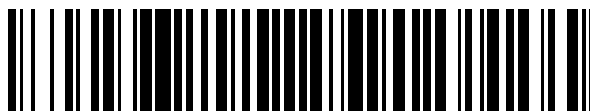


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 211**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2002 E 02798569 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1468008**

54 Título: **Polimorfismos del promotor del factor inhibidor de la migración de macrófagos en la enfermedad inflamatoria**

30 Prioridad:

21.12.2001 US 341832 P

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

18.09.2013

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAUGH, JOHN A.;
BUCALA, RICHARD;
CHITNIS, SMITA;
DONNELLY, SEAMUS C.;
GREGERSEN, PETER K. y
MONTEIRO, JOANITA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 423 211 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polimorfismo del promotor del factor inhibidor de la migración de macrófagos en la enfermedad inflamatoria

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un procedimiento y aparato de diagnóstico basado en un polimorfismo funcional en el promotor de un gen que codifica el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Más específicamente, esta invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la predisposición a determinados estados patológicos, mediante la detección de la presencia de este polimorfismo del promotor. La invención también se refiere al aparato para detectar el polimorfismo, genes del MIF que contienen el polimorfismo y a una sonda para ello.

10 Antecedentes de la tecnología

Una serie de estudios experimentales han conducido al concepto de que el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) funciona como un contrarregulador fisiológico de la acción glucocorticoide en el sistema inmunitario. En esta función, la posición del MIF en la cascada de citoquinas es actuar en coordinación con los glucocorticoides endógenos para controlar el nivel de referencia y la magnitud de la respuesta inflamatoria (1). El MIF también tiene varias funciones proinflamatorias directas en enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide (2), sepsia (3, 4), síndrome de dificultad respiratoria aguda (5) y glomerulonefritis (6).

15 El MIF se describió originalmente hace unos 30 años como un factor derivado de linfocitos T que inhibía la migración de macrófagos peritoneales (7), pero ahora se sabe que varios otros tipos de células, incluyendo los propios macrófagos, son fuentes importantes de MIF (8). Los niveles de MIF son elevados en el suero y en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (2, 9), y en las diartrosis la inmunotinción de MIF se puede localizar en los macrófagos CD14+ del revestimiento sinovial y sinoviocitos de tipo fibroblastos (2). Después de la liberación, MIF es directamente proinflamatorio por activación o promoción de la expresión de citoquinas (TNF α (8, 10), IL-1 β , IL-2 (11), IL-6 (8,12), IL-8 (13) e IFN γ (11, 14)), liberación de óxido nítrico (15), expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMP) (16, 17), e inducción de la ruta de la ciclooxigenasa-2 (Cox-2) (18). La capacidad de MIF para inducir la activación sostenida de la ruta de la MAP quinasa p44/p42 (ERK-1/2) (18) e inhibir la apoptosis dependiente de p53 (19, 20), también sugiere que este mediador tiene una función importante en el inicio del paño sinovial reumatoide.

20 La patente de EE. UU. nº 6.030.615 de Bucala y col., describe un procedimiento de combinación para tratar enfermedades causadas por la toxicidad mediada por citoquinas, que comprende administrar una cantidad eficaz de (a) un inhibidor de MIF, tal como un anticuerpo que se une a un polipéptido MIF, en el que el polipéptido MIF tiene un peso molecular de aproximadamente 12,5 kDa en combinación con (b) anticuerpo dirigido contra TNF α , dirigido contra IL1, dirigido contra IFN- γ , IL-1RA, un esteroide, un glucocorticoide o IL10.

25 El concepto de que los polimorfismos en los genes de respuesta inmunitaria contribuyen a la patogénesis de determinadas enfermedades autoinmunitarias/inflamatorias humanas ha recibido un interés creciente en los últimos años. Actualmente, se han mostrado muy pocos polimorfismos génicos que sean funcionalmente importantes y que tengan un valor en el pronóstico en estados patológicos específicos. Los ejemplos previamente definidos incluyen polimorfismos en TNF α e IL1ra que se ha mostrado que tienen cierta importancia en el pronóstico de la malaria y la cardiopatía isquémica, respectivamente (24, 25). Igualmente, se ha publicado que una serie de polimorfismos en el TNF α y la IL- β están asociados con la gravedad de la artritis reumatoide (26-28).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

30 La presente invención se basa en parte en la identificación de un nuevo polimorfismo en el gen *Mif* humano que consiste en una repetición del tetranucleótido CATT situada en la posición -817 del promotor de *Mif*. Como se describe en el presente documento, este polimorfismo del promotor es funcionalmente significativo *in vitro*, y el análisis de una cohorte de pacientes con artritis reumatoide indica que esta repetición CATT está asociada con la gravedad de la enfermedad.

35 Por lo tanto, un objeto de esta invención es proporcionar un procedimiento de diagnóstico que comprende determinar el genotipo de un promotor de *Mif* humano.

Otro objeto de esta invención, es proporcionar medios de diagnóstico que comprenden un medio para determinar el genotipo de un promotor de *Mif* humano.

40 Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de la gravedad de una enfermedad inflamatoria no infecciosa o de una predisposición a la gravedad de una enfermedad inflamatoria no infecciosa, que comprende detectar un polimorfismo en un promotor de *Mif* humano que se correlaciona con un aumento o disminución de la expresión del polipéptido MIF. En este procedimiento, la enfermedad inflamatoria no infecciosa es, por ejemplo, autoinmunidad, enfermedad de injerto contra huésped, o preferiblemente artritis reumatoide, y preferiblemente la detección del polimorfismo es indicativa de la gravedad de la enfermedad o la predisposición a la gravedad de la

enfermedad. Preferiblemente, este polimorfismo en un promotor de *Mif* humano que se correlaciona con un aumento o disminución de la expresión del polipéptido MIF es un polimorfismo de repetición del tetranucleótido CATT en la posición -817 del gen *Mif* humano, seleccionado del grupo que consiste en 5, 6, 7 y 8 unidades de repetición, donde la presencia de 5 unidades de repetición indica la aparición o predisposición a la gravedad baja de la enfermedad.

5 El procedimiento de diagnóstico de la invención comprende preferiblemente una etapa de amplificación del promotor de *Mif* usando una técnica de PCR. Para este propósito, la invención proporciona un conjunto de cebadores de PCR seleccionados para amplificar una región de un promotor de *Mif* humano. Por ejemplo, el conjunto de cebadores de la PCR se puede seleccionar del grupo que consiste en: (i) MIF-F (-1024) y MIF-R (-421); (ii) MIF-F (-441) y MIF-R (+4);
10 (iii) MIF-F (-13) y MIF-R (+395); y (iv) MIF-F (+379) y MIF-R (+1043), como se muestra en la tabla 1, más adelante. La invención también se refiere a un procedimiento de uso de un conjunto de cebadores de la invención para detectar un polimorfismo en una región del promotor de *Mif* humano, y a un artículo de fabricación (tal como un kit de diagnóstico) que comprende un conjunto de cebadores de PCR de la invención.

