



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 265 939**

51 Int. Cl.:
A61K 31/085 (2006.01)
A61K 31/055 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00928397 .9**
86 Fecha de presentación : **25.04.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1173163**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de tetrac y procedimiento para su utilización.**

30 Prioridad: **26.04.1999 US 130961 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Elliot Jr. Danforth**
84 Beartown Road
Underhill, Vermont 05489, US
Albert Burger

72 Inventor/es: **Danforth, Elliot, Jr. y**
Burger, Albert

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 265 939 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

Composiciones farmacéuticas de tetrac y procedimiento para su utilización.

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a la utilización de tetrac (ácido 3,3',5,5'-tetraiodotiroacético), un metabolito natural de la hormona tiroidea T4 (L-tiroxina), para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos o de otros crecimientos anormal en la glándula tiroidea. Las composiciones farmacéuticas de la invención son capaces de suprimir la secreción de la hormona estimuladora tiroidea (TSH) mientras reduce o evita la estimulación tiromimética de los tejidos periféricos en comparación con una dosis supresiva de TSH equivalente de L-tiroxina.

15 **2. Antecedentes**

La tiroidea es una glándula bilobular situada en la base del cuello frente a la tráquea. Segrega diversas hormonas que regulan el metabolismo del cuerpo así como la función orgánica y afecta, por tanto, a cosas tales como el ritmo cardiaco, el nivel de colesterol, el peso corporal, el nivel energético, la fuerza muscular y la condición de la piel, entre otras. Las hormonas tiroideas se unen a los receptores proteicos estrechamente asociados al ADN en el núcleo de las células del cuerpo regulando así la transcripción del ADN y la traducción del ARN. Por tanto, los efectos metabólicos de las hormonas tiroideas proceden de su capacidad para regular la producción de enzimas y proteínas en el cuerpo.

25 La cantidad de hormonas tiroideas presentes en el cuerpo es cuidadosamente regulada por un mecanismo de retroalimentación que implica al hipotálamo, a las glándulas pituitaria y a la tiroidea. El hipotálamo produce tirotrópina, que libera la hormona (TRH) que provoca que la pituitaria produzca la hormona estimulante de la tiroidea (TSH). La TSH estimula la tiroidea para producir T4 (tiroxina) y T3 (3,3',5-triiodotironina), las dos hormonas tiroideas más importantes (Fig. 1). Los niveles de T4 y T3 en sangre son controlados por la pituitaria, que producirá más TSH si los niveles de hormona tiroidea son demasiado bajos y menos si los niveles de T3 y T4 son demasiado altos.

30 La T4 es el principal producto segregado por la glándula tiroidea mientras la T3 es la hormona tiroidea más potente debido a su alta afinidad de unión con los receptores nucleares de hormona tiroidea. La secreción de TSH procedente de la glándula pituitaria es altamente sensible a la inhibición por T3. Aunque la T3 sea secretada solamente por la glándula tiroidea en pequeñas cantidades, su principal fuente en la glándula pituitaria es a través de la conversión local de T4 en T3 mediante la enzima específica de la pituitaria, la monodeyodinasas tipo II. Por tanto, el control de la secreción de TSH por la pituitaria depende de la actividad de esta monodeyodinasas. A medida que las concentraciones circulantes de T4 se aproximan a los niveles normales, la T4 suprime la actividad de la monodeyodinasas tipo II específica de la pituitaria, reduciendo así la generación de T3 y liberando de forma efectiva a la pituitaria de otra supresión. La capacidad de T4 para controlar la supresión de secreción de TSH explica la regulación por retroalimentación de T4 sobre su propia secreción y el punto de referencia normal del eje tiroidea-pituitaria.

45 La presencia de demasiada o insuficiente hormona tiroidea en el cuerpo conduce a anomalías que pueden convertirse en una amenaza para la vida si no se tratan. La presencia de demasiada hormona tiroidea conduce a hipertiroidismo. El hipertiroidismo, o superactividad de la glándula tiroidea, tiene varias causas y, entre otros síntomas, provoca ansiedad, insomnio, pérdida de peso y ritmo cardiaco rápido. El hipertiroidismo se trata destruyendo toda o parte de la glándula tiroidea por extirpación quirúrgica, tratamiento con radioyodo o ambos y con medicamentos que bloquean la síntesis de hormonas tiroideas.

50 Una presencia insuficiente de hormona tiroidea conduce a hipotiroidismo, que es más común que el hipertiroidismo. El hipotiroidismo, o hipoactividad de la glándula tiroidea, tiene varias causas y, entre otras cosas, los síntomas provocan letargo, debilidad, aumento de peso y ritmo cardiaco bajo. El hipotiroidismo se trata durante toda la vida mediante sustitución por hormonas tiroideas sintéticas, normalmente L-tiroxina.

55 Los crecimientos anormales o tumores de la glándula tiroidea se tratan actualmente por extirpación quirúrgica de la glándula, seguida de radioyodo para destruir cualquier tejido tiroideo remanente. Se continúa con un tratamiento crónico con dosis supra fisiológicas de T4 para suprimir la secreción de la TSH procedente de la glándula pituitaria, impidiendo así la estimulación de células cancerosas residuales en la tiroidea que expresen el receptor de TSH. Estas dosis supra fisiológicas supresivas de T4 conducen inevitablemente a un hipertiroidismo suave.

60 Otros metabolitos de las hormonas tiroideas son el tetrac (ácido 3,3',5,5'-tetraiodotiroacético) y el triac (ácido 3,3',5-triiodotiroacético), que son producidos por la desaminación de T4 y T3 respectivamente (Fig. 1). El tetrac es una prohormona del triac y es convertido por dos enzimas, la misma monodeyodinasas tipo II encontrada en la pituitaria, y en cierta medida en otras zonas en el cerebro y con una baja expresión en el corazón y en la glándula tiroidea, y la monodeyodinasas tipo I, encontrada en el hígado y demás tejidos periféricos, que convierte la T4 en T3. El triac es también un inhibidor potente de la secreción de TSH y ha sido investigado como sustituto de la T4 en el tratamiento de la tiroidea de pacientes después de tiroidectomía. Sin embargo, debido a su potente actividad tiromimética en los tejidos periféricos y a su muy corta vida media plasmática, se descubrió que el triac no era un sustituto adecuado de

la T4 con este propósito. Sin embargo, se ha descubierto que el triac era útil en el tratamiento de una forma rara de resistencia a la hormona tiroidea.

Así, resultaría muy deseable desarrollar nuevas composiciones farmacéuticas capaces de suprimir la secreción de TSH mientras se reduce o evita el hipertiroidismo iatrogénico inducido por dosis supresivas de TSH comparables de T4 (L-tiroxina).

Véase también: Bracco, D. y col. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77:221-228 (1993); Burger, A.G. y Vallotton, M.B., "The metabolism of tetraiodothyroacetic acid and its conversion to triiodothyroacetic acid", *Thyroid Hormone Metabolism*, páginas 223-239, W.A. Harland y J.S. Orr, editors, Academic Press, London, New York, San Francisco, (1975); Burger, A.G. y col. *Acta Endocrinologica*, 92:455-467 (1979); Goolden, A.W.G. y col. *The Lancet*, 1:890-891 (1956); Green, W.L. e Ingbar, S.H. *J. Clin. Endocr.*, 21:1548-1565 (1961); Lerman, J. y Pitt-Rivers, R.J. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 16:1470-1479 (1956); Lerman, J., *J. Clin. Endocr.*, 21:1044-1053 (1961); Liang, H. y col. *Eur. J. Endocrinol.*, 137:537-544 (1997); Menegay, C. y col. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 121:651-658 (1989); y Richardson-Hill, S. y col. *J. Clin. Invest.*, 39:523-533 (1960).

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos usos, tal como se definen en la reivindicación 1, de composiciones farmacéuticas que comprenden tetrac que son capaces de suprimir la secreción de TSH mientras se reduce o evita la estimulación tiromimética de los tejidos periféricos inducida por una dosis de L-tiroxina que produce un efecto supresivo de TSH equivalente. La invención proporciona además la utilización de compuestos farmacéuticos que comprenden una combinación de tetrac y L-tiroxina (T4).

Las composiciones farmacéuticas preferentes son capaces de suprimir la secreción de TSH mientras reducen o evitan la estimulación tiromimética de los tejidos del corazón, hígado, riñones, músculos y huesos en comparación con la estimulación de dichos tejidos inducida por una dosis de L-tiroxina que produce un efecto supresivo de TSH equivalente.

Las composiciones utilizadas de acuerdo con la presente invención son capaces de suprimir la secreción de TSH sin suprimir la actividad de la monodeyodinasas de tipo II específica de la pituitaria.

Se suprime la secreción de TSH al mismo tiempo que se reduce o evita la estimulación tiromimética de los tejidos periféricos inducida por una dosis de L-tiroxina que produce un efecto supresivo de TSH equivalente que comprende la administración de una composición farmacéutica que incluye tetrac.

La utilización de la presente invención puede emplearse para tratar pacientes que padecen de tumores o de otros crecimientos anormales en la glándula tiroidea. La utilización de la presente invención es particularmente útil para suprimir el crecimiento de tejido tiroideo residual en un paciente con cáncer de tiroides después de tiroidectomía.

