



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 352 228**

⑮ Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02725395 .4**

⑯ Fecha de presentación : **29.03.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1383919**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

⑭ Título: **Procedimiento y composiciones para usar el polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II como receptor para el factor inhibidor de la migración de macrófagos.**

⑩ Prioridad: **29.03.2001 US 279435 P**

⑬ Titular/es: **CYTOKINE PHARMASCIENCES, Inc.**

**Walnut Hill Plaza**

**150 South Warner Road, Suite 420**

**King of Prussia, Pennsylvania, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2011**

⑰ Inventor/es: **Bucala, Richard, J.;**  
**Donnelly, Seamas;**  
**Leng, Lin;**  
**Mitchell, Robert y**  
**Metz, Christine, N.**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2011**

⑭ Agente: **Carpintero López, Mario**

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

La presente solicitud reivindica los derechos de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos con Nº de Serie 60/279.435, presentada el 29 de marzo de 2001.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****5 Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para usar el polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II, li (también conocido como CD74), como receptor para el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), incluyendo procedimientos y composiciones para usar este receptor, así como agonistas y antagonistas de 10 MIF que se unen a este receptor o que modulan de otra manera la interacción de MIF con CD74, o las consecuencias de dicha interacción, en procedimientos para el tratamiento de afecciones caracterizadas por niveles de MIF alterados local o sistémicamente, particularmente afecciones inflamatorias y cáncer.

**Antecedentes de la Tecnología**

15 El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), la primera actividad citocina que se describirá, ha surgido para ser visto como un regulador crítico de la respuesta inmune innata y adaptativa<sup>1-3</sup>. El MIF está codificado por un único gen, y los estudios de cristalización han demostrado que MIF define un nuevo plegamiento de proteínas y una nueva superfamilia estructural<sup>4</sup>. A pesar del hecho de que la actividad biológica atribuida primero al MIF se describió hace casi 30 años, sólo recientemente se ha conocido información en relación con el papel exacto del MIF en la fisiología e inmunidad celular<sup>1-9, 18</sup>. El MIF está implicado en el centro de la activación de macrófagos y linfocitos T y en el desarrollo de choque séptico, artritis y otras afecciones inflamatorias<sup>2</sup>. Además, el MIF se ha asociado con cáncer<sup>32</sup>.

25 El MIF está implicado de forma crítica en la expresión de la inmunidad innata y adquirida. El MIF se libera por una diversidad de tipos celulares y es un factor necesario para la activación de respuestas proliferativas de macrófagos<sup>18</sup>, linfocitos T<sup>6</sup> y fibroblastos<sup>7</sup>, los efectos mitogénicos del MIF se desarrollan a través de una ruta de activación autocrina/paracrina que implica a la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógeno p44/p42 (ERK-1/2). Los ratones MIF -/- son muy resistentes al choque endotóxico<sup>3</sup>, y la inmunoneutralización del MIF confiere protección frente al choque séptico<sup>25</sup> y una diversidad de patologías inmunoinflamatorias tales como hipersensibilidad de tipo retardado<sup>26</sup>, artritis<sup>27</sup> y glomerulonefritis<sup>28</sup>. Las acciones del MIF sobre las células también muestran varias características únicas. Éstas incluyen una acción contrarreguladora global sobre la inmunosupresión inducida por glucocorticoides<sup>5, 6</sup>, la inducción de un patrón sostenido de 30 activación de ERK-1/2<sup>7</sup> y el antagonismo funcional de la apoptosis dependiente de p53<sup>6</sup>.

Las propiedades proinflamatorias del MIF se han asociado a su capacidad para contrarregular los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides<sup>5, 6</sup>, y se ha supuesto que sus interacciones con células requieren un mecanismo de acción basado en receptor<sup>7, 8</sup> o reflejan un modo de acción intracelular especializado<sup>9</sup>. Numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*

5 han concordado con que el MIF actúe por acoplamiento de un receptor de superficie celular, sin embargo, la ausencia de progresos hacia la identificación de receptores candidatos ha provocado interés en modos de acción intracelulares especializados<sup>9</sup> o en el papel biológico potencial de la actividad tautomerasa del MIF<sup>2, 21</sup>. También hay pruebas de que el MIF pueda funcionar como una isomerasa<sup>4</sup>.

10 Se ha establecido que la cadena invariante asociada a MHC de clase II, li (CD74)<sup>10</sup>, desempeña un papel importante en el procesamiento y el transporte de proteínas de MHC de clase II del retículo endoplásmico al aparato de Golgi<sup>10</sup>. La mayor parte de li se disocia del complejo de clase II como carga de péptidos antigenicos sobre sus sitios de unión de clase II. Aproximadamente el 2-5 % de la li celular total se expresa también en la superficie celular<sup>17</sup>, 15 donde se ha demostrado que funciona como una molécula accesoria para la activación de linfocitos T<sup>11</sup>. li se ha implicado previamente en la señalización y las funciones auxiliares para la activación de células inmunes<sup>11-13</sup>.

La Patente de Estados Unidos Nº 5.559.028 de Humphreys y col. desvela construcciones génicas para la expresión de cadenas de li de tipo silvestre y mutantes en 20 células recombinantes. La Patente de Estados Unidos Nº 5.726.020 de Humphreys y col. desvela y reivindica construcciones génicas inversas expresables y oligonucleótidos que hibridan con una molécula de ARNm de li, inhibiendo de esta manera la traducción de la molécula de ARNm de li.

El documento US 6 030 615 (Bucala y col.) desvela antagonistas del MIF que son 25 anticuerpos anti-MIF neutralizantes, junto con anticuerpos anti-receptor de MIF y receptores de MIF solubles, que neutralizan la actividad biológica del MIF. Este documento también desvela moléculas antisentido y ribozimas que impiden o reducen la expresión de MIF. No se desvela la naturaleza del receptor de MIF. El documento WO 98/17314 (The Pivower Institute for Medical Research) describe anticuerpos anti-MIF neutralizantes y moléculas antisentido para el 30 tratamiento del cáncer. El documento WO 00/74718 (Immunomedics, Inc.) describe anticuerpos dirigidos contra CD74.

### **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La invención se basa, en parte, en la identificación, usando la expresión, clonación y análisis funcionales, de que el polipéptido de cadena invariante asociado a Clase II, li (o 35 CD74)<sup>10</sup> es un receptor celular para MIF. Por lo tanto, MIF se une al dominio extracelular de li,

una proteína de membrana de Tipo II, y la es necesario para la activación celular inducida por MIF y/o cambios fenotípicos incluyendo, por ejemplo, la señalización a través de la cascada de MAP quinasas (ERK)-1/2 de quinasas relacionadas con señales extracelulares y la proliferación celular. La relación de la invención proporciona un mecanismo para la actividad 5 del MIF como citocina y lo identifica como un ligando natural para la, que se ha implicado previamente en la señalización y funciones auxiliares para la activación de células inmunes.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a procedimientos para explorar compuestos para identificar moduladores positivos o negativos de la unión de MIF, o de la actividad en relación con la unión a CD74. Por lo tanto, en un primer caso, la presente 10 invención proporciona un procedimiento para explorar compuestos para determinar un agonista o un antagonista de MIF que comprende: poner en contacto un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) con MIF en presencia y ausencia de un compuesto candidato y comparar la interacción del MIF y dicho polipéptido li en presencia de dicho compuesto candidato con su interacción en ausencia de dicho compuestos candidato, por lo que un 15 compuesto candidato que aumenta la interacción de dicho MIF con dicho polipéptido li se identifica como un agonista de MIF, y un compuesto candidato que inhibe la interacción de dicho MIF con dicho polipéptido li se identifica como un antagonista de MIF; en el que dicho polipéptido li comprende la secuencia de aminoácidos completa de li de la Figura 5 (SEC ID N°: 2) o un fragmento de unión a MIF del mismo.

20 Dicho procedimiento puede comprender un ensayo de unión bioquímico (es decir acelular), que comprende: poner en contacto un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) con MIF en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo, y comparar la interacción de unión del MIF y polipéptidos li en presencia del compuesto de ensayo con su interacción en ausencia del compuesto de ensayo, por lo que un compuesto que modula 25 positivamente la interacción del MIF con el polipéptido li se identifica como un potenciador de la actividad de unión de MIF y un compuesto que modula negativamente la interacción del MIF con el polipéptido li se identifica como un inhibidor de la actividad de unión del MIF. Los potenciadores identificados de esta manera son agonistas terapéuticos candidatos o 30 potenciadores de MIF, mientras que los inhibidores identificados de este modo son antagonistas terapéuticos candidatos de MIF. Por ejemplo, un compuesto de ensayo puede reforzar la unión del MIF al polipéptido li (es decir, aumentar la afinidad de la interacción) y por lo tanto aumentar la interacción del MIF y el polipéptido li. Dicho potenciador se identifica por lo tanto como un agonista o potenciador de MIF, y se identifica como un agente terapéutico candidato para aumentar, independientemente de o en relación con el MIF endógeno o 35 exógeno, los efectos del MIF en sujetos que requieren dicho aumento. Como alternativa, un

compuesto de ensayo que compite con el MIF por la unión al polipéptido li o inhibe de otra manera la interacción del MIF con el polipéptido li se identifica como un antagonista de MIF, y se identifica como un agente terapéutico candidato para antagonizar los efectos del MIF en sujetos que requieren dicho antagonismo. En este ensayo de unión bioquímico, el polipéptido la, comprende la secuencia completa de la, o un fragmento de unión a MIF del mismo, y el ensayo se realiza convenientemente con los péptidos li y MIF preparados de forma recombinante, estando uno de los mismos opcionalmente inmovilizado en un soporte sólido y estando uno de los mismos (o un compañero de unión al mismo, tal como un anticuerpo) marcado para facilitar la detección y la medición de la interacción de unión de MIF:li.