15 La invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia del promotor de *Mif* humano en la que el tetranucleótido CATT en la posición -817 se repite 5, 6, 7 u 8 veces. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN aislada, en particular un fragmento de ADN genómico aislado, que se ha amplificado a partir de una muestra de ADN de un sujeto humano. En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una parte de un promotor de *Mif* humano que comprende un polimorfismo de repetición del tetranucleótido CATT en la posición -817 del gen *Mif* humano.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de terapia de la enfermedad inflamatoria que comprende detectar en un individuo la gravedad de una enfermedad inflamatoria no infecciosa o una predisposición a la gravedad de una enfermedad inflamatoria no infecciosa. Este procedimiento comprende: detectar en un sujeto humano un polimorfismo en un promotor de *Mif* humano que se correlaciona con un aumento o disminución en la expresión del polipéptido MIF, donde la detección del polimorfismo es indicativa de la gravedad de la enfermedad o la predisposición a la gravedad de la enfermedad. Este procedimiento de terapia de la enfermedad inflamatoria comprende
25 además tratar al sujeto humano para prevenir o reducir la gravedad de la enfermedad inflamatoria o retrasar el inicio de la enfermedad inflamatoria. Por ejemplo, la terapia puede comprender tratar al sujeto humano administrando una cantidad eficaz de al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor del MIF, un anticuerpo dirigido contra el TNF- α , un anticuerpo dirigido contra la IL1, y un anticuerpo dirigido contra el IFN- γ , IL-1RA, un esteroide, un glucocorticoide y IL-10.

30 En una realización preferida del procedimiento de la invención de terapia de la enfermedad inflamatoria, la enfermedad inflamatoria es la artritis reumatoide y el polimorfismo en un promotor de *Mif* humano es un polimorfismo de repetición del tetranucleótido CATT en la posición -817 del gen *Mif* humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 La figura 1 muestra una representación esquemática de la región del promotor de *Mif* humano. Están recuadrados los sitios de unión del factor de transcripción putativo y las áreas de interés. La región de repetición CATT polimórfica (de -817 a -797/-785) está indicada sin sombreado.

40 La figura 2 muestra la actividad de transcripción basal de las variantes polimórficas del promotor de *Mif* humano en células Cos-7. La actividad del promotor de MIF se determinó mediante ensayos de luciferasa doble con resultados expresados en unidades relativas de luz (URL). Se cotransfectaron transitoriamente células Cos-7 con 800 ng de vector de ADN de ensayo: pGL3-Basic (control negativo), pMIF-5, pMIF-6, pMIF-7 o pMIF-8 (construcciones de luciferasa-promotor de MIF específico con polimorfismo de 5, 6, 7 u 8 repeticiones CATT) y 200 ng de vector pRLTK de control. Después de 48 h, las células se lisaron y se determinó la actividad de la luciferasa en relación con la actividad de la renilla usando un kit de luciferasa doble (Promega) y un luminómetro TD 20/20. Los datos representan la media de 4 experimentos individuales, cada uno llevado a cabo por duplicado \pm DT. * indica $P < 0,03$ frente a la actividad de la construcción de pMIF-5.
45

50 La figura 3 muestra el efecto de la variación polimórfica de repetición CATT en las respuestas del promotor de *Mif* a la estimulación con suero y forskolina en células Cos-7. Se determinó la actividad del promotor de MIF por ensayos de luciferasa dobles, con resultados expresados como unidades relativas de luz (URL). Se cotransfectaron transitoriamente células Cos-7 con 800 ng de vector de ADN de ensayo: pGL3-Basic (control negativo), pMIF-5, pMIF-6, pMIF-7 o pMIF-8 (construcciones de luciferasa-promotor de MIF específico con polimorfismo de 5, 6, 7 u 8 repeticiones CATT) y 200 ng de vector pRLTK de control. Después de 24 h de transfección, las células se lavaron en PBS y después se cultivaron en medio exento de suero durante la noche. Después, las células se dejaron sin estimular (privadas de suero) o se trataron con suero de ternero fetal al 2% (FCS) o forskolina 1 μ M ("FSK 1 μ M"). Después de 12 h más de incubación se determinó la actividad de la luciferasa como en la figura 2. Los datos representan la media de 4 experimentos individuales, cada uno llevado a cabo por duplicado \pm DT. * indica $P < 0,03$ frente a la actividad de la construcción de pMIF-5.
55

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El nuevo polimorfismo del gen *Mif* identificado en la presente invención está asociado con la actividad reducida del promotor de MIF, y la presencia de este genotipo en el estado homocigótico parece estar asociado con un menor riesgo de artritis reumatoide grave.

5 Se ha mostrado que el MIF promueve la secreción de $TNF\alpha$ y potencia la secreción de óxido nítrico inducida por el $IFN\gamma$ de macrófagos (8). Además, el MIF es un regulador autocrino importante de la activación de macrófagos (8), linfocitos T (11) y fibroblastos (18). Estos datos han conducido a numerosas investigaciones de la potencial función del MIF en las afecciones inflamatorias crónicas tales como la artritis reumatoide.

10 Los niveles de proteína MIF circulan con niveles mayores en el suero de los pacientes con artritis reumatoide y la expresión celular de MIF es potenciada en la membrana sinovial (2, 9). Los fibroblastos sinoviales cultivados obtenidos de pacientes con artritis reumatoide secretan cantidades significativas de MIF de forma espontánea en cultivo, y la secreción aumenta más después de la estimulación proinflamatoria (2). La estimulación de MIF de los fibroblastos sinoviales reumatoides da como resultado una mayor expresión de las metaloproteinasas de la matriz (16), así como la inducción de la fosfolipasa A_2 (PLA_2) y expresión de la COX-2 (29). También se ha mostrado que la inmunoneutralización de la actividad del MIF en cultivos de sinoviocitos inhibe la expresión de la COX-2 inducida por IL- 1β y ARNm de PLA_2 (29). La administración de un anticuerpo dirigido contra MIF neutralizante también retrasa el inicio y disminuye la gravedad de la artritis inducida por colágeno de tipo II en ratones (30) e inhibe profundamente el desarrollo de la artritis inducida por adyuvante en ratas (31). Por lo tanto, hay pruebas considerables que implican al MIF en la patogénesis de la artritis inflamatoria.