El tetrac es un metabolito natural de la tiroxina (T4), la principal hormona tiroidea secretada. La potencia tiromimética del tetrac es inferior a la del triac debido a su menor afinidad de unión a los receptores nucleares de la hormona tiroidea. Además, el tetrac se convierte localmente en triac, inhibidor potente de la secreción de TSH, mediante la monodeyodinasas de tipo II específica de la pituitaria. Debido a su larga vida media, el tetrac asegura un suministro constante de triac así como de pequeñas cantidades de triac localmente producidas en la pituitaria y su rápida vida media metabólica limita la actividad tiromimética del triac en otros tejidos del cuerpo. Además, el tetrac, a diferencia de la T4, no suprime la actividad de la monodeyodinasas específica de la pituitaria, ya que su concentración en el plasma aumenta. Por tanto, después de la conversión en triac, el tetrac es capaz de suprimir la TSH sin restricciones. Además, el tetrac es menos tiromimético en los tejidos periféricos si se compara con la T4 y es farmacéuticamente más adecuado que el triac debido a su vida media plasmática más larga.

A continuación se revelan otros aspectos de la invención.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: muestra las estructuras de T4 (L-tiroxina), T3 (3,5,3'-triiidotironina), tetrac (ácido 3,3',5,5'-tetraiodotiroacético) y triac (ácido 3,3',5-triiidotiroacético).

Fig. 2: muestra los efectos de T4 y del tratamiento con tetrac sobre la actividad cardíaca de la monodeyodinasas de tipo I (panel a) y los niveles de ARNm de SERCA (panel b) en ratas tratadas.

Fig. 3: muestra los efectos de T4 y del tratamiento con tetrac sobre los niveles α - y β -MHC de ARNm (paneles a y b, respectivamente) en ratas tratadas.

Fig. 4: muestra los efectos de T4 y del tratamiento con tetrac sobre la actividad hepática de la monodeyodinasas de tipo I (panel a) y los niveles hepáticos de ARNm de la monodeyodinasas de tipo I (panel b) en ratas tratadas.

ES 2 265 939 T3

Fig. 5 muestra los efectos de T4 y del tratamiento con tetrac sobre los niveles de ARNm de la hormona del crecimiento (GH) (panel a) y los niveles de ARNm de la monodeyodinasa de tipo II (panel b) en ratas tratadas.

Fig. 6: muestra los efectos de T4 y del tratamiento de tetrac sobre la actividad de la monodeyodinasa de tipo II en el córtex cerebral (panel a) y en el tejido adiposo marrón (BAT) (panel b) en ratas tratadas.

Fig. 7: muestra el gráfico de Ln (TSH) (ng/ml) contra Ln (actividad hepática de la monodeyodinasa de tipo I).

Fig. 8: muestra los niveles circulantes de TSH en pacientes humanos, extraídos del tratamiento con T4 y posteriormente tratados con una dosis diaria de tetrac o T4 durante 21 días.

Descripción detallada de la invención

Hemos descubierto ahora que las composiciones farmacéuticas que comprenden tetrac son útiles como medicamentos tiromiméticos para el tratamiento de mamíferos, en particular de seres humanos, que padecen de hipotiroidismo iatrogénico. De forma más particular, las composiciones de la invención son capaces de suprimir la secreción de la TSH al mismo tiempo que reducen o anulan el hipertiroidismo iatrogénico inducido por unas dosis supresivas de TSH equivalentes de L-tiroxina. Los compuestos de la invención son particularmente útiles para tratar a los pacientes con cáncer de tiroides después de una tiroidectomía ya que son capaces de suprimir completamente, o casi completamente, la secreción de TSH y así impiden la estimulación del crecimiento de tejido tiroideo residual. Las composiciones de la invención pueden comprender también otros compuestos tiromiméticos, en particular L-tiroxina.

Las composiciones de la invención son útiles para tratar pacientes con crecimientos anormales o tumores en la tiroides, incluidos los cánceres de tiroides bien diferenciados como los cánceres papilar, folicular y papilar/folicular combinados. Preferentemente, las composiciones de la invención se administran a los pacientes después de una tiroidectomía para impedir la estimulación y el re-crecimiento de los tejidos tiroideos residuales.

La invención proporciona igualmente la utilización de composiciones farmacéuticas que comprenden tetrac o tetrac combinado con otros compuestos tiromiméticos para suprimir la secreción de TSH en mamíferos. Los compuestos tiromiméticos preferentes útiles para las composiciones de la invención incluyen T4, T3 y triac. Son particularmente preferentes aquellas composiciones farmacéuticas que comprenden tetrac y T4.

La administración de los compuestos de la invención puede llevarse a cabo mediante diversas vías adecuadas, incluyendo las vías oral, tópica (incluida transdérmica, bucal o sublingual), nasal y parenteral (incluida por inyección intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, intradérmica o intramuscular) u otras formas apropiadas. Se entenderá que las presentes cantidades preferentes de los compuestos activos empleados en determinada terapia varían según el compuesto específico que se esté utilizando, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación, el lugar particular de administración, la condición y la edad del receptor, etc. Las velocidades óptimas de administración para un determinado protocolo de administración pueden ser comprobadas inmediatamente por los especialistas en la técnica mediante pruebas convencionales de determinación de dosificación.

Las dosificaciones de los compuestos tiromiméticos oscilan generalmente en el rango de 0,01 a 10.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Las dosificaciones de tetrac preferentes son de 0,1 a 1.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en particular dosificaciones de tetrac de 1 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Las composiciones de la invención que comprenden tetrac o tetrac combinado con otro compuesto tiromimético pueden administrarse solas, también pueden estar presentes formando parte de una composición farmacéutica en una mezcla con una sustancia vehículo orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable adecuada para la vía parenteral, oral o para otra vía de administración deseada y que no reaccione perjudicialmente con los compuestos activos y no perjudique al receptor de los mismos. Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados se incluyen, sin limitarse a, agua, soluciones salinas, alcohol, aceites vegetales, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, glucosa, manosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceites esenciales, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso de éter de petróleo, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, ciclodextranos, aceites de pescado, componentes de aceites de pescado, triglicéridos, ácidos grasos ω -3, ésteres de ácidos grasos ω -3, etc. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo con lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humidificantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares, siempre que no reaccionen perjudicialmente con los compuestos activos. Estas composiciones también pueden criodeshidratarse y reconstituirse en los disolventes adecuados.

Para la aplicación parenteral son particularmente adecuadas las soluciones, preferentemente soluciones aceitosas o acuosas ligeramente alcalinas, proteínas vehículo así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluidos los supositorios. Las ampollas son convenientes para la administración de dosificaciones unitarias.

Para la aplicación enteral son particularmente adecuadas las pastillas, grageas o cápsulas que contienen talco y/o un ligante vehículo carbohidrato o similar, siendo preferentemente como vehículo la lactosa y/o el almidón de maíz y/o el almidón de patata. Se puede utilizar un jarabe, elixir o similar en el cual se emplee un vehículo edulcorante. Pueden

formularse composiciones de liberación retardada, incluidas aquellas en las cuales el componente activo está protegido por revestimientos diferentemente degradables, por ejemplo, por microencapsulación, revestimiento múltiple, etc.

Los compuestos terapéuticos de la invención pueden incorporarse también en liposomas. La incorporación puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos conocidos de preparación de liposomas, por ejemplo sonicación y extrusión. Los métodos convencionales adecuados para la preparación de liposomas se describen también, por ejemplo, en A.D. Bangham y col., *J. Mol. Biol.*, 23:238-252 (1965); F. Olson y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 557:9-23 (1979); F. Szoka y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75:4194-4198 (1978); S. Kim y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 728:339-348 (1983); y Mayer y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161-168 (1986).

El liposoma puede elaborarse a partir de cualquiera de los materiales liposómicos convencionales sintéticos o naturales con fosfolípidos, incluidos los fosfolípidos procedentes de fuentes naturales como el huevo, fuentes vegetales o animales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, esfingomielina, fosfatidilserina o fosfatidilinositol. También se pueden utilizar fosfolípidos sintéticos, por ejemplo dimiristoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina y sus fosfatidiletanolaminas y fosfatidilgliceroles correspondientes. En los liposomas puede incorporarse colesterol o demás esteroides, hemisuccinato de colesterol, glicolípidos, 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), cloruro de N-[1-(2,3-dioleoil)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), y otros lípidos catiónicos. La cantidad relativa de tetrac y demás compuestos tiromiméticos, así como de los aditivos utilizados en los liposomas, puede variar de forma relativamente amplia. Los liposomas de la invención contienen adecuadamente aproximadamente del 60 al 90 por ciento en moles de fosfolípidos naturales o sintéticos; se puede utilizar colesterol, hemisuccinato de colesterol, ácidos grasos o lípidos catiónicos en cantidades que oscilan entre el 0 y el 50 por ciento en moles; y el compuesto o los compuestos terapéuticos de la invención pueden estar presentes adecuadamente en cantidades de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 50 por ciento en moles.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos. Se proporcionan estos ejemplos para ayudar a la comprensión de la invención y no deben ser considerados como limitaciones de la misma.

Ejemplo 1

Preparación de ácido 3,3',5,5'-tetraiodotiroacético (tetrac)

Los procedimientos de síntesis para la producción de hormonas tiroideas son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo Stewart C. Harvey y col., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, U.S.A., páginas 979-981).

En general, el tetrac se puede obtener por iodación de triac o de acetato de 4'-hidroxi-3,3',5-triiodofenoxifenilo mezclando yodo y yoduro en solución acuosa. La purificación de tetrac a partir de triac se realiza mediante diversas cristalizaciones en acetona.