El ensayo de unión puede ser un ensayo de unión celular, que comprende CD74 expresado (normalmente o como consecuencia de una modificación por ingeniería genética para la expresión de li) por una célula (procariota o eucariota), típicamente en la superficie celular, y la unión del MIF al mismo se detecta y se mide en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo. Como en el ensayo bioquímico o acelular descrito anteriormente, se realiza una comparación de la interacción de unión del MIF y el polipéptido li presentado en células en presencia del compuesto de ensayo con su interacción en ausencia del compuesto de ensayo, por lo que un compuesto que modula positivamente la interacción del MIF con el polipéptido li (es decir aumenta su afinidad) se identifica como potenciador de la actividad de unión del MIF y un compuesto que modula negativamente la interacción del MIF con el polipéptido li (es decir, disminuye su afinidad) se identifica como un inhibidor de la actividad de unión del MIF. Los potenciadores identificados de esta manera son agonistas terapéuticos candidatos o potenciadores del MIF, mientras que los inhibidores identificados de esta manera son antagonistas terapéuticos candidatos del MIF.

El ensayo celular puede ser un ensayo de señalización, en el que la actividad de una cascada de señalización intracelular se mide antes y después de poner el MIF en contacto con el polipéptido CD74 presentado en células, en presencia o en ausencia de un compuesto de ensayo. Preferentemente, el ensayo de señalización es un ensayo de activación de ERK-1/2. Un compuesto de ensayo que modula positivamente la actividad de señalización del MIF por interacción con el polipéptido li se identifica como un potenciador de la actividad de señalización del MIF, y un compuesto que modula negativamente la señalización del MIF a través de la interacción del MIF con el polipéptido li se identifica como un inhibidor de la actividad de señalización del MIF. Los potenciadores identificados de esta manera son agonistas o potenciadores terapéuticos candidatos de MIF, mientras que los inhibidores identificados de esta manera son antagonistas terapéuticos candidatos del MIF.

El ensayo celular puede ser un ensayo de la actividad celular o del fenotipo celular, en

el que la actividad o fenotipo de una célula diana se mide antes y después de poner el MIF en contacto con el polipéptido CD74 presentado en células, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo. Preferentemente, el ensayo de la actividad o del fenotipo es un ensayo de proliferación o un ensayo para determinar el antagonismo funcional de la apoptosis dependiente de p53. Un compuesto de ensayo que modula positivamente la actividad celular elegida o el cambio fenotípico mediado por MIF a través de la interacción con el polipéptido li se identifica como un potenciador de la actividad celular del MIF, y un compuesto que modula negativamente la actividad celular elegida o el cambio fenotípico mediado por MIF a través de la interacción con el polipéptido li se identifica como un inhibidor de la actividad celular del MIF. Los potenciadores identificados de esta manera son agonistas terapéuticos candidatos o potenciadores del MIF, mientras que los inhibidores identificados de esta manera son antagonistas terapéuticos candidatos del MIF.

Una forma de dicho agonista o antagonista sería un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como un anticuerpo anti-CD74. Se conocen en la técnica anticuerpos anti-CD74 y fragmentos de unión a CD74 de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD74 puede ser un anticuerpo monoclonal y también puede ser un anticuerpo humano, humanizado o quimérico, preparado por cualquier procedimiento convencional.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para inhibir un efecto del MIF sobre una célula que comprende en su superficie extracelular un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une al MIF y, por lo tanto, media el efecto del MIF. Este procedimiento comprende: poner en contacto a la célula con un antagonista u otro inhibidor del MIF, donde el antagonista o inhibidor inhibe, en un primer caso, la unión del MIF al polipéptido li; en un segundo caso, la señalización iniciada por la interacción de MIF:li; y en un tercer caso, un cambio en la actividad celular, metabolismo o fenotipo logrado por la interacción de MIF:li. En cualquiera de estos procedimientos, el antagonista o inhibidor puede ser un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al polipéptido li. Como alternativa, el inhibidor puede ser el polipéptido li soluble o un fragmento de unión a MIF soluble del mismo que inhibía la interacción del MIF y el polipéptido li (o las consecuencias celulares de dicha interacción) por unión a MIF o por interacción con el polipéptido li en la superficie de una célula. En algunos casos, la célula que comprende el polipéptido li está presente en un mamífero y el antagonista u otro inhibidor se administra al mamífero en una composición farmacéutica. Un mamífero que se beneficiaría de este procedimiento es un mamífero que padeciera una afección o trastorno caracterizado por niveles de MIF elevados local o sistémicamente por encima del intervalo normal encontrado en mamíferos que no padecen dicha afección. En tal caso, el antagonista o inhibidor se administra en una cantidad eficaz para

tratar la afección o trastorno. Por ejemplo, el mamífero puede padecer un cáncer o un trastorno inflamatorio y el antagonista o inhibidor se administra en una cantidad eficaz para tratar el cáncer o trastorno inflamatorio. El trastorno inflamatorio puede ser, por ejemplo, choque séptico o artritis.

5       Más particularmente, un aspecto de la invención es un procedimiento para inhibir una actividad del MIF, comprendiendo dicho procedimiento: poner en contacto el MIF con un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF. El fragmento del polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF puede ser una forma soluble del polipéptido, particularmente una forma soluble que comprende el dominio de unión extracelular de este polipéptido transmembrana de tipo II. En algunos casos, el MIF a inhibir está en un mamífero y el polipéptido li o un fragmento del mismo se administra al mamífero en una composición farmacéutica. Cuando el mamífero padece un cáncer o un trastorno inflamatorio, tal como choque séptico o artritis, el polipéptido li o el fragmento del mismo se administra en una cantidad eficaz para tratar el trastorno. En un caso adicional, al antagonista o inhibidor de MIF se administra en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad infecciosa, estando en dicha enfermedad el MIF, o un polipéptido relacionado evolutivamente con MIF (como se demuestra por su homología de secuencia) que procede del patógeno infeccioso (ya sea un virus, bacteria, hongo o, especialmente, un parásito), presente local, sistémicamente o en la superficie de contacto huésped:patógeno.

20      Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento para purificar MIF que comprende: poner en contacto una muestra que comprende MIF con un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF, en condiciones que promuevan la unión específica del MIF al polipéptido li o un fragmento del mismo, y separar el complejo de MIF:polipéptido li formado de esta manera de materiales que no se unan al polipéptido li o fragmento del mismo. En este procedimiento, el polipéptido li puede inmovilizarse sobre una matriz de soporte sólido. La invención también proporciona un procedimiento para ensayar la presencia del MIF que comprende: poner en contacto una muestra con un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF en condiciones que promuevan la unión específica del MIF al polipéptido li o fragmento del mismo, y detectar cualquier complejo de MIF:polipéptido li o MIF:fragmento de polipéptido li formado de esta manera.

25      Otro procedimiento más proporcionado por la invención es un procedimiento *in vitro* para reducir un efecto del MIF sobre una célula que comprende en su superficie un polipéptido de cadena invariante de cadena de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF y, por lo tanto, media el efecto del MIF. Este procedimiento comprende: proporcionar a la

