

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 228**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02787885 .9**
96 Fecha de presentación: **30.11.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1454142**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2004**

54 Título: **Inhibición de la tristetrapolina para proteger el corazón de lesiones cardíacas**

30 Prioridad:
12.12.2001 EP 01129564

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.04.2012

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**KLUXEN, Franz-Werner;
HENTSCH, Bernd;
EHRING, Thomas;
BRÄNDLE, Marian;
HOHEISEL, Jörg, Dietrich;
FROHME, Marcus y
ZUBAKOV, Dimitri**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

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).

ES 2 378 228 T3

DESCRIPCIÓN

Inhibición de la tristetraprolina para proteger el corazón de lesiones cardíacas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a compuestos adecuados para el tratamiento de afecciones que pueden mejorar, al menos en parte, aumentando la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF α). La invención además se refiere a ensayos para la identificación de un individuo en mayor riesgo o que sufre tales afecciones y a los métodos de detección de compuestos por su capacidad para estimular la biosíntesis de TNF α .

Antecedentes de la invención

- 10 El TNF α es una potente citoquina secretada por muchos tipos de células. El TNF α también se encuentra sobre las células en una forma de mayor peso molecular unida a la membrana celular y parece que esta forma también media en diversos efectos biológicos. Se piensa que el TNF α tiene una escasa función en el desarrollo y la fisiología normales; sin embargo, ejerce efectos nocivos y destructivos sobre muchos tejidos en muchos estados patológicos (Tracey y col., Ann. Rev. Med. 1994; 45:491). Entre los estados patológicos en los que se ha demostrado que el TNF α ejerce un papel importante se incluyen el síndrome de choque séptico, la caquexia cancerosa, la artritis reumatoide, etc.

Por el contrario, los estudios experimentales de varios laboratorios han demostrado que en el corazón de mamíferos adultos se sintetiza ARNm de TNF α después de determinadas formas de estrés (Bader y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91:11831; Giroir y col., J. Clin. Invest. 1992; 90:693; Giroir y col., Am. J. Physiol. 1994; 267:H118).

- 20 La observación repetida de que el TNF α se expresa prácticamente en todas las formas de lesión cardíaca tanto en mamíferos grandes como pequeños, incluyendo, aunque sin limitaciones, infarto de miocardio (Mauri y col., J. Intern. Med. 1989; 225:333; Basaran y col., Angiology. 1993; 44:332), angina inestable (Matsumori y col., Br. Heart J. 1994; 72:566), sobrecarga hemodinámica (Kapadia y col., J. Clin. Invest. 1995; 96:1042), lesión miocárdica por reperfusión (Lefer y col., Science. 1990; 249:61; Herskowitz y col., Am. J. Pathol. 1995; 146:419), cardiomiopatía hipertrófica (Matsumori y col., Br. Heart J. 1994; 72:561) e insuficiencia cardíaca congestiva en fase terminal (Levine y col., N. Engl. J. Med. 1990; 223:236; Torre-Amione y col., Circulation. 1996; 93:704) sugiere que el TNF α puede actuar en el corazón como un «gen innato de respuesta al estrés» filogenéticamente conservado.

- 30 A este respecto, la observación de que el TNF α confiere resistencia al estrés hipóxico en el tejido cardíaco adulto sugiere que la producción de TNF α por parte del tejido cardíaco lesionado y/o estresado puede constituir un mecanismo autocrino/paracrino/yuxtacrino local para proteger a las células vecinas dentro del corazón (Nakano y col., Circulation. 1998; 97:1392).

- 35 Se sabe que periodos breves de oclusión de la arteria coronaria seguidos de reperfusión protegen al corazón de posteriores periodos de afecciones isquémicas que de otro modo serían mortales. Sin embargo, este primer periodo protector concluye en varias horas. Veinticuatro horas después de la isquemia inicial, se produce un «segundo periodo de protección» (SPP) que puede durar varios días, dependiendo de la especie utilizada y de las condiciones experimentales. Además de los periodos de oclusión/reperfusión, se sabe también que varias sustancias como la adenosina y el lipopolisacárido (LPS) inducen un SPP.

- 40 Entre otros, la expresión de iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) se considera un mediador importante del SPP. La iNOS en sí es inducida por el TNF α , que se expresa, por ejemplo, después de la inducción de un SPP por el LPS. La expresión del TNF α parece ser necesaria para el desarrollo del SPP. Por tanto, un nivel elevado de TNF α puede tener un uso terapéutico en afecciones que pueden mejorar, al menos en parte, por el aumento de la producción de TNF α , incluido, aunque sin limitaciones, enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas o para la prevención del daño por reperfusión.

- 45 La presente invención se refiere a una nueva estrategia para el tratamiento de afecciones que pueden mejorar, al menos en parte, aumentando la producción de TNF α . Esta estrategia supone el uso de un ADNc o un ARNc complementario al ARNm de TTP o un anticuerpo anti-TTP que se una específicamente a TTP o fragmentos de dichos anticuerpos.