El tetrac está comercialmente disponible de diversas compañías, incluida la Firma Formula GmbH (Berlín, Alemania), Simafex (Marans, Francia), ICMD (Mulhouse-Dornach, Francia) y Sigma (St. Louis, MO).

Ejemplo 2

Efectos del tetrac sobre la supresión de TSH y sobre los parámetros cardiacos en ratas

Se obtuvieron hormonas tiroideas (3,3'-T₂, T₃, T₄) y sus análogos Diac, Triac y Tetrac de Henning Co. (Berlín, Alemania). Se compraron todos los reactivos químicos utilizados a Fluka (Buchs, Suiza), a Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) o a Merck (Darmstadt, Alemania). Se compraron las minibombas osmóticas (modelo 2002) a Alzet (Palo Ato, USA). Se compró el [¹²⁵I]-Na libre de vehículo a Amersham International (Buckinghamshire, R.U.) y el [¹³¹I]Na a Nuklear Reaktor, Würenlingen, Suiza. T₃, T₄, Triac y Tetrac se marcaron con ¹²⁵I por el método de la cloramina-T utilizando 3,5-T₂, L-T₃, Diac y Triac como sustratos respectivamente (Burger, A. y col., *Endocrinology* (1975) 97:919-923). Las actividades específicas obtenidas fueron superiores a 1.200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Se compraron setenta y nueve ratas macho SIVZ al criador (Institut für Labortierkunde des Universität Zürich, Zürich, Suiza). Se convirtieron en hipotiroideas mediante una única inyección de [¹³¹I]Na (100 $\mu\text{Ci}/\text{rata}$) y antes y a lo largo del experimento se añadió un 0,02% de 2-mercapto-1-metilimidazol (MMI) al agua de beber. Con el fin de tener un grupo de control eutiroideo de peso similar y edad idéntica, 10 ratas recibieron solamente el MMI en el agua de beber y 2 semanas antes de implantar la minibombas se retiró el MMI. Se implantaron de forma intraperitoneal (i.p.) las minibombas osmóticas (velocidad de secreción de 0,25 $\mu\text{l}/\text{hora}$, duración 14 días) 2 meses después de la inyección de [¹³¹I]Na. Se llenaron las minibombas con T₄ o Tetrac disuelto en NaOH 0,05N, BSA al 2% y 100.000 cpm de [¹²⁵I]T₄ ó [¹²⁵I]Tetrac como control de sus velocidades de secreción. La infusión duró 13 días. Se infundieron 0; 1,5; 4,5; 13,5 y 40,5 nmol de Tetrac/día/100 g de peso corporal ó 0,5; 1,5; 4,5 y 13,5 nmol de T₄/día/100 g de peso corporal (BW) (n = 4/dosis). Se incluyó un grupo de control eutiroideo. Se pesaron los animales cada 2 días. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y se recogió y almacenó la sangre -20°C hasta su utilización. Se retiraron rápidamente los tejidos (hígado, corazón, tejido adiposo marrón, córtex cerebral y pituitaria), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

ES 2 265 939 T3

Ensayos de hormonas. Se midieron los niveles totales de T4, T3, Tetrac, Triac y TSH en el suero (coeficiente de variación intraensayo del 7 al 10%, coeficiente de variación interensayo del 12 al 15%) mediante el método de Burger, A., Sakoloff, C., Staeheli, V., Vallotton, M.D. e Ingbar, S.H., Acta. Endocrinol. (Copenh.) 80:58-69 (1975). Las medidas de TSH en suero se realizaron con los reactivos amablemente suministrados por el National Pituitary Program, NIAMDD, NIH (Bethesda, USA). Los límites de detección fueron de 0,80 ng de TSH/ml; 9,5 pmol de T4/ml; 0,16 pmol de T3/ml; 10 pmol de Tetrac/ml y 0,52 pmol de Triac/ml.

Actividad de las monodeyodinasas de tipo I y II. Se determinaron las actividades de las monodeyodinasas de tipo I y de tipo II en homogenados tisulares midiendo la liberación de radioioduro de [¹²⁵I]rT3 de acuerdo con el método de Leonard y Rosenberg (Leonard, J.L. y col., Endocrinology (1980), 106:444-451).

Se midió la actividad de la monodeyodinasa de tipo I en homogenados de hígado utilizando rT3 1 μ M y DTT 1 mM con 10 min de incubación, para el corazón, rT3 0,01 μ M y DTT 10 mM con 1 hora de incubación. Se midió la actividad de la monodeyodinasa de tipo II en tejido adiposo marrón (BAT) y en el córtex cerebral utilizando rT3 1 nM, DTT 10 mM y propiltiouracilo 1 mM (PTU) con 1 hora de incubación. Se midieron las concentraciones de proteína por el método Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) con gammaglobulina bovina como proteína estándar. Para estudiar el efecto del Tetrac circulante sobre la actividad de las enzimas, a 2 ratas se les inyectó vía intraperitoneal 10 μ Ci de ¹²⁵I-Tetrac y se sacrificaron 6 horas más tarde. Se extrajeron los homogenados tisulares con 3 volúmenes de etanol-NH₃ (97:3). Después de 10 minutos de centrifugación a 15.000g, se secó a vacío el sobrenadante y se aplicó al TLC (Merck 254, tolueno, ácido acético, agua: 2:2:1). Para calcular las concentraciones tisulares se utilizaron los máximos niveles de Tetrac en suero (406 pmol/ml). Las concentraciones tisulares calculadas fueron: hígado: 1,9; corazón: 2,29 y córtex cerebral: 0,47 fmol de Tetrac/ μ g de proteína.

Extracción de ARN total e hibridización tipo Northern Blot. Se extrajo el ARN total con el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski, P y Sacchi, N. Anal. Biochem. (1987) 162:156-159). La sonda para la monodeyodinasa de tipo I fue amablemente suministrada por el Dr. P.R. Larsen (Harvard Medical School, Boston, USA); para la monodeyodinasa de tipo II, por el Dr. DL St. Gernain, Lebanon, NH, la sonda de hormonas del crecimiento en ratas (rGH) por el Dr. F. DeNoto (University of California, San Francisco, USA); y la sonda para Ca²⁺-ATPasa (SERCA2) del retículo sarcoplásmico cardiaco de ratas por el Dr. W.H. Dillmann y el Dr. R. Sayen (Medical Center of University of California, San Diego, USA). Las sondas para la cadena pesada de α - y β -miosina (α -MHC y β -MHC) fueron sintetizadas por Microsynth (Microsynth GmbH, Balgach, Suiza). Las sondas fueron marcadas con γ [³²P]dCTP mediante un kit cebador aleatorio de oligonucleótidos (¹⁷QuickPrime™ Kit, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) a una actividad específica de 1 x 10⁹ cpm/ μ g de ADN, excepto para α - y β -MHC, utilizando polinucleótido-quinasa T4 con γ [³²P]dATP. La hibridización se llevó a cabo a 42°C.

La cantidad de ARNm marcado se cuantificó por densitometría de barrido láser (Phosphorimager, Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA). Las variaciones en la carga de ARN y en la transferencia de membrana se corrigieron por cuantificación densitométrica de una fotografía negativa de las bandas ribosomales de ARN 28S y 18S a partir de geles de ARN coloreados con bromuro de etidio. Se rehicieron geles con más del 10% de variación.

Los valores finales se obtuvieron utilizando los grupos tratados con 0,5 y 1,5 nmol de T4/día/100 g de peso corporal (según el tejido) como control y expresados en unidades arbitrarias. Cada membrana contenía una muestra de 0,5 y/o 1,5 nmol de T4/día/100 g de peso corporal. Para los niveles de ARN de la monodeyodinasa de tipo II pituitaria se utilizó como estándar interno el valor densitométrico de la dosis más alta de T4.

Métodos estadísticos. Se utilizó un Análisis de Varianza de Bifactorial (ANOVA) para estimar las diferencias entre los dos grupos de tratamiento, en base a las dosis crecientes de hormonas (4 niveles) y a la interacción entre el tratamiento y los niveles de dosis (SAS General Linear Models Program). Se consideraron los niveles de dosis a una proporción molar 1:3 para 1, 3, 9 y 27 veces la dosis más baja. Se realizó un análisis de covarianza de un factor con Ln (TSH) como covariable utilizando el software BMDP (1V), que incluye también una prueba para las pendientes paralelas de regresión. Cuando los dos grupos de tratamiento compartían una pendiente común, se calcularon los valores ajustados del Corazón para cada grupo de tratamiento a la concentración global media de Ln (TSH). La mayoría de las variables se transformó logarítmicamente para mejorar la linealidad de estos análisis. Se consideró la significación p < 0,05.

Resultados

Las ratas tratadas con Tetrac y T4 aumentaron de peso durante los 13 días de tratamiento (véase la Tabla 1). Con dosis más altas de Tetrac y T4 el aumento de peso final fue inferior al de los demás grupos. Para ambos tratamientos, el incremento del peso del hígado fue paralelo al incremento del peso corporal. Sin embargo, el peso del corazón aumentó más rápidamente que el peso corporal con velocidades de infusión de T4 crecientes mientras que el Tetrac era menos eficaz (p < 0,01).