célula una molécula de ácido nucleico antisentido en una cantidad eficaz para reducir la cantidad de polipéptido li producido por la célula. La molécula de ácido nucleico antisentido se une específicamente a una porción de ARNm expresada a partir de un gen que codifica el polipéptido de cadena invariante de MHC de clase Ii (li) y, por lo tanto, disminuye la traducción 5 del ARNm en la célula y, finalmente, el nivel de polipéptido li en la superficie de la célula. En este procedimiento, la célula que comprende el polipéptido li puede estar en un mamífero, por ejemplo, un mamífero que padece una afección o trastorno caracterizado por niveles de MIF elevados local o sistémicamente por encima del intervalo normal en mamíferos que no padecen dicha afección o trastorno. Por ejemplo, el mamífero puede padecer un cáncer o un 10 trastorno inflamatorio, tal como choque séptico o artritis. En tal caso, el ácido nucleico antisentido se administra en una composición farmacéutica, en una cantidad eficaz para tratar la afección o trastorno.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La FIG. 1 ilustra la unión de alta afinidad del MIF a monocitos THP-1. a, El Alexa-MIF 15 muestra la retención total de la actividad biológica de MIF dependiente de la dosis, evaluada por la activación de la cascada de MAP quinasas p44/p42 (ERK-1/2), visualizada por transferencia de Western de lisados celulares usando anticuerpos específicos para fosfo-p44/p42 o p44/p42 total; y b, supresión de la apoptosis dependiente de p53 inducida por la privación de suero (CM: medio completo, SFM: medio sin suero). Se añadió MIF o Alexa-MIF a 20 50 ng/ml. Los datos mostrados son la Media  $\pm$  DT de pocillos por triplicado y son representativos de 3 experimentos independientes. Se proporcionaron pruebas adicionales de la retención de la estructura nativa por conjugación con Alexa mediante la medición de la actividad tautomerasa de MIF usando éster metílico de L-dopacromo como sustrato<sup>25</sup>. No se observaron diferencias en la actividad tautomerasa de Alexa-MIF frente a MIF no conjugado 25 (Alexa-MIF:  $\Delta DO_{475} = 0,275 \text{ s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  proteína, frente a rMIF:  $\Delta DO_{475} = 0,290 \text{ s}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ; P = NS). c, El análisis de citometría de flujo muestra que la unión de Alexa-MIF a monocitos THP-1 se potencia notablemente por tratamiento con IFN- $\delta$ . La competición por la unión de Alexa-MIF se realizó en presencia de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de rMIF no marcado. d, Visualización directa de la unión de Alexa-MIF a monocitos THP por microscopía confocal. Se cultivaron células THP-1 en 30 cubreobjetos, se incubaron con IFN $\gamma$  (1 ng/ml) durante 72 h y se tiñeron con Alexa-MIF (*panel izquierdo*) o Alexa-MIF más exceso de rMIF no marcado (*panel derecho*). El Alexa-MIF unido a células se internalizó rápidamente tras el cambio de las células de 4 °C a 37 °C durante 15 min (*panel derecho*). Aumentos: 630x. e, características de unión de Alexa-MIF a monocitos THP-1 activados con IFN $\gamma$ . El recuadro muestra los datos de unión transformados por análisis de Scatchard, que indican dos actividades de unión distintas; una con una  $K_d = 3,7 \times 10^{-8} \text{ m}$  y la 35

otra con una  $K_d = 3,5 \times 10^5$ , los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

La FIG. 2 muestra que li es una proteína de unión a superficie celular para MIF. **a**, Ciclos secuenciales de separación de células activadas por fluorescencia de transfectantes de células COS-7 muestran un enriquecimiento para actividad de unión a MIF. **b**, Diagramas que indican la estructura de li (isoforma de 35 kDa) y tres de diez clones de ADNc representativos con actividad de unión a MIF. IC, TM y EC son los dominios intracelular, transmembrana y extracelular. M1 y M17 se refieren a dos sitios de inicio de la traducción alternativos. **c**, Análisis de citometría de flujo de la unión de MIF a células que expresan li. La unión aumentada de Alexa-MIF a células COS-7 transfectadas con li frente a las transfectadas con vector de control (*panel izquierdo*) inhibía la unión de Alexa-MIF a células COS-7 transfectadas con li incubadas con mAb anti-li (clon LN2) frente a un control de mAb isotípico (mAb con) (*panel central*), y la unión aumentada de Alexa-MIF a monocitos THP-1 estimulados con IFN $\gamma$  incubados con mAb anti-li (clon LN2) frente a un control de mAb isotípico (*panel derecho*). Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. El mAb anti-li, LN2 (PharMingen), es reactivo con un epítope que reside en el interior de 60 aminoácidos del extremo terminal C extracitoplásmico de la proteína. **d**, El MIF se une al domino extracelular de li *in vitro*. Se preparó proteína [ $^{35}$ S]-li en una reacción de transcripción y traducción acopladas usando plásmidos que codifican fragmentos de li de diferentes longitudes. La interacción proteína-proteína se evaluó midiendo la radiactividad unida en placas de 96 pocillos que se revistieron previamente con MIF ( $n = 6$  pocillos por experimento). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos, que muestran que la unión de MIF se ve gravemente comprometida con vectores que expresan fragmentos de li de los aminoácidos 1-72 o 1-109 frente a la unión sólida con vectores que expresan fragmentos de li de los aminoácidos 1-149 o 1-232 (longitud completa).

La FIG. 3 ilustra la mediación por li de la estimulación de MIF de la fosforilación por ERK-1/2 (p44/p42) en células COS-7. **a**, La fosforilación de ERK-1/2 se induce por MIF en células COS-7 transfectadas con el vector de li (COS-7/li) o el vector de control (COS-7/V). Las células se trataron sin o con diversas dosis de rMIF durante 2,5 h y se analizaron para determinar la fosfo-p44/p42 y la p44/p42 total por transferencia de Western. **b**, Hay una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por MIF por mAb anti-li. Se transfecaron células Cos-7 con un vector de li y se estimularon con 50 ng/ml de MIF durante 2,5 h en presencia de un mAb de control isotípico o un mAb anti-li (clon LN2) a diferentes dosis. En los experimentos de control, el anti-li no mostró ningún efecto sobre la fosforilación de ERK-1/2 en ausencia de MIF añadido (*datos no mostrados*).

La FIG. 4 ilustra transferencias de Western de la fosforilación inducida por MIF. **a**, La

dosis de MIF estimula de forma dependiente la fosforilación de ERK-1/2 (p44/p42) en linfocitos **B** Raji humanos, como se visualiza por transferencia de Western para fosfo-p44/p42. **b**, Hay una inhibición de la fosforilación de ERK-1/2 inducida por MIF en células Raji también por mAb anti-li. Se estimularon células Raji con 50 ng/ml de MIF durante 2,5 h en presencia de un 5 anticuerpo de control de isótipo (Ab Con) o de los dos mAb anti-li, B741 o LN2, cada uno añadido a 50 µg/ml. **c**, El anti-li inhibe la proliferación de células Raji inducida por MIF cuantificada por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. **d**, El anti-li también inhibe la proliferación inducida por MIF de fibroblastos humanos. Se añadieron anticuerpos a una concentración final de 50 µg/ml. Los resultados mostrados son la Media ± DT de ensayos por triplicado y son 10 representativos de al menos tres experimentos separados. Los anticuerpos anti-li no mostraron ningún efecto sobre la proliferación celular en ausencia de MIF añadido (*datos no mostrados*).

La FIG. 5 muestra la secuencia de nucleótidos completa (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos traducida más larga (empezando en el nt **8**; SEC ID N°: 2) del ARNm humano para el polipéptido li (cadena invariante asociada con antígenos HLA-DR p33 [N° Acceso 15 GenBank X00497 M14765]), como se presenta en Strubin, M. y col., The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. EMBO J., 3, 869-872 (1984).

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

En el presente documento se usan las abreviaturas siguientes: Alexa-MIF: conjugado 20 de MIF con Alexa 488, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, li: cadena invariante asociada con MHC de clase II (CD74), IFN $\gamma$ : interferón- $\gamma$ , mAb: anticuerpo monoclonal, MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos.

Usando clonación, expresión y análisis funcionales, los presentes inventores han identificado como receptor celular para MIF la cadena invariante asociada con la Clase II, li 25 (CD74)<sup>10</sup>. El MIF se une al dominio extracelular de li, una proteína de membrana de Tipo II, y li es necesario para los efectos celulares inducidos por MIF, incluyendo por ejemplo la activación de la cascada de MAP quinasas ERK-1/2 y la proliferación celular. Estos datos proporcionan un mecanismo para la actividad del MIF como citocina y lo identifican como un ligando natural para li, que se ha implicado previamente en la señalización y funciones auxiliares para la 30 activación de células inmunes<sup>11-13</sup>. Los presentes inventores unieron el colorante fluorescente Alexa 488<sup>14</sup> a MIF recombinante por técnicas convencionales, verificaron la conservación de la actividad biológica del conjugado (FIG. 1A, B) y realizaron experimentos de unión con un panel de tipos celulares que se sabe que responden a MIF. A modo de ilustración, usando citometría de flujo, los presentes inventores observaron una unión de alta afinidad de Alexa-MIF a la 35 superficie de la línea celular monocítica humana THP-1. Esta actividad de unión se indujo por

activación de los monocitos con interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y se completó por adición de un exceso de MIF no marcado (FIG. 1C). La microscopía confocal y la visualización directa de monocitos tratados con IFN $\gamma$  a 4 °C mostraron unión en superficie de Alexa-MIF, y el Alexa-MIF unido a células se internalizó tras un cambio de temperatura a 37 °C (FIG. 1D). Estudios de unión cuantitativa realizados con concentraciones crecientes de Alexa-MIF revelaron dos clases evidentes de receptores de superficie celular (FIG. 1E). La actividad de unión de mayor afinidad mostró una  $K_d$  de  $3,7 \times 10^{-8}$  M y  $3,1 \times 10^4$  sitios de unión por célula, y la unión de menor afinidad mostró una  $K_d$  de  $3,5 \times 10^{-7}$  M y  $4,9 \times 10^4$  sitios por célula.