- 50 La TTP (Lai y col., J. Biol. Chem. 1990; 265:16556), también conocida como Nup475 (DuBois y col., J. Biol. Chem. 1990; 265:19185) y TIS11 (Varnum y col., Oncogene 1989; 4:119; Varnum y col., Mol. Cell. Biol. 1991; 11:1754), es una fosfoproteína de 33 kDa ampliamente distribuida codificada por el gen de respuesta inmediata-temprana Zfp-36 (Taylor y col., Nucl. Acids Res. 1991; 19:3454). Este gen se ha mapeado en el cromosoma 7 del ratón, y el gen

- humano equivalente (ZFP36) se ha mapeado en el cromosoma 19q13.1 (Taylor y col., Nucl. Acids Res. 1991; 19:3454). TTP es el prototipo de un grupo de proteínas que contienen dos o más posibles dedos de cinc altamente conservados de la clase CCCH (Varnum y col., Mol. Cell. Biol. 1991; 11:1754; Taylor y col., Nucleic Acids Res. 1991; 19:3454; Gomperts y col., Oncogene. 1990; 5:1081; Ma y col., Oncogene. 1994; 9:3329). Asimismo, se ha demostrado que la proteína une Zn^{2+} y se ha localizado en el núcleo celular en fibroblastos de ratón (DuBois y col., J. Biol. Chem. 1990; 265:19185), lo que sugiere que puede tratarse de un factor de transcripción. La estimulación con suero u otro mitógeno de fibroblastos quiescentes causa la rápida fosforilación de la serina y la traslocación del núcleo al citosol de la TTP (Taylor y col., J. Biol. Chem. 1995; 270:13341), siendo probable que ambos sucesos modulen su función en las células.
- Recientemente se ha demostrado que TTP interviene en la regulación del $TNF\alpha$ en macrófagos (Carballo y col., Science 1998; 281:2001). Los lipopolisacáridos y el $TNF\alpha$ inducen la expresión de TTP. La TTP se une a un elemento rico en AU (ARE) en el extremo 3' prima de la molécula de ARNm de $TNF\alpha$, desestabilizando así dicho ARNm.
- En el documento WO 97/42820 se han utilizado las propiedades de TTP para el tratamiento de enfermedades asociadas con el exceso de $TNF\alpha$, como el síndrome del choque séptico, caquexia cancerosa, artritis reumatoide, etc. Se describen los métodos de tratamiento de dichas enfermedades aumentando el nivel de TTP, así como los métodos de selección de compuestos por su capacidad para inhibir la producción de $TNF\alpha$ y los métodos para identificar a un individuo que se encuentre en un mayor riesgo de sufrir los efectos del exceso de $TNF\alpha$.
- En el documento WO 01/12213 se proporcionan métodos para regular la destrucción de moléculas de ARNm que contienen un elemento rico en AU (ARE), por ejemplo, métodos para estimular la degradación de una molécula de ARNm que codifica $TNF\alpha$ y métodos para inhibir la degradación de una molécula de ARNm que codifica el factor estimulante de granulocitos y macrófagos para el tratamiento de la granulocitopenia.
- Hasta ahora se desconocía la función de la TTP en un individuo en riesgo o que sufre una afección que puede mejorarse, al menos en parte, aumentando la producción de $TNF\alpha$, que incluye, aunque sin limitaciones, enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas.

Resumen de la invención

- Un objetivo de la presente invención es proporcionar ensayos de cribado para seleccionar compuestos por su capacidad para aumentar la producción de $TNF\alpha$.
- Un objetivo adicional de la presente invención es el uso de un ADNc o un ARNc complementario al ARNm de TTP, en el que dicho ADNc o ARNc se une al ARNm de TTP e inhibe su traducción, o un anticuerpo anti-TTP que se une específicamente a TTP y que inhibe la unión de TTP al ARNm de $TNF\alpha$ o fragmentos de dichos anticuerpos seleccionados entre el grupo compuesto por $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , fragmentos Fv , proteínas $scFv$, fragmentos monovalentes Fab' 3.5S y péptidos de CDR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas seleccionadas entre el grupo compuesto por sobrecarga hemodinámica, lesión por reperfusión miocárdica, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca congestiva en fase terminal, infarto de miocardio y angina inestable, y medicamentos que comprenden estos compuestos.
- Una realización de la presente invención es también proporcionar el uso de los compuestos activos para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un individuo en riesgo o que sufre enfermedades que pueden mejorarse, al menos en parte, aumentando la producción de $TNF\alpha$ que incluyen, aunque sin limitaciones, enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas o para la prevención del daño por reperfusión.

Objetivos y ventajas adicionales de la invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Detección del ARNm de TTP en corazones de perro mediante RT-PCR.

1. Control de 8 h de reperfusión (cirugía simulada)
2. Control de 4 h de reperfusión (cirugía simulada)
3. 16 h de reperfusión (cirugía)
4. 8 h de reperfusión (cirugía)

5. 4 h de perfusión (cirugía)

Se utilizaron los ARN de las fuentes indicadas para el análisis por RT-PCR. Se realizó la transcripción inversa de los ARN empleando métodos convencionales y posteriormente se sometieron a PCR usando oligodesoxinucleótidos cortos como cebadores diseñados a partir de la secuencia original de TTP de perro.

5 Descripción detallada de la invención

Los objetivos de la presente invención se logran en función de los resultados inesperados de que la expresión de la proteína tristetraprolina (TTP) está regulada por incremento de forma dependiente del tiempo en el tejido cardíaco después de la oclusión de la arteria coronaria y tras la perfusión (Fig. 1).