ES 2 265 939 T3

TABLA 1

Ratas hipotiroideas tratadas durante 2 semanas con infusión continua de Tetrac o de T4 (minibombas Alzet). Se muestran los resultados del peso del corazón y del peso corporal total (BW)

5

| | nmol/día/100 g de BW | Corazón (g) | Corazón/BW (%) |
|--------------------|----------------------|-------------|----------------|
| Infusión de Tetrac | 1,5 (0) | 0,76±0,02 | 0,31±0,01 |
| | 4,5 (3x) | 0,83±0,04 | 0,33±0,02 |
| | 13,5 (9x) | 0,94±0,03 | 0,36±0,01 |
| | 40,5 (27x) | 0,98±0,06 | 0,39±0,02 |
| Infusión de T4 | 0,5 (0) | 0,86±0,06 | 0,35±0,02 |
| | 1,5 (3x) | 0,90±0,04 | 0,34±0,01 |
| | 4,5 (9x) | 1,19±0,03 | 0,45±0,02 |
| | 13,5 (27x) | 1,32±0,11 | 0,54±0,02 |
| Eurtiroides (WM) | | 1,04±0,05 | 0,38±0,01 |
| Hipotiroides | | 0,61±0,03 | 0,27±0,01 |

10

15

20

25

promedio ± SEM

30

Los niveles de Tetrac en suero eran altos pero los niveles de Triac en suero permanecieron bajos. La proporción de Triac en suero con respecto al Tetrac era más baja que la proporción de T3 con respecto a T4 (véase la Tabla 2). A pesar de estos altos niveles de Tetrac en suero, la contaminación de los homogenados con Tetrac no fue suficiente como para afectar al ensayo con enzimas. En los homogenados de córtex cerebral, la concentración era inferior a 1 fmol/μg de proteína. La adición de Tetrac a un ensayo de monodeyodinas de tipo II utilizando la proteína microsómica procedente del córtex cerebral mostró, con 1 fmol de Tetrac/μg de proteína, un 90,5% de actividad total. Se obtuvieron resultados similares mediante la adición de T4 ó rT3.

35

TABLA 2

Valores de TSH, T4, T3, Triac y Tetrac en suero

40

| | nmol/día/100 g de BW | Valores en suero | | | | |
|--------------------|----------------------|------------------|--------------|--------------|-----------------|------------------|
| | | TSH (ng/ml) | T3 (pmol/ml) | T4 (pmol/ml) | Triac (pmol/ml) | Tetrac (pmol/ml) |
| Infusión de Tetrac | 1,5 (0) | 90,3±8,6* | | | 1,1±0,3 | 168±16 |
| | 4,5 (3x) | 4,6±0,5 | | | 1,1±0,2 | 332±19 |
| | 13,5 (9x) | 1,2±0,3 | | | 2,4±0,5 | 458±27 |
| | 40,5 (27x) | <0,8 | | | 6,3±1,7 | 406±57 |
| Infusión de T4 | 0,5 (0) | 110,2±10,8 | 0,7±2,8 | 43,1±2,8 | | |
| | 1,5 (3x) | 11,8±3,0 | 1,2±0,1 | 77,1±9,4 | | |
| | 4,5 (9x) | 1,0±0,2 | 3,4±0,2 | 129,7±9,5 | | |
| | 13,5 (27x) | <0,8 | 24,0±0,7 | 353,4±31,7 | | |
| Eutiroides (WM) | | 7,9±1,1 | 2,1±0,2 | 81,9±6,1 | | |
| Hipotiroides | | 76,7±6,4 | 0,2±0,0 | | | |

45

50

55

60

65

Promedio± SEM; los valores de TSH en suero fueron significativamente más bajos en las ratas tratadas con Tetrac en comparación con las ratas tratadas con T4 a la misma proporción molar de velocidad de infusión

ES 2 265 939 T3

Se utilizaron infusiones a una proporción molar de T4 con respecto a Tetrac de 1 a 3. Por esta razón, en el análisis de los cálculos de varianza (ANOVA), se utilizaron proporciones molares. En la Fig. 2a y b se muestran los efectos de las 2 hormonas sobre los dos parámetros cardiacos, la actividad de la monodeyodinasas de tipo I y los niveles de ARNm SERCA 2a. La inspección de las dos Figuras demuestra la escasa respuesta al aumento de la dosis de Tetrac en comparación con T4 ($p < 0,001$). En ANOVA, una interacción significativa entre los dos tratamientos con hormonas ($p = 0,003$ para la monodeyodinasas de tipo I del corazón, $p \leq 0,001$ para SERCA 2a) verifica esta diferencia en la respuesta. Para α - y β -MHC no hubo interacción con la dosis y el tratamiento (Fig. 3).

Las respuestas de la actividad de la monodeyodinasas de tipo I y los niveles de ARNm SERCA 2a contrastan con las respuestas de la actividad hepática de la monodeyodinasas de tipo I y ARNm, mostradas en la Fig. 4. Aquí las respuestas de los tejidos al aumento de la dosis de las dos hormonas fueron paralelas, y para la monodeyodinasas de tipo I hepática, las concentraciones fueron significativamente más altas para las ratas tratadas con T4 a todos los niveles de dosis ($p = 0,001$ y para el ARNm del hígado $p = 0,053$). No hubo diferencia en el tratamiento para la respuesta del ARNm de la hormona del crecimiento (GH) (Fig. 5a). Sin embargo, la inhibición de los niveles de ARNm de la monodeyodinasas de tipo II fue claramente menos eficaz con Tetrac que con T4, $p = 0,001$ (Fig. 5b).

En las Figs. 6a y b se ilustra la respuesta de la actividad de la monodeyodinasas de tipo II. En el córtex cerebral, el efecto del Tetrac es claramente inferior al de T4 ($p = 0,001$) y en el tejido adiposo marrón también aparece una diferencia ($p < 0,001$), pero menos notable. Hubo una interacción significativa entre el tratamiento y las dosis variables $p = 0,001$ para el cerebro y $p < 0,01$ para BAT. Se descubrió que las concentraciones de TSH en suero eran más altas en las ratas tratadas con T4 en comparación con las ratas tratadas con Tetrac (promedio de 31 contra 24 ng/ml, $p \leq 0,04$). Por tanto, los datos fueron sometidos a un análisis de covarianza con el logaritmo natural de TSH (Ln(TSH)) como covariable. Para estas variables en las cuales los dos grupos de tratamiento tenían una pendiente similar de respuesta en comparación con sus concentraciones de Ln(TSH), se pudieron calcular los promedios ajustados de los grupos a la concentración global del grupo Ln(TSH). La Fig. 7 demuestra el gráfico de Ln(TSH) contra Ln(actividad hepática de la monodeyodinasas de tipo I). Se resumen los resultados en la Tabla 3. Éstos indican que a una concentración igual de TSH en suero, la actividad hepática de la monodeyodinasas de tipo I y los niveles de ARNm están menos estimulados en las ratas tratadas con Tetrac (el 59 y 49% del valor en las ratas tratadas con T4). El Tetrac era también menos activo que la T4 en la reducción de la actividad excesiva de la monodeyodinasas de tipo 2 característica del córtex hipotiroideo y de los tejidos adiposos marrones. En la Tabla 3 se expresan los resultados en términos de actividad remanente y, en consecuencia, la actividad de la enzima era más alta con el inhibidor más pobre.

TABLA 3

Nivel de la actividad hepática de las monodeyodinasas de tipo I y II y niveles de ARNm de la monodeyodinasas hepática de tipo I, MHC y hormona del crecimiento (GH) en ratas infundidas con Tetrac y T4

| Medida | Órgano | N | Promedios Ajustados* | | T4/Tetrac ** | Tetrac/T4 | Valor p |
|---|-----------------|----|-----------------------------|-------------------------|-----------------|-----------|------------|
| | | | Ratas infundidas con Tetrac | Ratas infundidas con T4 | | | |
| Actividad residual de la monodeyodinasas de tipo I | Hígado | 62 | 106 | 108 | | 59% | <0,001 |
| ARNm de la monodeyodinasas de tipo I residual | Hígado | 27 | 2,48 | 5,1 | | 49% | <0,03 |
| Actividad residual de la monodeyodinasas de tipo II | Córtex cerebral | 61 | 27,7 | 5,02 | 18% | | <0,001 |
| Actividad residual de la monodeyodinasas de tipo II | BAT | 61 | 28 | 11,8 | 42% | | <0,001 |

ES 2 265 939 T3

TABLA 3 (continuación)

| Medida | Órgano | N | Promedios Ajustados* | | T4/Tetrac ** | Tetrac/T4 | Valor p |
|--------------------|------------|----|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------|-----------|------------|
| | | | Ratas infundidas con Tetrac | Ratas infundidas con T4 | | | |
| ARNm α -MHC | Corazón | 20 | 5,3 | 1,13 | 21% | | <0,001 |
| ARNm β -MHC | Corazón | 24 | 328 | 495 | | 66% | 0,19 |
| ARNm GH | Pituitaria | 30 | 20.280 | 28.644 | | 71% | 0,07 |

Se estimaron los promedios ajustados de los grupos para cada variable mediante análisis de covarianza a la concentración media de Ln(TSH). Para SERCA 2a y la monodeyodinasa cardiaca de tipo I las pendientes entre el tratamiento con T4 y Tetrac eran diferentes y, por tanto, no se pudo estimar la potencia media. Los niveles de ARNm se expresan en unidades arbitrarias (Phosphorimager).

*: para cada medida en ratas tratadas con T4 y Tetrac.