Para identificar el receptor de MIF, los presentes inventores prepararon ADNc a partir de monocitos THP-1 activados con IFN $\gamma$  y construyeron una biblioteca de expresión en mamífero en el vector lambdaZAP-CMV<sup>15</sup>. Alícuotas de la biblioteca que representaban un total de  $1,5 \times 10^7$  recombinantes se usaron para transfectar células COS-7 que se había establecido previamente que mostraban una actividad de unión detectable escasa para MIF, y los transfectantes se analizaron por citometría de flujo para determinar la unión de Alexa-MIF. Las células con tinción positiva se aislaron por separación de células y los clones de ADNc se recogieron, se amplificaron y se volvieron a usar para transfectar células COS-7 para rondas adicionales de separación de células (FIG. 2A). Después de cuatro rondas de selección, se prepararon colonias individuales en *E. coli* y se volvieron a escoger aleatoriamente 250 colonias para su análisis. Los presentes inventores secuenciaron 50 clones que llevaban insertos de ADNc de  $\geq 1,6$  kB y observaron que 10 codificaban la cadena invariante asociada con la Clase II, li (CD74), una proteína transmembrana de Tipo II de 31-41 kD<sup>16</sup>. Aunque los clones aislados diferían con respecto a su longitud total, cada uno estaba en la orientación con sentido y codificaba un dominio transmembrana y extracelular completo (FIG. 2B).

Para confirmar que li es una proteína de unión a superficie celular para MIF, los presentes inventores analizaron la unión de Alexa-MIF a células COS-7 transfectadas con un plásmido de expresión de li (FIG. 2C). La unión se inhibió por exceso de MIF no marcado (*datos no mostrados*) y por un mAb anti-li dirigido contra la porción extracelular de la proteína. El mAb anti-li también inhibía la unión de Alexa-MIF a monocitos THP-1 estimulados con IFN $\gamma$ . La inhibición por el mAb anti-li de la unión de Alexa-MIF a monocitos THP-1 era significativa, pero parcial, lo que concuerda con la interpretación de que li representa una de las dos clases de receptores de superficie celular para MIF reveladas por el análisis de Scatchard (FIG. 1E). La proteína li-[<sup>35</sup>S] preparada mediante un sistema de lisado de reticulocitos de transcripción y traducción acopladas se unía a MIF *in vitro* y el epítopo de unión principal estaba localizado en una región de 40 aminoácidos contenida en el interior del dominio extracelular de li (FIG. 2D).

Para verificar la significación funcional de la unión de MIF a li en un sistema ejemplar,

los presentes inventores examinaron la actividad de MIF para estimular la activación de ERK-1/2 y la proliferación celular en diferentes células que expresaban li. Los presentes inventores observaron un aumento mediado por MIF y una reducción mediada por mAb anti-li dependiente de la dosis en la fosforilación de ERK-1/2 en células Cos-7 transfectadas con li (FIG. 3).

5 Independientemente de la transfección con el gen de li, sin embargo, los presentes inventores no pudieron detectar ningún efecto proliferativo del MIF sobre esta línea celular epitelial de mono (*datos no mostrados*). Después los presentes inventores examinaron la actividad del MIF para inducir la activación de ERK-1/2 y respuestas proliferativas aguas abajo en la línea celular humana Raji B, que expresa un alto nivel de li<sup>19</sup>. El MIF estimulaba la fosforilación de ERK-1/2 en células Raji quiescentes, y cada uno de dos mAb anti-li bloqueaba este efecto estimulante de MIF (FIG. 4A, B). Es destacable que el efecto inhibidor de anti-li sobre la fosforilación de ERK-1/2 estaba asociado con una disminución significativa en la proliferación estimulada por MIF de estas células (FIG. 4C). Además, los presentes inventores confirmaron el papel de la ruta de estimulación de MIF-li en células fuera del sistema inmune. El MIF prolonga la vida de 10 fibroblastos murinos primarios<sup>8</sup>, y tanto los efectos mitogénicos del MIF como su inducción de la cascada de transducción de señales de ERK-1/2 se han caracterizado mejor en este tipo celular<sup>7</sup>. Los fibroblastos expresan bajos niveles de li<sup>20</sup>, y los presentes inventores observaron que el anti-li inhibía significativamente tanto la fosforilación de ERK-1/2 como el efecto mitogénico del MIF sobre fibroblastos cultivados (FIG. 4D y *datos no mostrados*).

20 En experimentos previos, los presentes inventores han experimentado dificultades considerables para preparar un MIF radiomarcado con <sup>125</sup>I bioactivo y han observado que la proteína es inestable en las condiciones de pH empleadas para la conjugación con biotina. Por el contrario, la modificación del MIF por Alexa 488 a una baja densidad molar producía una proteína totalmente bioactiva que permitía la identificación de receptores de MIF en monocitos humanos y la clonación y expresión de li como receptor de MIF en la superficie celular. Estos datos amplían significativamente la comprensión de los presentes inventores de li fuera de su papel en el transporte de proteínas de clase II, y respaldan estudios recientes que han descrito 25 una función de señalización accesoria para li en la fisiología de linfocitos B y T<sup>10-13</sup>.

30 Estos descubrimientos proporcionan una primera percepción en la larga búsqueda de un receptor de MIF, aunque probablemente están implicadas otras proteínas en algunas actividades mediadas por MIF. Por ejemplo, al igual que MIF, li es un homotímero<sup>23</sup>, y el dominio intracelular de li consiste en 30-46 aminoácidos, dependiendo de cuál de los dos codones de inicio en fase de lectura se utilice<sup>16</sup>. Se ha demostrado que el li codificado por monocitos potencia respuesta proliferativas de linfocitos T y esta función auxiliar de li se ha 35 asociado con una interacción específica dependiente de sulfato de condroitina entre li y CD44”.

Los presentes inventores han observado un efecto inhibidor de anti-CD44 sobre la fosforilación de ERK-1/2, pero no unión de MIF, en células que expresan li. Esto concuerda con la deducción de que li unido a MIF es un ligando estimulante para la activación de MAP quinasas mediada por CD44. CD44 es una glicoproteína transmembrana de Tipo I muy polimórfica<sup>24</sup>, y 5 probablemente CD44 media alguna de las consecuencias aguas abajo de la unión de MIF a li.

La interferencia en las rutas de transducción de señales inducidas por la interacción de MIF-li, por ejemplo, proporcionando antagonistas o inhibidores de la interacción de MIF-li, ofrece nuevas estrategias a la modulación de respuestas de activación e inmunes celulares a 10 MIF. Los agentes activos a este respecto (agonistas y antagonistas y otros inhibidores) se espera que tengan utilidad terapéutica en enfermedades y afecciones tipificadas por cambios locales o sistémicos en los niveles de IF.

La interacción de unión específica entre MIF y el polipéptido de cadena invariante de clase II, li, también hace conveniente el uso de reactivos de MIF marcados como vehículos “de tipo caballo de Troya” mediante los que concentrar un marcador o una toxina deseados en 15 células que presentan li en su superficie celular. En resumen, un marcador o entidad tóxica deseada se asocia con un ligando de MIF (por ejemplo, por unión covalente) y el ligando de MIF modificado después se presenta a células que presentan li localizado en su superficie celular, uniéndose dicho polipéptido de cadena invariante de clase II al mismo y produciendo la internalización del ligando de MIF modificado, provocando de esta manera que la célula 20 operativa se marque o se vea afectada por la toxicidad específicamente. Las células que presentan li pueden exponerse al ligando de MIF modificado *in vitro* o *in vivo*, pudiendo en este último caso las células que presentan li identificarse o verse afectadas por toxicidad específicamente en un paciente. Una amplia diversidad de reactivos de diagnóstico y terapéuticos pueden conjugarse ventajosamente con un ligando de MIF (que puede ser un MIF 25 de longitud completa biológicamente activo o un fragmento de unión a li del mismo, o una mutéína de cualquiera de los anteriores y, particularmente, una mutéína de este tipo adaptada para que sea biológicamente inactiva y/o para que se acople de forma más conveniente a una entidad marcadora o tóxica), proporcionando un ligando de MIF modificado de la invención. Típicamente, los reactivos deseables acoplados a un ligando de MIF incluyen: fármacos 30 quimioterápicos tales como doxorrubicina, metotrexato, taxol y similares; quelantes tales como DTPA con los que pueden formar complejos marcadores detectables tales como moléculas fluorescentes o agentes citotóxicos tales como metales pesados o radionúclidos; y toxinas tales como exotoxina de *Pseudomonas* y similares.

## PROCEDIMIENTOS

## MIF y Anticuerpos

Se purificó MIF recombinante humano a partir de un sistema de expresión de *E. coli* como se ha descrito previamente<sup>22</sup> y se conjugó con Alexa 488<sup>14</sup> por el protocolo del fabricante (Molecular Probes, Eugene OR). La relación media entre el ligando colorante y el homotímero MIF era de 1:3, como se determina por espectrometría de masas y desorción e ionización por láser asistida por matriz (Kompact probe/SEQ, Kratos Analytical Ltd, Manchester, Reino Unido). Los anticuerpos monoclonales anti-li humanos (clones LN2 y M-B741) se obtuvieron en PharMingen (San José, CA).