20 En el presente documento se describe una asociación significativa entre los pacientes que son homocigóticos para el alelo 5-CATT de expresión baja y la enfermedad reumatoide menos agresiva. Solo 1/79 (1,2%) de los pacientes con artritis reumatoide grave heredan este genotipo, comparado con 101105 (9,5%) de los pacientes con enfermedad no progresiva más leve. Esto sugiere que una predisposición genética a la expresión baja de MIF protege contra la inflamación persistente y/o la destrucción articular. Actualmente no se sabe que factores de transcripción pueden estar implicados en la modulación de los efectos transcripcionales de la región polimórfica, pero el alelo 5-CATT muestra menos respuestas *in vitro* tanto a la estimulación con suero como con forskolina así como menor actividad basal. También existe un elemento repetido CATT en el promotor del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano (GM-CSF), y es necesario para la actividad del promotor (32, 33). Se ha mostrado que el factor nuclear YY1³⁴, y más recientemente los factores AP-1 y SP-1, pueden formar complejos con esta región del promotor de G-CSF (35). Sigue sin estar determinado si cualquiera de estos mismos factores también influye en la actividad de la repetición CATT de MIF.

35 La región de la repetición CATT en el gen *Mif* contiene varios sitios de unión del factor de transcripción Pit-1 putativo. Pit-1 es un factor de transcripción específico de la hipófisis que es crítico para la expresión de las hormonas hipofisarias tales como la prolactina y la hormona del crecimiento (36). La glándula hipofisaria anterior es una fuente importante de MIF en roedores (3) y secreta MIF en respuesta al estrés fisiológico o infeccioso (37). También se ha mostrado que el factor de liberación de corticotropina (CRF) es un potente inductor de la expresión de MIF en células hipofisarias cultivadas. Un reciente análisis funcional del promotor del gen de MIF murino usando células hipofisarias de rata y la línea celular hipofisaria AtT-20 demostró que la expresión génica inducida por CRF depende de la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP (38). Es interesante que han aparecido recientemente en la bibliografía las publicaciones de la conexión del locus de CRF con la artritis reumatoide, y hay alguna prueba de que el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal (HPA) puede tener una función en la patogénesis de la artritis reumatoide en determinados pacientes. Se ha mostrado que los pacientes con artritis reumatoide activa tienen niveles diurnos de cortisol anormalmente bajos frente a la función hipofisaria y suprarrenal normales, sugiriendo un defecto a nivel hipotalámico (40). Dada la capacidad del MIF a contrarregular la acción glucocorticoide en el sistema inmunitario (revisado por Bucala (1)), la expresión de MIF por la glándula hipofisaria anterior puede ser importante para el desarrollo de enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide.

45 Desde el inicio de estos estudios, se ha descrito un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) -173*G/C en el promotor del gen *Mif*, por Donn y col. (41) y se mostró que estaba asociado con la artritis idiopática de inicio juvenil sistémica (AIJS). Se vio la posesión de al menos un alelo 173*C en 36,8% de los pacientes con AIJS comparado con 20,3% de la población normal (41). Sin embargo, no hay información relacionada con el efecto de este SNP en la expresión génica. Un estudio preliminar de los autores de la presente invención indica que el alelo 173*C no puede explicar los datos de asociación presentes o los resultados de los ensayos del promotor; realmente no hay pruebas del desequilibrio de ligamiento entre el alelo 173*C y el alelo 5-CATT (no se muestran los datos).

55 Se considera que el $TNF\alpha$ es una citoquina efectora crítica en la artritis reumatoide, y la terapia dirigida contra el $TNF\alpha$ ha surgido para tener una alta eficacia en el tratamiento de esta enfermedad (42). Hay que destacar que hay una estrecha relación entre el MIF y el $TNF\alpha$. Parece que el MIF actúa como un importante regulador corriente arriba de la expresión del $TNF\alpha$. El MIF promueve la secreción del $TNF\alpha$ de macrófagos y anula la capacidad de los glucocorticoides para suprimir la producción de $TNF\alpha$ de los macrófagos (43). La inmunoneutralización de MIF también reduce los niveles en la circulación de $TNF\alpha$ (3). En un marco clínico, el análisis de los polimorfismos de MIF proporciona un pronosticador de la gravedad de la enfermedad, en particular en enfermedades inflamatorias y más en

particular en la enfermedad reumatoide, y puede ayudar a la selección de la terapia de intervención. Los datos del presente documento también reafirman la potencial importancia del MIF como una diana terapéutica en la artritis reumatoide y posiblemente otras enfermedades inflamatorias.

Parte experimental

5 Materiales y procedimientos

Pacientes: las muestras de ADN se obtuvieron del Banco de Datos para Enfermedades Reumáticas de Wichita y eran representativas de pacientes caucasianos con seguimiento en consultorio reumatológico desde 1974. Los pacientes con artritis reumatoide se dividieron en 2 grupos usando los siguientes criterios: A) grave (n=79); edad media de inicio 55 años, duración media de la enfermedad de 13 años, tasa media de puntuación de Larsen de 4,0, valoración media de RF de 339,24 y una puntuación media de HAQ de 1,36. B) Media (n=105); edad media de inicio 45 años, duración media de la enfermedad de 15 años, puntuación media de Larsen de 1,0, valoración media de RF de 362,84 y una puntuación media de HAQ de 0,93. Voluntarios caucasianos sanos proporcionaron ADN genómico que se usó como el grupo normal de control (n=159).

Extracción de ADN: El ADN se extrajo de sangre entera usando el kit G Nome (Bio 101 Inc., CA, EE. UU.) y de los cepillos bucales usando el Pure Gene Kit® (Gentra Systems Inc., MN, EE. UU.).

Secuenciación del gen *Mif* y análisis de polimorfismo: El gen *Mif* (número de acceso en GenBank: L19686, incorporado en el presente documento en su totalidad por referencia) está situado en el cromosoma 22q11.2 (44). El gen tiene 2167 pb de longitud y tiene 3 exones separados por 2 intrones de 189 pb y 95 pb. Se usaron 4 conjuntos de cebadores para extender el gen entero (tabla 1, a continuación).

