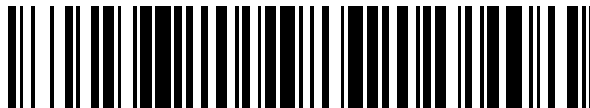


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 032**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2004 PCT/US2004/027945**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2005 WO05020919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2004 E 04782427 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 1658037**

54 Título: **Método de tratamiento y bioensayo que implica el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) como factor depresor del miocardio de origen cardiaco**

30 Prioridad:

29.08.2003 US 498659 P

25.02.2004 US 547054 P

25.02.2004 US 547056 P

25.02.2004 US 547057 P

25.02.2004 US 547059 P

26.03.2004 US 556440 P

27.08.2004 US 927494

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.01.2017

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)

One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015, US;

BAXTER HEALTHCARE SA (33.3%) y

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF

TEXAS SYSTEM (33.3%)

72 Inventor/es:

GIROIR, BRETT;

WILLIS, MONTE;

DE LA CRUZ, VIDAL y

SIELECKI, THAIS

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 599 032 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

Método de tratamiento y bioensayo que implica el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) como factor depresor del miocardio de origen cardiaco

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La invención se refiere en general a la patología y fisiología en especies de vertebrados que implican citocinas y otros mecanismos de señalización celular y, también, a ensayos de diagnóstico que implican citocinas y otros mecanismos de señalización celular. Otros aspectos de la invención se refieren al factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) como factor depresor del miocardio y como mediador de la disfunción cardiaca inducida por endotoxinas *in vivo*. Otros aspectos de la invención se refieren a mediar y / o inhibir la producción o la actividad de MIF, y a composiciones, para su uso en el tratamiento y prevención de la disfunción cardiaca asociada a quemaduras, sepsis, quemaduras u otras afecciones relacionadas con quemaduras. Otros aspectos de la invención se refieren a la liberación de MIF desde el corazón, el hígado y el bazo, y al papel de señalización del receptor I/II del TNF después de la exposición a LPS. Otros aspectos de la invención se refieren a la liberación de MIF independiente de la señalización del receptor I/II del TNF en el suero. Otros aspectos de la invención se refieren a la expresión de CD74 en los cardiomiocitos y a su mediación de la disfunción cardiaca.

20

Antecedentes de la tecnología

25 El factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina proinflamatoria, pluripotencial, cuyos mecanismos de acción se han analizado a lo largo de las últimas cuatro décadas. El conocimiento actual en la técnica en relación con el MIF incluye estudios dirigidos a su cristalización como trímero, su estado de oligomerización fisiológicamente relevante; sus supuesto(s) receptor(es) de membrana; y la relevancia fisiológica de su actividad enzimática intracelular como tautomerasa y oxidorreductasa.

25

30 En muchos estudios se ha demostrado que el MIF desempeña un papel importante en enfermedades tan diversas como artritis reumatoide (M. Leech, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rheumatoid Arthritis: Evidence of Proinflammatory Function and Regulation by Glucocorticoids", *Arthritis Rheum*, 42, 1601-1608 (1999), M. Leech, *et al.*, "Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Evolution of Rat Adjuvant Arthritis", *Arthritis Rheum*, 41, 910-917 (1998), A. Mikulowska, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor is Involved in the Pathogenesis of Collagen Type 11-Induced Arthritis in Mice", *J. Immunol.*, 158, 5514-5517 (1997)), hipersensibilidad de tipo retardado (J. Bernhagen, *et al.*, "An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Tuberculin Delayed-Type Hypersensitivity Reaction", *J. Exp. Med.*, 183, 277-282 (1996), H.Y. Lan, *et al.*, "De Novo Renal Expresión of Macrophage Migration Inhibitory Factor During the Development of Rat Crescentic Glomerulonephritis", *Am. J. Pathol.*, 149, 1119-1127 (1996), H.Y. Lan, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression in Human Renal Allograft Rejection", *Transplantation*, 66, 1465-1471 (1998), H.Y. Lan, *et al.*, "TNF-Alpha Up-Regulates Renal MIF Expression in Rat Crescentic Glomerulonephritis", *Mol. Med.*, 3, 136-144 (1997), T. Shimizu, *et al.*, "Increased production of Macrophage Migration Inhibitory Factor by PBMCs of Atopic Dermatitis", *J. Allergy Clin. Immunol.*, 104, 659-669 (1999)), enfermedad pulmonar inflamatoria (S.C. Donnelly, *et al.*, "Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Respiratory Distress Syndrome", *Nat. Med.*, 3, 320-323 (1997), H. Makita, *et al.*, "Effect of Anti-Macrophage Migration Inhibitory Factor Antibody on Lipopolisaccharide-Induced Pulmonary Neutrophil Accumulation", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 158, 573-579 (1998), A.G. Rossi, *et al.*, "Human Circulating Eosinophils Secrete Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). Potential Role in Asthma", *J. Clin. Invest.*, 101, 2869-2874 (1998)), cáncer (J. Chesney, *et al.*, "An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Angiogenesis and Growth of a Murine Lymphoma", *Mol. Med.*, 5, 181-191 (1999), M.T. del Vecchio, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor in Prostatic Adenocarcinoma: Correlation with Tumor Grading and Combination Endocrine Treatment-Related Changes", *Prostate*, 45, 51-57 (2000), J.D. Hudson, *et al.*, "AI Proinflammatory Citocina Inhibits p53 Tumor Suppressor Activity", *J. Exp. Med.*, 190, 1375-1382 (1990), A. Kamimura, *et al.*, "Intracellular Distribution of Macrophage Migration Inhibitory Factor Predicts the Prognosis of Patients with Adenocarcinoma of the Lung", *Cancer*, 89, 334-341 (2000), K. Meyer-Siegler, *et al.*, "Increased Stability of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in DU-145 Prostate Cancer Cells", *J. Interferon Citocina Res.*, 20, 769-778 (2000), T. Shimizu, *et al.*, "High Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Human Melanoma Cells and Its Role in Tumor Cell Growth and Angiogenesis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 751-758 (1999), Takahashi, *et al.*, "Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the Mechanism of Tumor Cell Growth", *Mol. Med.*, 4, 707-714 (1998)), infarto de miocardio (M. Takahashi, *et al.*, "Elevation of Plasma Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction", *Am. J. Cardiol.*, 89, 248-249 (2002), M. Takahashi, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Redox-Sensitive Cytokine in Cardiac Myocytes", *Cardiovasc Res.*, 52, 438-445 (2001), C.M. Yu, *et al.*, "Elevation of Plasma Level of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction", *Am. J. Cardiol.*, 88, 774-777 (2001)), y choque séptico (J. Bernhagen, *et al.*, "MIF is a Pituitary-Derived Cytokine that Potentiates Lethal Endotoxaemia", *Nature*, 365, 756-759 (1993), M. Bozza, *et al.*, "Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis", *J. Exp. Med.* 189, 341-346 (1999), T. Calandra, *et al.*, "MIF as a Glucocorticoid-Induced

65

Modulator of Cytokine Production”, *Nature*, 377, 68-71 (1995), T. Calandra, *et al.*, “Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor”, *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000), T. Calandra, *et al.*, “Macrophage Migration Inhibitory Factor is a Critical Mediator of the Activation of Immune Cells by Exotoxins of Gram-Positive Bacteria”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11383-11388 (1998)). Hay cierta evidencia de que los anticuerpos monoclonales o policlonales anti-MIF pueden afectar a la patología de la septicemia, pero su papel no se ha caracterizado exhaustivamente en seres humanos. Sin embargo, durante el choque séptico, el MIF aumenta en el plasma de animales y seres humanos, y el bloqueo de la actividad del MIF por anticuerpos monoclonales o policlonales da como resultado una marcada mejora en la supervivencia de animales con septicemia inducida experimentalmente (M. Bozza, *et al.*, “Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis”, *J. Exp. Med.* 189, 341-346 (1999), T. Calandra, *et al.*, “Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor”, *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000)).

Se ha demostrado el bloqueo de la actividad de MIF con varios inhibidores. Se ha demostrado el bloqueo de la actividad enzimática de MIF con diversos compuestos químicos tal como se muestra en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 10/226.299, presentada el 23 de agosto de 2002, ahora pendiente. Véase también, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.492.428. También se han usado anticuerpos para bloquear la actividad de MIF en la patente estadounidense n.º 6.030.615. También puede inhibirse la expresión de MIF usando tecnología antisentido tal como se da a conocer en la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 08/738.947, presentada el 24 de octubre de 1996, ahora pendiente, o en la patente estadounidense n.º 6.268.151 que demuestra además formulaciones farmacéuticas que pueden usarse con todos los inhibidores de MIF mencionados anteriormente.

Los lipopolisacáridos (LPS) reducen la contactilidad miocárdica intrínseca y se piensa que son importantes en la disfunción miocárdica que se produce en la septicemia y el choque séptico (A.M. Lefer, “Mechanisms of cardiodepression in endotoxin shock”, *Circ Shock Suppl* 1:1-8 (1979), J. E. Parrillo, *et al.*, “A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses *in vitro* myocardial cell performance”, *J. Clin. Invest.* 76:1539-1553 (1985), J.M. Reilly, *et al.*, “A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock”, *Chest*. 95:1072-1080 (1989)). Muchas citocinas proinflamatorias se liberan tras una exposición a LPS y se ha demostrado que median directamente en la disfunción cardíaca observada incluyendo TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, NO y factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) (O. Court, *et al.*, “Clinical review: Myocardial depression sepsis and septic shock”, *Crit. Care* 6:500-508 (2002), L.B. Garner, *et al.*, “Macrophage Migration Inhibitory Factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor”, *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, 285:H2500-2509 (2003), S. Krishnagopalan, *et al.*, “Myocardial dysfunction in the patient with sepsis”, *Curr. Opin. Crit. Care* 8:376-388 (2002)). Recientemente se describió el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) como un factor depresor del miocardio de origen cardíaco en un modelo de exposición a endotoxinas subletal (endotoxicosis) (L.B. Garner, *et al.*, “Macrophage Migration Inhibitory Factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor”, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285:H2500-2509 (2003)). Una exposición a LPS indujo la presencia constitutiva de la citocina proinflamatoria MIF que se liberó de manera máxima hacia las 12 horas. La liberación de MIF en este modelo iba en paralelo con la disfunción cardíaca que se demostró que mediaba el MIF que se retrasó tras la exposición a LPS. La neutralización de MIF mediante anticuerpos anti-MIF dio como resultado una protección significativa que comenzó a las 8 horas y desapareció completamente hacia las 48 horas ((L.B. Garner, *et al.*, “Macrophage Migration Inhibitory Factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor”, *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285:H2500-2509 (2003))). El MIF es único entre las citocinas mencionadas anteriormente en su liberación retardada y su capacidad para bloquear mediadores posteriores.

Los investigadores han notificado previamente una discordancia temporal entre los niveles de TNF- α en el miocardio y la disfunción contráctil que se producía durante la endotoxemia (X. Meng, *et al.*, “TNF-alpha and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship”, *Am. J. Physiol* 275:R502-508 (1998)). Es decir, la disfunción cardíaca no se produjo hasta que los niveles de TNF- α habían vuelto al nivel inicial, lo que sugiere que el TNF- α es una señal centinela importante para otros depresores cardíacos que conspiran más directamente para producir disfunción en la septicemia. Se desconoce la importancia de estas citocinas tempranas, sin embargo, se han sometido a prueba estrategias terapéuticas contra mediadores tempranos del choque séptico tales como modalidades de anticuerpos anti-IL-1 β y anti-TNF- α en ensayos con seres humanos, no observándose beneficios probablemente debido a su aparición temprana en el proceso de enfermedad (C.J. Fisher, *et al.*, “Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial”, *Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group, Jama*, 271:1836-1843 (1994), C.J. Fisher, *et al.*, “Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial”, *The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group, Crit. Care Med.*, 22:12-21 (1994), C. Natanson, *et al.*, “Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis”, *Ann. Intern. Med.*, 120:771-783 (1994), K. Reinhart, *et al.*, “Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned”, *Crit. Care Med.*, 29:S121-125 (2001)).

El factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) está implicado en la patogénesis de varias

enfermedades, incluyendo septicemia. El MIF se opone a los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides y también altera significativamente el metabolismo tisular. Aunque el MIF parece expresarse de manera ubicua, actualmente no hay publicaciones que indiquen si el MIF se expresa en el miocardio *in vivo*, o si la liberación del MIF del miocardio u otros tejidos durante la septicemia podría afectar adversamente al rendimiento cardiaco.