## 10 Citometría de Flujo, Análisis de Scatchard y Microscopía Confocal.

Se cultivaron células THP-1 ( $2,5 \times 10^5$  células/ml) en DMEM/FBS al 10 % con o sin IFN $\gamma$  (1 ng/ml, R&D Systems, Mineápolis, MN) durante 72 h. Después del lavado, se resuspendieron  $5 \times 10^5$  células en 0,1 ml de medio y se incubaron con 200 ng de Alexa-MIF a 4 °C durante 45 min. Después, las células se lavaron con PBS enfriado con hielo (pH 7,4) y se sometieron a un análisis de citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA). En experimentos seleccionados, se incubaron monocitos THP-1 o transfectantes COS-7 con Alexa-MIF junto con 50  $\mu$ g/ml de un mAb anti-li o un mAb de control isotípico. Para el análisis de Scatchard, se incubaron muestras por triplicado de células THP-1 tratadas con IFN $\gamma$  ( $1 \times 10^6$ ) durante 45 min a 4 °C en PBS/FBS al 1 % junto con Alexa-MIF (0-1,5  $\mu$ M, calculado como trímero MIF), se lavaron 3 veces con PBS/FBS al 1 % frío y se analizaron por citometría de flujo usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson, San José, CA)<sup>29</sup>. La curva de unión específica se calculó restando la unión inespecífica (medida en presencia de un exceso de MIF no marcado) de la unión total. Se realizó microscopía de fluorescencia confocal de la unión de Alexa-MIF a células con un instrumento de exploración láser LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Se incubaron células THP-1 con IFN $\gamma$  durante 72 horas y se lavaron 3 veces con PBS/FBS al 1 % antes de la tinción durante 30 min (4 °C) con 2 ng/ $\mu$ l de Alexa-MIF o Alexa-MIF más 50 ng/ $\mu$ l de rMIF no marcado.

## Construcción de Biblioteca de ADNc, Expresión y Separación de Células

Se preparó ADNc a partir del ARN poli(A)+ de monocitos THP-1 activados con IFN $\gamma$ , se clonó en el vector lambda ZAP-CMV (Stratagene, La Jolla, CA) y alícuotas de ADN (2,5  $\mu$ g/ml) se usaron para transfectar  $15 \times 10^6$  células COS-7 por el procedimiento de DEAE-dextrano<sup>30</sup>. Las células transfectadas se incubaron con Alexa-MIF durante 45 min a 4 °C, se lavaron y las células con tinción positiva se aislaron<sup>31</sup> con un separador de células Moflo (Cytomation, Fort Collins, CO). En un procesamiento típico, se inyectaron  $1,5 \times 10^7$  células/ml y se analizaron a un caudal de  $1 \times 10^4$  células/s. La recuperación generalmente era  $\geq 90\%$ . Se extrajo ADN

plasmídico de las células separadas usando el kit Easy DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se usó para transformar *E. coli* XL-10 gold (Stratagene, La Jolla, CA) para una amplificación adicional. Después, el ADN plasmídico purificado se volvió a usar para transfectar células COS-7 para rondas adicionales de separación. Después de 4 rondas de separación de células, 5 se volvieron a escoger 250 colonias individuales aleatoriamente y el tamaño del inserto se analizó por PCR. Los clones con insertos >1,6 Kb se usaron para transfectar individualmente células COS-7 y la actividad de unión a MIF se volvió a analizar por citometría de flujo.

Transcripción y Traducción *In vitro*.

Usando un clon de ADNc de li de longitud completa como molde, se generaron tres productos de li truncados (1-72 aa, 1-109 aa, 1-149 aa) y uno de longitud completa (1-232 aa) mediante PCR y se subclonaron en el vector de expresión pcDNA3.1/V5-HisTOPO (Invitrogen). La secuencia de nucleótidos completa de un clon de ADNc de li ilustrativo y las supuestas formas polipeptídicas de li que codifica se presentan en la Figura 5. La fidelidad de la construcción de vector se confirmó por secuenciación automática de ADN y las construcciones 15 se usaron después como moldes para la transcripción y traducción acopladas usando el sistema de lisado de reticulocitos TNT (Promega, Madison WI). La unión de li marcado con [<sup>35</sup>S] a MIF inmovilizado se evaluó por una incubación de 3 h a temperatura ambiente como se recomienda por el protocolo de TNT.

Ensayos de Actividad.

La fosforilación dependiente de la dosis de ERK-1/2 se midió por transferencia de Western de lisados celulares usando anticuerpos específicos dirigidos contra fosfo-p44/p42 o p44/p42 total siguiendo procedimientos descritos previamente<sup>7</sup>. La supresión mediada por MIF de la apoptosis se evaluó en fibroblastos embrionarios murinos privados de suero por inmunoensayo de fragmentos de ADN asociados a histonas citoplasmáticos (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN)<sup>8</sup>. Se realizaron estudios de proliferación mediante una modificación de procedimientos publicados previamente<sup>7,8</sup> —se cultivaron linfocitos B Raji humanos (Cultivo Americano de Tejidos Tipo, Rockville, MD) en RPMI/FBS al 10 %, se sembraron en placas de 96 pocillos (500-1000 células/pocillo) y se volvieron quiescentes por incubación durante una noche en RPMI/suero al 0,5 %. Las células se lavaron, se reemplazó el 25 RPMI/suero al 0,5 % y se añadieron el MIF y los anticuerpos según se indica. Después de una incubación adicional durante una noche, se añadió 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina y las células se recogieron 12 h después. La mitogénesis de los fibroblastos se examinó en fibroblastos pulmonares humanos normales (CCL210, Cultivo Americano de Tejidos Tipo) cultivados en DMEM/FBS al 10 %, resuspendidos en DMEM/suero al 2 % y sembrados en placas de 96 30 placas de 96 pocillos (150 células/pocillo) junto con MIF y anticuerpos como se muestra. Se añadieron mAb

de control de isotipo o anti-li a una concentración final de 50 µg/ml. La proliferación se evaluó el día 5 después de la incorporación durante una noche de [<sup>3</sup>H]-timidina en el ADN.

Como será evidente para un experto en el campo de la invención, son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores. Por lo tanto, debe entenderse que la invención puede ponerse en práctica de otra manera distinta a la descrita específicamente en el presente documento.

#### REFERENCIAS

1. Weiser y col., "Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitor factor", Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 86, 7522-752 (1989).
2. Metz y col., Cytokine Reference Vol. I. Ligand Review: MIF., eds. Oppenheim y col., Academi Press, San Diego, 703-716 (2000).
3. Bozza y col., "Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis", J. Exp. Med., 189, 341-346 (1999).
4. Swope y col., "Macrophage migration inhibitor factor: cytokine, hormone, or enzyme?", Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 139, 1-32 (1999).
5. Calandra y col., "MIF as a glucocorticoid-induced counter-regulator of cytokine production", Nature 377, 68-71 (1995).
6. Bacher y col., "An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in T cell activation", Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 93, 7849-7854 (1996).
7. Mitchell y col., "Sustained mitogen-activated protein kinase (MAP) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF)", J. Biol. Chem., 274, 18100-18106 (1999).
8. Hudson y col., "A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity", J. Exp. Med., 190, 1375-1382 (1999).
9. Kleemann y col., "Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1", Nature, 408, 211-216 (2000).
10. Cresswell y col., "Assembly, transport, and function of MHC class II molecule", Annu. Rev. Immunol., 12, 259 -293 (1994).
11. Naujokas y col., "The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44", Cell, 74, 257-268 (1993).
12. Naujokas y col., "Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4+ T cell development", Immunity, 3, 359-372 (1995).
13. Shachar y col., "Requirement for invariant chain in B cell maturation and function", Science, 274, 106-108 (1996).
14. Panchuk-Voloshina y col., "Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield

- exceptionally bright, photostable conjugates", *J. Histochem. Cytochem.*, 9, 1179-1188 (1999).
15. Wang y col., "Expression cloning and characterization of the TGF- $\beta$  Type III receptor", *Cell*, 67, 797-805 (1991).
- 5 16. Strubin y col., "Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs", *Cell*, 47, 619-625 (1986).
17. Sant y col., "Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins" *J. Immunol.*, 135, 416-422. (1985).
- 10 18. Calandra y col., "The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor", *J. Exp. Med.*, 179, 1895-1902 (1994).
19. Hansen y col., "Internalization and catabolism of radiolabelled antibodies to MHC class-II invariant chain by B-cell lymphomas", *Biochem. J.*, 320, 293-300 (1996).
- 20 20. Koch y col., "Differential expression of the invariant chain in mouse tumor cells: relationship to B lymphoid development", *J. Immunol.*, 132, 12-15 (1984).
- 15 21. Bendrat y col., "Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor (MIF)", *Biochemistry*, 36, 15356-15362 (1997).
22. Thurman y col., "MIF-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody", *J. Immunol.*, 134, 305-309 (1985).
- 20 23. Ashman y col., "A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC Class II-associated invariant chain", *J. Immunol.* 163, 2704-2712 (1999).
24. Lesley y col., "CD44 and its interaction with extracellular matrix", *Adv. Immunol.*, 54, 271-335 (1993).
- 25 25. Calandra y col., "Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor", *Nature Med.*, 6, 164-170, (2000).
26. Bernhagen y col., "An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction", *J. Exp. Med.*, 183, 277-282 (1996).
27. Mikulowska y col., "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice", *J. Immunol.*, 158, 5514-5517 (1997).
- 30 28. Lan y col., "The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in immunologically induced kidney disease in the rat", *J. Exp. Med.*, 185, 1455-1465 (1997).
29. Palupi y col., "Bovine  $\beta$ -lactoglobulin receptors on transformed mammalian cells (hybridomas MARK-3): characterization by flow cytometry", *J. Biotech.*, 78, 171-184 (2000).
- 35 30. D'Andrea y col., Expression cloning of the murine erythropoietin receptor, *Cell*, 57, 277-285.