Tabla 1. Secuencias de cebadores y condiciones para la PCR en el gen <i>Mif</i>					
Conjunto de cebadores	Localización de los cebadores	Secuencias de los cebadores (5'-3')	Temp. de reasociación (°C)	Condiciones especiales	Tamaño de producto de la PCR
Conj. 1	MIF-F (-1074) MIF-R (-421)	TGCAGGAACCAATACCCATAGG (SEQ. ID NO: 1) TGCGTGAGCTTGTGTGTTTGAG (SEQ. ID NO: 2)	58,1		654 pb
Conj.2	MIF-F (-441) MIF-R (+4)	TCAAACACACAAGCTCACGCA (SEQ. ID NO: 3) TGGTCCCGCCTTTTGTG (SEQ. ID NO: 4)	60,8	DMSO 10%	445 pb
Conj.3	MIF-F (-13) MIF-R (+395)	CACAAAAGGCGGGACCACA (SEQ. ID NO: 5) ACTGCGAGGAAAGGGCG (SEQ. ID NO: 6)	62,3	7-Desaza-GTP 25% en dNTP 1,25 mM	408 pb
Conj.4	MIF-F (+379) MIF-R (+1043)	CGCCCTTTCCTCGCAGT (SEQ. ID NO: 7) TAGAATGGAAAGACACTGGG (SEQ. ID NO: 8)		DMSO 10%	665 pb

20 La reacción de la PCR consistía en 1x tampón de PCR II (Perkin Elmer, CA, EE. UU.), 20 ng de ADN, MgCl₂ 1,5 mM, 20 pmoles de cada uno de los cebadores directo e inverso y 0,5 unidades de polimerasa Amplitaq Gold® (Perkin Elmer - Applied Biosystems, CA, EE. UU.). Los dNTP se usaron en una concentración 0,2 mM excepto para el conjunto 3, donde los dNTP 0,2 mM tenían 0,05 mM de 7-desaza-GTP en una reacción de PCR de 20 µl. Las condiciones de la PCR eran las siguientes: 95°C/12 min, seguido de 40 ciclos de 95°C/30 s, temp. de reasociación (Tabla 1)/30 s, 72°C/60 s y 72°C/10 min. Los productos de la PCR se resolvieron usando un gel de agarosa al 1% teñido

25

con bromuro de etidio.

5 Los productos de la PCR de 6 controles normales y 6 pacientes con artritis reumatoide se secuenciaron usando el kit de reacción listo para secuenciación Big Dye Terminator® Cycle Sequencing (Perkin Elmer - Applied Biosystems). Se recopilaron las secuencias de los cuatro conjuntos de cebadores para representar el gen *Mif* entero y se compararon para analizar diferencias entre el grupo de artritis reumatoide y los controles normales.

Secuenciación rápida para el polimorfismo de repetición CATT: Se usó el cebador directo del conjunto 1 (SEQ ID NO: 1) con el cebador inverso MIF-R -728 (5' - AATGGTAAACTCGGGGAC - 3'; SEQ ID NO: 9). El cebador inverso se marcó de forma fluorescente con TET para permitir la detección de los productos de la PCR usando la electroforesis capilar (45).

10 Las condiciones de la PCR eran 1x tampón de PCR II, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 0,75 pmoles de cada cebador, 1 ng de ADN, 0,05 µl de la polimerasa AmpliTaq Gold® en una reacción de PCR de 10 µl. Las condiciones de ciclo de la PCR usadas eran las mismas descritas antes excepto para las condiciones de reasociación de 53,8°C/30 s. Se añadió 1 µl de producto de PCR diluido a 12 µl de formamida desionizada que contenía 0,5 µl de GS-500 TAMRA de tamaño estándar (Perkin Elmer-Applied Biosystems). Las muestras se desnaturalizaron antes de resolverlas usando un
15 ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer-Applied Biosystems). Las muestras de ADN de individuos homocigotos que previamente se habían secuenciado completamente se usaron como controles para los tamaños de repeticiones obtenidos por electroforesis capilar.

Clonación del promotor de MIF y ensayo de indicador: El ADN genómico obtenido del cribado primario que contenía el polimorfismo de repetición de 5, 6, 7 u 8 tetranucleótidos CATT se usó como un molde para la PCR para la
20 clonación inicial en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, CA, EE. UU.). Se usaron los siguientes cebadores para generar un producto de PCR de 1173 - 1189 pb que representa 1071 - 1087 pb de la región flanqueadora en dirección 5' de la secuencia que codifica MIF más las primeras 102 pb del exón I (véase la figura 1):

Cebador directo: 5-CTCGAGCTGCAGGAACCAATACCCAT-3' (SEQ ID NO: 10);

Cebador inverso: 5'-AAGCTTGGCATGATGGCAGAAGGACC-3' (SEQ ID NO: 12).

25 Después de completar la secuenciación, la región del promotor se escindió del vector pCR2.1 y se clonó en los sitios Xho1/HindIII del vector de luciferasa pGL3-Basic (Promega, WI, EE. UU.). Este vector contiene el ADNc que codifica una versión modificada de la luciferasa de luciérnaga en ausencia de elementos potenciadores o promotores eucariotas. Se generaron construcciones de luciferasa reguladas directamente por el promotor de MIF que contenían 5,
30 6, 7 u 8 polimorfismos CATT. Se llevaron a cabo transfecciones transitorias usando 3 µl de Fugene 6 (Roche, NJ, EE. UU.) y 1 µg de ADN por pocillo de una placa de 6 pocillos según las instrucciones del fabricante. Las líneas celulares usadas incluían Cos-7 (fibroblastos de riñón de mono), A549 (epitelio pulmonar humano) y CCD-19LU (fibroblastos pulmonares humanos primarios). Los datos se normalizaron respecto a un control interno de luciferasa Renilla que estaba regulado por el promotor de la timidina quinasa del virus Herpes simplex (vector PRL-TK - Promega, WI, EE. UU.). Posteriormente, cada transfección consistía en 800 ng de ADN de ensayo (gen de la luciferasa regulado por el
35 promotor de MIF) combinado con 200 ng de vector de control de ADN PRL-TK. Los ensayos de la luciferasa se midieron usando el luminómetro TD-20/20 (Turner Designs, CA, EE. UU.) y el sistema indicador Dual Luciferase Reporter System (Promega, WI, EE. UU.). La actividad basal del promotor se determinó midiendo la actividad de la luciferasa 36 h después de la transfección. En algunos casos, las células se estimularon durante las últimas 20 h de cultivo antes de la medición de la actividad del promotor.

40 **Genotipo y análisis estadístico:** Los datos se analizaron usando el software Genotyper® 2.1 (Perkin Elmer-Applied Biosystems, CA, EE. UU.). La relación entre los genotipos y el estado de la enfermedad (normal, leve o grave) se examinó usando el ensayo de chi cuadrado y el ensayo exacto de Fisher. Los ensayos de gen indicador se repitieron de 3 a 10 veces por duplicado. Los datos se representan como la media ± DT y se compararon por ensayos U de Mann-Whitney no paramétricos. La significancia se definió como P<0,05.

