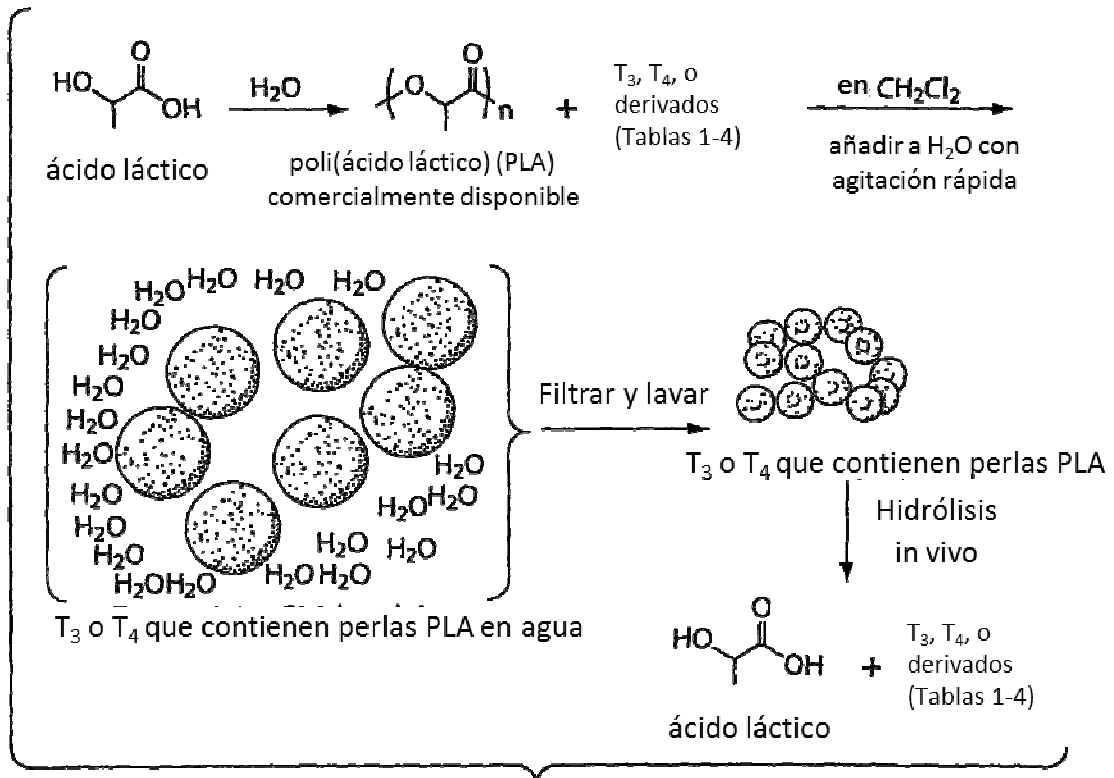
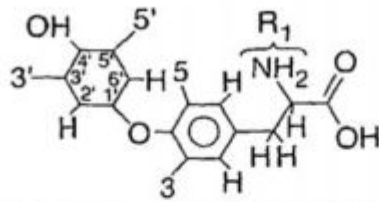


Fig. 19

Tabla A



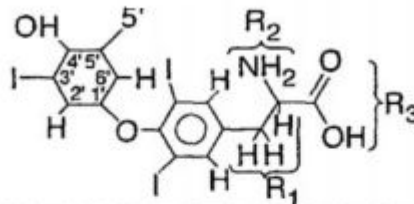
| 3' | 5' | 3 | 5 | R ₁ | Análogo: |
|-------------------|----|-----------------|----|----------------------|-----------------------------------|
| I | I | I | I | NH ₂ | L-T ₄ |
| I | H | I | I | NH ₂ | L-T ₃ |
| I | I | I | H | NH ₂ | rT ₃ |
| H | H | I | I | NH ₂ | 3,5-L-T ₂ |
| I | I | H | H | NH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

^aIsop, isopropilo

^bMe, metilo

Fig. 20A

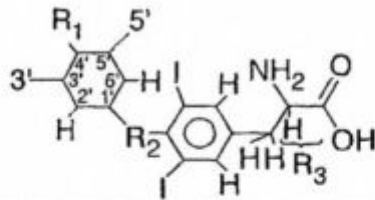
Tabla B



| R ₁ | R ₂ | R ₃ | 5' | Análogo |
|--------------------|-----------------|---------------------------------|----|---|
| CH ₂ CH | H | CO ₂ H | I | ácido 3,5,3,5'- tetrayodotiropropiónico |
| CH ₂ | H | CO ₂ H | I | ácido 3,5,3,5'- tetrayodotiroacético |
| CH ₂ | H | CO ₂ H | H | ácido 3,5,3,5'- tetrayodotiropropiónico |
| CH ₂ CH | NH ₂ | COC ₂ H ₅ | I | ácido 3,5,3,5'- triyodotiroacético |
| CH ₂ CH | NH ₂ | H | H | L-T ₄ etil éster de 3,5,3,5'- triyodotironamina |

Fig. 20B

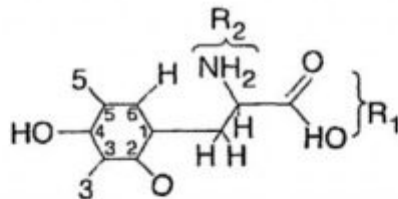
Tabla C



| 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 | S-puente T ₃ |
| 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-diyodo-L-tirosina |
| Br | Br | COOH | NH ₂ | 3,5-dibromo-L-tirosina |
| Me | Me | COOH | NH ₂ | 3,5-dimetil-DL-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-diyodotiramina |
| H | H | H | NH ₂ | Tiramina |
| I | I | COOH | H | ácido 3-(3,5-diyodo-4-hidroxifenil)propiónico |