La disfunción cardiaca durante la septicemia (O. Court, *et al.*, "Clinical review: Myocardial depression sepsis and septic shock", *Crit. Care*, 6:500-508 (2002), S. Krishnagopalan, *et al.*, "Macrophage Dysfunction in the Patient with Sepsis", *Curr. Opin. Crit. Care*, 8, 376-388 (2002)) está asociada con un mal desenlace tanto en modelos de seres humanos (P. Ammann, *et al.*, "Elevation of Troponin I in Sepsis and Septic Shock", *Intensive Care Med.*, 27, 965-969 (2001), C.N. Sessler, *et al.*, "New Concepts in Sepsis", *Curr. Opin. Crit. Care*, 8,465-472 (2002)) como de animales (M. Bozza, *et al.*, "Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis", *J. Exp. Med.*, 189, 341-346 (1999), T. Calandra, *et al.*, "Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000)). Se ha demostrado previamente que la disfunción cardiaca asociada con septicemia o quemadura se debe principalmente a factores depresores circulares del miocardio, incluyendo TNF- α (B.P. Giroir, *et al.*, "Inhibition of Tumor Necrosis Factor Prevents Myocardial Dysfunction During Burn Shock", *Am. J. Physiol.*, 267, H118-H124 (1994), Haudek, *et al.*, "Differential Regulation of Myocardial NF Kappa B Following Acute or Chronic TNF-Alpha Exposure", *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33, 1263-1271 (2001), A. Kumar, *et al.*, "Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 Beta are Responsible for *in vitro* Myocardial Cell Depression Induced by Human Septic Shock Serum", *J. Exp. Med.*, 183, 949-958 (1996)). Sin embargo, puesto que el TNF- α es una citocina centinela de respuesta rápida, y desaparece de la circulación días o semanas antes de la resolución de la disfunción del miocardio, sigue habiendo la necesidad de averiguar sin podrían existir proteínas depresoras del miocardio adicionales.

Estudios que utilizan bacterias vivas, ya sea mediante inyección directa de *E coli* i.p. o mediante ligadura y punción cecal (CLP), han demostrado previamente que los niveles en plasma y/o líquido peritoneal de MIF aumentan varias horas tras la exposición, y que los anticuerpos contra MIF protegían a los ratones de peritonitis bacteriana letal (T. Calandra, *et al.*, "Protection from septic shock by neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000)). Además, los ratones se protegían cuando los anticuerpos se administraban hasta 8 h tras el comienzo de la infección (T. Calandra, *et al.*, "Protection from septic shock by neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000)).

El MIF tiene varias propiedades que lo hacen único entre las citocinas. Se libera MIF preformado de numerosos tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos y la hipófisis anterior (J. Bernhagen, *et al.*, "Regulation of the Immune Response by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Biological and Structural Features", *J. Mol. Med.*, 76, 151-161 (1998), T. Calandra, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A Glucocorticoid Counter-Regulator Within the Immune System", *Crit. Rev. Immunol.*, 17, 77-88 (1997), S.C. Donnelly, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Regulator of Glucocorticoid Activity with a Critical Role in Inflammatory Disease", *Mol. Med. Today*, 3, 502-507 (1997), R.A. Mitchell, *et al.*, "Tumor Growth-Promoting Properties of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)", *Semin. Cancer Biol.*, 10, 359-366 (2000)). Sin embargo, la lista de fuentes de MIF continúa creciendo e incluye otros tejidos tales como pulmón, hígado, glándula suprarrenal, bazo, riñón, piel, músculo, timo, piel y testículos (M. Bacher, *et al.*, "Migration Inhibitory Factor Expression in Experimentally Induced Endotoxemia", *Am. J. Pathol.*, 150, 235-246 (1997), G. Fingerle-Rowson, *et al.*, "Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression by Glucocorticoids *in vivo*", *Am. J. Pathol.*, 162, 47-56 (2003)). El MIF tiene al menos 2 actividades catalíticas que son distintas: actividad tautomerasa y oxidoreductasa. Para este fin, se han desarrollado inhibidores farmacológicos de la actividad tautomerasa de MIF para el tratamiento de enfermedades relacionadas con MIF tales como septicemia, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), asma, dermatitis atópica, artritis reumatoide, nefropatía y cáncer (A. Dios, *et al.*, "Inhibition of MIF Bioactivity by Rational Design of Pharmacological Inhibitors of MIF Tautomerase Activity", *J. Med. Chem.*, 45, 2410-2416 (2002), M. Orita, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor and the Discovery of Tautomerase Inhibitors", *Curr. Pharm. Des.*, 8, 1297-1317 (2002)). Estas enfermedades han mostrado beneficiarse de los anticuerpos anti-MIF.

Varias investigaciones indican que el MIF puede ejercer efectos mediante mecanismos tanto directos como indirectos. Estudios anteriores han aportado pruebas de que el MIF promueve la liberación y los efectos farmacodinámicos de otras citocinas proinflamatorias. Los macrófagos que expresan ADNc antisentido de MIF (que conduce a menos MIF endógeno) secretan/expresan significativamente menos TNF- α , IL-6 y NO, mientras que la actividad de NF- κ B disminuye en respuesta a LPS (44). Por tanto, parece que el MIF puede interactuar directamente con la ruta de señalización de LPS (H. Lue, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Mechanisms of Action and Role in Disease", *Microbes Infect.*, 4, 449-460 (2002)). Además, ratones deficientes en MIF (MIFKO), tal como se demuestra en la solicitud de patente estadounidense n.º (expediente del apoderado n.º 9551-095-27) presentada el 19 de diciembre de 2002, que son resistentes a dosis letales de LPS, tienen niveles circulantes en plasma inferiores de TNF- α en comparación con ratones de tipo silvestre en el nivel inicial. Tras la exposición a LPS, demuestran concentraciones disminuidas de TNF- α circulante, concentraciones aumentadas de óxido nítrico (NO) y concentraciones sin cambios de IL-6 e IL-12 (M. Bozza, *et al.*, "Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis", *J. Exp. Med.* 189, 341-346 (1999)). Aunque el MIF parece promover las citocinas pro-inflamatorias, se ha demostrado que los efectos de MIF actúan de una manera

independiente del TNF- α . Cuando se realizó CLP en ratones deficientes en TNF- α , se observó una tasa de supervivencia del 60 % en ratones a los que se administraron anticuerpos anti-MIF en comparación con una tasa de supervivencia del 0 % en ratones de tipo silvestre (T. Calandra, *et al.*, "Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000)).

5 En relación con la disfunción cardíaca no relacionada con septicemia, también se han descrito concentraciones séricas elevadas de MIF en pacientes tras infarto de miocardio agudo (M. Takahashi, *et al.*, "Elevation of Plasma Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction", *Am. J. Cardiol.*, 89, 248-249 (2002), M. Takahashi, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Redox-Sensitive Citocina in Cardiac Myocytes", *Cardiovasc Res.*, 52, 438-445 (2001), C.M. Yu, *et al.*, "Elevation of Plasma Level of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction", *Am. J. Cardiol.*, 88, 774-777 (2001)), con relevancia fisiológica desconocida hasta ahora. De manera similar, se ha observado que miocitos cardíacos en cultivo liberan MIF en respuesta a hipoxia y peróxido de hidrógeno (iniciador de radicales libres) pero no angiotensina II, endotelina-1, IL-1 β o TNF- α (J. Fukuzawa, *et al.*, "Contribution of Macrophage Inhibitory Factor to Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by Oxidative Stress in Cardiomyocytes", *J. Biol. Chem.*, 277, 24889-24895, M. Takahashi, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Redox-Sensitive Cytokine in Cardiac Myocytes", *Cardiovasc Res.*, 52, 438-445 (2001)). Hay muchos escenarios clínicos que podrían desencadenar potencialmente la liberación de MIF de miocardio, afectando así adversamente a la función cardíaca. La disfunción cardíaca puede manifestarse a través de cualquier estado irregular en los miocitos cardíacos y el tejido cardíaco. Tales disfunciones incluyen, pero no se limitan a, miocarditis, endocarditis, pericarditis, enfermedad cardíaca reumática, infarto de miocardio, arritmia, fibrilación, choque cardiogénico, isquemia, hipertrofia, cardiomiopatía, angina, palpitación o soplo cardíaco, insuficiencia o ataque cardíaco, y cualquiera de los síntomas o defectos asociados generalmente con enfermedades cardíacas congénitas.

25 El factor de inhibición de la migración de macrófagos se expresa en muchos órganos incluyendo el corazón y se ha asociado con una disfunción cardíaca retardada en un modelo murino de endotoxemia (Garner, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor is A Cardiac-Derived Myocardial Depressant Factor", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 258, H2500-H2509 (2003)).

30 La lesión por quemadura da como resultado lesión cardíaca y disfunción contráctil que implica gasto cardíaco disminuido, choque e insuficiencia ventricular izquierda (J.T. Murphy, *et al.*, "Evaluation of Troponin-I as An Indicator of Cardiac Dysfunction After Thermal Injury", 45, 700-704, (1998), E.M. Reynolds, *et al.*, "Left Ventricular Failure Complicating Severe Pediatric Burn Injuries", *J. Pediatr. Surg.* 30, 264-269; descripción 269-270 (1995), W.C. Shoemaker, *et al.*, "Burn Pathophysiology In Man. I. Sequential Hemodynamic Alterations", *J. Surg. Res.*, 14, 64-73 (1973), R. R. Wolfe, *et al.*, "Review: Acute Versus Chronic Response to Burn Injury", *Circ. Shock*, 8, 105-115 (1981)). Se ha notificado que estas deficiencias contráctiles aparecen ya a las 2 horas tras la lesión por quemadura (J.W. Horton, *et al.*, "Postburn Cardiac Contractile Function and Biochemical Markers de Postburn Cardiac Injury", *J. Am. Coll. Surg.*, 181, 289-298 (1995)). Varios estudios recientes han aclarado los acontecimientos moleculares tempranos que implican una ruta de señalización de endotoxinas incluyendo el receptor 4 de tipo toll (Tlr-4), IRAK y NF κ B en respuesta a factores derivados del intestino (D.L. Carlson, *et al.*, "I Kappa B Overexpression in Cardiomyocytes Prevents NF-Kappa B Translocation and Provides Cardioprotection in Trauma", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 284, H804-814 (2003), J.T. Sambol, *et al.*, "Burn-Induced Impairment of Cardiac Contractile Function is Due to Gut-Derived Factors Transported in Mesenteric Lymph", *Shock*, 18, 272-276 (2002), J.A. Thomas, *et al.*, "IRAK Contributes to Burn-Triggered Myocardial Contractile Dysfunction", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283, H829-836 (2002), J.A. Thomas, *et al.*, "TLR4 Inactivation and rBPI(21) Block Burn-Induced Myocardial Contractile Dysfunction", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 283, H1645-1655 (2002)).

Aunque la señalización de endotoxinas a través del receptor de Tlr-4 representa la ruta inicial de la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura, otros investigadores han demostrado que mediadores posteriores tempranos incluyen TNF- α , IL-1 β e IL-6 (H. Lue, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Mechanisms of Action and Role in Disease", *Microbes Infect.*, 4, 449-460 (2002)). Experimentalmente, cuando se bloquea el TNF- α , disminuye la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura, haciendo hincapié en su importancia como regulador clave de la disfunción (B.P. Giroir, *et al.*, "Inhibition of Tumor Necrosis Factor Prevents Myocardial Dysfunction During Burn Shock", *Am. J. Physiol.*, 267, H118-124 (1994)). Cuando se han sometido a prueba estrategias terapéuticas contra mediadores tempranos del choque séptico tales como modalidades de anticuerpos anti-IL-1 β y anti-TNF- α en ensayos con seres humanos, no se han observado beneficios probablemente debido a su aparición temprana en el proceso de enfermedad (C.J. Fisher Jr., *et al.*, "Recombinant Human Interleukin 1 Receptor Antagonist in the Treatment of patients with Sepsis Syndrome, Results from a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", Phase III rHL-1ra Sepsis Syndrome Study Group, *Jama*, 271, 1836-1843 (1994), C.J. Fisher, *et al.*, "Initial Evaluation of Human Recombinant Interleukin-1 Receptor Antagonist in the Treatment of Sepsis Syndrome: A Randomized, Open-Label, Placebo-Controlled Multicenter Trial", The IL-1ra Sepsis Syndrome Study Group, *Crit. Care Med.*, 22, 12-21 (1994), C. Natanson, *et al.*, "Selected Treatment Strategies for Septic Shock Based on Proposed Mechanisms of Pathogenesis", *Ann. Intern. Med.*, 120, 771-783 (1994), K. Reinhart, *et al.*, "Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Sepsis: Update on Clinical Trials and Lessons Learned", *Crit. Care Med.*, 29, S121-125 (2001)).

Recientemente, se ha demostrado que la citocina conocida como factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) desempeña un papel clave en la mortalidad por septicemia (H. Lue, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Mechanisms of Action and Role in Disease", *Micorbes Infect.*, 4, 449-460 (2002)). De hecho, se ha demostrado que la terapia anti-MIF mejora significativamente la supervivencia en modelos letales de septicemia (ligadura y punción cecal), aún cuando se administre hasta 8 horas tras el ataque (T. Calandra, *et al.*, "Protection From Septic Shock By neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*, 6,164-170 (2000)). Además, se ha demostrado que el MIF desempeña un papel clave en el SDRA (K. N. Lai, *et al.*, "Role For Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Respiratory Distress Syndrome", *J. Pathol.*, 199,496-508 (2003)), una complicación común de la lesión por quemadura (M. Bhatia, *et al.*, "Role of Inflammatory Mediators in the Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome", *J. Pathol.*, 202,145-156 (2004)). El fin de este estudio fue entonces identificar y caracterizar el MIF como diana terapéutica útil de la morbilidad cardiaca asociada con lesión por quemadura usando un modelo murino bien definido de lesión por quemadura (Garner, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor is a Cardiac-Derived Myocardial Depressant Factor", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 285, H2500-2509 (2003)).

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de terapias para cardiodepresión, cardiodisfunción, morbididades asociadas con quemadura y cardioprotección en las que actualmente no se dispone de terapia.