** : Actividad de T4 en % de Tetrac; Actividad de Tetrac en % de T4

GH: Hormona del Crecimiento

BAT: Tejido Adiposo Marrón

Ejemplo 3

Evaluación de la toxicidad del Tetrac en monos Cynomologus

Preparación del Tetrac para inyección. Se compararon el Tetrac procedente de Rhône Poulenc y de Henning Laboratory. Se disolvió el polvo de Tetrac en NaOH 0,1N estéril a 2 mg/ml. Se elaboró esta solución antes de empezar cada período de tratamiento y se almacenó a 4°C en tubos de polipropileno protegidos contra la luz. Se preparó cada solución para inyección diariamente después de la dilución en el vehículo (0,9% de NaCl) que contenía un 5% de suero de mono (v/v), se almacenó a temperatura ambiente y se protegió contra la luz de acuerdo con las condiciones de almacenamiento de la sustancia de prueba.

Animales. Un macho y una hembra de mono Cynomologus *Macaca fascicularis* criados para este propósito fueron suministrados por el Centre de Recherches Primatologiques, Port Louis, Mauricio. Los animales tenían aproximadamente seis años y un peso corporal de 5,8 kg para el macho y 6,2 kg para la hembra. Los animales fueron alojados por separado en jaulas de acero inoxidable y se colocó una bandeja metálica debajo de cada jaula para recoger la orina. Los animales se alimentaron diariamente con aproximadamente 200 gramos para cada uno de una alimentación U.A.R. 107 C en bolas (lotes n°. 61106, 61207 y 70317, U.A.R., Villemoisson-sur-Orge, Francia), distribuida aproximadamente 2 horas después del tratamiento con Tetrac. No se conocía ningún contaminante presente en la alimentación, el agua de beber o el material de cama a niveles que se supone pudieran haber interferido o perjudicado el resultado del estudio.

Tratamiento con Tetrac. Los detalles del tratamiento y el nivel de dosis se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Dieta de tratamiento para monos Cynomologus (1 macho y 1 hembra) durante un período de 12 semanas

| Semanas de tratamiento | Suministrador de TETRAC | Animal | Nivel de dosis (μ g/kg/día) |
|------------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------------|
| 1 a 3 | Rhône-Poulenc Henning | macho hembra | 75 |
| 4 a 6 | --- | macho hembra | --- |
| 7 a 9 | Henning Rhône-Poulenc | macho hembra | 75 |
| 10 a 12 | --- | macho hembra | --- |

ES 2 265 939 T3

Semanas 1 a 3 y semanas 7 a 9: los animales recibieron la sustancia de prueba TETRAC proporcionada por Rhône-Poulenc o por Henning Laboratories durante un período de tres semanas.

Semanas 4 a 6 y semanas 10 a 12: se mantuvo un período de reposo de tres semanas.

Administración de Tetrac. Se administró el Tetrac vía inyección intramuscular en el músculo del muslo una vez al día, aproximadamente a la misma hora cada día, varios días a la semana durante un período de tres semanas. La cantidad de Tetrac administrado a cada animal se ajustó según el peso corporal registrado más recientemente. Se utilizó un volumen de dosificación constante de 0,5 ml/kg.

Reconocimientos clínicos de los monos

Morbilidad y mortalidad. Los animales fueron controlados al menos dos veces al día en busca de mortalidad y signos de morbilidad.

Signos clínicos. Los animales fueron observados al menos una vez al día, aproximadamente a la misma hora cada día.

Peso corporal. Se registró el peso corporal de cada animal una vez antes del inicio del período de tratamiento, el primer día del período de tratamiento, y al menos una vez por semana hasta el final del estudio.

Consumo de alimentos. Se estimó el consumo de alimentos de cada animal mediante el cálculo de la diferencia entre la cantidad dada y la que quedaba a la mañana siguiente. Esto se evaluó diariamente durante la semana antes del tratamiento y a lo largo del estudio. El consumo de alimentos se expresó como porcentaje de la cantidad dada. Cada vez que se requería rapidez, se quitaba la comida al final del día y se realizaba la estimación del consumo en este momento, estando disponible la comida durante aproximadamente cinco horas aquel día.

Resultados

Mortalidad. No se produjo ninguna muerte durante el estudio.

Signos clínicos. No se observaron signos clínicos durante el tratamiento de los períodos de descanso.

Peso corporal. Los aumentos de peso corporal registrados durante el tratamiento o períodos de reposo se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5

Aumento del peso corporal de los monos Cynomologus durante el tratamiento de 12 semanas con Tetrac

| | Peso Corporal | |
|------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | Tetrac de Rhône-Poulenc | Tetrac de Henning Laboratory |
| Macho | | |
| período de tratamiento | +100 g (+2%) | +200 g (+3%) |
| período de descanso | +100 g (+2%) | 0 |
| Hembra | | |
| período de tratamiento | +300 g (+8%) | +300 g (+9%) |
| período de descanso | 0 | +100 g (+3%) |

Se registró un aumento ligeramente más alto del peso corporal en la hembra durante los dos períodos de tratamiento cuando se comparan con los períodos de descanso sin diferencias relevantes entre los dos suministradores de Tetrac. No se observaron diferencias relevantes en el macho entre los períodos de tratamiento y de descanso.

Consumo de alimentos. El consumo estimado de alimentos fue del 75% o del 100%, expresado en días de observación/número de días en el período en cuestión, tal como se muestra en la Tabla 6.

ES 2 265 939 T3

TABLA 6

Consumo de alimentos para los monos Cynomologus durante el período de tratamiento de 12 semanas con Tetrac

| | Consumo de Alimentos | | | |
|------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------|------------|
| | Tetrac de Rhône-Poulenc | | Tetrac de Henning Laboratory | |
| Macho | | | | |
| pretratamiento | 100%: 7/7 | | --- | |
| período de tratamiento | 100%: 20/21 | 75%: 1/21 | 100%: 21/21 | |
| período de descanso | 100%: 21/21 | | 100%: 21/21 | |
| Hembra | | | | |
| pretratamiento | --- | | 100%: 6/7 | 75%: 1/7 |
| período de tratamiento | 100%: 14/21 | 75%: 7/21 | 100%: 8/21 | 75%: 13/21 |
| período de descanso | 100%: 16/21 | 75%: 5/21 | 100%: 18/21 | 75%: 3/21 |

Se registró una tendencia a un consumo de alimentos ligeramente más bajo por la hembra durante el período de tratamiento con el Tetrac proporcionado por Henning Laboratory. En el macho, el consumo de alimentos no se vio afectado por el tratamiento.

Ejemplo 4

Supresión de la TSH por Tetrac en comparación con la T4 en seres humanos

Se le retiró a un paciente que recibía 200 $\mu\text{g}/\text{día}$ de la dosis de T4 el tratamiento de T4 y fue tratado con Tetrac durante 21 días con una dosis de 2.100 $\mu\text{g}/\text{día}$. Se pueden ver los resultados en la Fig. 8. La TSH pasó rápidamente de 151,0 mU/l a 6,3 mU/l durante los 21 días de tratamiento. La concentración circulante describe el porcentaje de supresión de TSH de los niveles notablemente elevados después de retirar la T4. Esto se compara con 6 pacientes tratados convencionalmente con 200 μg de T4/día después del inicio de la retirada de T4.

La invención se ha descrito detalladamente con referencia a las realizaciones preferentes de la misma. Sin embargo, se valorará que los especialistas en la técnica, al considerar este descubrimiento, puedan hacer modificaciones y mejoras dentro del espíritu y alcance de la invención tal como se establece en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de Tetrac para la preparación de una composición farmacéutica que comprende Tetrac, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, mezclada con un soporte farmacéuticamente aceptable, para suprimir la secreción de TSH al mismo tiempo que se reduce o evita la estimulación tiromimética de los tejidos periféricos inducida por una dosis de L-tiroxina que produce un efecto supresivo de TSH equivalente, para el tratamiento de cualquiera de las siguientes condiciones:

- 10 - tumores u otro crecimiento anormal en la glándula tiroidea;
- supresión del crecimiento del tejido tiroideo residual en un paciente después de tiroidectomía.

15 2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque se suprime la secreción de TSH al mismo tiempo que se reduce o evita la estimulación tiromimética de los tejidos del corazón, hígado, riñones, músculo o hueso.

3. Utilización según la reivindicación 1 para el tratamiento a largo plazo de pacientes con tumores o crecimientos anormales en la glándula tiroidea.

20 4. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque la composición farmacéutica comprende además un compuesto tiromimético adicional como T4 (L-tiroxina), T3 (3,3',5-triiodotironina) y Triac (ácido 3,3',5-triiodoti-roacético).

25 5. Utilización según la reivindicación 4, **caracterizada** porque el compuesto tiromimético adicional es L-tiroxina.