Fig. 20D

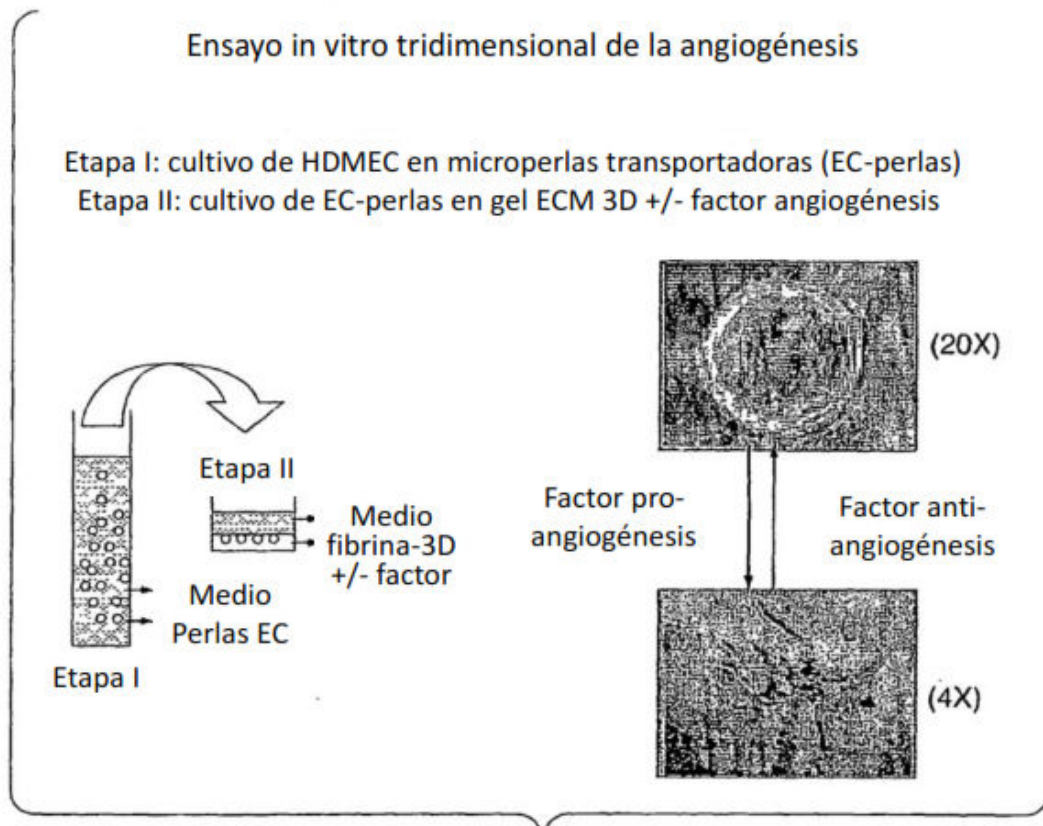


Fig. 21

Angiogénesis de brotes in vitro de HDMEC en fibrina 3D

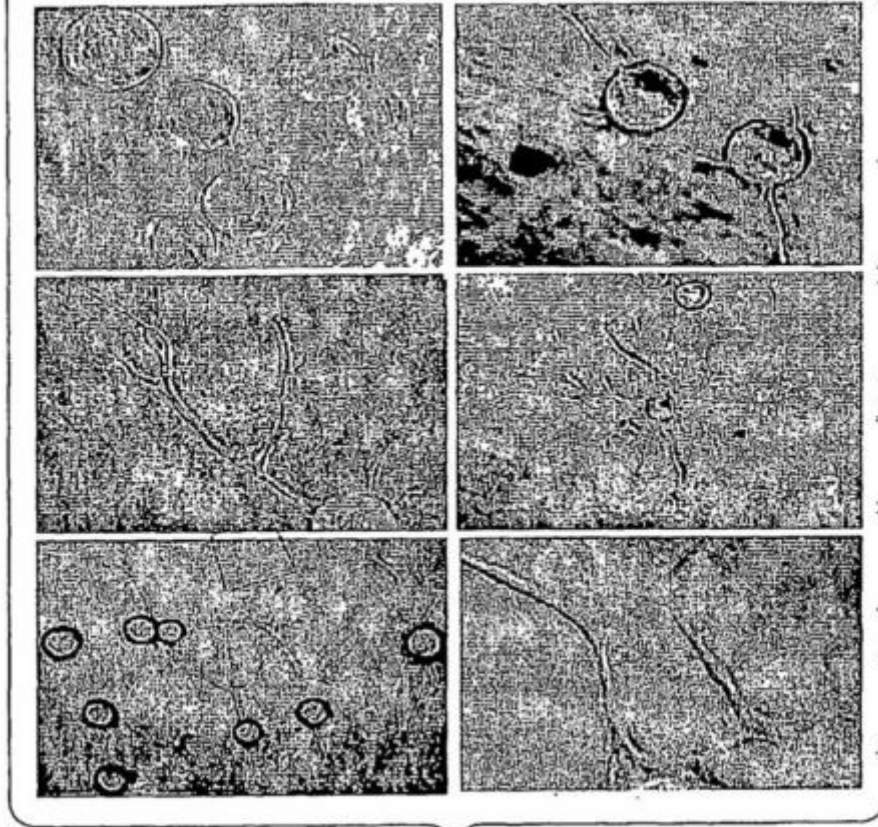


Fig. 22