La patente estadounidense n.º 6.030.615 se refiere a métodos y composiciones para tratar una enfermedad producida por toxicidad mediada por citocina.

La patente estadounidense n.º 6.420.188 se refiere a métodos y composiciones para antagonizar la actividad de MIF y a métodos de tratamiento de diversas enfermedades basándose en esta actividad.

La patente estadounidense n.º 6.599.938 se refiere a métodos y composiciones para antagonizar la actividad de MIF y a métodos de tratamiento de diversas enfermedades basándose en esta actividad.

La patente estadounidense n.º 6.645.493 se refiere a composiciones y métodos para inhibir la liberación y/o actividad biológica de MIF.

Sumario de la invención

La presente invención se define tal como sigue:

1. Una composición farmacéutica eficaz para su uso en el tratamiento o la prevención de la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, que comprende:

una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. La composición farmacéutica del punto 1, que comprende además al menos un inhibidor de CD74, en la que el inhibidor de CD74 comprende al menos un anticuerpo anti-CD74.

3. La composición farmacéutica del punto 1, que comprende además una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-TNFR.

4. La composición farmacéutica del punto 1 o el punto 3, en la que el uso da como resultado una mejora de la función cardiaca medida por un acortamiento fraccional en el sujeto.

Descripción de las figuras

La descripción anterior se entenderá mejor cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos. Para el fin de ilustrar la invención, se muestra en los dibujos una realización que se prefiere actualmente, sin embargo, se entiende que esta invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos mostrados.

FIGURA 1: Se detecta liberación de proteína MIF en el plazo de 12 h de exposición a LPS en tejido cardiaco. Cada punto de datos es la media (+/- error estándar) de 3 experimentos de inmunotransferencia de tipo Western independientes. Debajo del gráfico se muestra una inmunotransferencia de tipo Western representativa. * $p < 0,05$.

FIGURA 2: La exposición a LPS no regula por incremento el ARNm de MIF en el tejido cardiaco. Cada punto de datos en el gráfico es la media (+/- error estándar) de 3 experimentos de transferencia de tipo Northern independientes. Debajo del gráfico se muestra una transferencia de tipo Northern representativa. No se identificaron diferencias significativas entre los puntos de tiempo ($p > 0,05$).

FIGURA 3: La presencia de MIF en el corazón, el hígado y el bazo antes y después de la exposición a LPS. El MIF preformado en el corazón, el hígado y el bazo (A, D, G) disminuye 12 h después de la exposición a LPS (B, E y H) y se repone tras 24 h (C, F e I) tal como se demuestra mediante inmunohistoquímica. Ampliación: 100X (riñón, bazo), 400X (corazón).

FIGURA 4: La función cardiaca determinada mediante preparación de Langendorff tras exposición a MIFr en ratones C57BL/6J y ratones C3H/HeJ resistentes a endotoxina demuestra que MIFr media en la disfunción cardiaca en un mecanismo independiente de LPS. Los datos representan el promedio de 7 (C3H/HeJ) a 10 (C57BL/6J) experimentos de Langendorff independientes por grupo. * $p < 0,05$.

FIGURA 5: Evaluación ecocardiográfica de los efectos de la administración de LPS y LPS más anticuerpos anti-MIF sobre la función cardiaca. Ecocardiogramas en modo M representativos en ratones de tipo silvestre en el nivel inicial y 8 h tras la administración de LPS, A y B, respectivamente. C y D muestran, respectivamente, ecocardiogramas representativos en Ratones tratados con LPS más anticuerpos anti-MIF a las 8 y 48 h. Se observa una protección significativa en la función cardiaca (% FS) en ratones expuestos a LPS cuando se administran anticuerpos anti-MIF antes del tratamiento (E). Los datos representan el promedio de 9 ciclos cardiacos de 3 ratones monitorizados en múltiples puntos de tiempo. * $p < 0,05$.

FIGURA 6: Modelo de quemadura que demuestra inhibición de MIF con anticuerpo anti-MIF tras la exposición a LPS. Los datos de quemadura demuestran que la inhibición de MIF con el anticuerpo anti-MIF y restablece la función cardiaca tras la quemadura.

FIGURA 7: Una representación gráfica que demuestra la velocidad de liberación de MIF del corazón tras traumatismo térmico. El factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) se expresa de manera constitutiva en tejido cardiaco y se libera de manera máxima 8 horas tras la lesión por quemadura. Cada punto de datos representa la densidad media en unidades arbitrarias (U.A.)/ $\text{mm}^2 \pm \text{EE}$ de 3 experimentos de inmunotransferencia de tipo Western independientes. Debajo del gráfico se muestra una inmunotransferencia de tipo Western representativa. Se emplearon un ANOVA de una vía y un procedimiento de comparación múltiple usando el método de Tukey para determinar la significación estadística en comparación con el grupo control (* $p < 0,05$).

FIGURA 8: Portaobjetos con tinción inmunohistoquímica que demuestran presencia de MIF en varias muestras de tejido. La parte insertada G- MIF, presente de manera constitutiva en el corazón, el hígado, el bazo, el pulmón y el riñón, se disminuye tras la lesión por quemadura. El MIF preformado en el corazón, el hígado y el bazo (A, E, I) disminuye 8 horas tras la lesión por quemadura (B, F, J), a excepción del hígado (M,N) y aumenta a las 24 horas en el corazón y el riñón (C, G), pero no en el corazón ni en el hígado (K,O) tal como se demuestra mediante inmunohistoquímica. Un control negativo (anticuerpo secundario sin el anticuerpo primario anti-MIF) demuestra de manera sistemática que no está presente tinción de fondo en cada punto de tiempo en cada órgano investigado tal como se representa en la columna más a la derecha (D, H, L, P). Ampliación: 100X (riñón, bazo, hígado), 400X (corazón).

FIGURA 9: Representaciones gráficas del cambio de concentración de tres citocinas diferentes a lo largo del tiempo tras traumatismo térmico. Figura 9 - Concentraciones séricas de MIF (ng/ml), IL-12 (pg/ml) e IL-6 (pg/ml) tras lesión por quemadura (A-C, respectivamente). Los datos se expresan como la media $\pm \text{EE}$ de seis ratones C57BL/6J tal como se determina mediante ELISA y se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía con un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar la significación entre grupos (* $p < 0,05$ en comparación con el nivel inicial).

FIGURA 10: Representación gráfica y transferencia de tipo Northern representativa que muestra regulación por incremento de ARNm de MIF tras traumatismo térmico. La lesión por quemadura regula por incremento la expresión de ARNm de MIF en tejido cardiaco significativamente hacia las 8 horas. Se detectaron los ARNm de MIF y β -actina usando sondas radiomarcadas con ^{32}P complementarias a los ARNm de MIF y β -actina. Cada punto de datos representa la densidad media en unidades arbitrarias (U.A.)/ $\text{mm}^2 \pm \text{EE}$ de 3 experimentos de transferencia de tipo Northern independientes. Debajo del gráfico se muestra una transferencia de tipo Northern representativa. Se determinó el MIF normalizado multiplicando la densidad de MIF por la densidad de β -actina presente. Se emplearon un ANOVA de una vía y un procedimiento de comparación múltiple usando el método de Tukey para determinar la significación estadística en comparación con el nivel inicial (* $p < 0,05$).

FIGURA 11: Representaciones gráficas de velocidades de flujo coronario calculadas de tres formas diferentes que comparan la medida de control de la velocidad de flujo con traumatismo térmico no tratado frente a traumatismo térmico tratado con anticuerpos anti-MIF. Determinación de la función cardiaca mediante preparación de Langendorff 18 horas tras la lesión por quemadura en función del flujo coronario (A) y Ca^{2+} . La función cardiaca se expresa como la media $\pm \text{EE}$ de 25 experimentos de Langendorff independientes (11 simulados, 9 de lesión por quemadura, 5 de lesión por quemadura tras tratamiento con anticuerpos anti-MIF). Se realizaron análisis independientes para cada LVP, $+dP/dt_{\text{máx}}$, y $-dP/dt_{\text{máx}}$ en función del grupo de tratamiento y la velocidad de flujo coronario usando un ANOVA de mediciones repetidas y un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre grupos (* $p < 0,05$).

- FIGURA 12: Representación gráfica y ecocardiográfica de los efectos de terapia con anticuerpos anti-MIF tras la lesión por quemadura que demuestra los efectos cardioprotectores del bloqueo de MIF. La evaluación ecocardiográfica de los efectos de terapia con anticuerpos anti-MIF tras la lesión por quemadura demuestra los efectos cardioprotectores del bloqueo de MIF. Ecocardiogramas en modo M representativos en ratones de tipo silvestre en el nivel inicial y 8 horas tras la lesión por quemadura, A y B, respectivamente. C y D representan ecocardiogramas representativos en lesión por quemadura más ratones tratados con anticuerpos anti-MIF a las 4 y las 48 horas, respectivamente. Se observa una recuperación significativa de la función cardíaca (% FS) en ratones con lesión por quemadura a los que se habían administrado anticuerpos anti-MIF antes de la lesión por quemadura (E). Los datos de cada grupo representan la media \pm EE de 9 ciclos cardíacos de 3 ratones monitorizados en múltiples puntos de tiempo. La función cardíaca determinada mediante ecocardiografía se expresa como % de acortamiento fraccional ($LVEDLVES/LVED \times 100$) \pm EE y se analizó usando un ANOVA de mediciones repetidas de una vía y un procedimiento de comparación múltiple empleando la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos específicos.
- FIGURA 13: Concentración sérica de MIF (veces de aumento desde el nivel inicial) tras una exposición a 4 mg/kg de endotoxinas en: (A) ratones de tipo silvestre, (B) ratones TNFR^{-/-} y (C) ratones de tipo silvestre tratados previamente (60 minutos) con Enbrel®. Los datos se expresan como fracción de los niveles iniciales de MIF (media \pm error estándar) de: (A) 6 ratones C57BL/6J, (B) 6 ratones TNFR^{-/-} y (C) 3 ratones C57BL/6J (C) tratados previamente con Enbrel®. Se determinaron los niveles séricos mediante ELISA y se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía con un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar la significación entre grupos (* $p < 0,05$ en comparación con el nivel inicial).
- FIGURA 14: No se detecta liberación de proteína MIF tras la exposición a LPS en tejido cardíaco. Cada punto de datos es la media (\pm error estándar) de 3 experimentos de inmunotransferencia de tipo Western independientes. Debajo del gráfico se muestra una inmunotransferencia de tipo Western representativa. * $p < 0,05$.
- FIGURA 15: La presencia de MIF en el corazón, el hígado y el bazo antes y después de la exposición a LPS en ratones TNFR^{-/-}. El MIF preformado en el corazón, el hígado y el bazo (A, D, G) no disminuye 12 horas después de la exposición a LPS (B, F, J) lo que se observa en ratones de tipo silvestre tal como se demuestra mediante inmunohistoquímica. Ampliación: 100X (riñón, bazo), 400X (corazón).
- FIGURA 16: La exposición a LPS no regula por incremento el ARNm de MIF en tejido cardíaco en ratones TNFR^{-/-}. Cada punto de datos en el gráfico es la media (\pm error estándar) de 3 experimentos de transferencia de tipo Northern independientes. Debajo del gráfico se muestra una transferencia de tipo Northern representativa. No se identificaron diferencias significativas entre los puntos de tiempo ($p > 0,05$).
- FIGURA 17: La función cardíaca determinada mediante preparación de Langendorff tras exposición a MIFr en ratones C57BL/6J, B6/129S y TNFR^{-/-} demuestra que MIFr media en la disfunción cardíaca independiente de la señalización de TNF- α *ex vivo*. Los datos representan el promedio de 6 (C57BL/6J), 4 (B6/129S) y 4 (TNFR^{-/-}) experimentos de Langendorff independientes por grupo. * $p < 0,05$.
- FIGURA 18: Evaluación ecocardiográfica de los efectos de la administración de LPS y LPS más anticuerpos anti-MIF sobre la función cardíaca en ratones TNFR^{-/-}. Ecocardiogramas en modo M representativos en ratones de tipo silvestre en el nivel inicial y 4 h tras la administración de LPS, A y B, respectivamente. C y D muestran, respectivamente, ecocardiogramas representativos en ratones tratados con LPS más anticuerpos anti-MIF a las 4 y las 48 horas. Se observa una protección significativa en la función cardíaca (% FS) en ratones expuestos a LPS cuando se administran anticuerpos anti-MIF antes del tratamiento (E). Los datos representan el promedio de 9 ciclos cardíacos de 3 ratones monitorizados en múltiples puntos de tiempo. * $p < 0,05$.
- FIGURA 19: Determinación de citocinas séricas en ratones de tipo silvestre y TNFR^{-/-} después de la exposición a LPS. Se sometió a ensayo un panel de citocinas inflamatorias en la plataforma Luminex para: (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) IFN- γ , (D) IL-12, (E) IL-10, (F) IL-6, (G) GM-CSF, e IL-2, IL-4, IL-5 (datos no mostrados). Los datos se expresan como la media \pm error estándar de concentraciones séricas de citocina de 3 ratones experimentales independientes en cada punto de tiempo.
- FIGURA 20: Determinación de citocinas séricas en tipo natural tras la exposición a LPS con o sin pretratamiento con anticuerpos anti-MIF (90 minutos). Se muestran las citocinas moduladas: (A) IFN- γ y (B) IL-10 tal como se someten a ensayo en la plataforma Luminex. Los datos se expresan como la media \pm error estándar de concentraciones séricas de citocina de 3 ratones experimentales independientes en cada punto de tiempo.
- FIGURA 21: Compara la función cardíaca (acortamiento fraccional) tras ligadura de LAD con LAD solo y anticuerpos anti-MIF + LAD.
- FIGURA 22: Muestra el efecto de la terapia con anticuerpos anti-MIF antes de LAD con LAD solo y anticuerpos anti-MIF + LAD.