31. Yamasaki y col., "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor", *Science*, 241, 825-828 (1988).

32. Chesney y col., "An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of murine lymphoma", *Mol. Med.*, 5, 181-191 (1999).

5        El análisis de los antecedentes de la invención del presente documento se incluye para explicar el contexto de la invención. Dicha explicación no es una admisión de que el material mencionado fuera publicado, conocido o parte de la técnica anterior o del conocimiento general común en cualquier parte del mundo en lo que se refiere a la fecha de prioridad de cualquiera de los aspectos indicados anteriormente.

10        Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que puede incluir modificaciones adicionales y que esta solicitud pretende incluir cualquier variación, uso o adaptación de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo dichas desviaciones de la presente divulgación como dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y 15        como puede aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en el presente documento.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para explorar compuestos para determinar un agonista o antagonista de MIF que comprende: poner en contacto un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) con MIF en presencia y ausencia de un compuesto candidato, y comparar la interacción del MIF y dicho polipéptido li en presencia de dicho compuesto candidato con su interacción en ausencia de dicho compuesto candidato, por lo que un compuesto candidato que aumenta la interacción de dicho MIF con dicho polipéptido li se identifica como un agonista de MIF, y un compuesto candidato que inhibe la interacción de dicho MIF con dicho polipéptido li se identifica como un antagonista de MIF; en el que dicho polipéptido li comprende la secuencia de aminoácidos completa de li de la Figura 5 (SEC ID Nº: 2) o una fragmento de unión a MIF de la misma.  
5
2. Uso de un antagonista de MIF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o una enfermedad infecciosa por inhibición de un efecto de MIF sobre una célula que comprende en su superficie extracelular un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF y, por lo tanto, media dicho efecto secundario de MIF, inhibiendo dicho antagonista la unión de MIF a dicho polipéptido li, seleccionándose el antagonista del grupo que consiste en anticuerpo anti-CD74 humano, un anticuerpo anti-CD74 humanizado, un anticuerpo anti-CD74 quimérico, un polipéptido li soluble y un fragmento de unión a MIF soluble de un polipéptido li soluble.  
15
3. Uso de un antagonista de MIF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer por inhibición de un efecto de MIF sobre una célula que comprende en su superficie celular un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF y por lo tanto media dicho efecto de MIF, inhibiendo dicho antagonista la unión de MIF a dicho polipéptido li, seleccionándose el antagonista del grupo que consiste en anticuerpo anti-CD74 humano, un anticuerpo anti-CD74 humanizado, un anticuerpo anti-CD74 quimérico, un polipéptido li soluble y un fragmento de unión a MIF soluble de un polipéptido li soluble.  
25
4. Un antagonista de MIF para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, una enfermedad infecciosa o cáncer mediante la inhibición de un efecto de MIF sobre una célula que comprende en su superficie extracelular un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF y, por lo tanto, media dicho efecto de MIF, inhibiendo dicho antagonista la unión de MIF a dicho polipéptido li, seleccionándose el antagonista del grupo  
30
- 35

que consiste en anticuerpo anti-CD74 humano, un anticuerpo anti-CD74 humanizado, un anticuerpo anti-CD74 quimérico, un polipéptido li soluble y un fragmento de unión a MIF soluble de un polipéptido li soluble.

- 5 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 o un antagonista de acuerdo con la reivindicación 4 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio que es choque séptico.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 3 o un antagonista de acuerdo con la reivindicación 4 para el tratamiento de un trastorno inflamatorio que es artritis.
- 10 7. Uso de un antagonista de MIF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio o una enfermedad infecciosa por contacto, extracelularmente, del MIF con un antagonista de MIF, en el que dicho antagonista de MIF comprende un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF.
- 15 8. Uso de un antagonista de MIF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer por contacto, extracelularmente, del MIF con un antagonista de MIF, en el que dicho antagonista de MIF comprende un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF.
- 20 9. Un antagonista de MIF para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, una enfermedad infecciosa o cáncer por contacto, extracelularmente, del MIF con un antagonista de MIF, en el que dicho antagonista de MIF comprende un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF.
- 25 10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8 o un antagonista de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o fragmento del mismo que se une a MIF es una forma soluble de dicho polipéptido o fragmento del mismo.
- 30 11. Uso de un antagonista de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha forma soluble de dicho polipéptido o fragmento del mismo comprende el domino de unión extracelular de dicho polipéptido o una parte del mismo.
- 35 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 o un antagonista de acuerdo con la

reivindicación 9, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio.

13. Uso de un antagonista de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el trastorno es choque séptico.

5

14. Uso de un antagonista de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el trastorno es artritis.

10 15. Un procedimiento para purificar MIF que comprende: poner en contacto una muestra que comprende MIF con un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF en condiciones que promueven la unión específica de MIF al polipéptido li o fragmento del mismo, y separar el complejo de MIF:polipéptido li o el complejo de MIF:fragmento de polipéptido li formado de esta manera de materiales que no se unen al polipéptido li o fragmento del mismo.

15

16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que dicho polipéptido li o fragmento del mismo se inmoviliza en una matriz de soporte sólido.

20 17. Un procedimiento para ensayar la presencia de MIF que comprende: poner en contacto una muestra con un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) o un fragmento del mismo que se une a MIF en condiciones que promueven la unión específica de MIF a dicho polipéptido li o un fragmento del mismo, y detectar cualquier complejo de MIF:polipéptido li o complejo de MIF:fragmento de polipéptido li formado de esta manera.

25

18. Un procedimiento *in vitro* para reducir un efecto del MIF sobre una célula que comprende en su superficie un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF y de esta forma media dicho efecto del MIF, comprendiendo dicho procedimiento: proporcionar a dicha célula una molécula de ácido nucleico antisentido en una cantidad efectiva para reducir la cantidad de dicho polipéptido li producido por dicha célula, en el que dicha molécula de ácido nucleico antisentido se une específicamente a una porción del ARNm expresado a partir de un gen que codifica dicho polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) y de esta forma reduce la traducción de dicho ARNm en dicha célula.

30

19. El uso de una molécula de ácido nucleico antisentido en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, enfermedad infecciosa o cáncer

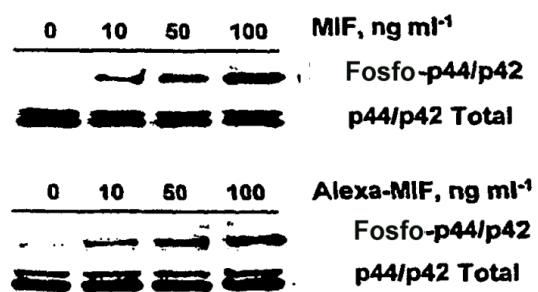
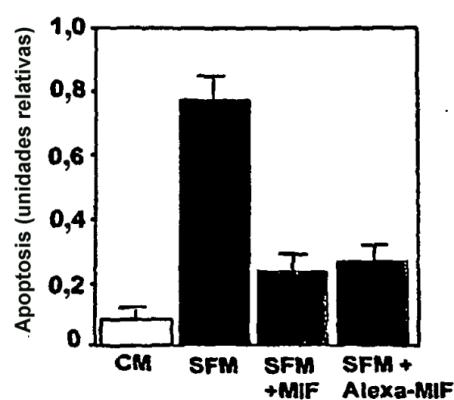
por reducción de un efecto del MIF sobre una célula que comprende en su superficie un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF y de esta forma media dicho efecto del MIF, en el que dicha molécula de ácido nucleico antisentido se une específicamente a una porción del ARNm expresado a partir de un gen que codifica dicho polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) y de esta forma reduce la traducción de dicho ARNm en dicha célula.

5 20. Una molécula de ácido nucleico antisentido para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio, enfermedad infecciosa o cáncer mediante la reducción de un efecto del MIF en una célula que comprende en su superficie un polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) que se une a MIF y de esta forma media dicho efecto del MIF, en el que dicha molécula de ácido nucleico antisentido se une específicamente a una porción del ARNm expresado a partir de un gen que codifica dicho polipéptido de cadena invariante de MHC de clase II (li) y por lo tanto reduce la traducción del ARNm en dicha célula.

15 21. Uso de acuerdo con la reivindicación 18, en el que el medicamento es una composición farmacéutica.