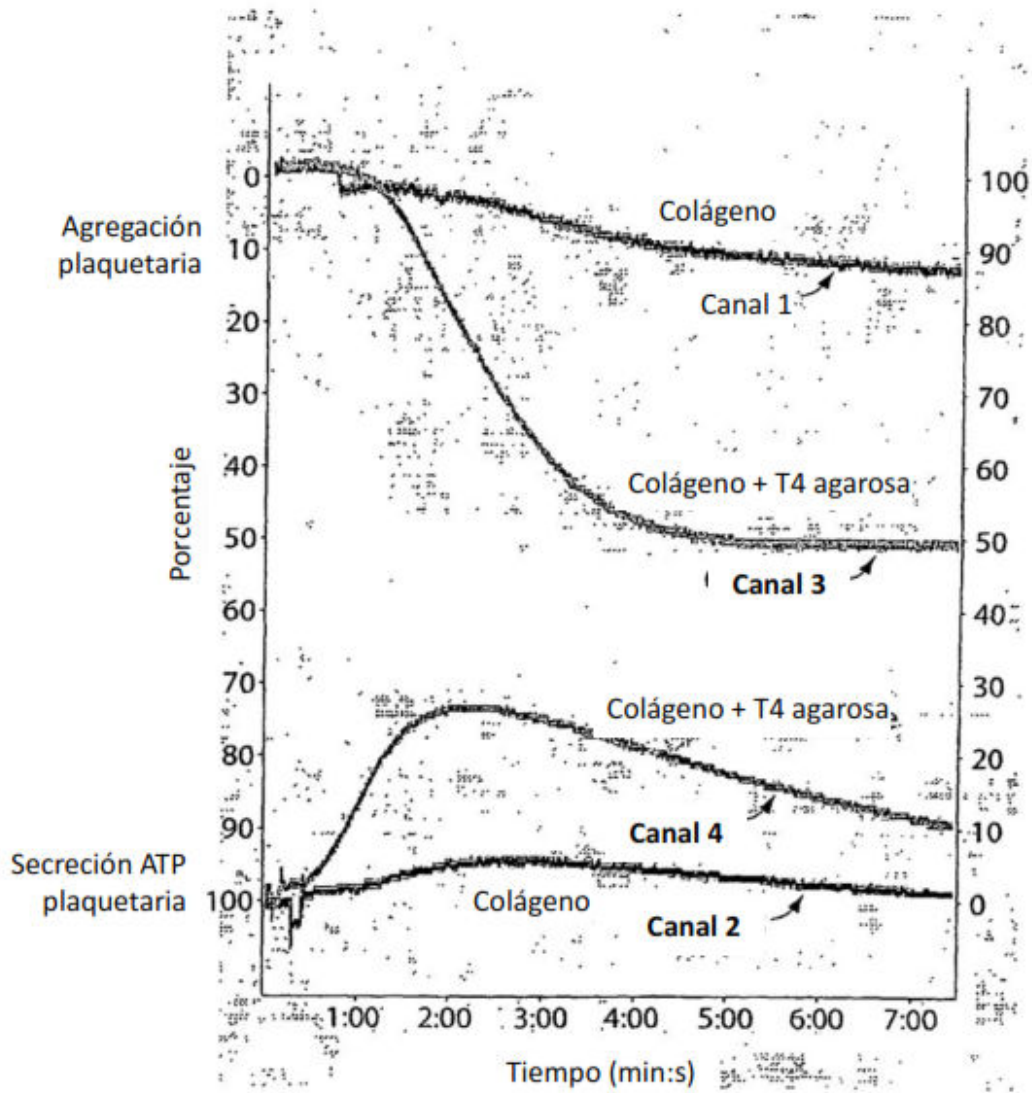


Fig. 23A

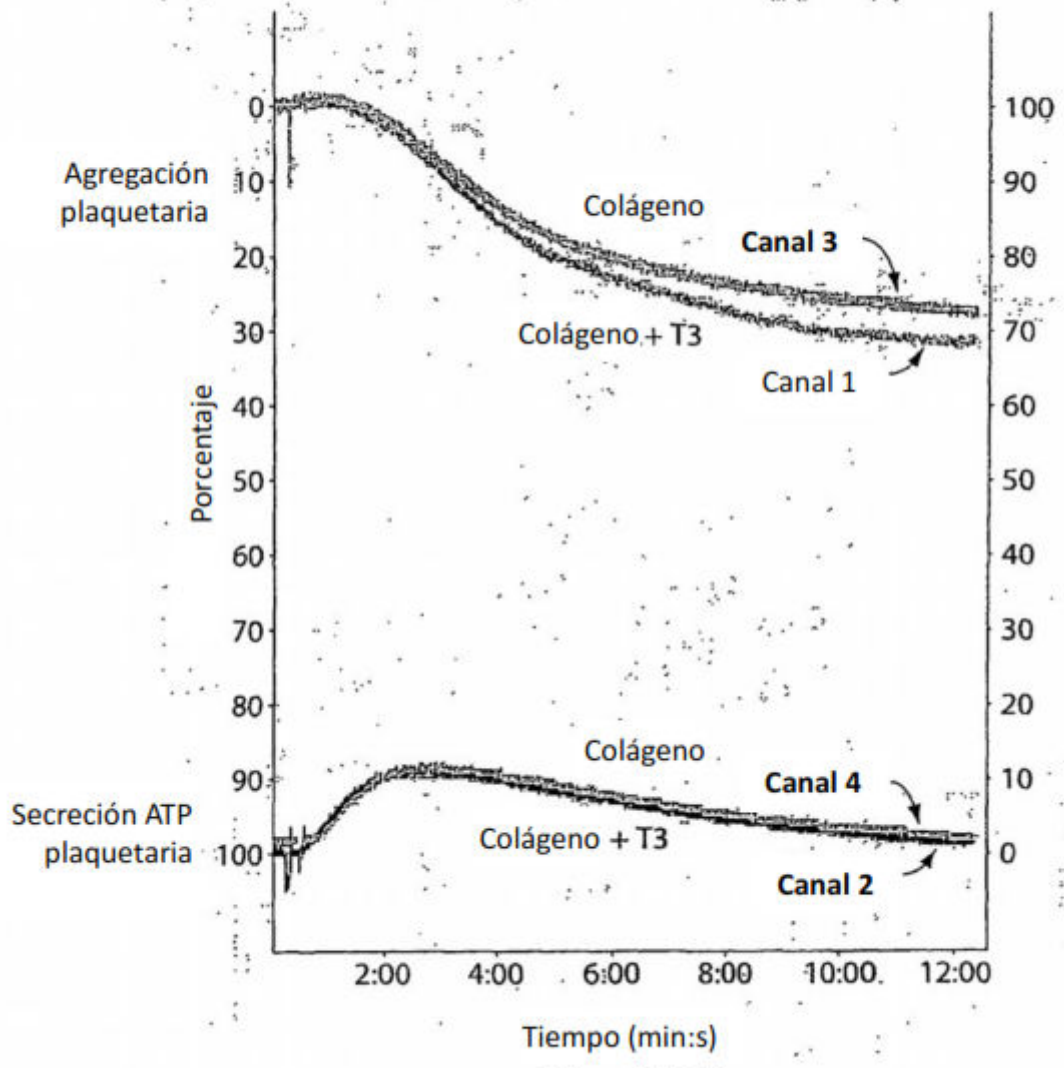


Fig. 23B

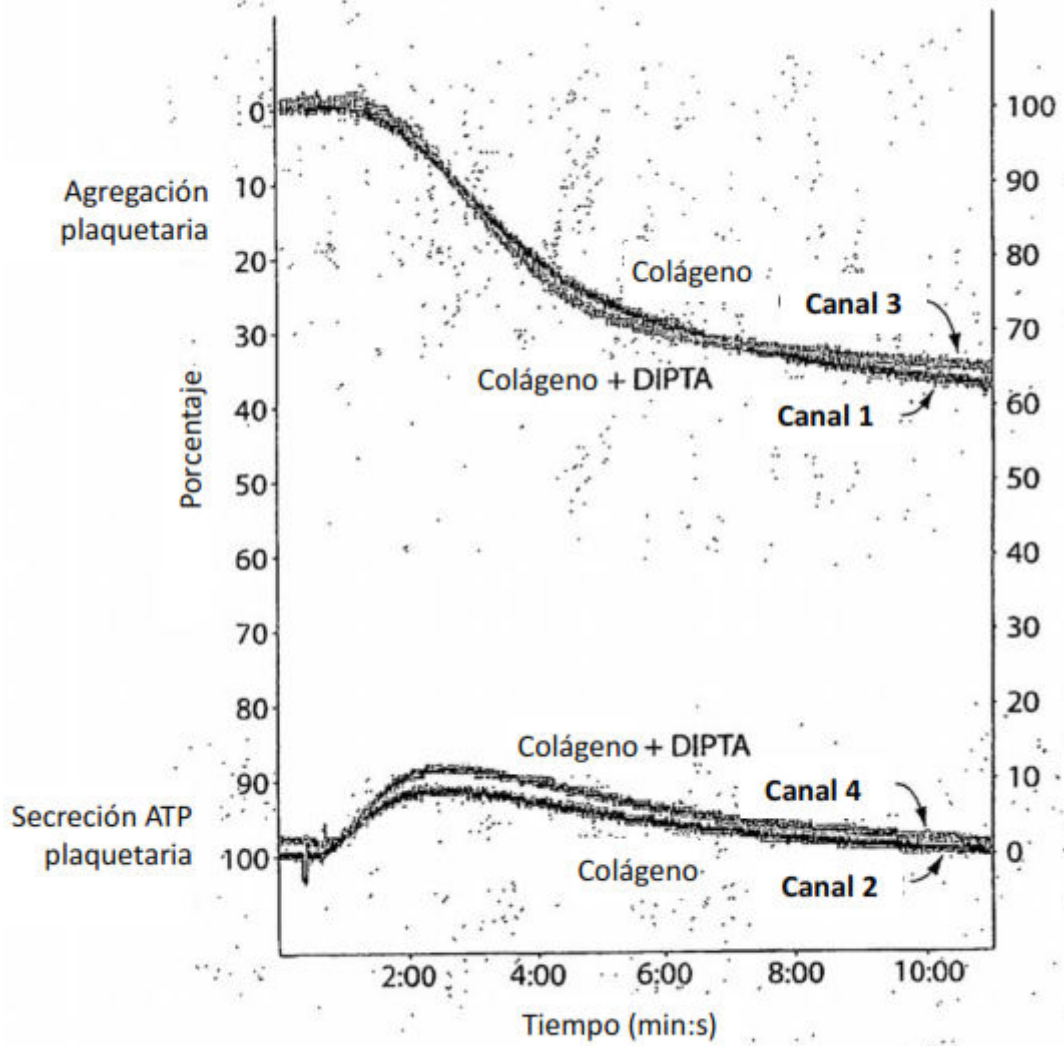


Fig. 23C

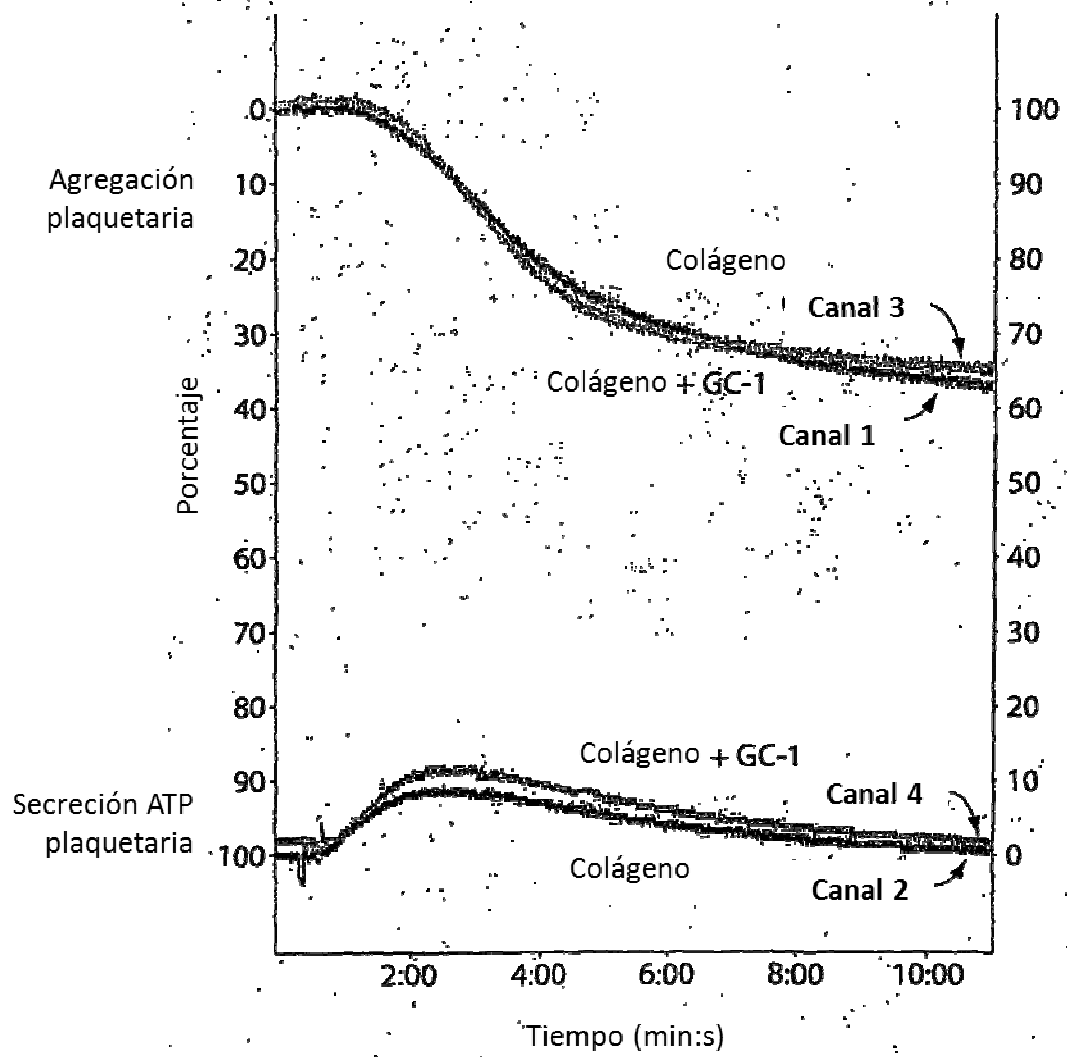