10 Como se indica anteriormente, la producción de $\text{TNF}\alpha$ por parte del tejido cardíaco lesionado y/o estresado puede actuar como mecanismo autocrino/paracrino/yuxtacrino local para proteger a las células vecinas. En consecuencia, la capacidad de TTP para regular la producción de $\text{TNF}\alpha$ en el corazón tiene una importancia farmacéutica considerable.

15 El hallazgo de que TTP se expresa en el corazón después de la oclusión de una arteria coronaria seguida de perfusión y la disponibilidad de la secuencia de aminoácidos de la TTP humana (Taylor y col., Nucl. Acids Res. 1991, 19:3454) y su secuencia codificada (p. ej., secuencia con el número de acceso de GenBank M63625) permiten el desarrollo de ensayos para el cribado de compuestos que pueden utilizarse para la prevención y/o el tratamiento de afecciones que pueden mejorar, al menos en parte, aumentando la producción de $\text{TNF}\alpha$ que incluyen, aunque sin limitaciones, enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas o para la prevención del daño por perfusión, así como métodos para la identificación y el diagnóstico de individuos en mayor riesgo o que padecen dichas afecciones.

La expresión «enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas» se refiere a enfermedades y/o lesiones como sobrecarga hemodinámica, lesión por perfusión miocárdica, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca congestiva en fase terminal y/o una enfermedad isquémica o consecuencia de la misma, como infarto de miocardio o angina inestable.

25 En un ejemplo de ensayo de cribado según la invención, se insertó el ADNc de la TTP humana de longitud completa en un vector de expresión eucariota adecuado (bajo el control de un promotor potente como SV40, CMV o un promotor inducible (p. ej., sistema tet on/off)) portando un marcador de selección como neomicina, zeozina, higromicina u otras sustancias para la selección de células recombinantes. Este vector de expresión se transfecta por medio de métodos convencionales dentro de una línea celular como H9C2, COS-1, COS-7, HEK293, HEK293 EBNA, CHO, BHK HeLa o líneas celulares similares para la expresión de los ADNc y se selecciona en una línea celular estable añadiendo el antibiótico. De esta forma se selecciona una línea celular monoclonal o policlonal.

35 Se construye un segundo plásmido usando un promotor como SV40, CMV o similar fusionado al gen de $\text{TNF}\alpha$ o un gen indicador como luciferasa, CAT, β -galactosidasa y una parte de la región 3' no traducida del ARNm de $\text{TNF}\alpha$ que abarca los fragmentos ARE (elementos ricos en AU) que se sabe desestabilizan el ARNm de $\text{TNF}\alpha$ (bases 1.197 a 1.350 de la secuencia con número de acceso de GenBank X02611). Además, el vector lleva un marcador de selección que es diferente del primer vector. La transfección puede efectuarse utilizando técnicas bien conocidas en la materia.

Después de la transfección y la selección del segundo plásmido, la línea celular se puede utilizar para detectar sustancias que interfieren con la actividad de la TTP.

40 Alternativamente, el plásmido portador de TTP y el plásmido portador del gen de $\text{TNF}\alpha$ o el gen indicador se pueden mezclar y ser transfectados posteriormente usando técnicas convencionales en una línea celular como se describe anteriormente.

45 Dicha línea celular se puede usar en un ensayo para el cribado de compuestos por su capacidad para potenciar la producción de $\text{TNF}\alpha$ inhibiendo y/o revirtiendo la unión de TTP al ARNm de $\text{TNF}\alpha$ que comprende, por ejemplo, los siguientes pasos:

a) poner en contacto el compuesto con la línea celular que expresa TTP y $\text{TNF}\alpha$ o, en lugar de $\text{TNF}\alpha$, una parte de la región 3' no traducida del ARNm de $\text{TNF}\alpha$ que abarque los fragmentos ARE que se sabe desestabilizan el ARNm de $\text{TNF}\alpha$ fusionado a un gen indicador y

50 b) determinar el nivel de expresión de $\text{TNF}\alpha$ o de la proteína indicadora y comparar dicho nivel con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto y

c) seleccionar compuestos que potencien la expresión de $\text{TNF}\alpha$ o la expresión de la proteína indicadora en comparación con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto.

5 Se añaden los compuestos en estudio y después de 24 a 72 horas se mide la actividad del gen indicador usando un lector de actividad enzimática o un detector de señal fluorescente, o en el caso en que la línea celular exprese $\text{TNF}\alpha$, con anticuerpos dirigidos contra el $\text{TNF}\alpha$ u otras técnicas bien conocidas en la materia; los valores observados se utilizan para la determinación de la actividad de TTP.

Las sustancias que aumentan la actividad de TTP pueden detectarse por una mayor actividad del gen indicador en comparación con las células control sin tratar.

10 Una sustancia que inhiba y/o revierta la unión de TTP al ARE localizado en el extremo 3' del ARNm del $\text{TNF}\alpha$ o del gen indicador estabilizará el ARNm y tendrá como consecuencia una mayor producción de $\text{TNF}\alpha$ o de proteína indicadora que en ausencia de dicho compuesto.