45 Resultados

Identificación de una repetición microsatélite en el promotor de Mif. Se usó el ADN genómico de 6 voluntarios normales y 6 pacientes reumatoides para la secuenciación completa del gen *Mif*. Debido al alto contenido de GC de este gen, el análisis se llevó a cabo en 4 secciones. El alineamiento de las 12 secuencias identificó un polimorfismo de repetición del tetranucleótido CATT en la región del promotor en la dirección 5' en la posición -817
50 (figura 1). Se encontraron los individuos que tenían alelos con 5, 6, 7 u 8 repeticiones CATT en sus secuencias. Los individuos eran heterocigotos u homocigotos para estos alelos, aunque no se encontraron homocigotos 7-CATT en la población normal ni se encontraron homocigotos 8-CATT en ninguna población estudiada.

Para la detección rápida del polimorfismo del promotor, se diseñó un cebador inverso marcado de forma fluorescente que estaba próximo a las unidades de repetición del tetranucleótido con el fin de amplificar un fragmento de
55 PCR más pequeño (340-352 pb). Después se analizó este fragmento usando electroforesis capilar en un analizador ABI 310 Genetic. Se usó el ADN de individuos previamente secuenciado como un molde para generar los fragmentos de ADN de control, con el fin de correlacionar el tamaño de fragmento observado en el analizador ABI 310 con el número

de repeticiones CATT en las muestras de ensayo. Por consiguiente, los 4 tamaños de producto de la PCR eran de 340, 344, 348 y 352 pb de longitud, y esto se corresponde con 5, 6, 7 y 8 repeticiones CATT, respectivamente. Los genotipos observados eran: 5,5; 5,6; 5,7; 6,6; 6,7; 7,7; 5,8; y 6,8. El genotipo 8,8 no se vio ni en la población normal (n=159) ni de pacientes (n=184); y el genotipo 7,7 no se vio en la población normal, pero se observó en un paciente en el grupo de artritis reumatoide.

Distribución de alelos *Mif* en controles normales y pacientes con artritis reumatoide. La distribución de los diferentes alelos *Mif* en controles normales, pacientes con artritis reumatoide leve y artritis reumatoide grave, se muestra en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2. Distribución de los genotipos MIF y la frecuencia del alelo 5-CATT en poblaciones normales y con artritis reumatoide (AR)

Población	Genotipo MIF								Frecuencia del alelo 5-CATT	
	5,5	6,6	7,7	5,6	5,7	6,7	5,8	6,8	alelos 5,5 ó 5,X	alelos X,X
Normal (n=159)	8 (5,03%)	53 (33,33%)	0	61 (38,36%)	10 (6,3%)	25 (15,72%)	1 (0,63%)	1 (0,63%)	80 (50,31%)	79 (49,69%)
Wichita AR leve (n=105)	10 (9,52%)	49 (46,67%)	1 (0,95%)	23 (21,91%)	8 (7,62%)	14 (13,33%)	0	0	41 (39,05%)	64 (60,95%)
Wichita AR grave (n=79)	1 (1,27%)	40 (50,63%)	0	20 (25,31%)	4 (5,06%)	13 (16,46%)	0	1 (1,27%)	25 (31,65%)	54 (68,35%)

No había desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles normales ($p=0,69$). Se encontró que las frecuencias de los alelos 5, 6, 7 y 8 eran 0,277, 0,607, 0,11 y 0,006 respectivamente.

El número de individuos que llevaban al menos un alelo 5-CATT disminuye de 50,31% en la población normal a 31,65% en la población con artritis reumatoide grave (tabla 2). La diferencia entre los pacientes con artritis reumatoide grave y los de control es estadísticamente significativa ($p<0,02$). Los casos y controles analizados en este estudio no se correspondían estrechamente para el origen étnico y geográfico, por lo tanto, los datos deben interpretarse con precaución. Por lo tanto, se llevó a cabo una comparación de genotipos específicos entre poblaciones con artritis reumatoide leve y grave, como se muestra en la tabla 2. El genotipo 5,5 se observa en 9,5% de los pacientes con artritis reumatoide leve, pero disminuye significativamente a 1,3% en pacientes con la enfermedad grave ($p = 0,0252$ por el ensayo exacto de Fisher). Estos datos indican que un alelo 5-CATT homocigoto es protector para el desarrollo de la enfermedad grave.

Efecto del polimorfismo de repetición CATT en la actividad del promotor de MIF. Para investigar si el polimorfismo de repetición CATT estaba asociado con la regulación funcional de la expresión de MIF, se desarrolló un ensayo de gen indicador y se estudió en condiciones definidas *in vitro*. Los ensayos de gen indicador se han usado ampliamente para estudiar la regulación transcripcional, o como lecturas para el seguimiento del factor de transcripción (21, 22).

La transfección de construcciones de luciferasa reguladas por el promotor de *Mif* en células Cos-7, células A549 y células CCD-19Lu se asoció con la actividad basal fuerte del promotor, como se indica por la alta producción de luciferasa, cuando se compara con el vector de control (pGL3-Basic) (figura 2 y datos no mostrados). La actividad del promotor aumentó por la forskolina (un inductor de la síntesis de CAMP, 23) y la estimulación con suero (figura 3), así como por la estimulación con éster de forbol (datos no mostrados). En general, la actividad basal del promotor era alta en cada una de las líneas celulares ensayadas cuando se comparaba con los controles negativos (vector pGL3 vacío) y positivo (pRL-TK), y estos datos parecían que se correlacionaban con el alto nivel de expresión de la proteína MIF endógena que se observó en estas líneas celulares (datos no mostrados). Hay que indicar, en cada una de las líneas celulares ensayadas, que la construcción del promotor de MIF con repetición 5-CATT mostró actividad transcripcional significativamente menor cuando se comparó con las construcciones de promotor con repeticiones de 6, 7 u 8-CATT.

Lista de referencias

Los siguientes documentos se citan entre paréntesis mediante un número en la memoria descriptiva anterior.