Fig. 23D

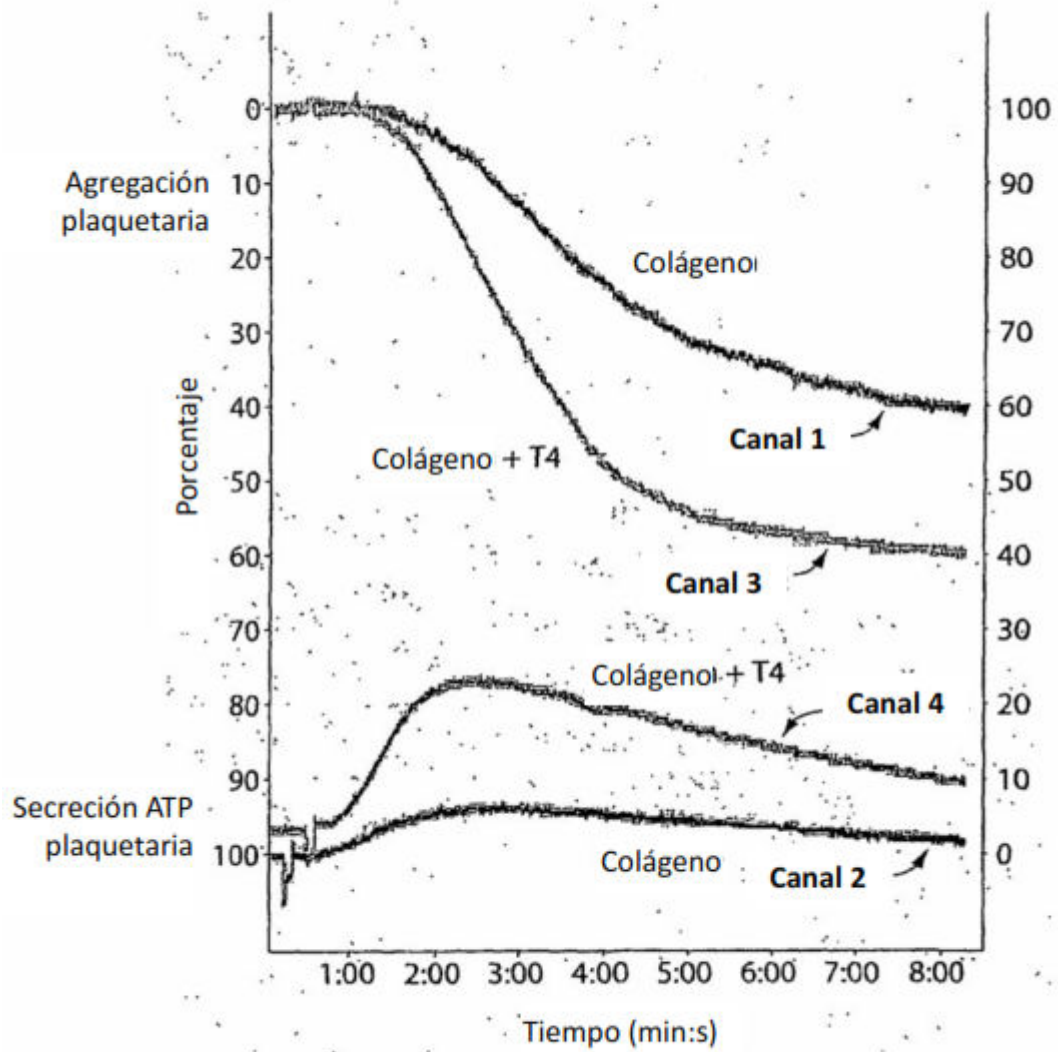


Fig. 23E

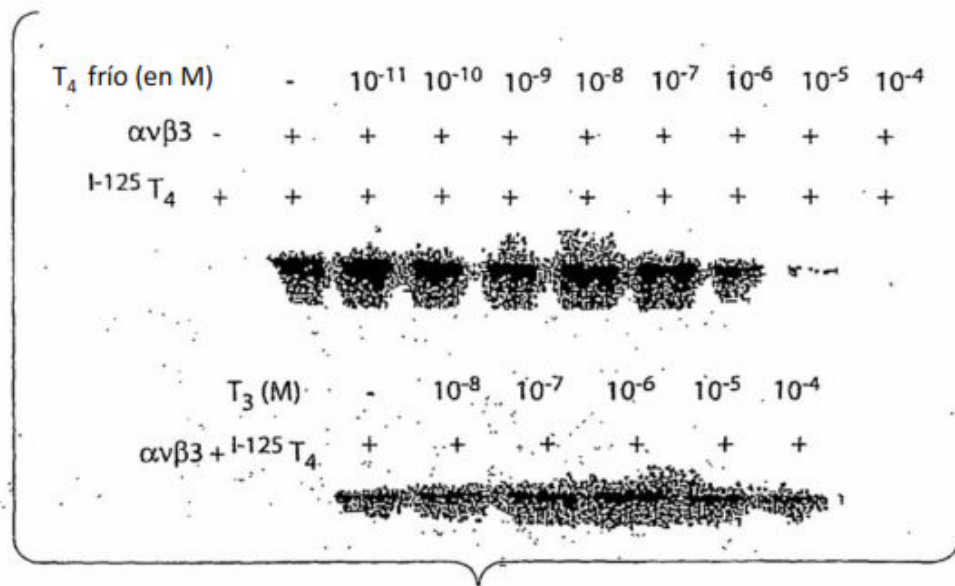


Fig. 24A

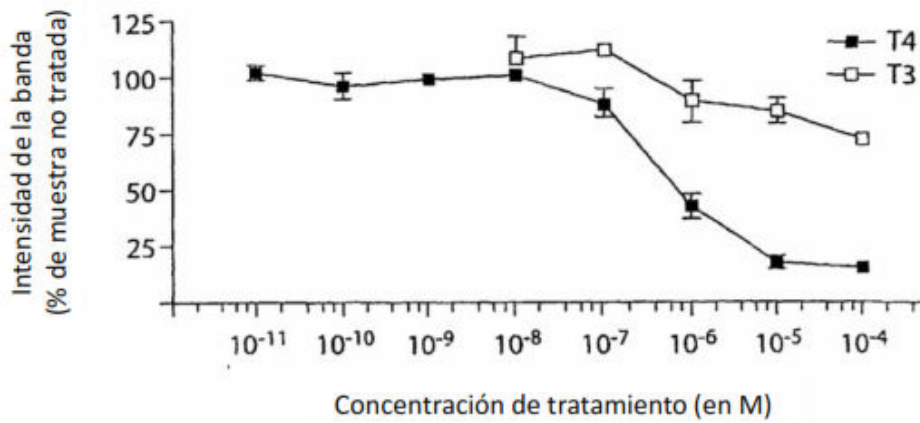