En otro ejemplo de ensayo de cribado según la invención, el ensayo comprende los siguientes pasos:

15 a) poner en contacto el compuesto que se desea detectar con una muestra sin células que contenga una construcción de expresión capaz de expresar una parte de la región 3' no traducida del ARNm del $\text{TNF}\alpha$ que abarque los fragmentos ARE que se sabe desestabilizan el ARNm del $\text{TNF}\alpha$ fusionado con un gen indicador en presencia de TTP en condiciones tales que la proteína indicadora pueda expresarse y

b) determinar el nivel de expresión de la proteína indicadora y comparar dicho nivel con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto y

20 c) seleccionar compuestos que potencien la expresión de la proteína indicadora en comparación con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto.

En un ejemplo más de ensayo de cribado según la invención, el ensayo comprende los siguientes pasos:

a) poner en contacto dicho compuesto con una muestra sin células que contenga ARNm de $\text{TNF}\alpha$ en presencia de TTP en condiciones tales que se pueda expresar el $\text{TNF}\alpha$ y

25 b) determinar el nivel de expresión de $\text{TNF}\alpha$ y comparar el nivel de $\text{TNF}\alpha$ producido con el obtenido en ausencia de dicho compuesto y

c) seleccionar compuestos que potencien la expresión de la proteína indicadora en comparación con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto.

Posteriormente, se puede analizar más en profundidad la estabilidad, toxicidad, etc. de los compuestos que inhiben y/o revierten la actividad inhibidora de TTP utilizando protocolos convencionales.

30 En un método para identificar y/o diagnosticar individuos con mayor riesgo o que padecen afecciones que pueden mejorar, al menos en parte, aumentando la producción de $\text{TNF}\alpha$, que incluyen, aunque sin limitaciones, enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas o para identificar individuos que necesitan un tratamiento para la prevención del daño por reperfusión, se puede examinar la presencia de cantidades elevadas de TTP o de ARNm de TTP en una muestra biológica obtenida de dichos individuos.

35 Por ejemplo, se puede llevar a cabo la detección de TTP poniendo en contacto la muestra con un anticuerpo anti-TTP y midiendo la cantidad de TTP.

40 Estos ensayos pueden realizarse por medio de uno de los muchos métodos existentes. Entre estos métodos figuran inmunoensayos que incluyen, aunque sin limitaciones, sistemas de ensayos competitivos y no competitivos utilizando técnicas como inmunotransferencias, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmuoadsorción ligado a enzima), inmunoensayos tipo «sándwich», ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos de fluorescencia e inmunoensayos de proteína A, por nombrar algunos.

Por ejemplo, dicho ensayo se puede realizar por medio de un método que comprenda los siguientes pasos:

a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de dicho individuo con anticuerpos anti-TTP en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a TTP

b) medir la cantidad de TTP mediante ELISA o un método como los mencionados anteriormente.

El anticuerpo anti-TTP se puede detectar mediante un anticuerpo secundario que además comprenda un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un isótopo radioactivo que se detecta mediante autorradiografía. Los isótopos que son especialmente útiles para los fines de la presente invención son ³H, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S y ¹⁴C. Los anticuerpos secundarios también pueden marcarse con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia se determina exponiendo el inmunoconjugado a una luz de una longitud de onda apropiada y detectando la fluorescencia resultante. Los compuestos marcados con fluorescencia son fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Alternativamente, el anticuerpo secundario puede marcarse para su detección uniéndolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunoconjugado con una etiqueta quimioluminiscente se determina detectando la presencia de la luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Entre los ejemplos de compuestos con etiqueta quimioluminiscente se encuentran luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De forma similar, se puede utilizar un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo secundario. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de una reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Entre los compuestos bioluminiscentes que son útiles para el marcaje se encuentran la luciferina, la luciferasa y la acuorina.

Alternativamente, el anticuerpo secundario puede marcarse para su detección ligándolo a una enzima. Cuando se incuba un conjugado anticuerpo-enzima en presencia del sustrato apropiado, el grupo enzimático reacciona con el sustrato para producir un grupo químico que se puede detectar, por ejemplo, con medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Entre los ejemplos de enzimas que se pueden utilizar para el marcaje detectable de inmunoconjugados poliespecíficos se encuentran β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la materia conocerán otros marcajes adecuados que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de grupos marcadores a anticuerpos se puede realizar utilizando técnicas convencionales conocidas en la materia. La metodología típica a este respecto se describe en Kennedy y col., Clin. Chim. Acta 1976, 70:1; Schurs y col., Clin. Chim. Acta 1977, 81:1; Shih y col., Intl J. Cancer 1990, 46: 1101; Stein y col., Cancer Res. 1990, 50:1330.

La TTP o los fragmentos de la misma utilizados para la producción de anticuerpos se pueden sintetizar de forma recombinante utilizando sistemas de expresión comunes como E. coli, baculovirus, células Cos, células Sf9 o células eucariotas como se describe en la literatura convencional (p. ej., Ausubel y col. (eds.): Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc., Nueva York). El ADNc también puede modificarse mediante una etiqueta como His(6), GST, FLAG o similar para facilitar la purificación de la proteína. La proteína/polipéptido puede purificarse entonces mediante métodos convencionales como cromatografía (p. ej., cromatografía en columna de intercambio iónico, de afinidad o de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, electroforesis o mediante cualquier otra técnica convencional de purificación de proteínas.