FIGURA 23: Presenta datos de función cardíaca 48 horas tras LAD para varios grupos de tratamiento.

5 FIGURA 24: Muestra la concentración de troponina sérica 48 h tras LAD con tratamiento con anticuerpos anti-MIF previo y retardado.

FIGURA 25: Muestra las concentraciones séricas de troponina I y MIF durante dos semanas tras la ligadura.

10 FIGURA 26: Muestra la expresión constitutiva de CD74 en órganos y la expresión de CD74 en corazón tras la exposición a LPS.

FIGURA 27: Muestra la ecocardiografía / acortamiento fraccional de varios grupos desde t = 0 hasta t = 48 h tras la exposición a LPS.

15 FIGURA 28: Muestra la liberación de CD74 en suero tras la exposición a LPS.

FIGURA 29: Muestra el gel en serie de CD74. Véase también la tabla 5.

20 FIGURA 30: Muestra la velocidad de flujo coronario frente a LVP, +dP/dt máx. y -dP/dt máx. en ratón CD74 KO.

FIGURA 31. Muestra las horas tras la ligadura frente al acortamiento fraccional para control, inhibidor de MIF de molécula pequeña + DMSO/MI y DMSO/MI.

Descripción detallada de la invención

25 Otros diversos objetos, características y ventajas relacionadas de la presente invención se apreciarán más completamente a medida que se entiendan mejor a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, que no pretende ser limitativa a menos que se indique otra cosa.

30 Una realización preferida de la divulgación se refiere a un método de tratamiento y un bioensayo que implican al factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) como factor depresor del miocardio de origen cardíaco.

Una realización preferida de la divulgación se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura.

35 Una realización preferida de la divulgación se refiere a la modulación de MIF como terapia para infarto de miocardio.

Una realización preferida de la divulgación se refiere a la modulación de TNF- α en la disfunción cardíaca.

40 Una realización preferida de la divulgación se refiere a un método de cardioprotección mediante la inhibición de CD74.

Una realización preferida de la divulgación se refiere a la modulación de MIF con anticuerpos anti-MIF.

45 Una realización preferida de la divulgación se refiere a un bioensayo para identificar agentes que inhiben la actividad de MIF.

Una realización preferida de la divulgación se refiere a la inhibición de MIF con anticuerpos anti-MIF y al restablecimiento concomitante de la función cardíaca (tras la quemadura).

50 Una realización preferida de la divulgación se refiere a un método para la mejora de la depresión cardíaca asociada con lesión por quemadura mediante la administración de anticuerpos anti-MIF.

Una realización preferida de la divulgación se refiere a la mejora de la función cardíaca tras infarto de miocardio agudo mediante la administración de anticuerpos anti-MIF.

55 Una realización preferida de la divulgación se refiere a la observación de que la liberación de MIF del corazón, el hígado y el bazo depende de la señalización del receptor de TNF- α I/II y, por tanto, el TNF- α puede ser una diana terapéutica.

60 Una realización preferida de la divulgación se refiere a la neutralización de TNF- α con TNFR humano recombinante:Fc

65 Una realización preferida de la divulgación se refiere a la neutralización de la actividad de MIF con uno o más anticuerpos anti-MIF.

Una realización preferida de la divulgación se refiere al descubrimiento del TNF- α como mediador anterior de MIF.

Una realización preferida de la divulgación se refiere a la observación de que CD74 (un receptor de MIF) se expresa en cardiomiocitos y es un mediador "crítico" de la disfunción cardíaca.

5 Una realización preferida de la divulgación se refiere a la inhibición de MIF y a la mejora de la cardioprotección mediante la inhibición del receptor de CD74 con uno o más anticuerpos neutralizantes monoclonales anti-CD74.

10 Un objeto preferido de la divulgación se refiere a un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca, tal como una irregularidad o depresión en la actividad miocárdica. El método incluye preferiblemente administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor del factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF). El inhibidor puede ser un anticuerpo. El inhibidor puede afectar a una actividad de MIF particular incluyendo una actividad enzimática, tal como actividad tautomerasa o actividad oxidorreductasa.

15 Una realización preferida de la divulgación se refiere a un ensayo para identificar agentes que inhiben la actividad de MIF. El ensayo preferiblemente implica tanto un miocito, ya sea *in vitro* o *in vivo*, como MIF en presencia y en ausencia de un agente que puede inhibir la actividad de MIF. El ensayo analiza la actividad del miocito, por ejemplo, usando herramientas tales como inmunoquímica o ecocardiografía, basándose en la presencia de MIF y un inhibidor potencial.

20 Una realización preferida de la divulgación se refiere a un método de uso de este ensayo para identificar un agente que inhibe la actividad de MIF que comprende colocar un miocito y MIF en presencia de un agente que puede inhibir la actividad de MIF y determinar el efecto sobre la actividad del miocito. El miocito puede estar *in vitro* o *in vivo* y el efecto puede medirse utilizando inmunoquímica o ecocardiografía.

25 Los presentes inventores han encontrado que MIF es un agente inductor de la disfunción miocárdica, que se sabe que contribuye significativamente a la morbimortalidad de la septicemia en seres humanos. Tanto en pacientes humanos como en modelos animales, la disfunción cardíaca asociada con septicemia se caracteriza por dilatación biventricular, contractilidad sistólica disminuida y relajación diastólica disminuida. Aunque no se desea restringirse a la teoría, se cree que su patogénesis es multifactorial, con citocinas de origen miocárdico tales como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) implicadas en la inducción de su comienzo.

30 Una realización de la presente solicitud se refiere a identificar si el MIF u otras proteínas de origen cardíaco median, mediante mecanismos paracrinos o autocrinos, la disfunción miocárdica en la septicemia y otras enfermedades cardíacas. El análisis de microalineamiento de detección de la expresión de genes cardíacos en ratones sugiere que el MIF se expresa en el corazón, y se regula de manera diferencial tras la exposición a lipopolisacáridos (LPS). Dados los datos de que la inhibición de MIF mejora el desenlace en animales con septicemia experimental, se idearon los ejemplos siguientes para verificar si los cardiomiocitos expresaban el MIF *in vivo*, si su expresión resultaba alterada por la exposición a endotoxinas y que el MIF tenía un efecto fisiológicamente importante sobre la función cardíaca. Varios de los ejemplos en el presente documento demuestran la expresión cardíaca de MIF *in vivo*, y determinan que MIF reduce la función cardíaca en una exposición a endotoxinas subletal *in vivo*.

35 El MIF se expresa de manera constitutiva en el miocardio normal, y se libera por los cardiomiocitos tras la exposición a endotoxinas, alcanzando los niveles de tejido cardíaco un nadir 12 horas tras la exposición. Se observan pruebas que respaldan una liberación retardada en la presente solicitud mediante inmunotransferencia de tipo Western e inmunohistoquímica que demuestran liberación significativa a las 12 h de tejido cardíaco y de bazo, y están respaldadas indirectamente por el comienzo retardado de la protección cardíaca que comienza a las ocho horas, y que continúa después. El tratamiento de ratones expuestos a LPS con anticuerpos monoclonales anti-MIF mejora significativamente la función cardíaca *in vivo* tal como se pone de manifiesto por la mejora en la fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo.

40 Para demostrar adicionalmente los efectos depresores del miocardio de MIF, se perfundieron corazones con latido de ratón (perfusión de Langendorff) con una disolución que contenía una concentración de MIF recombinante (MIFr). La perfusión con MIFr da como resultado reducción significativa del rendimiento tanto sistólico como diastólico. Los presentes inventores han demostrado que el MIF se sintetiza por los cardiomiocitos *in vivo*, y se libera tras la exposición a LPS. Por tanto el MIF media directamente en la disfunción cardíaca y se demuestra que el MIF es una diana farmacológica para la mejora de la función cardíaca en septicemia y otras enfermedades cardíacas.

45 Los datos de microalineamiento sobre la expresión de genes cardíacos subrayan que el MIF también se expresa en tejido cardíaco. Varios ejemplos en el presente documento indican que la perfusión de MIF reduce directamente la función cardíaca *in vitro*; y además, el tratamiento con cualquiera de dos anticuerpos monoclonales independientes dirigidos contra el MIF mitiga la depresión miocárdica tardía.

50 La invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca asociada con quemadura, tal como una irregularidad o depresión en la actividad miocárdica. La composición comprende un inhibidor del factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF). El inhibidor puede

inhibir la actividad de MIF y/o la producción de MIF. El inhibidor es un anticuerpo. El inhibidor puede afectar a una actividad particular de MIF incluyendo una actividad enzimática, tal como actividad tautomerasa o actividad oxidoreductasa. El inhibidor puede inhibir o bloquear la actividad de MIF o la producción de MIF en tejido miocárdico. El inhibidor también puede inhibir o impedir la liberación de MIF, tal como inhibidores del transportador ABC.

Otra realización preferida de la divulgación se refiere a un ensayo para identificar agentes que inhiben la actividad o la producción de MIF. El ensayo implicaría un miocito, ya sea *in vitro* o *in vivo*, y posiblemente MIF en presencia y en ausencia de un agente que inhibe la actividad de MIF o la producción de MIF. El ensayo analizaría la actividad del miocito, usando herramientas tales como inmunoquímica o ecocardiografía, basándose en la presencia de MIF y un inhibidor potencial.

Una realización de la invención utiliza el papel de MIF en la disfunción cardíaca asociada con quemadura para su uso en métodos de prevención/tratamiento. Usando un modelo murino de lesión por quemadura (TBSA del 40 %), los presentes inventores identificaron que el MIF cardíaco constitutivo disminuía significativamente (2,1 veces) 8 horas tras la lesión por quemadura tal como se determina mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western. El MIF sérico fue máximo a las 4 horas tras la lesión por quemadura (aumento de 2,2 veces). Estos patrones concuerdan con la liberación de MIF de reservas citoplasmáticas de origen cardíaco y sistémico tras la lesión por quemadura. Tal como se observa en los ejemplos en el presente documento, para determinar el efecto de MIF en la disfunción cardíaca observada tras la lesión por quemadura, se trataron ratones tratados previamente con anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-MIF. Comenzando a las 4 horas tras la lesión por quemadura (y continuando hasta las 48 horas) únicamente los ratones con lesión por quemadura demostraron un porcentaje de acortamiento fraccional (% FS) del ventrículo izquierdo deprimido del 38,6 \pm 1,8 % (% FS simulado 56,0 \pm 2,6 %). Los ratones tratados con anticuerpo anti-MIF demostraron una función cardíaca mejorada retardada tras la lesión por quemadura, con recuperación completa de la función hacia las 24 horas. Esto demuestra que la citocina MIF media en la disfunción cardíaca asociada tardía con lesión por quemadura, y también demuestra que MIF es una diana farmacológica para el tratamiento de la disfunción cardíaca asociada con quemadura así como otras complicaciones mediadas por MIF tales como SDRA asociada con lesión por quemadura.

Tras la lesión por quemadura, se libera MIF de manera máxima en el suero hacia las 4 horas (figura 9); la liberación del tejido se produce al máximo hacia las 8 horas (corazón y bazo) (figuras 7 y 8). Cuando MIF se neutraliza por anticuerpos, la función cardíaca mejora significativamente hacia las 12 horas y completamente hacia las 24 horas, lo que demuestra la modulación de MIF como mediador de la disfunción cardíaca *in vivo* tras la lesión por quemadura (figura 12).

En un modelo de ratón de lesión por quemadura, se ha demostrado que los LPS median en la disfunción cardíaca asociada a través de su interacción con Tlr-4 (receptor 4 de tipo toll) y su interacción con IRAK-1. Se cree que la fuente de LPS se deriva del intestino debido a varios ataques potenciales asociados con la lesión por quemadura. Estos incluyen isquemia intestinal, translocación bacteriana y permeabilidad intestinal aumentada. Aunque no se desea restringirse a la teoría, se cree que la producción y la liberación de factores inflamatorios se vuelven sistémicas a través de tejidos linfoides asociados con el intestino.