Fig. 24B

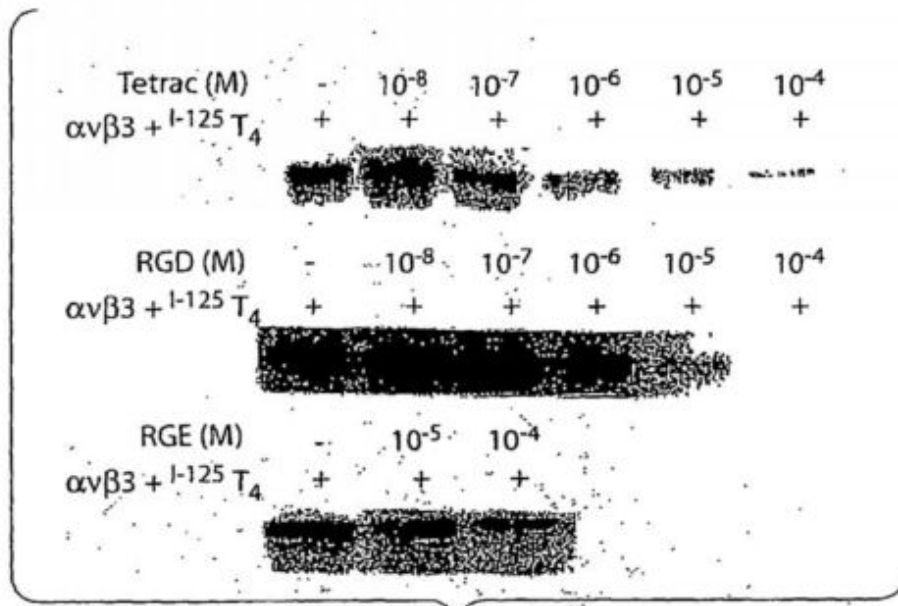


Fig. 25A

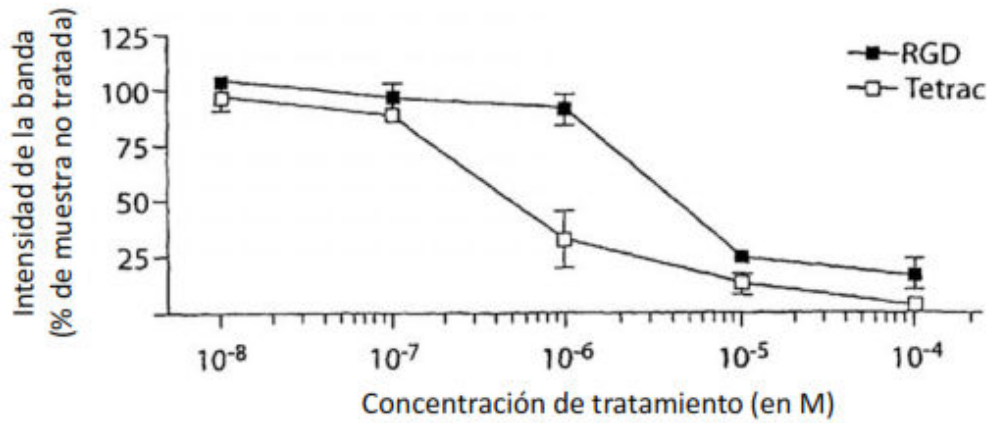


Fig. 25B

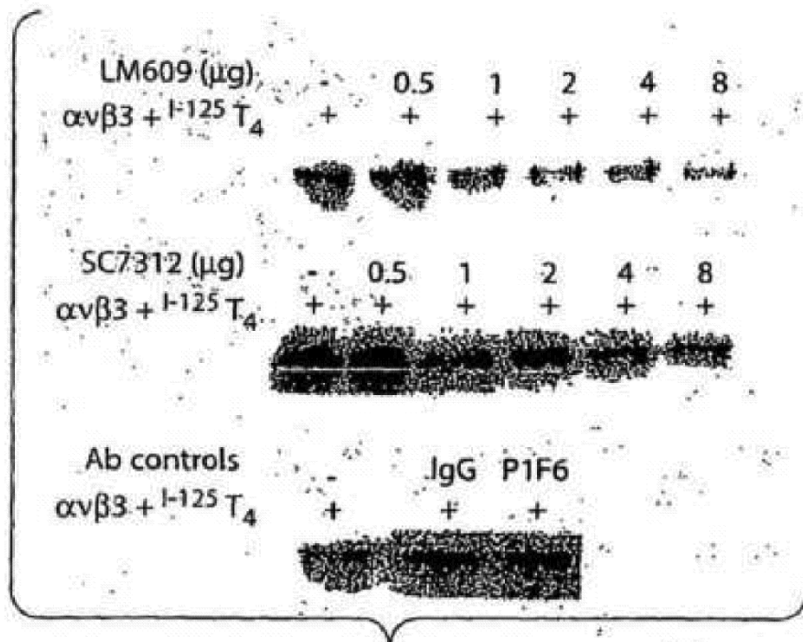


Fig. 26A