Alternativamente, la TTP se puede aislar a partir de fuentes naturales, usando técnicas bien conocidas en la materia como se describe anteriormente.

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra la TTP recombinante o a la TTP aislada de fuentes naturales utilizados para el ensayo se pueden preparar empleando métodos bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Green y col., «Production of Polyclonal Antisera», en Immunochemical Protocols, Manson, ed., páginas 1-5, Humana Press 1992; Williams y col., en DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª edición, Glover y col. (eds.), página 15, Oxford University Press 1995).

La inmunogenicidad de TTP puede incrementarse a través del uso de un adyuvante, como alum (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, como fusiones de TTP o una porción de la misma con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción de polipéptido es «semejante a un hapteno», dicha porción puede unirse o ligarse de forma ventajosa a un transportador macromolecular (como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica bovina (BSA) o toxoide tetánico) para la inmunización.

Aunque los anticuerpos policlonales se obtienen normalmente en animales como caballos, vacas, perros, pollos, ratas, ratones, cobayas, cabras u ovejas, un anticuerpo anti-Zsig62 de la presente invención también puede obtenerse a partir de un anticuerpo de primate subhumano. Las técnicas generales para obtener anticuerpos de utilidad diagnóstica y terapéutica en babuinos puede encontrarse, por ejemplo, en el documento WO 91/11465 y en Losman y col., *Int. J. Cancer*. 1990, 46: 310.

Alternativamente, se pueden generar anticuerpos monoclonales anti-TTP. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales murinos frente a antígenos específicos mediante métodos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Kohler y col., *Nature* 1975, 256: 495; Coligan y col. (eds.), *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, páginas 2.5.1- 2.6.7 (John Wiley & Sons 1991), Picklesley y col., «Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E coli», en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª edición, Glover y col. (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)). En resumen, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando a ratones una composición que contenga TTP, verificando la presencia de la producción de anticuerpos extrayendo una muestra de suero, extirpando el bazo para obtener los linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando los clones positivos que producen anticuerpos frente al antígeno, cultivando los clones que producen los anticuerpos frente al antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridomas. Por ejemplo, un anticuerpo anti-TTP de la presente invención puede derivar de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen de ratones transgénicos que han sido modificados por ingeniería genética para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición antigénica. En esta técnica, los elementos de los loci de las cadenas pesada y ligera humanas se introducen en cepas de ratón derivadas de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci de las cadenas pesada y ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos de antígenos humanos y se pueden utilizar para producir hibridomas secretores de anticuerpos humanos.

Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, en Green y col., *Nature Genet.* 1994, 7: 13; Lonberg y col., *Nature* 1994, 368:856; Taylor y col., *Int. Immun.* 1994, 6: 579.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse y purificarse a partir de los cultivos de hibridomas por medio de diversas técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína-A sefarosa, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico (véase, por ejemplo, Baines y col., «Purification of Immunoglobulin G (IgG)», en *Methods in Molecular Biology*, vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

En un método alternativo para identificar y diagnosticar individuos con mayor riesgo o que padecen afecciones que pueden mejorar, al menos en parte, aumentando la producción de $\text{TNF}\alpha$, que incluyen, aunque sin limitaciones, enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas o para identificar individuos que necesitan un tratamiento para la prevención del daño por reperfusión, se puede examinar la presencia de cantidades elevadas de ARNm de TTP en una muestra biológica obtenida de dichos individuos.

Por ejemplo, la detección del ARNm de TTP se puede llevar a cabo como sigue:

a) poner en contacto una muestra biológica que contiene ARN obtenida de dicho individuo con un ADNc, ARNc detectable de TTP o un fragmento de la misma capaz de unirse al ARNm de TTP en condiciones en las que pueda producirse la hibridación con el ARNm de TTP

b) medir la cantidad de ARNm de TTP mediante cualquier método basado en la hibridación, como transferencia de ARN, transferencia en mancha, métodos de protección de ARNasa o similares que se basan en la hibridación del ADNc o el ARNc de TTP con el ARN objetivo derivado de las muestras que se desea analizar.

En un método adicional de la invención se pueden usar secuencias derivadas del ADNc de TTP para el diseño de cebadores que se pueden aplicar para cualquier método basado en la PCR para la cuantificación del ARNm de TTP. La cuantificación de los niveles de ARNm de TTP en muestras biológicas se puede utilizar como herramienta diagnóstica para detectar la expresión génica alterada.

Según la presente invención, los términos «ADNc» o «ARNc» se refieren a una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla formada a partir de un ARNm molde por medio de la enzima transcriptasa inversa. Normalmente se emplea un cebador complementario a porciones del ARNm para el inicio de la transcripción inversa.

Las condiciones anteriores pretenden servir como guía y está entre las capacidades de un experto en la materia adaptar estas condiciones para el uso en un ensayo en particular.

El hallazgo de que la expresión de TTP está regulada por incremento en el tejido cardíaco después de la oclusión de una arteria coronaria y tras la reperfusión proporciona una base terapéutica, especialmente para el tratamiento de enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas o para un tratamiento para la prevención del daño por reperfusión.