1. Bucala, "MIF Rediscovered: Cytokine, Pituitary Hormone, and Glucocorticoid-Induced Regulator of the Immune Response", *FASEB Journal*, 10, 1607-1613 (1996).
2. Leech, y col. "Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rheumatoid Arthritis: Evidence of Proinflammatory Function and Regulation by Glucocorticoids", *Arthritis Rheum.*, 42, 1601-1608 (1999).
- 5 3. Bernhagen y col., "MIF is a Pituitary-Derived Cytokine that Potentiates Lethal Endotoxemia", *Nature*, 365, 756-759 (1993).
4. Bernhagen, y col., "The Emerging Role of MIF in Septic Shock and Infection", *Biotherapy*, 1995; 8,123-127 (1995).
- 10 5. Donnelly, y col., "Macrophage Migration Inhibitory Factor and Acute Lung Injury", *Chest*, 1999; 116, 111S (1999).
6. Yang, y col., "Reversal of Established Rat Crescentic Glomerulonephritis by Blockade of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Potential Role of MIF in Regulating Glucocorticoid Production", *Molecular Medicine*, 4, 413-424 (1998).
- 15 7. David, "Delayed Hypersensitivity *in vitro*: Its Mediation by Cell-Free Substances Formed by Lymphoid Cell-Antigen Interaction", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 56, 72-77 (1996).
8. Calandra, y col., "Macrophage is an Important and Previously Unrecognized Source of Macrophage-Migration Inhibitory Factor", *J. Exp. Med.*, 179, 1895-1902 (1994).
9. Onodera, y col., "High Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Synovial Tissues of Rheumatoid Joints", *Cytokine*, 11,163-167 (1999).
- 20 10. Calandra, y col., "Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*; 6, 164-170 (2000).
11. Bacher, y col., "An Essential Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in T-cell Activation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7849-7854 (1996).
- 25 12. Satoskar, y col., "Migration-Inhibitory Factor Gene-Deficient Mice are Susceptible to Cutaneous Leishmania Major Infection", *Infect. Immun.*; 69, 906- 911 (2001).
13. Benigni, y col., "The Proinflammatory Mediator Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces Glucose Catabolism in Muscle", *J. Clin. Invest*, 2000; 106, 1291-1300 (2000).
14. Abe, y col., "Regulation of the CTL Response by Macrophage Migration Inhibitory Factor", *J. Immunol.*; 166, 747-753 (2001).
- 30 15. Benihagen, y col., "Purification and Characterization of the Cytokine Macrophage-Migration Inhibitory Factor (MIF)", *FASEB Journal*, 8, A1417 (1994).
16. Onodera, y col., "Macrophage Migration Inhibitory Factor Up-Regulates Expression of Matrix Metalloproteinases in Synovial Fibroblasts of Rheumatoid Arthritis", *J. Biol. Chem.*, 275, 444-450 (2000).
- 35 17. Meyer-Siegler, y col., "Macrophage Migration Inhibitory Factor Increases MMP-2 Activity in DU-145 Prostate Cells", *Cytokine*, 12, 914-921 (2000).
18. Mitchell, y col., "Sustained Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). Regulatory Role in Cell Proliferation and Glucocorticoid Action", *J. Biol. Chem.*; 274, 18100-18106 (1999).
- 40 19. Hudson, y col., "A Proinflammatory Cytokine Inhibits p53 Tumor Suppressor Activity", *J. Exp. Med.*, 190: 1375-1382 (1999).
20. Mitchel, y col., "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Sustains Macrophage Proinflammatory Function by Inhibiting p53: Regulatory Role in the Innate Immune Response", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (pendiente de publicación).
- 45 21. Alam, y col., "Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription", *Anal. Biochem.*, 188, 245-254 (1990).
22. Naylor, y col., "Reporter Gene Technology: the Future Looks Bright", *Biochem. Pharmacol.*, 58, 749-757 (1999).
23. Seamon, y col., "Forskolin: A Unique Diterpene Activator of Cyclic AMP-Generating Systems", *J. Cyclic*

- Nucleotide Res.*, 7, 201-224 (1981).
24. McGuire, y col., "Variation in the TNF- α Promoter Region Associated with Susceptibility to Cerebral Malaria", *Nature*, 371, 508-510 (1994).
- 5 25. Francis, y col. "Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease", *Circulation*, 99, 861-866 (1999).
26. Buchs, y col., "IL-1 β and IL-1 Ra Gene Polymorphisms and Disease Severity in Rheumatoid Arthritis: Interaction with Their Plasma Levels", *Genes Immun.*, 2, 222-228 (2001).
27. Mu, y col., "Tumor Necrosis Factor a Microsatellite Polymorphism is Associated with Rheumatoid Arthritis Severity Through an Interaction with the HLA-DRB1 Shared Epitope", *Arthritis Rheum.*, 42, 438-442 (1999).
- 10 28. van Krugten, y col., "Association of the TNF +489 Polymorphism with Susceptibility and Radiographic Damage in Rheumatoid Arthritis", *Genes Immun.*, 1, 91-96 (1999).
29. Sampey, y col., "Régulation of Synoviocyte Phospholipase A2 and Cyclooxygenase 2 by Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Arthritis Rheum.*, 44, 1273-1280 (2001).
- 15 30. Mikulowska, y col., "Macrophage Migration Inhibitory Factor is Involved in the Pathogenesis of Coliagen Type 11-Induced Arthritis in Mice", *J. Immunol.*, 158, 5514-5517 (1997).
31. Leech, y col., "Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor by Endogenous Glucocorticoids in Rat Adjuvant-Induced Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 43, 827-833 (2000).
32. Nimer, y col., "The Repeated Sequence CATT(A/T) is Required for Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Promoter Activity", *Mol. Cell. Biol.*, 10, 6084-6088 (1990).
- 20 33. Nimer, y col. "Adjacent, Cooperative Elements Form a Strong, Constitutive Enhancer in the Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene", *Blood*, 87, 3694-3703 (1996).
34. Ye, y col., "Identification of a DNA Binding Site for the Nuclear Factor YY1 in the Human GM-CSF Core Promoter", *Nucleic Acids Res.*, 22, 5672-5678 (1994).
- 25 35. Ye, y col., "Characterization of the Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Gene Ppromoter: An AP I Complex and an Sp1 - Related Complex Transactivate the Promoter Activity that is Suppressed by a YY1 Complex", *Mol. Cell Biol.*, 16, 157-167 (1996).
36. Cohen, y col., "Role of Pit-1 in the Gene Expression of Growth Hormone, Prolactin, and Thyrotropin", *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 25, 523-540(1996).
- 30 37. Calandra, y col., "MIF as a Glucocorticoid-Induced Modulator of Cytokine Production", *Nature*, 377, 68-71 (1995).
38. Waeber, y col., "Transcriptional Activation of the Macrophage Migration-Inhibitory Factor Gene by the Corticotropin-Releasing Factor is Mediated by the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Responsive Element-Binding Protein CREB in Pituitary Cells", *Mol. Endocrinol*, 12, 698-705 (1998).
- 35 39. Baerwald, y col., "Corticotropin Releasing Hormone (CRH) Promoter Polymorphisms in Various Ethnic Groups of Patients with Rheumatoid Arthritis", *Z. Rheumatol.*, 59, 29-34 (2000).
40. Chikanza, y col., "Defective Hypothalamic Response to Immune and Inflammatory Stimuli in Patients with Rheumatoid Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 35,1281-1288 (1992).
41. Donn, y col., "A Novel 5'-Flanking Region Polymorphism of Macrophage Migration Inhibitory Factor is Associated with Systemic-Onset Juvenile Idiopathic Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 44, 1782-1785 (2001).
- 40 42. Feldmann, y col., "Anti-TNF Alpha Therapy of Rheumatoid Arthritis: What Have We Learned?", *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 163-196 (2001).
43. Calandra, y col., "MIF, a Previously Unrecognized Macrophage Cytokine, Induces Macrophages to Secrete TNF- α and Overcomes Dexamethasone-Suppression of TNF Secretion", *Clinical Research*, 42, A138 (1994).
- 45 44. Paralkar, y col., "Cloning the Human Gene for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)", *Genomics*, 19: 48-51 (1994).
45. Tsuda, y col., "Separation of Nucleotides by High-Voltage Capillary Electrophoresis", *J. Appl. Biochem.*, 5, 330-336 (1983).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de diagnóstico *in vitro* de la existencia o de la predisposición a la artritis reumatoide, que comprende detectar 5, 6, 7 u 8 unidades de repetición del tetranucleótido CATT entre las posiciones -817 y -785 del gen de MIF humano, usando el conjunto de cebadores de amplificación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12, en el que la presencia de una unidad de repetición del tetranucleótido CATT 5,5 homocigótica indica la existencia o la predisposición a una gravedad baja de la enfermedad, y en el que la ausencia de una unidad de repetición del tetranucleótido CATT 5,5 homocigótica indica la existencia o la predisposición a una gravedad alta de la enfermedad.
- 10 2. Un procedimiento de detección *in vitro* de la gravedad de la artritis reumatoide, que comprende detectar la presencia o ausencia de una unidad de repetición del tetranucleótido CATT 5,5 homocigótica entre las posiciones -817 y -785 del gen de MIF humano, usando el conjunto de cebadores de amplificación de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12, en el que la presencia de una unidad de repetición del tetranucleótido CATT 5,5 homocigótica está asociada con un riesgo menor de artritis grave, y en el que la ausencia de una unidad de repetición del tetranucleótido CATT 5,5 homocigótica está asociada con un riesgo mayor de artritis grave.
- 15 3. Uso de un conjunto de cebadores para amplificar una región del promotor de MIF humano, en el que el tetranucleótido CATT en la posición -817 se repite 5 veces, 6 veces, 7 veces u 8 veces.
- 20 4. Uso según la reivindicación 3, en el que se usa uno de los siguientes conjuntos de cebadores: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 8, o SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12.