En un modelo de endotoxemia subletal en ratones (4 mg/kg de LPS), se observa que MIF medió en efectos depresores cardíacos tardíos *in vivo*. También se determina que MIF recombinante induce una depresión cardíaca inmediata *ex vivo* mediante un ensayo de Langendorff de una manera independiente de LPS. Con respecto a la lesión por quemadura, una realización de la presente invención tiene de manera adecuada varias ventajas en comparación con las observaciones realizadas en un modelo de endotoxemia. En primer lugar, se libera MIF en un punto de tiempo anterior en el modelo de quemadura (4 horas, figura 7) en comparación con la exposición a LPS (8 horas) y este aumento en las concentraciones sistémicas de MIF es significativamente superior (aumento de 2,2 veces (figura 9) frente a 1,5 veces). En segundo lugar, el grado de la disfunción cardíaca no es tan grande en el modelo de lesión por quemadura en comparación con el modelo de endotoxemia tal como se mide mediante ecocardiografía. Con respecto a la lesión por quemadura, los presentes inventores permiten de manera deseable que disminuya el porcentaje de acortamiento fraccional (una estimación del gasto cardíaco) en el 38 % con respecto al nivel inicial hacia las cuatro horas (% FS del 56,2 - (% FS del 34,8/(% FS del 56,2) en comparación con 53,7 % en el modelo de endotoxemia (% FS del 67,2 - FS % del 31,1/(% FS del 67,2) a las cuatro horas. La inhibición de MIF según una realización de la presente invención da como resultado la protección cardíaca completa hacia las 24 horas (figura 12), lo que no se producía hasta las 48 horas en el modelo de endotoxemia, aunque se observó primero protección significativa hacia las 8 horas en el modelo de endotoxemia, y no hasta las 12 horas en el modelo de lesión por quemadura. Esto demuestra que MIF desempeña un papel superior en la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura. Finalmente, se determinó que el aumento en los niveles cardíacos de ARNm de MIF estaba aumentado significativamente hacia las 8 horas en la lesión por quemadura (figura 10) y que no aumentaba hasta las 48 horas en el modelo de endotoxemia. Aunque se ha demostrado que los efectos cardíacos de la lesión por quemadura están relacionados con los LPS derivados del intestino, el ataque efectivo es más complejo que el modelo de endotoxemia porque implica la piel así como el intestino y es un proceso de enfermedad más relevante fisiológicamente.

La neutralización de MIF dio como resultado cardioprotección que comienza a las 12 horas, y se identificó una marcada disfunción cardiaca en ratones con lesión por quemadura ya a las cuatro horas (figura 12). TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 se secretan por los cardiomiocitos y TNF- α e IL-1 β son los mediadores principales de la depresión miocárdica. La presente invención contempla el papel que desempeñen estos en la disfunción cardiaca temprana que se produce antes de la disfunción cardiaca mediada por MIF. Puesto que se libera MIF localmente del corazón justo antes (8 horas) de los efectos protectores del tratamiento con anticuerpos anti-MIF (12 horas) observados mediante ecocardiografía, la presente invención contempla que MIF desempeña un papel significativo en la disfunción cardiaca observada en puntos de tiempo posteriores en este modelo (12-48 horas tras la lesión por quemadura). De las diez citocinas adicionales investigadas sistémicamente (figura 9), sólo IL-6 e IL-12 sistémicas se modularon tras la lesión por quemadura. Los niveles sistémicos de IL-12 disminuyeron significativamente las primeras 12 horas, tal como se ha notificado en pacientes con septicemia posquirúrgica. Se formula la hipótesis de que las disminuciones en esta citocina TH1 constituyen un mecanismo mediante el cual disminuye la supervivencia en septicemia por respuestas inmunitarias innatas frente a la infección afectadas que se han identificado en la lesión por quemadura.

Se ha demostrado que una lesión por quemadura importante produce aumentos significativos en los niveles plasmáticos y cardiacos de malondialdehído (MDA), un producto principal de la peroxidación de lípidos que resulta del estrés oxidativo en tejidos. Además, se ha demostrado que la terapia antioxidante disminuye la liberación de citocinas inflamatorias en la lesión por quemadura lo que se asocia a las respuestas inflamatorias al estrés oxidativo aumentado. Estudios previos han demostrado que MIF se secreta de los cardiomiocitos tras el estrés oxidativo, y sin desear restringirse a la teoría, este puede ser un mecanismo por el cual se libera MIF. El estrés oxidativo iniciado por H₂O₂ da como resultado la activación de la ruta de señalización de ERK1/2 y la proteína cinasa C, pareciendo ser responsable esta última de la secreción de MIF. Por tanto, la liberación cardiaca de MIF preformado puede iniciarse con aumentos en el estrés oxidativo en el corazón lo que señala la liberación de MIF (figuras 7 y 8) y regula por incremento su transcripción (figura 10) con el fin de reponer las reservas en los cardiomiocitos.

La mayoría de las citocinas tienen una expresión controlada estrechamente que se regula por incremento tras la estimulación. MIF, sin embargo, existe preformado en cantidades sustanciales y su expresión depende no sólo de la síntesis de novo de proteínas, sino también de reservas preexistentes que se controlan mediante mecanismos secretorios que implican a los transportadores ABC. El gen de MIF no codifica para una secuencia señal N-terminal cuyo papel es translocarlo al retículo endoplasmático. MIF se ubica predominantemente en el núcleo y en el citosol en pequeñas vesículas que se pinchan y se liberan al exterior de las células. El daño a las células necróticas conduce, por tanto, a una liberación del MIF almacenado previamente. Aunque no se desea restringirse a la teoría, puesto que estudios anteriores han demostrado claramente que la lesión por quemadura implica necrosis de piel en este modelo, la liberación de MIF puede producirse directamente desde células necróticas de la piel, puesto que se ha identificado MIF en la piel y se ha localizado en las capas basales de la epidermis.

Además de la liberación necrótica de MIF preformado, se ha demostrado que la epidermis dañada y los fibroblastos aumentan la expresión y la secreción de MIF. Por ejemplo, en la dermatitis atópica, MIF está regulado por incremento y desempeña un papel fundamental en la patofisiología de la enfermedad. Se ha demostrado que la exposición a UV B corporal total *in vivo* aumenta la producción de MIF, lo que sugiere su implicación en lesiones tisulares. La epidermis lesionada y los fibroblastos cultivados también aumentan la expresión de MIF lo que contribuye positivamente al proceso de curación de heridas. Los niveles sistémicos de MIF pueden aumentar de manera más rápida y espectacular (2,2 veces hacia las 4 horas en el modelo de lesión por quemadura frente al aumento de 1,5 veces hacia las 8 horas en el modelo de endotoxemia) en este modelo de lesión por quemadura en comparación con el modelo de endotoxemia debido a factores que implican MIF liberado de piel lesionada por quemadura.

Se ha demostrado que MIF desempeña un papel en el SDRA y las complicaciones pulmonares de la septicemia. Se ha demostrado que la terapia con anticuerpos anti-MIF disminuye la acumulación de neutrófilos pulmonares en la lesión pulmonar aguda asociada con septicemia. MIF se expresa en el endotelio capilar alveolar y en macrófagos infiltrantes de pacientes con SDRA. Se ha demostrado que la expresión de MIF forma un bucle de amplificación con TNF- α asociándose efectivamente la inflamación grave con estas dos citocinas en el SDRA. Puesto que el SDRA es una complicación importante y común de la lesión por quemadura, la presente divulgación contempla terapias con anticuerpos anti-MIF que son útiles en otras indicaciones aparte de las protectoras cardiacas, y afectan gravemente a los desenlaces.

MIF es único entre las citocinas porque tiene múltiples actividades enzimáticas, incluyendo actividad oxidoreductasa y tautomerasa. Se ha demostrado que la inhibición de su actividad tautomerasa contrarresta actividades conocidas de MIF tales como sus actividades de desactivación de glucocorticoides. Se han desarrollado inhibidores farmacológicos de la actividad tautomerasa de MIF para enfermedades en las que han sido eficaces las terapias con anticuerpos anti-MIF tales como septicemia, asma, dermatitis atópica y síndrome respiratorio agudo (SDRA).

La citocina MIF desempeña un papel significativo en la disfunción cardiaca tardía asociada con lesión por quemadura. La propia MIF es un depresor cardiaco directo y tiene una liberación retardada del corazón. La liberación retardada de MIF y el desarrollo de inhibidores que inhiben potencialmente la actividad de MIF hacen de

MIF una diana potencial para enfermedades tales como lesión por quemadura asociada morbilidad en relación con sus efectos cardiopulmonares.

Los presentes inventores han encontrado que la liberación MIF del corazón, el hígado y el bazo depende de la señalización del receptor de TNF I/II tras la exposición a LPS. Adicionalmente, los presentes inventores identifican la liberación al suero de MIF independiente de la señalización del receptor de TNF I/II. Sin la señalización de receptor de TNF, los niveles de MIF parecen ligeramente retardados (12-24 horas en comparación con 8 horas en el tipo natural) y ligeramente aumentados (1,7-2,3 veces con respecto al nivel inicial en comparación con un aumento de 1,5 en ratones de tipo silvestre). Además, la liberación de MIF independiente del receptor de TNF en ratones deficientes en el receptor de TNF I/II (TNFR^{-/-}) es suficiente para mediar en la disfunción cardíaca hacia al menos 24 horas después de la exposición a LPS pese a la falta de liberación de MIF de tejidos que se han identificado previamente en ratones de tipo silvestre. La disfunción cardíaca temprana se identificó en los ratones TNFR^{-/-}, sin desear restringirse a la teoría, se cree que se debe probablemente a mediadores conocidos que los presentes inventores han identificado que se expresan de manera elevada en este modelo (IL-1 β , IL-6) además de otros mediadores potenciales (por ejemplo, IL-18 así como otros mediadores). En corazones aislados (preparación de Langendorff), se determinó que MIF inducía una disfunción cardíaca (sistólica y diastólica) inmediata (en el plazo de 20 minutos) directamente en ratones tanto TNFR^{-/-} como de tipo silvestre en el mismo grado. Sin embargo, la disfunción cardíaca inducida por LPS en los ratones TNFR^{-/-}, desapareció completamente hacia las 48 horas con neutralización de MIF con anticuerpos, lo que indica que la liberación de MIF independiente mediada por el receptor de TNF podría inducir una profunda disfunción cardíaca tardía (24 y 48 horas) en un modelo de endotoxicosis.

La citocina MIF se expresa de manera constitutiva en numerosos tipos celulares incluyendo linfocitos, macrófagos y la hipófisis anterior. Muchos tejidos también contienen MIF incluyendo el corazón, pulmón, hígado, glándula suprarrenal, bazo, riñón, piel, músculo, timo, piel y testículos. Recientemente se ha descrito el mecanismo de secreción en monocitos estimulados con LPS. Los inhibidores de la secreción clásica de proteínas tales como la monensina o la brefeldina A no inhiben la secreción de MIF, lo que sugiere una vía de exportación de proteínas no clásica. Cuando se administraron inhibidores de los transportadores ABCA1 (casete de unión a ATP A1) (gliburida y probenidida), no se produjo la secreción de MIF. MIF se ubica predominantemente en el núcleo y el citosol en vesículas pequeñas que se pinchan y se liberan al exterior de las células. Se ha demostrado que esta ruta de secreción no clásica, mediada por vesículas, es un mecanismo de secreción de otros mediadores inflamatorios importantes, tales como HMGB1, que se ha demostrado que desempeña un papel significativo en enfermedades inflamatorias y específicamente en septicemia. En la presente invención se describe por primera vez la dependencia de la secreción de MIF sobre la señalización de TNF- α en varios tejidos.

MIF tiene numerosas actividades biológicas incluyendo propiedades antagonistas de glucocorticoides, propiedades catalíticas que se regulan a través del coactivador JAB1/CSN5 y la proteína de la superficie celular CD74/cadena II. La secreción específica de MIF resulta tras estímulos inflamatorios tales como endotoxina (LPS) y factor de necrosis tumoral, así como hormonas tales como ACTH y angiotensina II. Además de las células inmunitarias, las células endocrinas y algunas células epiteliales secretan MIF. La secreción se debe a una potenciación de la expresión de MIF y a la síntesis de novo así como a una inducción de la liberación a partir de reservas preexistentes; habiéndose demostrado ambas previamente en el corazón.

Se ha notificado que MIF cardíaca se libera de manera máxima a las 12 horas tras la exposición a LPS en ratones de tipo silvestre. Los niveles séricos de MIF en ratones de tipo silvestre tras la exposición a LPS se liberan de manera máxima a las 8 horas, lo que corresponde a una protección temprana de la disfunción cardíaca. Cuando se inhibe la señalización de TNF- α tras la exposición a LPS o bien mediante el pretratamiento con Enbrel® o bien en ratones TNFR^{-/-}, los niveles de MIF llegan a un máximo más tarde y es ligeramente superior, lo que indica que el TNF- α tiene cierto control sobre los niveles séricos de MIF, pero no inhibe la liberación de MIF. Cuando se pretrataron ratones de tipo silvestre con anticuerpos neutralizantes anti-MIF y se sometieron a una exposición a LPS (4 mg/kg), se observó una disfunción cardíaca grave inicial a las cuatro horas que fue idéntica a la de ratones a los que se administraron LPS solo. Sin embargo, se observó protección significativa inicial a las 8 horas y mejorada hasta las 48 horas donde la función cardíaca no fue significativamente diferente de la los animales control. Puesto que MIF tenía un efecto cardíaco casi inmediato y directo en corazones de tipo silvestre aislados, se creyó que MIF desempeñaba un papel en la función cardíaca que estaba emparejada con su liberación retardada. Sin embargo, en la presente invención se demuestra que la liberación no cardíaca de MIF también puede tener efectos significativos sobre la función *in vivo* (24 y 48 horas). Estos efectos se producen posteriormente a los descritos antes (protección inicial a las 8 horas) y de manera paralela hay un retardo en la liberación de MIF sistemáticamente cuando se bloquea la señalización de TNF- α (12-24 horas) en comparación con ratones de tipo silvestre (liberación máxima de MIF a las 8 horas).