- 5 Por ejemplo, el individuo puede recibir tratamiento con anticuerpos anti-TTP, preferiblemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanizados dirigidos contra TTP para inhibir la unión de la TTP al ARNm de TNF α y, por tanto, para aumentar la producción de TNF α .

10 El término «fragmento de anticuerpo» como se utiliza en la presente invención se refiere a una porción de un anticuerpo, como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab y similares. Independientemente de su estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. El término también incluye un polipéptido sintético o un polipéptido modificado por ingeniería genética que se une a un antígeno específico, tales como polipéptidos que contienen la región variable de la cadena ligera, fragmentos «Fv» que contienen las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas polipeptídicas de cadena sencilla recombinantes en las que las regiones variables pesada y ligera están conectadas a través de un enlazador peptídico («proteínas scFv») y 15 unidades de reconocimiento mínimas que consisten en restos aminoacídicos que mimetizan la región hipervariable.

El término «anticuerpos humanizados» se refiere a proteínas recombinantes en las que las regiones determinantes de complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal se han transferido desde las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina murina dentro de un dominio variable humano.

20 Dichos anticuerpos se pueden producir como se describe anteriormente. Para usos particulares puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-TTP. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos monoclonales por métodos convencionales. Como ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir mediante escisión enzimática de los anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor 25 tiol para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede realizarse usando un grupo bloqueante para los grupos sulfidrilos que resultan de la escisión de puentes disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce directamente dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Estos métodos se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 4.331.647, Nisonoff y col., Arch. Biochem. Biophys. 1960, 89:230; Porter, Biochem. J. 1959, 73:119; Edelman y col., in Methods in Enzymology vol. 1, página 422 (Academic Press 1967). También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, como la separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos de cadenas pesada-ligera monovalentes, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que reconoce el anticuerpo intacto. 30

35 Por ejemplo, los fragmentos Fv contienen una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA 1972, 69: 2659. Alternativamente, las cadenas variables pueden unirse mediante un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzarse mediante agentes químicos como glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 1992,12: 437).

40 Los fragmentos Fv pueden contener cadenas VH y VL conectadas mediante un enlazador peptídico. Estas proteínas de cadena sencilla de unión a antígeno (scFv) se preparan mediante la construcción de un gen estructural que comprende las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL los cuales están conectados mediante un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula huésped, como E. coli. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena polipeptídica sencilla con dos dominios V unidos por un péptido enlazador. Los métodos para producir scFv se describen, por ejemplo, en Bird y col., Science 1988, 242: 423; patente de EE. UU. 4.946.778 y Pack y col., Biol. Technology 1993, 11: 1271.

45 Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos de CDR («unidades de reconocimiento mínimo») se pueden obtener mediante la construcción de genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick y col., Methods: A Companion to Methods in 50 Enzymology 2:106 (1991), Courtenay-Luck, «Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies», en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter y col. (eds.), página 166, Cambridge University Press 1995 y Ward y col., «Genetic Manipulation and Expression of Antibodies», en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch y col. (eds.), página 137, Wiley-Liss, Inc. 1995).

55 Alternativamente, se puede producir un anticuerpo anti-TTP a partir de un anticuerpo monoclonal humanizado. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen mediante la transferencia de regiones determinantes de complementariedad desde las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón dentro de un dominio