20 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 19 o una molécula de ácido nucleico antisentido de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha molécula de ácido nucleico antisentido está en forma de un oligonucleótido.

25 23. Uso de acuerdo con la reivindicación 19 o una molécula de ácido nucleico antisentido de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicha molécula de ácido nucleico antisentido está en forma de una construcción recombinante que expresa dicha molécula de ácido nucleico antisentido en dicha célula.

**FIG. 1A****FIG. 1B**

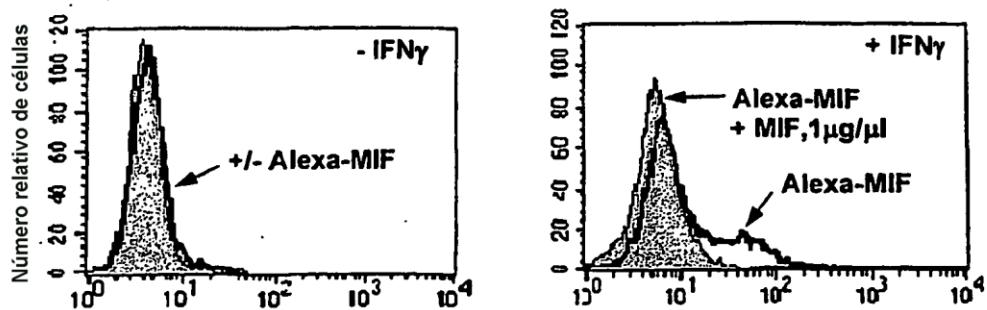


FIG. 1C

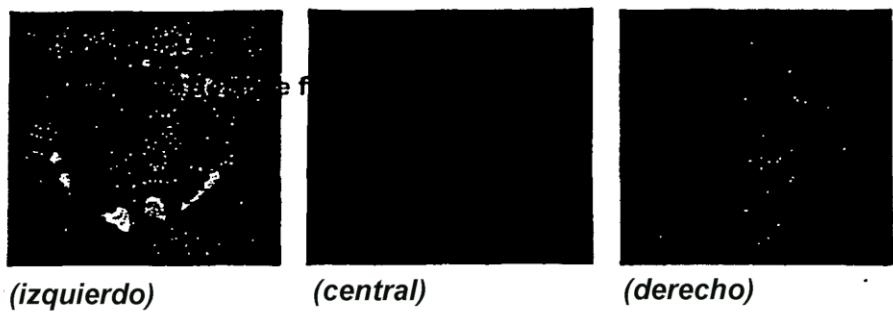


FIG. 1D

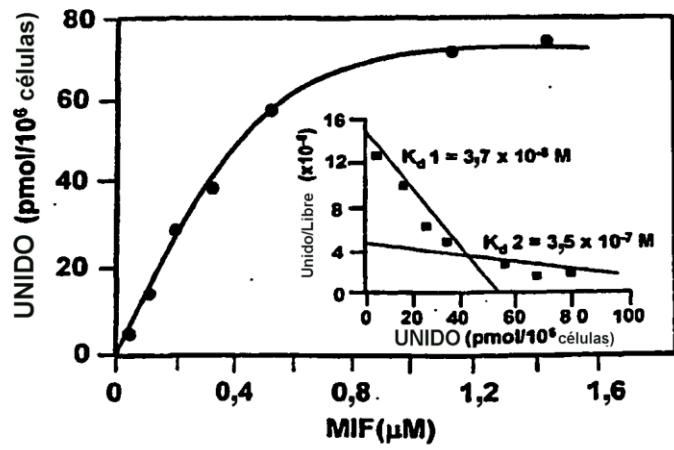
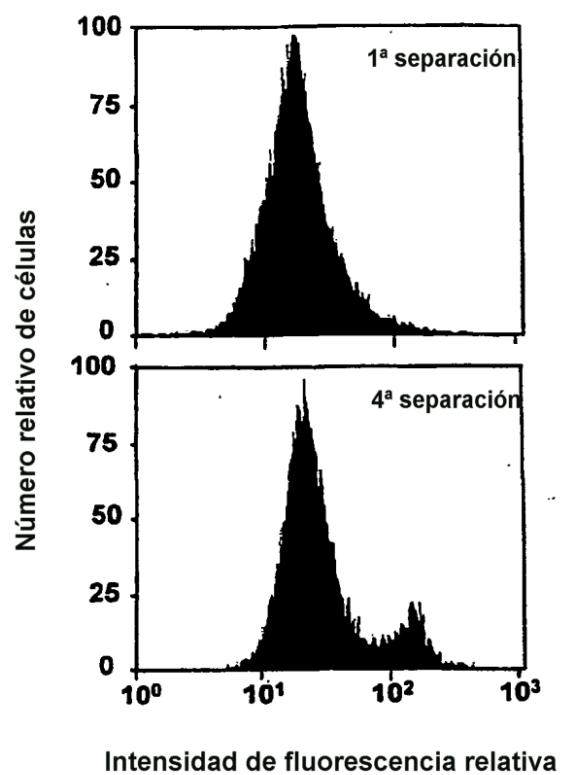
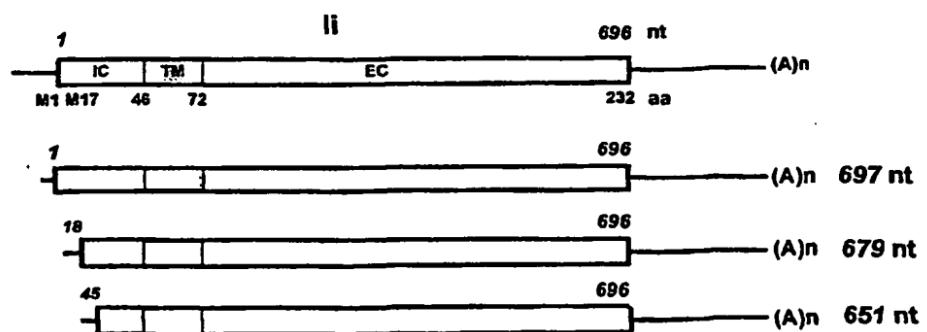
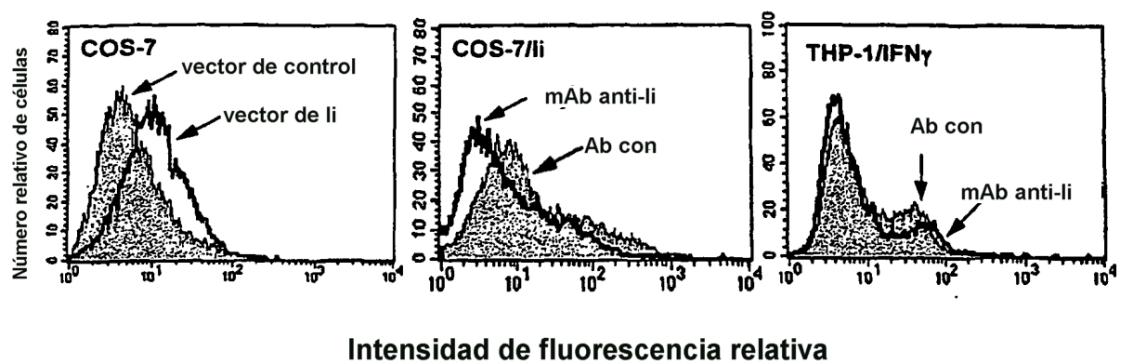
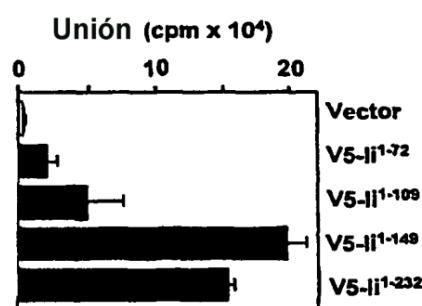
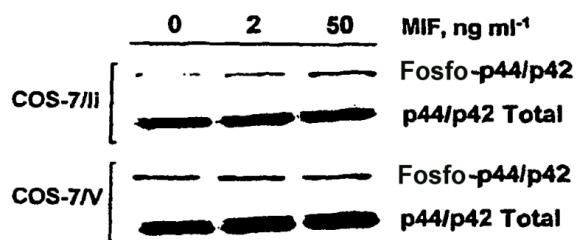
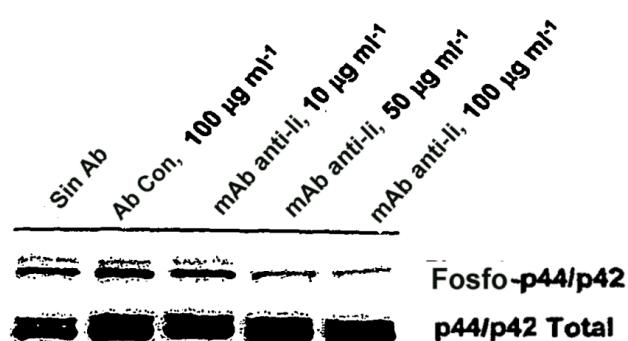
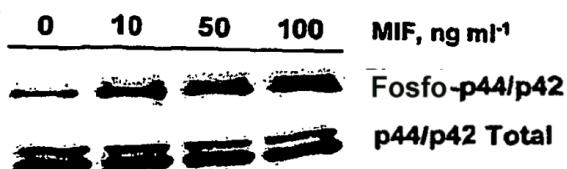
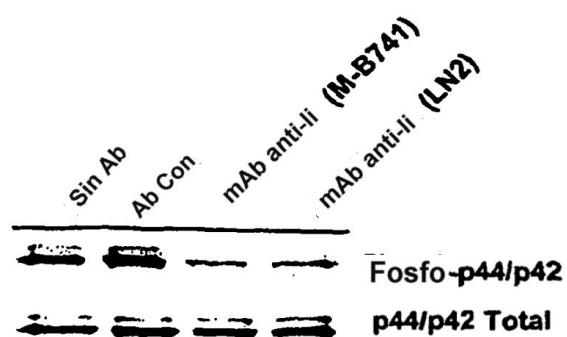