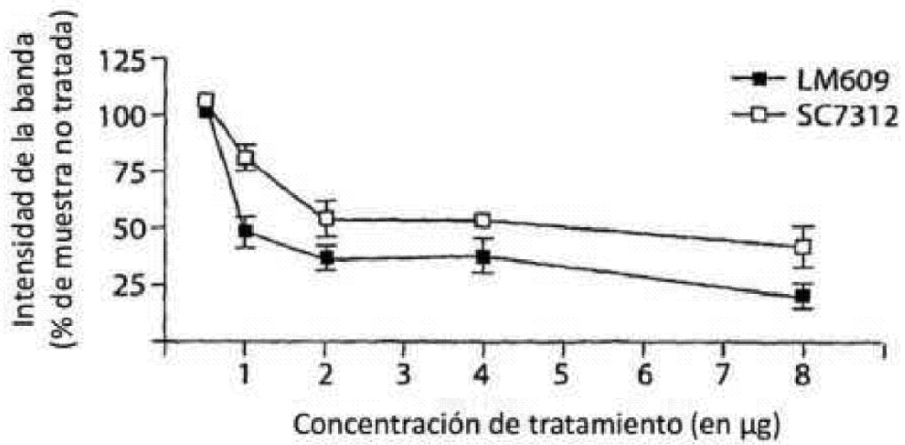


Fig. 26B

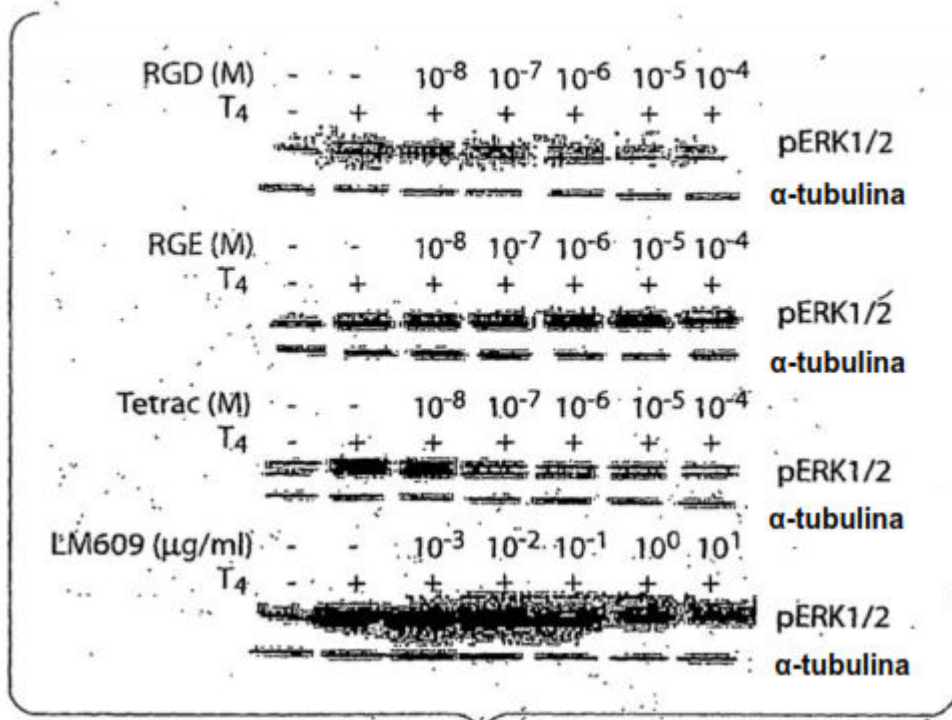


Fig. 27A

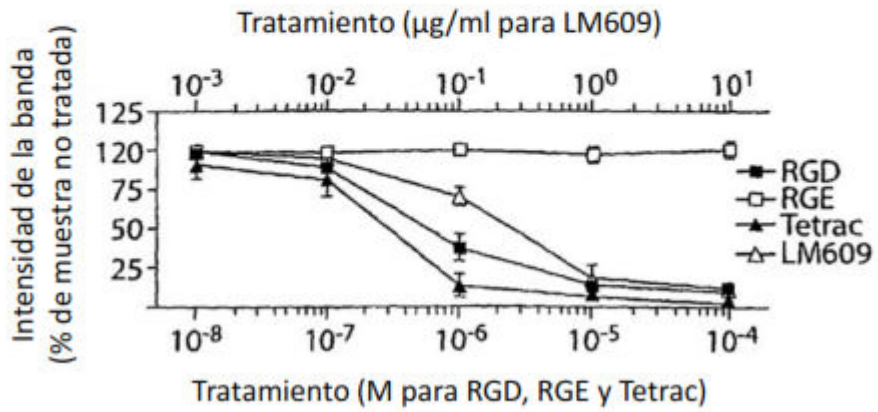


Fig. 27B

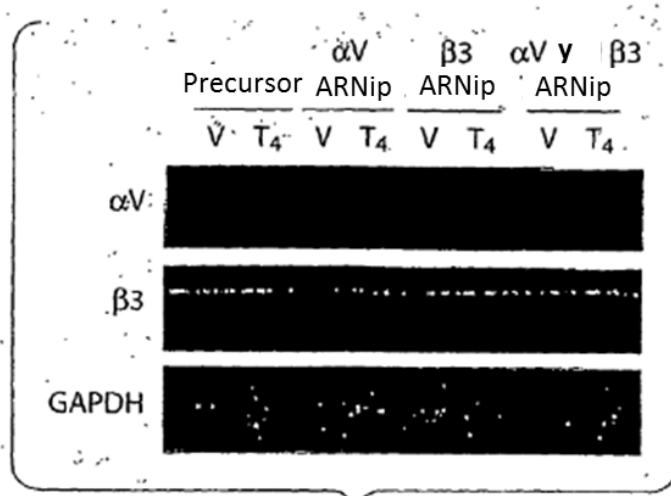