Se cree que la disfunción cardíaca temprana puede atribuirse a varias citocinas que se ha demostrado que median en la disfunción cardíaca asociada con septicemia (y LPS) tales como TNF- α , IL-1 β e IL-18. Se ha notificado una discordancia temporal entre los niveles de TNF- α en el miocardio y la disfunción contráctil en endotoxemia. Estos hallazgos de la disfunción miocárdica asociada con LPS no se produjeron hasta que los niveles de TNF- α volvieron al nivel inicial, lo que contradice otros hallazgos que han notificado protección de la disfunción cardíaca inducida por

LPS tras la neutralización del TNF- α . Estos hallazgos y otros han conducido a la hipótesis de que se requiere TNF- α para los aumentos inducidos por LPS de mediadores posteriores tales como IL-1 β , IL-6, IL-18 entre otros factores no identificados todavía. Los presentes inventores demuestran que la señalización de TNF media en algunos (secreción de MIF secreción del corazón, el hígado, el bazo), pero no en todos, los efectos de MIF en su modelo de endotoxemia.

Otros investigadores han estudiado el papel centinela de la señalización de TNF- α , específicamente en relación con la citocina IL-18 en modelos de endotoxemia. Tras la exposición a LPS en ratones deficientes en TNF- α (-/-), los niveles de IL-18 en el corazón no cambian significativamente, mientras que los ratones de tipo silvestre demostraron aumentos significativos en los niveles de IL-18. Cuando se neutraliza la IL-18, este estudio demostró que la disfunción cardíaca inducida por LPS se reduce y que la IL-18 parece tener efectos posteriores sobre el TNF- α , IL-1 β tisulares, así como sobre los niveles de ICAM-1/VCAM-1. Aunque este estudio se centró en la producción y liberación miocárdica de IL-18 en el miocardio, no se investigaron fuentes no cardíacas de IL-18. Se cree que este estudio es similar al de los presentes inventores en la dependencia del TNF- α de la producción/liberación de IL-18 en tejido (cardíaco).

De manera similar, es importante mencionar un estudio anterior que identificó los efectos de la inhibición de TNF- α sobre la expresión de ARNm de citocina miocárdica así como de los niveles plasmáticos de citocina tras la exposición a LPS. La inhibición de TNF redujo de manera parcial aunque significativa los niveles plasmáticos de IL-1 β , L-6 y MCP-1 pero no de MIF, TNF, IL-10 ni IL-12 a las 2 horas; en cambio el pretratamiento con anticuerpos anti-TNF redujo significativamente la expresión miocárdica de IL-1 β pero no de otras citocinas incluyendo MIF en este punto de tiempo inicial. Puesto que los presentes inventores han mostrado que se demuestra que se libera MIF más tarde de 2 horas (máximos a las 12 horas), los presentes inventores describen por primera vez rutas de MIF independientes de TNF y dependientes de TNF que son paralelas a las de IL-1 β , IL-6 y MCP-1 en este estudio anterior. Son hallazgos importantes puesto que se ha demostrado que la mayoría de estas citocinas median directamente en la disfunción cardíaca.

Aunque la disfunción cardíaca de los ratones TNFR-/- tras la exposición a LPS en este estudio ((% FS del 18,2 % (45,9-27,7)) no es tan profunda como la determinada en ratones de tipo silvestre en el estudio anterior (36,7 % (67,3-30,6)), la depresión es significativa. Puesto que se han atribuido múltiples citocinas a la disfunción cardíaca temprana tras la exposición a LPS, se determinaron los niveles séricos de citocina en el modelo de TNFR-/- . Los niveles de TNF- α estaban espectacularmente aumentados en comparación con los ratones de tipo silvestre, sin embargo, sin receptores funcionales (receptor de TNF I o receptor de TNF II), sus efectos no fueron mediar en la disfunción cardíaca temprana observada. Sin embargo, se observaron claramente aumentos en IL-1 β e IL-6 a las 4 horas (31,2 y 8,5 veces por encima de los ratones de tipo silvestre, respectivamente) y probablemente contribuyeron a la disfunción cardíaca temprana además de otras citocinas tales como IL-1 β recientemente descrita así como otros mediadores todavía no descritos. Se ha descrito previamente el papel de la señalización del TNF- α en la regulación de la secreción de TNF- α . Sin embargo, los presentes inventores han demostrado por primera vez que la señalización del receptor de TNF- α regula IL-1 β , IL-12 e IL-10 mediante un mecanismo de retroalimentación negativa y regula positivamente el IFN- γ (figura 19). De manera similar, los ratones deficientes en IL-6 tienen expresión aumentada de IL-1 β y TNF- α tras la exposición a LPS y los presentes inventores contemplan que la IL-6 cardíaca suprime la expresión de mediadores proinflamatorios incluyendo ella misma mediante un mecanismo de retroalimentación negativa.

La señalización del TNF- α se produce a través de 2 receptores, los receptores de TNF- α 1 y 2. Estas dos rutas tienen rutas de señalización divergentes. La interacción de TNF- α y el receptor 1 activa varias rutas de transducción de señales incluyendo NF- κ β , que el receptor de TNF- α no activa. Para investigar cuál de los dos receptores posibles de TNF era el responsable de la inhibición de la liberación de MIF en el corazón, los presentes inventores expusieron ratones en los que la sobreexpresión de I κ B en el corazón dio como resultado la inhibición casi completa de NF- κ β . Mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western, los presentes inventores demostraron que no se producía liberación de la misma manera que en los ratones TNFR-/- en todos los puntos de tiempo sometidos a prueba (datos no mostrados, idéntico a la figura 2A). Estos ratones tienen TNF- α circulante equivalente a los tipos naturales (puesto que la inhibición de NF- κ β es específica de corazón). Adicionalmente, estos ratones expresan MIF en el suero de manera similar a los ratones de tipo silvestre. Por consiguiente, la presente invención contempla que el receptor de TNF 1 puede mediar en la liberación tisular observada en ratones de tipo silvestre del corazón. Puesto que el fenotipo de este corazón está completamente protegido tras la exposición a LPS mediante ecocardiografía durante las primeras 48 horas (datos no mostrados), los presentes inventores contemplan que hacer el MIF circulante requiere que se señalicen proteínas mediadas por NF- κ β anteriores (TNF- α , IL-1 β) o que MIF medie sus efectos mediante el propio NF- κ β .

La liberación de IL-10 e IFN- γ tras la exposición a LPS en ratones de tipo silvestre se atenúa cuando se tratan previamente con anticuerpos neutralizantes frente a MIF (figura 20). Puesto que MIF tiene una liberación retardada, probablemente son las citocinas afectadas debido a su relación temporal con MIF, lo que se produce tras liberarse el MIF (figura 13). Estos hallazgos indican que la actividad de MIF desempeña un papel significativo en la liberación de

IL-10 e IFN- γ tras la exposición a endotoxina, aunque es probable que no sea la única señal para su liberación. Es interesante observar que en los ratones TNFR-/- (figura 19C) también se inhibe esa liberación de IFN- γ , lo que hace que tanto TNF como MIF sean necesarios para su liberación. De manera similar, en un modelo de colitis inducida por sulfato de dextrano mediante anticuerpos anti-MIF, se suprimió significativamente el IFN- γ . Se ha demostrado que la expresión de iNOS en miocitos cardiacos se expresa cuando TNF- α y LPS se administran con IFN- γ , pero NO sin IFN- γ . Puesto que el propio iNOS desempeña un papel en las rutas reguladoras de la disfunción cardiaca asociada a LPS, estas rutas de citocina son complejas y probablemente interaccionan estrechamente.

Los esfuerzos para inhibir TNF- α con el fin de reducir la morbimortalidad en la septicemia y el choque séptico han fracasado previamente en clínica, aunque estudios preclínicos en ratones protegieron contra las exposiciones a endotoxinas. Los presentes inventores han encontrado que la inhibición de la señalización de TNF- α antes de la exposición a LPS da como resultado la inhibición de la secreción de MIF de estos tejidos, aunque la liberación sérica de MIF no resulta afectada. Además, cuando se administró Enbrel justo inmediatamente antes o después de la exposición a LPS en lugar de 90 minutos antes, se produjo liberación tisular de MIF esporádicamente (datos no mostrados) lo que explica los efectos de MIF posteriores adicionales mediante esta terapia. Aunque no se desea restringirse a la teoría, estos hallazgos indican mecanismos por los que no han funcionado las terapias con anticuerpos anti-TNF- α debido a los efectos de MIF.

Aunque este estudio de exposición a LPS en ausencia de una infección hepática no puede extrapolarse directamente a disfunción miocárdica inducida por septicemia, es importante observar que se ha demostrado que MIF es fisiológicamente relevante en un modelo de peritonitis polimicrobiana hepática (CLP). Cuando se administraron anticuerpos neutralizantes frente a MIF a ratones TNF- α -/- (particularmente propensos a ataque de CLP) MIF protegió contra la letalidad (supervivencia del 62 % a los 9 días en ratones neutralizados con MIF en comparación con el 0 % con CLP solo) a las 15 horas. De manera similar, en ratones de tipo silvestre, los anticuerpos neutralizantes frente a MIF protegieron durante 9 días (punto final del experimento) donde sobrevivió el 81 % en comparación con el 31 %, aun cuando los anticuerpos se administraron hasta 4,5 horas tras el ataque (supervivencia del 61 % en comparación con el 5 %). Por consiguiente, los presentes inventores contemplan terapias con anticuerpos anti-MIF contra disfunción miocárdica inducida por septicemia.

Puesto que la liberación de MIF está retardada y no resulta afectada parcialmente por el bloqueo de mediadores anteriores importantes tales como TNF- α , puede representar una buena diana terapéutica. Para este fin, puede intervenir farmacológicamente en la inhibición de la actividad tautomerasa de MIF que media en algunas de sus funciones biológicas. Además, recientes mecanismos de secreción no clásicos también son dianas potenciales para la terapia. Sin embargo, es importante comprender que todavía existen otras dianas significativas en septicemia que se conocen (HMGB1) así como dianas no descritas. Por tanto, es importante comprender los efectos de la invención terapéutica de todos estos mediadores.

Los presentes inventores han demostrado que MIF desempeñan un papel significativo en la disfunción cardiaca inducida por LPS que se cree que contribuye a la disfunción miocárdica durante la septicemia. Puesto que se cree que el TNF- α es una citocina centinela importante en la disfunción cardiaca inducida por LPS, se han investigado los efectos de bloquear las rutas de señalización de TNF- α *in vivo* sobre la disfunción cardiaca inducida por MIF. Las concentraciones séricas y la distribución temporal de MIF estaban ligeramente aumentadas y se retardó por la inhibición de la señalización de TNF- α (aumentada de manera máxima a las 12-24 horas (1,7-2,3 veces con respecto al nivel inicial con la inhibición de la señalización de TNF- α frente a 8 horas en el tipo natural (aumento de 1,5 veces). La liberación de MIF preformado del corazón, el hígado y el bazo no se produjo después de la exposición a LPS tras la inhibición de la señalización de TNF- α a diferencia de la liberación máxima retardada a las 12 horas observada anteriormente en ratones de tipo silvestre. El análisis de tipo Northern del ARNm de MIF cardiaco no reveló cambios significativos en la transcripción después de la exposición a LPS. Cuando se aplicó MIF recombinante a corazones TNFR-/- aislados (preparación de Langendorff), se detectó una disminución significativa en la función cardiaca igual a la de ratones de tipo silvestre, lo que indica que la señalización de MIF fue el TNF- α . La ecocardiografía de ratones TNFR-/- tras la exposición a LPS demostró una disfunción cardiaca temprana (disminución del 18,2 % en el % de acortamiento fraccional) que mejoró mínimamente tras 48 horas. Cuando se neutralizó MIF mediante anticuerpos monoclonales, la función cardiaca mejoró significativamente hacia las 24 horas y se recuperó completamente hacia las 48 horas, lo que indica que MIF desempeñaba un papel en la disfunción cardiaca asociada con LPS tardía pese a la falta de liberación tisular. Este estudio demuestra por primera vez que la liberación de MIF de tejido cardiaco y otros es dependiente de la señalización de TNF, y la liberación sérica de MIF no resulta afectada por una de señalización de TNF tras la exposición a LPS y es adecuada para mediar la disfunción cardiaca.

El factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina pluripotencial con efectos directos y significativamente perjudiciales sobre la función cardiaca durante la septicemia (infecciones graves). Una realización de la presente invención demuestra en un modelo de ratón que la inhibición de la actividad de MIF puede mejorar profundamente la función cardiaca tras un infarto de miocardio agudo (véanse las figuras 21-25). Esta mejora es evidente en el plazo de horas y se prolonga durante la duración del experimento (1 semana). Es sumamente probable que la modulación de MIF disminuya el tamaño del infarto y de otros parámetros patológicos. El grado de

mejora en la función cardiaca es notable y sustancialmente supera al menos las 10 veces en comparación con otras dianas inmunitarias tales como TNF-alfa.

Antes de la presente invención no había tratamientos para el infarto de miocardio que se dirigieran a mediadores químicos/de citocina de la disfunción cardiaca y la lesión aguda de tejido miocárdico. La tecnología actual se dirige a minimizar el infarto mediante terapias tales como TPA. Una vez que se administra TPA o una terapia similar, no hay ninguna terapia farmacológica para prevenir la insuficiencia/choque cardiogénico aparte de los inotropos convencionales (dobutamina) o dispositivos mecánicos (bomba de balón intraaórtica). Las terapias para bloquear MIF están administrándose simultáneamente con TPA o angioplastia de balón para mejorar adicionalmente la función cardiaca tanto a corto plazo como a largo plazo y minimizar potencialmente el tamaño del infarto tal como se contempla en el presente documento.