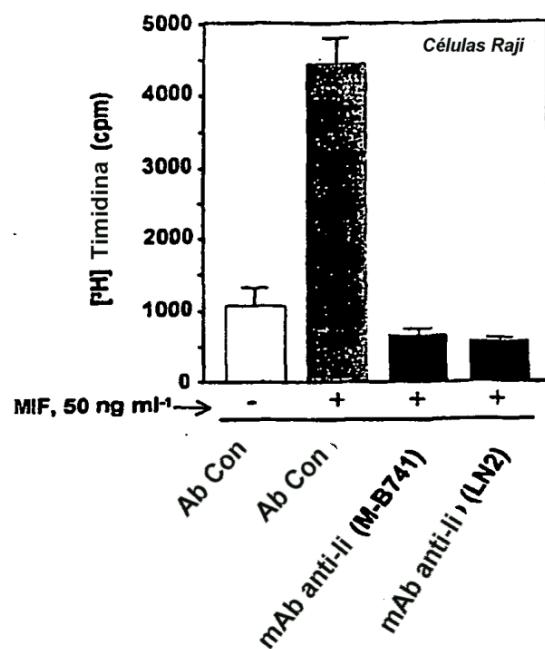
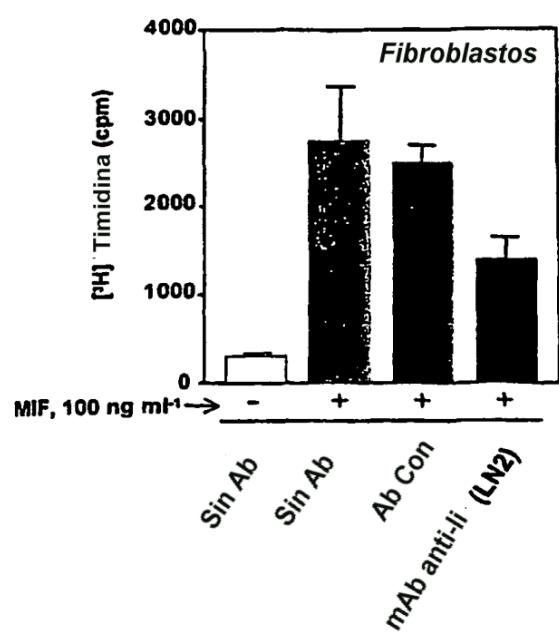
FIG. 1E

**FIG. 2A****FIG. 2B**

**FIG. 2C****FIG. 2D**

**FIG. 3A****FIG. 3B**

**FIG. 4A****FIG. 4B**

**FIG. 4C****FIG. 4D**

## FIGURA 5

supuesta 035  
supuesta 033

Leyenda:  = CNS  = otra característica

### Secuencia:

1	TTCCCCRATG CACRACGCCA CACCCCGGAG CTGTCGGGCA CTCACGACCC CAGTCATCTGC M H R R R S R S C R E D Q K P V H D	H D	supuesta	p35
61	TGTCACCCCCC CACCTTATCT CCACRACATCA CCAACTGGCC ATGCTGGGCC CGCGCGCTGC D Q R D L I S N H E Q L P H L G R R P G	D Q R D L I S N H E Q L P H L G R R P G	supuesta	p35
121	CCCCCGGAG ACCACTGCGA CCGCCGCCGC CCTGTCACCA CGCTTTTCCG TCCCTGGTCAC A P E S K C S R G A L Y T G F S I L V T	A P E S K C S R G A L Y T G F S I L V T	supuesta	p35
181	TCTCCCTCTC CCGCCCGCCCG CGACCGACCC CTCCTCTCTC TCCACGCCGC AGCGCGCGCT L L L A G Q A T T R Y F L Y G G Q G R L	L L L A G Q A T T R Y F L Y G G Q G R L	supuesta	p35
241	CCACACATCG ACAGTCACCT CCCACGACCT CGACCTGGCG AACCTGGCGA TGGACGCTTC D K L T U T S O H L G L E H L R M K L P	D K L T U T S O H L G L E H L R M K L P	supuesta	p35
301	ACACCTCCG AACCTGCGA CGACATCGG CTCACGCCGC CGCCCTGGCGA TCCACGCCCT K P P K P V S K M R H A T P L L M G A L	K P P K P V S K M R H A T P L L M G A L	supuesta	p35
361	CGCCATGGCA CGCCCTGGCC CGCCGGCGCT CGACGATCGG ACCAGCTATCG CCACACATCG P M G R L P Q G P M Q N A T K Y G N H T	P M G R L P Q G P M Q N A T K Y G N H T	supuesta	p35
421	ACAGGACCAT GTGATGCCGC TCCCTCCACCA TCCCTGGCGCC CTGACGCTCT RCCCCGGCGT E D H V M H L L Q N A D P L K V Y P P L	E D H V M H L L Q N A D P L K V Y P P L	supuesta	p35
481	CGAGGGCGCC TTCCCGGCGA ACCTGACGCA CCTTACGAC ACCATGGCGA CGATACATCG K G S F P E H L R H L K N T H E T I D W	K G S F P E H L R H L K N T H E T I D W	supuesta	p35
541	CGAGCTCTTT CACACCTGGCA TCAACATTC CGCTCTCTT GAAATGGCGA CGACCTCTT K V F E S H M H H W L L F E M S R H S L	K V F E S H M H H W L L F E M S R H S L	supuesta	p35
601	CGAGGCGGGCG CGCCCTGAGG CTCCCGGGCA AGAGTCATCG GAGCTGGCGG AGCGCTCTTC E S K P T D A P P K E S L E L E D P S S	E S K P T D A P P K E S L E L E D P S S	supuesta	p35
661	TGGGCTGGCT GTGACCGAGC AGGAGCTGGG CCCAGCTGGCC ATGCTGACGC AGCGCGCGC G L G V T K Q D L G P U P H	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p35
721	CTCTTCACCA TCCCTGGCGC CGCACACGCC TACACCTCTTC TTGCTCCCTT CGGGCGCGC CCCCCTCCCCC ATGCTCCACG CTGTCACCTCA TCCCTACGCGA CTGCTGGCGCT CGCTCTTCTG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
781	CCCCCTCCCCC ATGCTCCACG CTGTCACCTCA TCCCTACGCGA CTGCTGGCGCT CGCTCTTCTG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
841	TCACCCCTCT ACACGACGAA CGAGCTGGGA ACAGCGAGAA ACACATGGCGC AGCGCGCTCG TCCCCCGATCT CCACCTGCGA ACAGGGCGCT CGAGCTGGCG AGAGCTGGCGA AGCGCTACGC	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
901	AGATCCCGCT TCCCTACGAC AGGAGCTGGT CGCACACGCC TCTGACGAC GAGCTGGCGA AGAGCTGGCG CGAGGCGGGCG CGACGGCGAGA CGGAGGAGGG ATACCGCTTCG ACCCGAGCGCC CGGGCTGGCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
961	AGATCCCGCT TCCCTACGAC AGGAGCTGGT CGCACACGCC TCTGACGAC GAGCTGGCGA AGAGCTGGCG CGAGGCGGGCG CGACGGCGAGA CGGAGGAGGG ATACCGCTTCG ACCCGAGCGCC CGGGCTGGCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
1021	ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATACCGCTTCG ACCCGAGCGCC CGGGCTGGCG ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATACCGCTTCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
1081	AGGCTGAGCC AGCTCTCTTC CTTTCCCCCG CTCACATCGCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATACCGCTTCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
1141	AGGCTGAGCC AGCTCTCTTC CTTTCCCCCG CTCACATCGCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATACCGCTTCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
1201	CGACCCGATCA TCCCTCTCG CGCCCCCTCG TCCCTCTCG TCAAGGCGCGC TTGCTTCTCG CTTTCAGGGCG CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATACCGCTTCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33
1261	CTTTCAGGGCG CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATGCTGACGTC CGCTCTCCCC CGAGGAGGGT ATACCGCTTCG	G L G V T K Q D L G P U P H	supuesta	p33