30

35

40

45

50

55

60

65

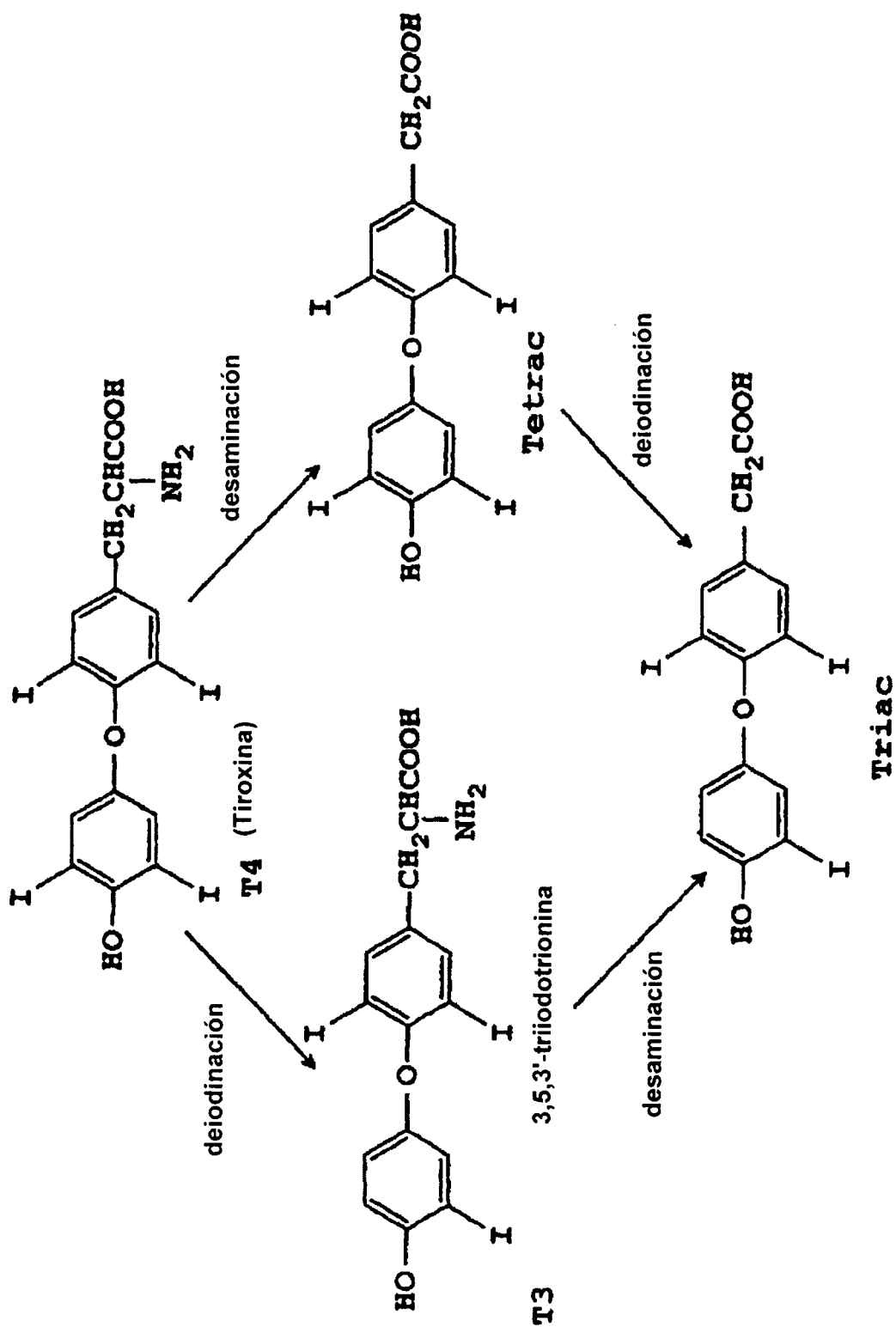


FIG. 1

ACTIVIDAD CARDIACA D1

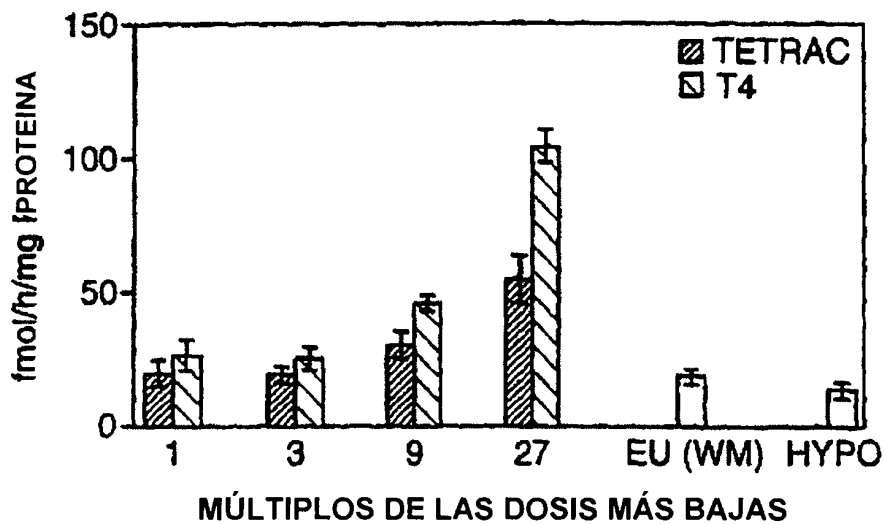


FIG. 2a

SERCA 2a mRNA

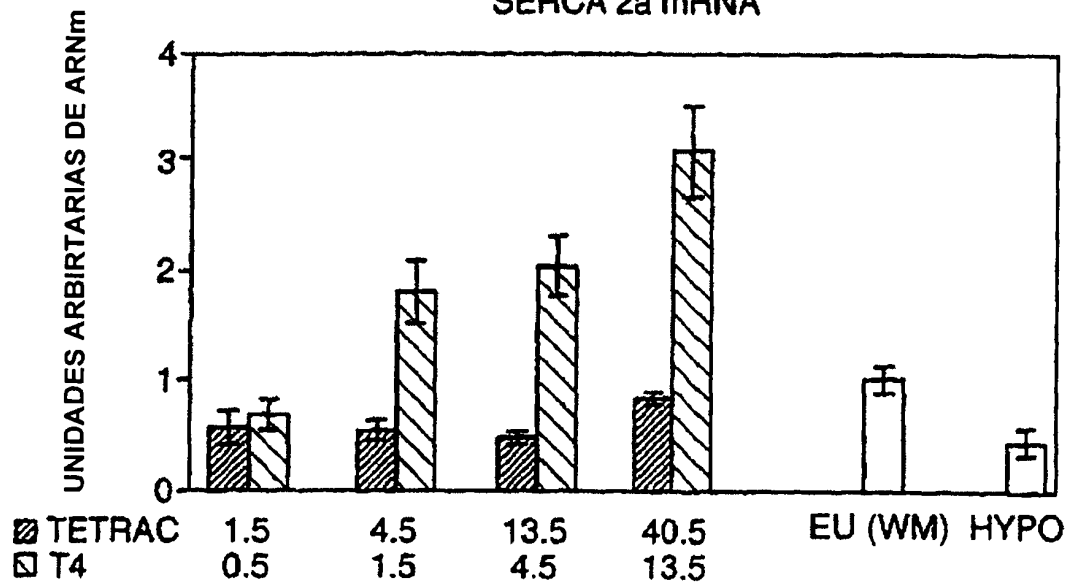


FIG. 2b

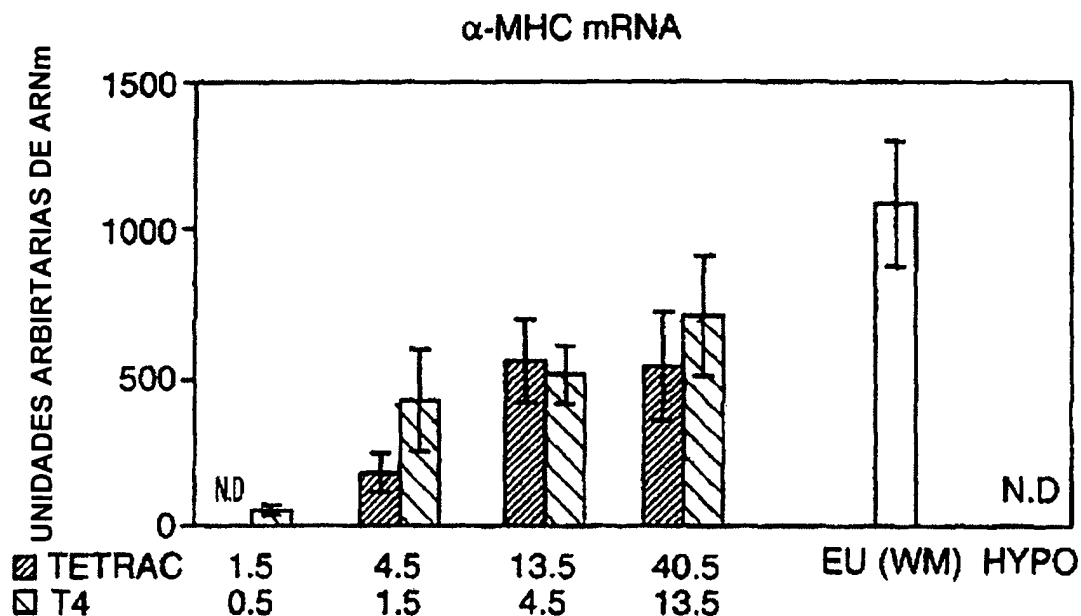


FIG. 3a

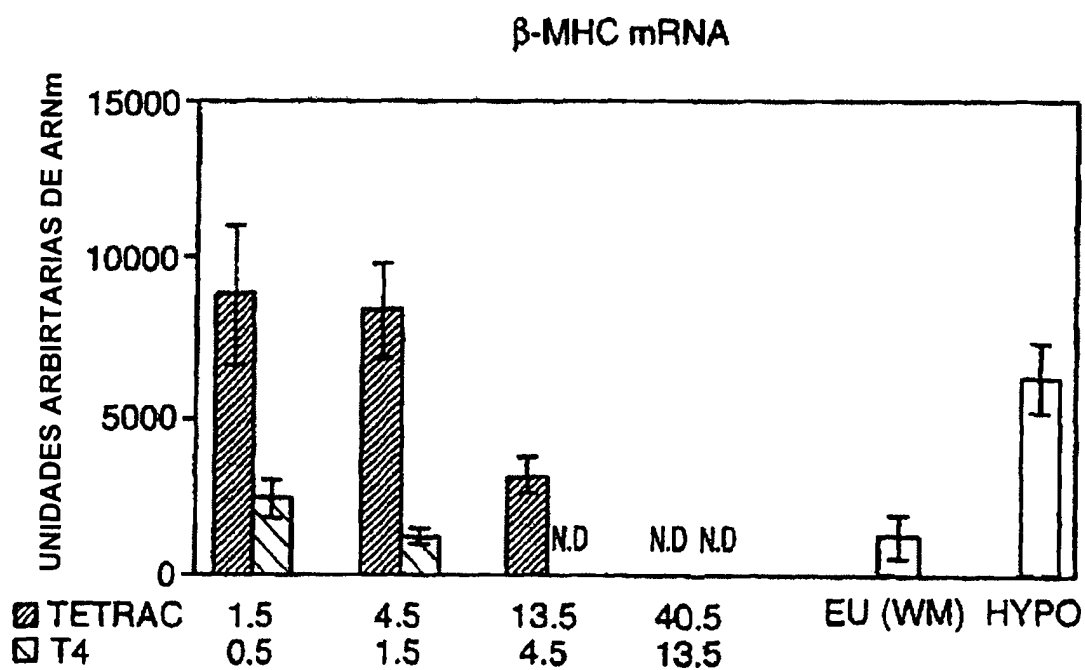


FIG. 3b