- variable humano. Los restos típicos de los anticuerpos humanos se sustituyen, entonces, en las regiones estructurales de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los posibles problemas asociados con la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Las técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulinas murinas se describen, por ejemplo, en Orlandi y col., Proc. Natl Acad Sci. USA 1989, 86: 3833. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describe, por ejemplo, en Jones y col., Nature 1986, 321: 522; Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89: 4285; Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 1992, 12: 437; Singer y col., J. Immun. 1993, 150: 2844 y la patente de EE. UU. n.º 5.693.762.
- Regímenes terapéuticos alternativos podrían ser el uso de secuencias de ADNc o ARNc de TTP o porciones de la misma. Los grupos finales protectores y las modificaciones naturales del ARN o ADN proporcionan estabilidad adicional permitiendo que las moléculas sean efectivas durante varios días. Estas modificaciones de los grupos de ADN o ARN se comercializan por ATUGEN, Berlín (Alemania).
- Estos ADNc o ARNc modificados o sin modificar se pueden utilizar para la hibridación con el ARNm de TTP y, por tanto, para la supresión de la producción de TTP.
- La administración del ácido nucleico a las células se puede hacer a través de diversos mecanismos. El ácido nucleico puede presentarse en combinación con un agente que facilite la introducción del ADN en la célula. Se pueden emplear diversas soluciones estériles para la administración de la composición, como agua, PBS, etc. La concentración del ADN debe ser la suficiente para proporcionar una dosis terapéutica.
- La administración real de ADNc, ARNc, anticuerpos o fragmentos de los mismos, formulados como se describe anteriormente, se puede llevar a cabo por diversas técnicas, como inyección directa, administración en el pulmón y otras superficies epiteliales, inyección intravenosa y otros métodos físicos.
- Un ejemplo de método de transferencia idóneo según la presente invención es la transferencia física directamente dentro de las células diana de ADNc o ARNc en liposomas o mezclas lipídicas usando preparaciones de liposomas o mezclas lipídicas disponibles en el mercado, como Lipofectine, Lipofectamine (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), Superfecto (Qiagen, Inc. Hilden, Germany) y Transfectarno (Promega Biotech, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados según procedimientos convencionales en la técnica. Una vez en la célula, el ADNc o el ARNc complementario al ARNm de TTP se une a dicho ARNm e inhibe la traducción de TTP, lo que tiene como resultado un aumento de la producción de TNF α . Dichas mezclas lipídicas también son comercializadas por ATUGEN, Berlín (Alemania). La transferencia de ADN mediada por liposomas ha sido descrita por diversos investigadores (Liu y col., Gene Therapy 1994, 1:7; Miller y Vile, FASEB J. 1995, 9:190).
- El método exacto de introducción del ácido nucleico en células de mamífero no está, por supuesto, limitado al método descrito anteriormente. Existen otras técnicas muy accesibles para este procedimiento que incluyen el uso, por ejemplo, de un mecanismo mediado por receptor y otro mecanismo de endocitosis. Esta invención se puede usar junto con cualquiera de estos u otros métodos de transferencia usados frecuentemente.
- Los ácidos nucleicos y los vehículos de administración de ácidos nucleicos de esta invención pueden estar en un transportador farmacéuticamente aceptable para su administración in vivo a un sujeto. Por «farmacéuticamente aceptable» se entiende un material que no es biológicamente, o de cualquier otra forma, indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto, junto con el ácido nucleico o el vehículo, sin causar ningún efecto biológico indeseable o sin interactuar de forma nociva con ninguno de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El transportador podría seleccionarse de forma natural para minimizar cualquier degradación del principio activo y cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sabría bien un experto en la materia.
- El ácido nucleico o el vehículo pueden administrarse por vía oral, parenteral (p. ej., intravenosa), inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, transdérmica, extracorpórea, tópica o similar. La cantidad exacta necesaria de ácido nucleico o vector variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad o mecanismo del trastorno que se está tratando, el ácido nucleico o vehículo en particular utilizado, su vía de administración y similares.
- Los compuestos seleccionados mediante un ensayo como el descrito anteriormente, los anticuerpos anti-TTP o los fragmentos de los mismos se pueden administrar por vía oral, parenteral (p. ej., intravenosa), inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, transdérmica, extracorpórea, tópica, mucosa o similares.
- Dependiendo del modo previsto de administración, los compuestos de la presente invención pueden estar en composiciones farmacéuticas en forma sólida, semisólida o formas de dosificación líquidas, como por ejemplo, comprimidos, supositorios, pastillas, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, lociones, cremas, geles o similares,

preferiblemente en forma de monodosis adecuada para la administración única de una dosis precisa. Las composiciones incluirán, como se indica anteriormente, una cantidad efectiva de la composición seleccionada, posiblemente en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable y, además, puede incluir otros agentes farmacológicos, transportadores, adyuvantes, diluyentes, etc. La administración parenteral de los compuestos de la presente invención, si se utiliza, se caracteriza generalmente por la inyección. Los inyectables se pueden preparar de formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución de la suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Como se usa en el presente documento, «administración parenteral» incluye las rutas intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa e intratraqueal. Una técnica revisada más recientemente para la administración parenteral supone el uso de un sistema de liberación lenta o sostenida, de modo que se mantiene una dosis constante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 3.610.795). Estos compuestos pueden presentarse en un transportador farmacéuticamente aceptable, que también puede incluir un adyuvante idóneo. Por «farmacéuticamente aceptable» se entiende un material que no es biológicamente, o de cualquier otra forma, indeseable, es decir, el material se puede administrar a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin causar ningún efecto biológico nocivo importante o sin interactuar de forma nociva con ninguno de los demás componentes de la composición en la que está contenido.

Las monodosis según la invención pueden contener las cantidades diarias necesarias del compuesto según la invención o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis deseada. La dosis óptima terapéuticamente aceptable y la frecuencia de dosis para un paciente concreto (mamíferos, incluidos seres humanos) depende de diversos factores, como la actividad del compuesto activo específico empleado, edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, velocidad de aclaramiento, objeto del tratamiento, es decir, terapia o profilaxis, y la naturaleza de la enfermedad que se desea tratar que son conocidos por los expertos en la materia.

Por consiguiente, en composiciones y combinaciones en un paciente tratado (in vivo) una dosis diaria farmacéuticamente eficaz del compuesto activo de esta invención está entre aproximadamente 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 0,1 y 10 mg/kg de peso corporal. Según la forma de aplicación, una dosis única puede contener entre 0,01 y 10 mg del compuesto activo.