Fig. 28A

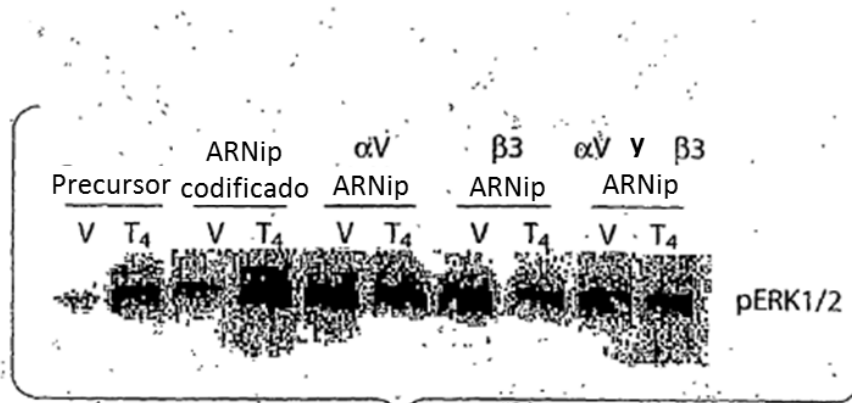


Fig. 28B

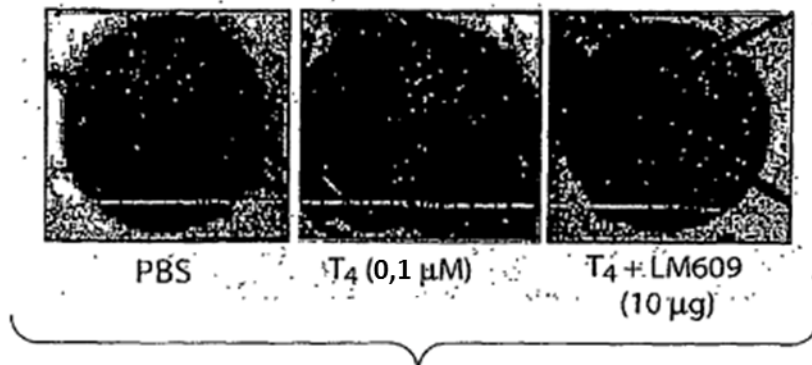


Fig. 29A

| Tratamiento CAM | nº de Ramas ± SEM | % Inhibición ± SEM |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| PBS | 73 ± 8 | - |
| T ₄ (0,1 μM) | 170 ± 16 | 0 |
| T ₄ + LM609 (10 μg) | 109 ± 9 | 64 ± 9*** |

Fig. 29B