ACTIVIDAD HEPÁTICA D1

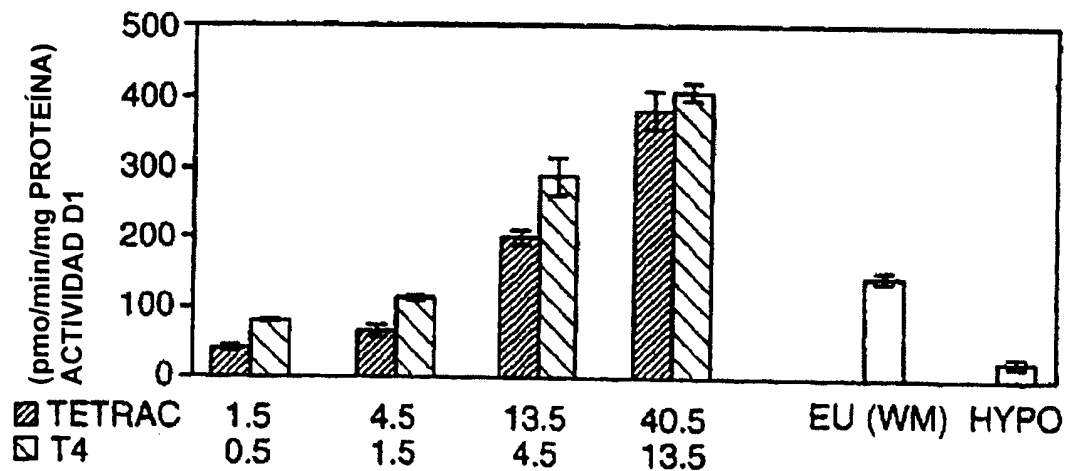


FIG. 4a

ARNm HEPÁTICO D1

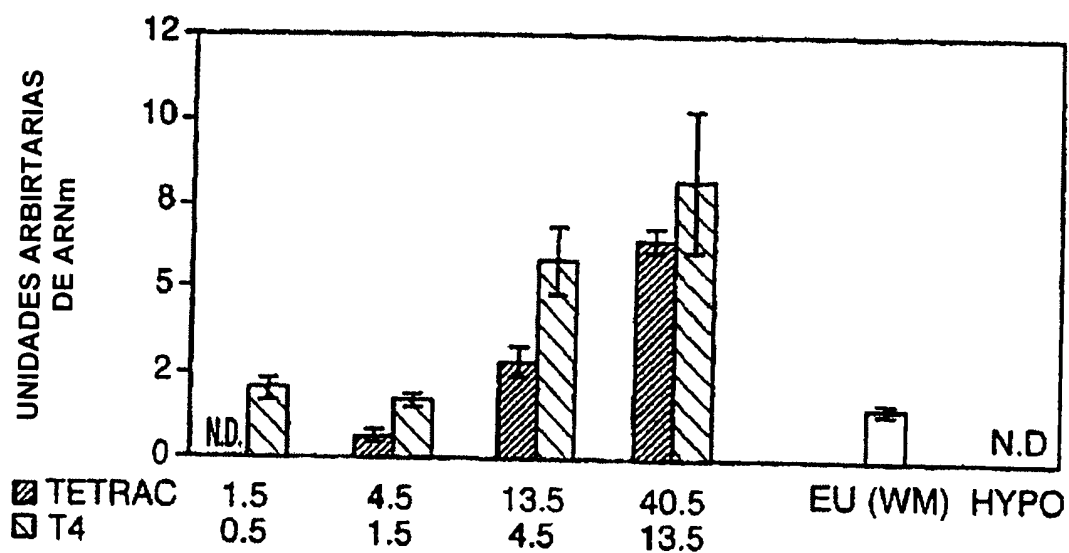


FIG. 4b

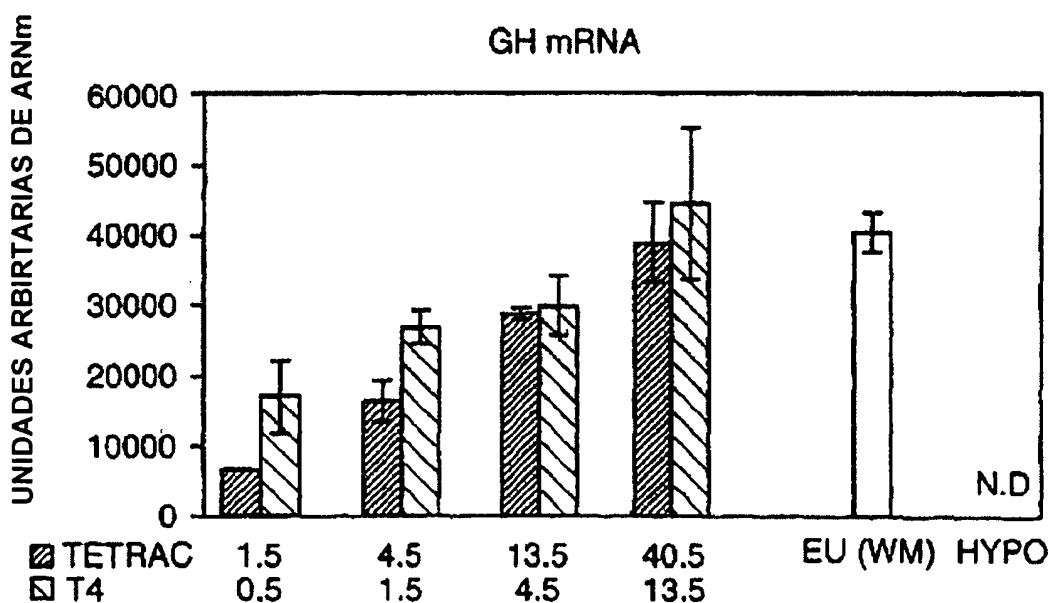


FIG. 5a

- ▨ NIVEL DE ARNm RELATIVO PARA TRATAMIENTO CON T4
- ▩ NIVEL DE ARNm RELATIVO PARA TRATAMIENTO CON TETRAC
- NIVEL DE ARNm RELATIVO EN RATAS HIPOTIROIDEAS