Una realización de la presente invención resuelve los problemas de la disfunción cardiaca aguda y crónica tras un infarto de miocardio agudo. La presente invención posibilita proporcionar una clase única de terapias porque modula un mediador inmunitario, es decir, MIF. Sin desear restringirse a la teoría, se cree que la presente invención puede disminuir directamente el tamaño del infarto. No existe ninguna terapia equivalente para preservar la función cardiaca a largo plazo. Para la función a corto plazo, la modulación de la actividad de MIF según la presente invención minimizaría la necesidad de bombas de balón intraaórticas y otros dispositivos mecánicos. Se obtienen anticuerpos monoclonales anti-MIF adecuados de Cytokine PharmaScience, Inc., King of Prussia, PA.

Otra realización de la presente divulgación se refiere a la inhibición de CD74 para proteger la disfunción cardiovascular asociada con enfermedades graves tales como septicemia, traumatismo, IM agudo e insuficiencia cardiaca congestiva. Aunque CD74 se ha descrito en células inmunitarias circulantes y células presentadoras de antígeno (en asociación con la clase II del MHC) hasta la presente invención, no se había notificado la presencia de CD74 en el corazón (así como en otros órganos). Y lo que es más importante, no se había demostrado previamente el papel de la función de CD74 sobre la función cardiaca en procesos fisiológicos o de enfermedad. Aunque se ha mostrado que CD74 media la actividad de MIF *in vitro*, esto no se ha confirmado independientemente y se limita a fibroblastos y leucocitos.

Se dispone de anticuerpos anti-CD74 humano adecuados, por ejemplo, de BD Biosciences (números de catálogo de producto 555538 (clon M-B741; formato purificado; isotipo de ratón IgG_{2a}, κ; W.S. n.º V CD74.4; reactividad humana) y 555612 (clon LN2; formato purificado; isotipo de ratón IgG₁, κ; W.S. n.º V CD74.3; reactividad humana).

La presente invención posibilita usar terapia con anticuerpos anti-citocina (incluyendo anticuerpos anti-MIF) en enfermedades cardiacas. Los experimentos preliminares usando terapia con anticuerpos anti-TNF en modelos de septicemia no funcionaron. Adicionalmente, MIF, la supuesta citocina bloqueada por la inhibición de CD74, es una citocina que se produce posteriormente, y en el modelo de IM agudo está aumentada durante varias semanas tras el ataque, lo que permite la intervención durante cualquier punto de ese tiempo.

La disfunción cardiaca temprana en el IM agudo y en la septicemia explica la alta morbimortalidad asociada con cada una de estas enfermedades. Los presentes inventores contemplan la terapia con citocinas que puede mejorar el rendimiento y disminuir potencialmente la morbilidad asociada con cada una.

La mayoría de las intervenciones terapéuticas en la enfermedad cardiaca se han centrado en la reperfusión (IM) o en los inotropos (IM y septicemia). Mediante una realización de la presente invención, la intervención con el receptor de CD74, el supuesto receptor para MIF, puede atenuarse la afectación cardiogénica tanto aguda como crónica y puede mejorar la supervivencia/desenlaces.

Se secreta MIF de los cardiomiocitos tras la exposición a LPS, y media directamente una disfunción cardiaca de comienzo tardío (>6 horas). En células inmunitarias, se determinó que CD74 era el receptor de MIF, que ejerce efectos a través de rutas de señalización intracelulares de ERK1/2. Para determinar si CD74 media en la disfunción cardiaca en septicemia inducida por MIF, los presentes inventores expusieron: 1) ratones de tipo silvestre (C57BL/6) a LPS; 2) ratones de tipo silvestre tratados previamente con anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-CD74; y expuestos a LPS y 3) ratones deficientes en CD74 con LPS (4 mg/kg). Se realizó ecocardiografía en serie y se determinó el acortamiento fraccional (% FS). A las 24 horas, se observó disfunción significativa en ratones WT a los que se había administrado LPS ((% FS=31,6 %±3,3 %) en comparación con los controles ((% FS=58±1 %). Tanto en los ratones tratados con anticuerpos anti-CD74 como en los deficientes para CD74 expuestos a LPS, la función cardiaca mejoró significativamente en comparación con los ratones de tipo silvestre a los que se habían administrado LPS solo ((% FS=49±3,6 % y 53,3±2,4 %, respectivamente, p<0,05). Puesto que nunca se ha documentado la expresión de CD74 en el corazón, los presentes inventores realizaron inmunotransferencias e histoquímica que confirmaron que CD74 está presente de manera constitutiva en las membranas de células cardiacas y en el citosol; y que se regulaba sustancialmente tras la exposición a LPS (casi ausente a las 12 horas - >disminución de 4 veces). Los presentes inventores demuestran que CD74 se expresa en cardiomiocitos y es un mediador crítico de la disfunción cardiaca.

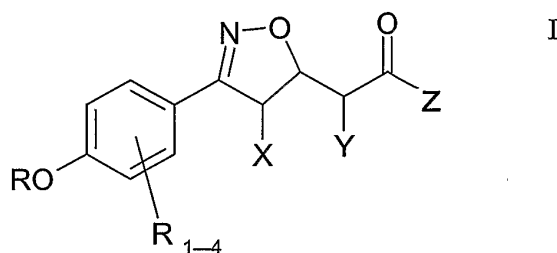
Otra realización de la presente divulgación se refiere a la inhibición de actividad de MIF mediante el uso de uno o

más de receptor de MIF soluble o antagonista del receptor de MIF. Como ejemplo, con las terapias con anticuerpos anti-TNF α , son adecuados REMICADE™ o INFLIXIMAB™ (anticuerpo anti-TNF α) y ENBREL™ o ETANERCEPT™ (receptor de TNF soluble). Este método incluye administrar uno o más del receptor de MIF soluble y/o el antagonista del receptor de MIF en una cantidad eficaz para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, o una combinación de los mismos a un sujeto que lo necesita.

Otra realización de la presente divulgación se refiere al uso de inhibidores de MIF de molécula pequeña (en ocasiones denominados "antagonistas de MIF" o "compuestos de isoxazolina") en el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, o una combinación de los mismos.

En la siguientes fórmulas químicas, el uso del superíndice en un sustituyente es para identificar un nombre de sustituyente (por ejemplo, "R²" se usa para indicar un sustituyente denominado R²), mientras que el uso de un subíndice se usa para enumerar el número de veces que aparece un sustituyente en ese sitio molecular (por ejemplo, "R₂" o "(R)₂" se usan ambos para indicar dos sustituyentes denominados simplemente "R").

Un inhibidor de MIF de molécula pequeña adecuado para su uso en los métodos en el presente documento tiene la siguiente fórmula I:



en la que:

R₁₋₄ son, independientemente, R, halo, N₃, CN, OH, NRR' o SH;

R y R' son, independientemente, H o alquilo C₁₋₆;

X es R, halo, N₃, CN, OR, NRR', SH, =O, =CH₂, o A;

A es un anillo aromático sustituido o no sustituido;

Y es R, NRR', NRR'' o (CH₂)_n-A;

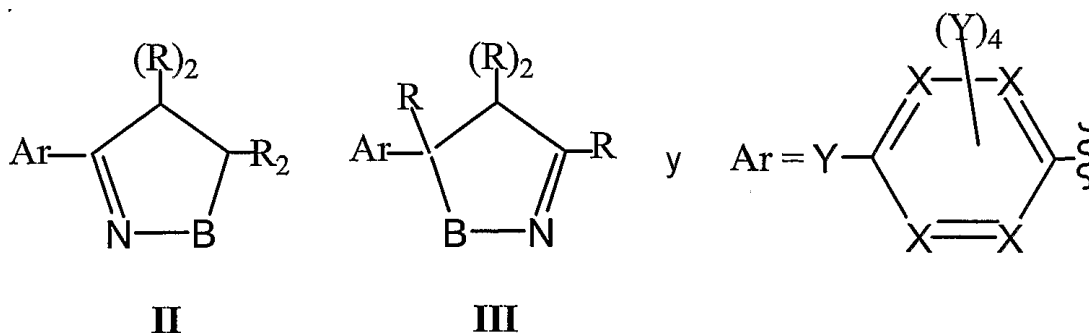
Z es R, OR, OR'', NRR', NRR'', o A;

R'' es una cadena C₂-C₁₈ saturada o insaturada, lineal o ramificada;

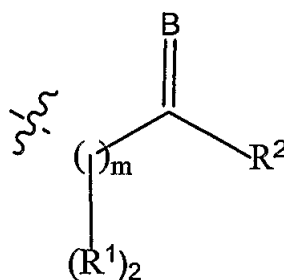
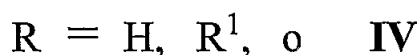
y n es 0 ó 1.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula I es un compuesto que contiene p-hidroxifenil-isoxazolina, en el que cada uno de R, R₁₋₄, X e Y es H o -CH₂-A y Z es OR. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula I es un éster del ácido (R)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-isoxazolinacético, particularmente el éster metílico del ácido del mismo (en ocasiones identificado como "ISO-1" o "CPSI" o "CPSI-26" en el presente documento) que también se conoce como éster metílico de p-hidroxifenol-isoxazolina. Todavía más preferiblemente, el compuesto es un éster del ácido 2-{3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-isoxazol-5-il}-3-fenil-propiónico, particularmente el éster metílico del mismo (identificado como "ISO-2").

Otros inhibidores de MIF de molécula pequeña adecuados para su uso en el método en el presente documento tienen las siguientes formulas II o III:



en la que B es o bien oxígeno o bien azufre y cada "R" se define independientemente:



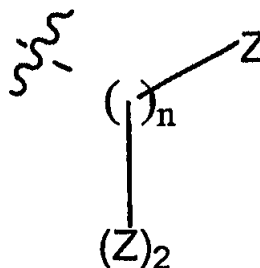
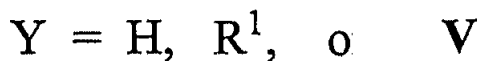
5

con el requisito de que cada "R" no puede aparecer sólo como hidrógeno en cualquiera de la fórmula II o III (es decir, al menos un R en cualquiera de la fórmula II o III es un sustituyente "R" distinto de hidrógeno), y cualquier B es independientemente o bien oxígeno o bien azufre; cualquier R^1 es independientemente hidrógeno, alquilo (C_1-C_6) o algún otro sustituyente adecuado, cualquier R^2 es una amina, un alcoxilo o algún otro sustituyente adecuado; y "m" es independientemente o bien cero o bien un número entero de desde uno hasta veinte;

10

cada X es independientemente o bien carbono o bien nitrógeno; y cuando cualquier X es carbono, entonces Y es el sustituyente definido independientemente para cada X como

15



cada Z es independientemente o bien hidrógeno, hidroxilo, halógeno, o bien algún otro sustituyente adecuado; y

"n" es independientemente cualquiera de 0, 1, 2, 3 ó 4;

20

y sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente divulgación también se refiere a las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de las fórmulas generales I, II ó III. Los ácidos que se usan para preparar las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de base mencionados anteriormente de esta divulgación son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, tales como las sales de cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, acetato, lactato, citrato, citrato ácido, tartrato, bitartrato, succinato, maleato, fumarato, glutamato, L-lactato, L-tartrato, tosilato, mesilato, gluconato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)).

25

30

La divulgación también se refiere a sales de adición de base de los inhibidores de MIF de molécula pequeña. Las bases químicas que pueden usarse como reactivos para preparar sales de base farmacéuticamente aceptables de esos compuestos de las fórmulas generales I, II o III que son de naturaleza ácida son aquellas que forman sales de base no tóxicas con tales compuestos. Tales sales de base no tóxicas incluyen, pero no se limitan a las derivadas de tales cationes farmacológicamente aceptables tales como cationes de metales alcalinos (por ejemplo, potasio y

35

sodio) y cationes de metales alcalinotérreos (por ejemplo, calcio y magnesio), sales de adición de amonio o amina solubles en agua tales como N-metilglucamina-(meglumina) y alcanolamonio inferior y otras sales de base de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables.

5 Los compuestos y profármacos de los inhibidores de MIF de molécula pequeña pueden existir en varias formas tautoméricas e isómeros geométricos y mezclas de los mismos. Tales formas tautoméricas se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación. Los tautómeros existen como mezclas de tautómeros en disolución. En forma sólida, habitualmente predomina un tautómero. Aunque puede describirse un tautómero, la presente divulgación incluye todos los tautómeros de los inhibidores de MIF de molécula pequeña.

10 La presente divulgación también incluye atropoisómeros de los inhibidores de MIF de molécula pequeña. Los atropoisómeros se refieren a compuestos de los inhibidores de MIF de molécula pequeña que pueden separarse en isómeros limitados rotacionalmente. Los inhibidores de MIF de molécula pequeña pueden contener dobles enlaces de tipo olefina. Cuando tales enlaces están presentes, los inhibidores de MIF de molécula pequeña existen como configuraciones cis y trans y como mezclas de los mismos.