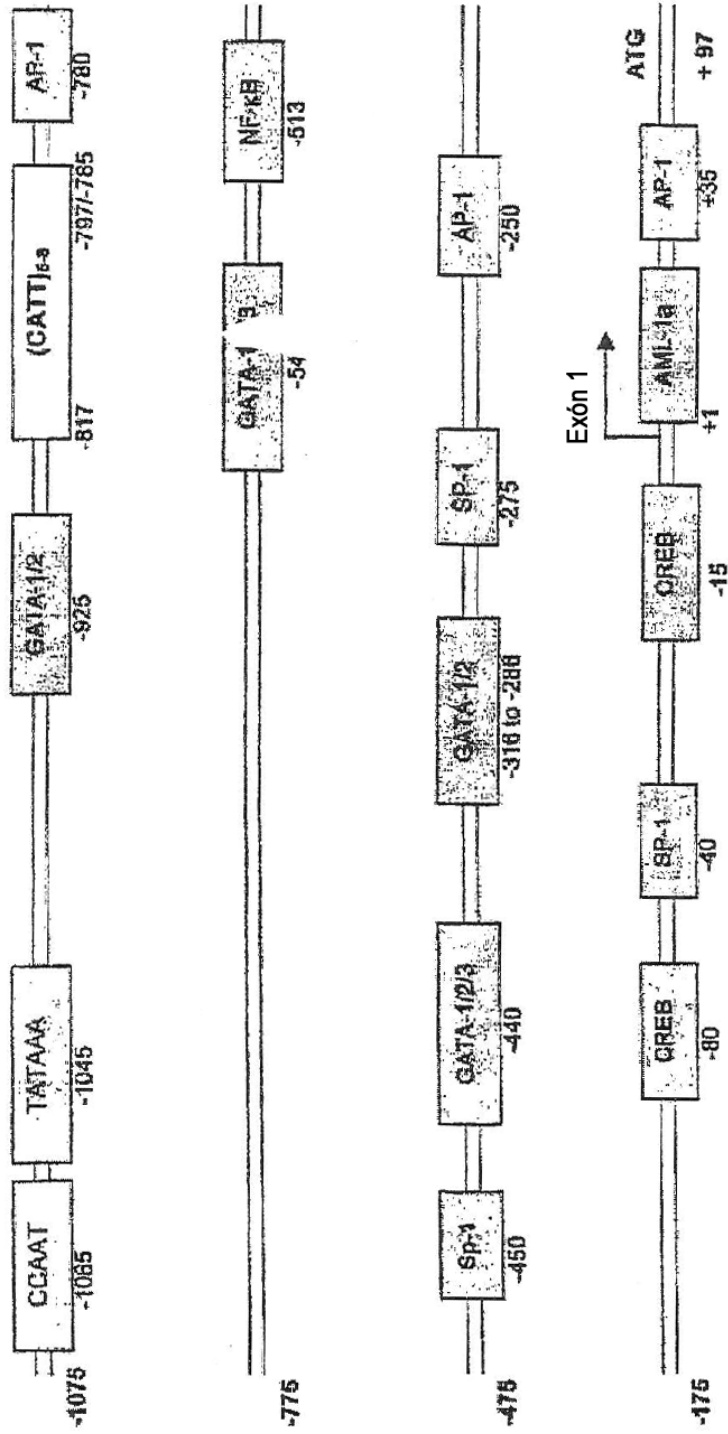


FIG. 1

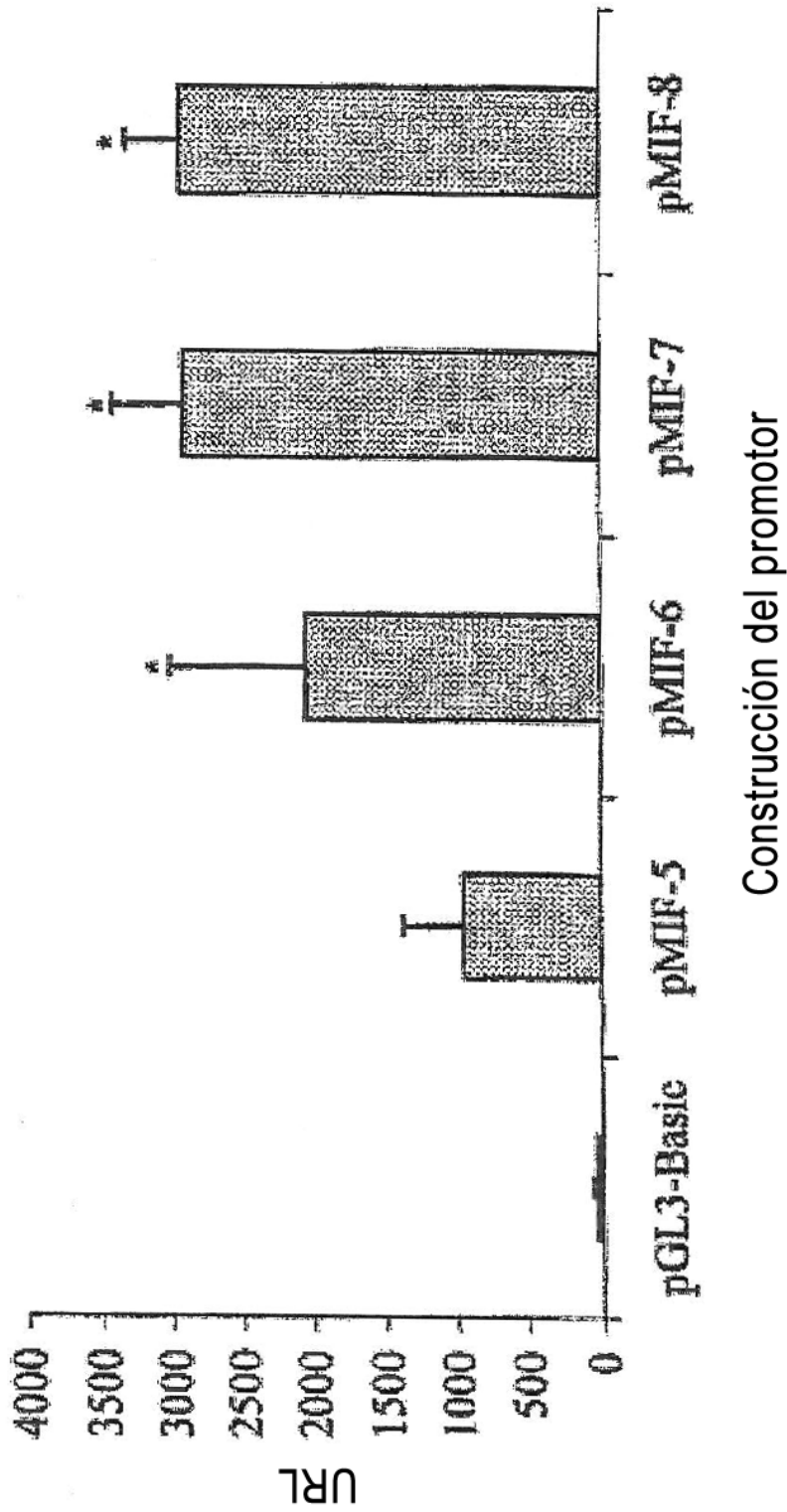