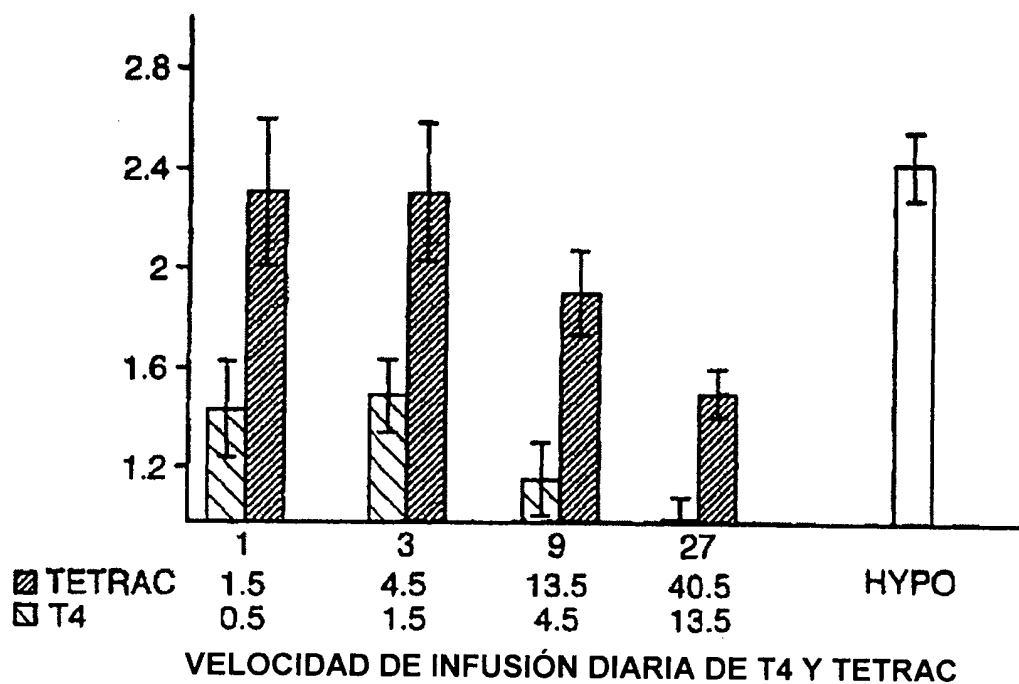


FIG. 5b

ACTIVIDAD EN EL CÓRTEX CEREBRAL D2

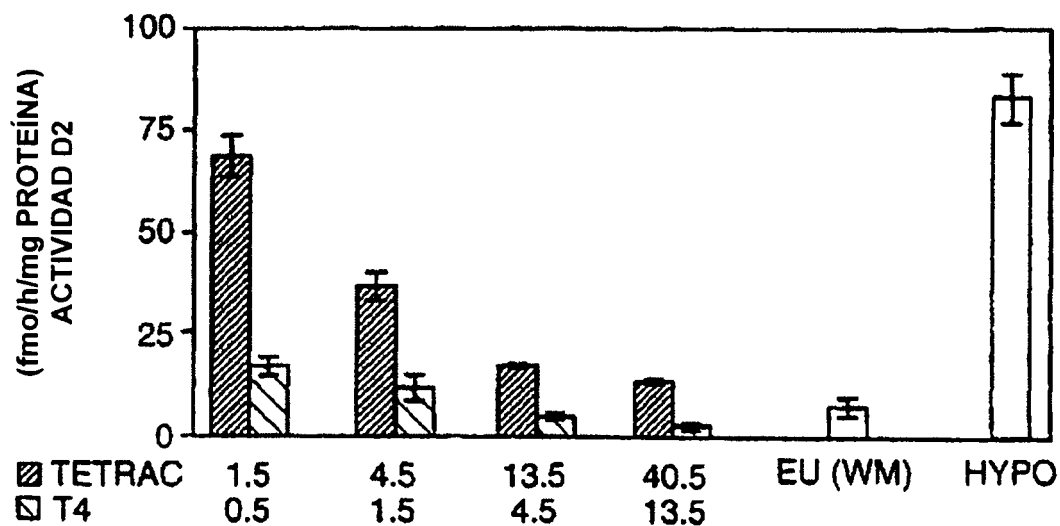


FIG. 6a

ACTIVIDAD EN BAT D2

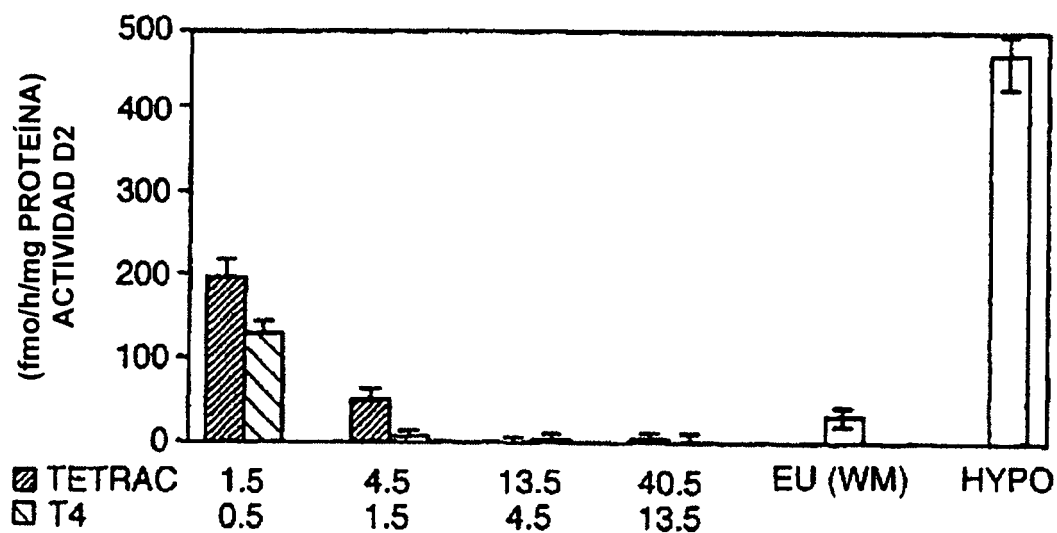


FIG. 6b

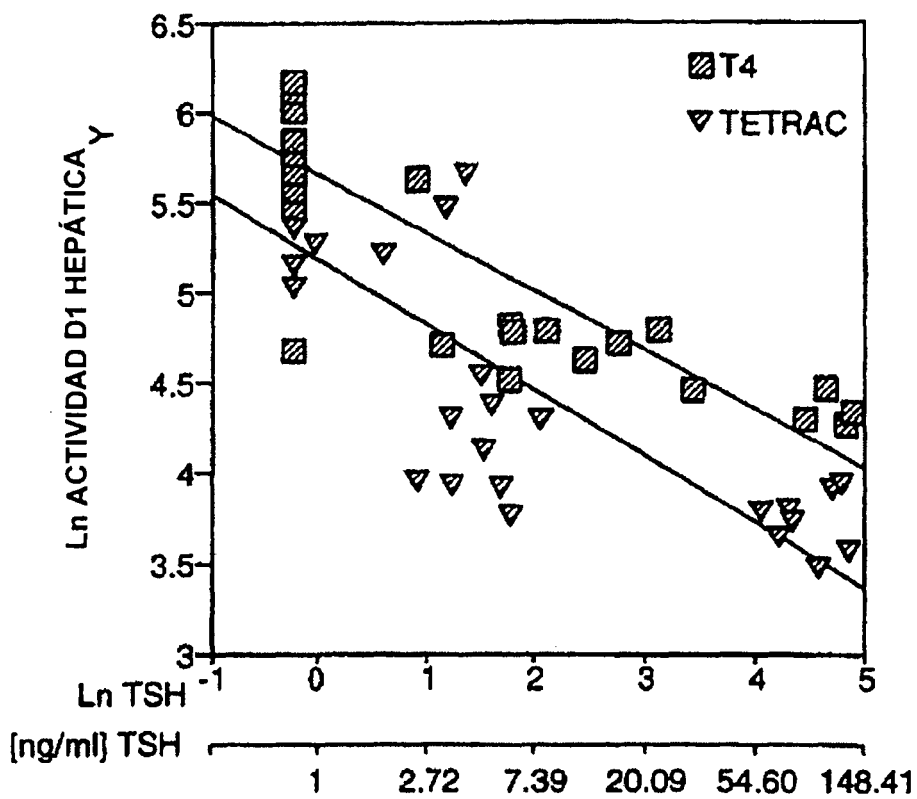


FIG. 7

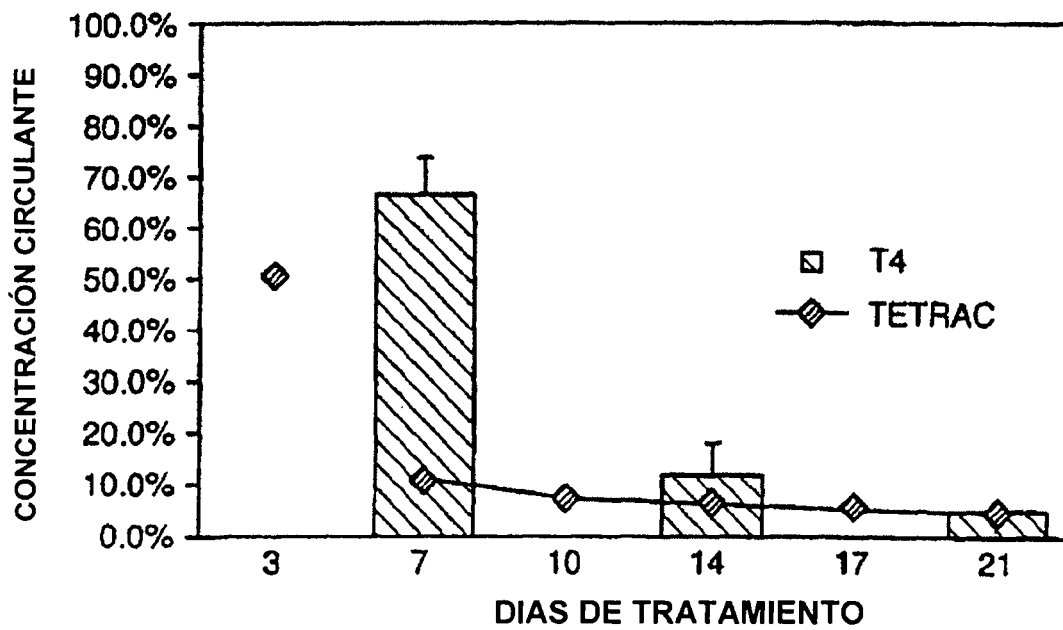


FIG. 8