Ejemplo

Se estudió la segunda ventana de protección del preconditionamiento isquémico en perros anestesiados a tórax abierto. Se conectaron aparatos a los perros para medir la presión del ventrículo izquierdo y la presión aórtica. Los animales se sometieron a 5 min de oclusión coronaria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda perfundiendo la pared anterior seguida de 4, 8 y 16 horas de perfusión. Un segundo grupo de perros (grupo control) no se sometió a oclusión coronaria. Siguiendo el protocolo experimental, se tomaron bloques transmural de tejido miocárdico del centro de la pared anterior y de la pared posterior control y se congelaron inmediatamente. Para identificar los ARNm que están regulados por incremento en el corazón de los perros sometidos a oclusión seguida de perfusión durante periodos de tiempo diferentes, se sometieron los ARN de estos corazones a RDA (análisis de diferencias representativas). El método está pensado para identificar ARNm presentes en cantidades más altas en el primer tejido, a menudo el tejido tratado (denominado «tester») que en el segundo tejido (denominado «driver»). Se extrajo el ARN del miocardio del ventrículo izquierdo congelado inmediatamente por medio de una extracción convencional con tiocianato de guanidina, seguido por la centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Pharmacia, LKB, Freiburg, Alemania). Se aisló el ARN-poli(A) utilizando un oligo-d(T) unido a microesferas magnéticas (DYNABEADS, Dynal, Noruega) según las instrucciones del fabricante. Para superar las alteraciones individuales en la expresión génica, se compararon los ARNm de tres corazones control sanos (Driver) y tres corazones debilitados (Tester), así como una mezcla de muestras. Después de la transcripción inversa (cDNA Synthesis System, Gibco), los ADNc bicatenarios se digirieron con DpnII, se ligaron a enlazadores, se amplificaron y se sustrajeron como se describe para el RDA (Hubank, M y Schatz, D.G. (1994): *Nucleic Acids Res.*, 22, 5640-5648) con modificaciones menores (Frohme y col. (2000): *Ann N Y Acad Sci.*, 910, 85-104). Se realizaron tres rondas de hibridación sustractiva que dieron lugar a los productos 2 y 3 diferentes que se clonaron en pBluescript II-SK+ en *E. coli* DH5alpha. Las inserciones de las bibliotecas de clones se amplificaron mediante PCR convencional para su análisis en gel. Se secuenció siguiendo procedimientos convencionales para el secuenciador automático (Applied Biosystems, EE. UU.). Se utilizaron los análisis BLASTX y BLASTN para identificar homologías de ADN y proteína de las secuencias identificadas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un compuesto por su capacidad para aumentar la producción del factor de necrosis tisular α (TNF α) inhibiendo y/o revirtiendo la unión de la tristetraprolina (TTP) al ARNm de TNF α , que comprende:
 - 5 a) poner en contacto el compuesto con una muestra sin células que contenga ARNm de TNF α o con una muestra sin células que contenga una construcción de expresión capaz de expresar parte de la región 3' no traducida del ARNm de TNF α que abarca los fragmentos conocidos de elementos ricos en AU (ARE) que se sabe desestabilizan el ARNm de TNF- α fusionado a un gen indicador en presencia de TTP en condiciones que permitan la expresión de la proteína indicadora, y
 - 10 b) determinar el nivel de expresión de TNF α o de la proteína indicadora y comparar dicho nivel con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto y
 - c) seleccionar compuestos que potencien la expresión de la proteína indicadora en comparación con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto.
2. Un método para la detección de un compuesto por su capacidad para aumentar la producción del TNF α inhibiendo y/o revirtiendo la unión de TTP al ARNm de TNF α , que comprende:
 - 15 a) poner en contacto el compuesto con una línea celular que exprese TTP y TNF α o, en lugar de TNF α , una parte de la región 3' no traducida del ARNm de TNF α que abarque los fragmentos ARE que se sabe desestabilizan el ARNm de TNF- α fusionado a un gen indicador y
 - b) determinar el nivel de expresión de TNF α o de la proteína indicadora y comparar dicho nivel con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto y
 - 20 c) seleccionar compuestos que potencien la expresión de TNF α o la expresión de la proteína indicadora en comparación con el nivel de expresión obtenido en ausencia del compuesto.
3. Uso de un ADNc o un ARNc complementario al ARNm de TTP, en el que dicho ADNc o ARNc se une al ARNm de TTP e inhibe su traducción, o un anticuerpo anti-TTP que se une específicamente a TTP e inhibe la unión de TTP al ARNm de TNF α o fragmentos de dichos anticuerpos seleccionados entre el grupo compuesto por F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, fragmentos Fv, proteínas scFv, fragmentos monovalentes Fab' 3.5S y péptidos de CDR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas seleccionadas entre el grupo compuesto por sobrecarga hemodinámica, lesión por reperfusión miocárdica, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca congestiva en fase terminal, infarto de miocardio y angina inestable.
 - 25
 - 30
4. Un medicamento para el tratamiento de enfermedades cardíacas y/o lesiones cardíacas seleccionadas entre el grupo compuesto por sobrecarga hemodinámica, lesión por reperfusión miocárdica, cardiomiopatía hipertrófica, insuficiencia cardíaca congestiva en fase terminal, infarto de miocardio y angina inestable, que consta de al menos un ADNc o un ARNc complementario al ARNm de TTP, uniéndose dicho ADNc o ARNc al ARNm de TTP e inhibiendo la traducción del ARNm de TTP o un anticuerpo anti-TTP que se une específicamente a TTP e inhibe la unión de TTP al ARNm de TNF α o fragmentos de dichos anticuerpos seleccionados entre el grupo compuesto por F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, fragmentos Fv, proteínas scFv, fragmentos monovalentes Fab' 3.5S y péptidos de CDR y, opcionalmente, un transportador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
 - 35

Fig. 1