FIG. 2

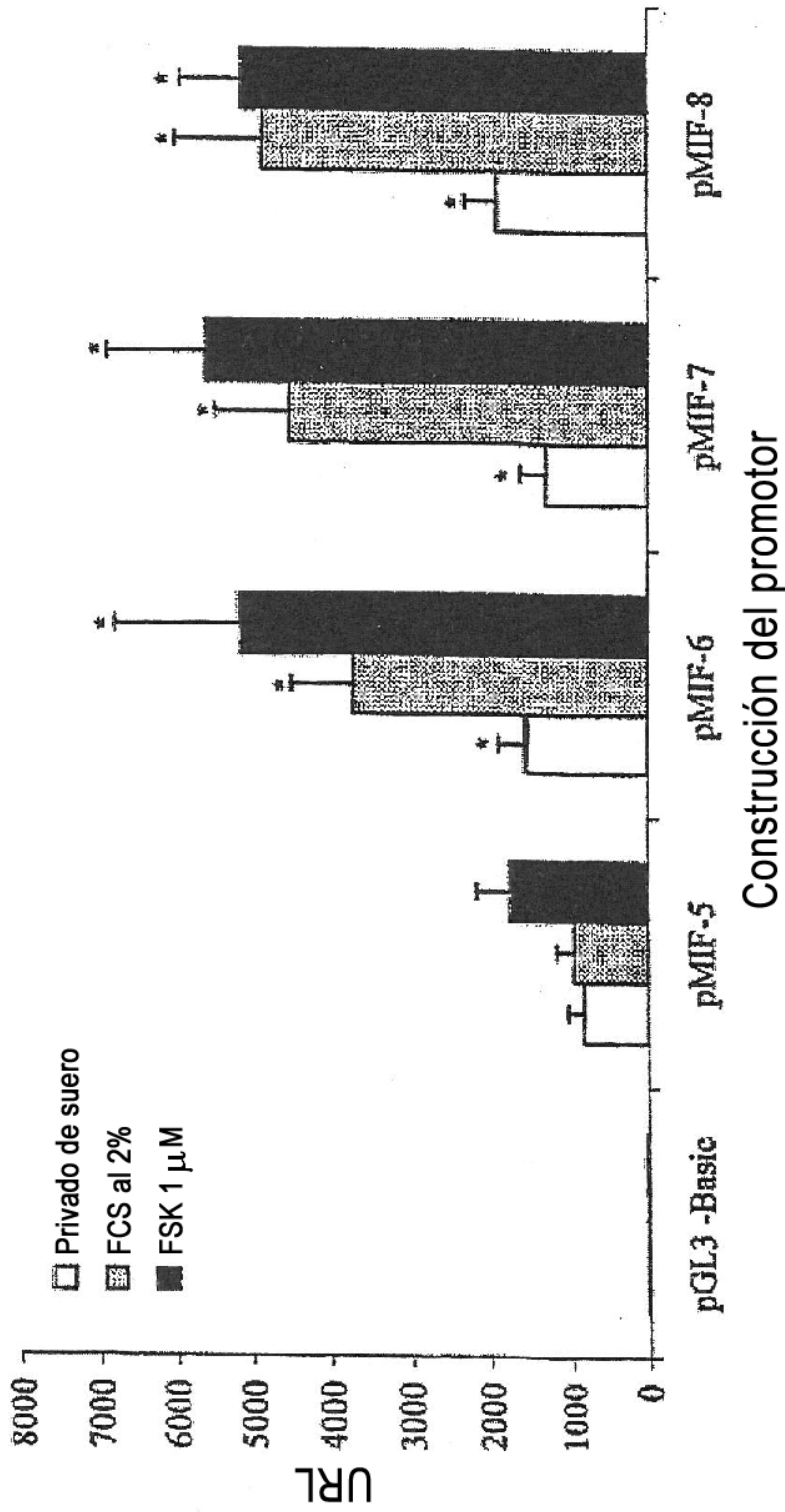


FIG. 3