15 Un "sustituyente adecuado" pretende significar un grupo funcional química y farmacéuticamente aceptable, es decir, un resto que no anula la actividad inhibidora de los inhibidores de MIF de molécula pequeña. Tales sustituyentes adecuados pueden seleccionarse de manera rutinaria por los expertos en la técnica. Los ejemplos ilustrativos de sustituyentes adecuados incluyen, pero no se limitan a grupos halo, grupos perfluoroalquilo, grupos perfluoroalcoxilo, grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos hidroxilo, grupos oxo, grupos mercapto, grupos alquiltio, grupos alcoxilo, grupos arilo o heteroarilo, grupos ariloxilo o heteroariloxilo, grupos aralquilo o heteroaralquilo, grupos aralcoxilo o heteroaralcoxilo, grupos HO-(C=O)-, grupos amino, grupos alquilo y dialquilamino, grupos carbamoilo, grupos alquilcarbonilo, grupos alcoxicarbonilo, grupos alquilaminocarbonilo, grupos dialquilamino, grupos arilcarbonilo, grupos ariloxicarbonilo, grupos alquilsulfonilo, grupos arilsulfonilo y similares.

25 Pueden encontrarse inhibidores de MIF de molécula pequeña preferidos en la solicitud provisional estadounidense 60/556.440, presentada el 26 de marzo de 2004, la solicitud provisional estadounidense 60/296.478, presentada el 8 de junio de 2001; y la solicitud estadounidense 10/164.630, presentada el 10 de junio de 2002.

30 Preferiblemente, en esta realización, se administra una cantidad eficaz de uno o más inhibidores de MIF de molécula pequeña y/o sales de los mismos como principio activo a un sujeto que lo necesita. También son posibles combinaciones de inhibidores de MIF de molécula pequeña.

35 Los compuestos de inhibidor de MIF de molécula pequeña también pueden administrarse en forma de sus sales y/o profármacos farmacéuticamente activos según sea apropiado. Son posibles combinaciones de sales y/o profármacos, como son combinaciones de formas de sal y formas distintas de sal del inhibidor de MIF de molécula pequeña.

40 Otra realización de la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas adecuadas en el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, o una combinación de los mismos, que incluye uno o más inhibidores de MIF de molécula pequeña y/o sales de los mismos como principio activo, y al menos un vehículo, excipiente, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptables.

50 Otra realización de la presente divulgación se refiere a la administración, a un sujeto que lo necesita, de una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña, sal del mismo, y/o profármaco del mismo y al menos un anticuerpo anti-MIF en el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, o una combinación de los mismos.

60 Otra realización de la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas adecuadas en el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la disfunción cardíaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, el tratamiento y/o la prevención de la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, o una combinación de los mismos, que incluye una cantidad eficaz de una combinación de al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña, sal del mismo y/o profármaco del mismo y

65

Sin desear restringirse a la teoría, se cree que la neutralización de la actividad tautomerasa (que se ha demostrado que tiene la citocina MIF) con inhibidores de MIF de molécula pequeña da como resultado o contribuye a la inhibición de la cardiodepresión que se produce tras un infarto de miocardio. La inhibición de la tautomerasa con inhibidores de molécula pequeña da como resultado cardioprotección similar a la de anticuerpos anti-MIF. Puesto que se ha demostrado que MIF tiene actividad tautomerasa y se ha sugerido en estudios *in vitro* que media su actividad, se cree que puede producirse neutralización de MIF una vez que se inhibe su actividad tautomerasa.

Los presentes inventores han encontrado que inhibir MIF y/o neutralizar la actividad tautomerasa de MIF proporciona una terapia anti-citocinas/inflamación contra enfermedades cardíacas. La inhibición de MIF mejora la función cardíaca tras un infarto de miocardio y posibilita ayudar con las secuelas agudas de los infartos de miocardio, tales como reducir la disfunción cardíaca temprana en el infarto de miocardio agudo y reducir la alta morbimortalidad asociada. Una ventaja que la presente invención tiene con respecto a las tecnologías actuales es que a diferencia de las intervenciones terapéuticas en la enfermedad cardíaca que se centran en inotropos, la presente invención, mediante el tratamiento y/o la prevención de la causa de la disfunción cardíaca, puede atenuar la afectación cardiogénica tanto aguda como crónica y mejorar la supervivencia/desenlaces.

Una realización de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto de la presente invención como principio activo (y/o sal y/o profármaco del mismo) y al menos un vehículo, excipiente, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptables para su uso según la invención.

Los compuestos también pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente activas usando opcionalmente vehículos, excipientes, adyuvantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables sustancialmente no tóxicos. Las composiciones para su uso de la presente invención pueden prepararse en cualquier vehículo o diluyente sólido o líquido convencional y opcionalmente cualquier adyuvante obtenido farmacéuticamente de manera convencional a un nivel de dosificación adecuado de manera conocida. Las preparaciones preferidas están en forma administrable que es adecuada para aplicación oral. Estas formas administrables, por ejemplo, incluyen píldoras, comprimidos, comprimidos con película, comprimidos recubiertos, cápsulas, polvos y depósitos.

También son posibles otras formas orales administrables. Los compuestos para su uso de la presente invención y/o preparaciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos pueden administrarse mediante cualquier medio apropiado, incluyendo pero sin limitarse a inyección (intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea) mediante absorción a través de revestimiento epiteliales o mucocutáneos (mucosa oral, revestimientos epiteliales rectales y vaginales, mucosa nasofaríngea, mucosa intestinal); vía oral, vía rectal, vía transdérmica, vía tópica, vía intradérmica, vía intragástrica, vía intracutánea, vía intravaginal, vía intravasal, vía intranasal, vía intrabucal, vía percutánea, vía sublingual, o cualquier otro medio adecuado dentro de las técnicas farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de la presente invención, que contienen al menos un compuesto de la presente invención o sales farmacéuticamente aceptables del mismo como principio activo, se administrarán normalmente en mezcla con materiales vehículos adecuados seleccionados de manera adecuada con respecto a la forma de administración deseada, es decir, comprimidos orales, cápsulas (o bien de carga sólida, de carga semisólida o bien de carga líquida), polvos para constitución, geles orales, elixires, gránulos dispersables, jarabes, suspensiones, y similares, y acorde con las prácticas farmacéuticas convencionales. Por ejemplo, para la administración oral en forma de comprimidos o cápsulas, el componente de fármaco activo puede combinarse con cualquier vehículo inerte farmacéuticamente aceptable no tóxico oral, tal como lactosa, almidón, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico (formas líquidas) y similares. Además, cuando se desee o se necesite, también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes adecuados.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender desde aproximadamente el 5 hasta aproximadamente el 95 por ciento en peso del principio activo, intervalo que incluye todos los valores y subintervalos entre el mismo, incluyendo el 5, el 5,5, el 6, el 6,5, el 7, el 7,5, el 8, el 8,5, el 9, el 9,5, el 10, el 15, el 20, el 25, el 30, el 35, el 40, el 45, el 50, el 55, el 60, el 65, el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 90,5, el 91, el 91,5, el 92, el 92,5, el 93, el 93,5, el 94, el 94,5 y el 95 % en peso.

Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma acacia, alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Entre los lubricantes pueden mencionarse para su uso en estas formas de dosificación, ácido bórico, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, y similares. Los disgregantes incluyen almidón, metilcelulosa, goma guar y similares. También pueden incluirse agentes edulcorantes y aromatizantes y conservantes según sea apropiado. Algunos de los términos indicados anteriormente concretamente disgregantes, diluyentes, lubricantes, aglutinantes y similares, se comentan en más detalle a continuación.

Adicionalmente, los compuestos o composiciones para su uso de la presente invención pueden formularse en forma de liberación sostenida para proporcionar la liberación de velocidad controlada de uno cualquiera o más de los componentes o principios activos para optimizar los efectos terapéuticos, es decir, actividad antihistamínica y similares. Las formas de dosificación adecuadas para la liberación sostenida incluyen comprimidos en capas que contienen capas de diversas velocidades de disgregación o matrices poliméricas de liberación controlada

impregnadas con los componentes activos y conformadas en forma de comprimido o capsulas que contienen tales matrices poliméricas porosas impregnadas o encapsuladas.

5 Las preparaciones en forma líquida incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Como ejemplo pueden mencionarse disoluciones acuosas, etanólicas, acuosas-etanólicas o acuosas-en propilenglicol para inyecciones parenterales o adición de edulcorantes y opacificantes para disoluciones, suspensiones y emulsiones orales. Las preparaciones en forma líquida también pueden incluir disoluciones para administración intranasal.

10 Las preparaciones en aerosol adecuadas para inhalación pueden incluir disoluciones y sólidos en forma de polvo, que pueden estar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como gas comprimido inerte, por ejemplo, nitrógeno.

15 Para preparar supositorios, en primer lugar se funde una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos tal como manteca de cacao, y se dispersa homogéneamente el principio activo en ella mediante agitación o mezclado similar. Entonces se vierte la mezcla homogénea fundida en moldes dimensionados convenientemente, se deja enfriar y de ese modo se solidifica.

20 También se incluyen preparaciones en forma sólida que se desea que se conviertan, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración o bien oral o bien parenteral. Tales formas líquidas incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones.

25 Los compuestos para su uso de la presente invención también pueden administrarse por vía transdérmica. Las composiciones transdérmicas pueden adoptar la forma de cremas, lociones, aerosoles y/o emulsiones y pueden incluirse en un parche transdérmico de tipo matriz o depósito tal como es convencional en la técnica para este fin.

30 El término cápsula se refiere a un recipiente o recinto especial compuesto por metilcelulosa, alcoholes polivinílicos o almidón o gelatinas desnaturalizadas para retener o contener composiciones que comprenden los principios activos. Las cápsulas de cubierta dura normalmente están compuestas por combinaciones de gelatinas de piel de cerdo y hueso de resistencia de gel relativamente alta. La propia cápsula puede contener pequeñas cantidades de colorantes, agentes opacificantes, plastificantes y conservantes.

35 Comprimido significa una forma de dosificación sólida comprimida o moldeada que contiene los principios activos con diluyentes adecuados. El comprimido puede prepararse mediante compresión de mezclas o granulaciones obtenidas mediante granulación en húmedo, granulación en seco o mediante compactación bien conocidas por un experto en la técnica.

Geles orales se refieren a los principios activos dispersos o solubilizados en una matriz semisólida hidrófila.

40 Polvos para constitución se refieren a combinaciones de polvos que contienen los principios activos y diluyentes adecuados que pueden suspenderse en agua o zumos.

Los diluyentes adecuados son sustancias que habitualmente constituyen la principal parte de la composición o forma de dosificación.

45 Los diluyentes adecuados incluyen azúcares tales como lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol, almidones derivados de trigo, maíz, arroz y patata, y celulosas tales como celulosa microcristalina. La cantidad de diluyente en la composición puede oscilar entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 95 % en peso de la composición total, preferiblemente entre aproximadamente el 25 y aproximadamente el 75 %, más preferiblemente entre aproximadamente el 30 y aproximadamente el 60 % en peso.

50 El término disgregantes se refiere a materiales añadidos a la composición para ayudarla a romperse (disgregarse) y liberar los medicamentos. Los disgregantes adecuados incluyen almidones, almidones modificados "solubles en agua fría" tales como carboximetilalmidón de sodio, gomas naturales y sintéticas tales como goma garrofín, goma karaya, goma guar, tragacanto y agar, derivados de celulosa tales como metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, celulosas microcristalinas y celulosas microcristalinas reticuladas tales como croscarmelosa de sodio, alginatos tales como ácido alginico y alginato de sodio, arcillas tales como bentonitas y mezclas efervescentes. La cantidad de disgregante en la composición puede oscilar entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 20 % en peso de la composición, más preferiblemente entre aproximadamente el 5 y aproximadamente el 10 % en peso.

60 Los aglutinantes se caracterizan por ser sustancias que unen o "adhieren" polvos entre sí y los hacen cohesivos formando gránulos, sirviendo por tanto como "adhesivo" en la formulación. Los aglutinantes añaden fuerza cohesiva a la ya disponible en el diluyente o agente de carga. Los aglutinantes adecuados incluyen azúcares tales como sacarosa, almidones derivados de trigo, maíz, arroz y patata; gomas naturales tales como goma arábica, gelatina y tragacanto; derivados de algas tales como ácido alginico, alginato de sodio y alginato de amonio y calcio; materiales celulósicos tales como metilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio y hidroxipropilmetilcelulosa; polivinilpirrolidona; y compuestos inorgánicos tales como silicato de aluminio y magnesio. La cantidad de aglutinante en la composición

65

puede oscilar entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 20 % en peso de la composición, más preferiblemente entre aproximadamente el 3 y aproximadamente el 10 % en peso, incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 3 y aproximadamente el 6 % en peso.

5 Lubricante se refiere a una sustancia añadida a la forma de dosificación para permitir que el comprimido, gránulos, etc., tras haberse comprimido, se libere del molde o troquel reduciendo la fricción o el desgaste. Los lubricantes adecuados incluyen estearatos metálicos tales como estearato de magnesio, estearato de calcio o estearato de potasio; ácido esteárico; ceras de alto punto de fusión; y lubricantes solubles en agua tales como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicoles d,l-leucina. Los lubricantes se añaden
10 habitualmente a la última etapa antes de la compresión, puesto que deben estar presentes sobre las superficies de los gránulos y entremedias de ellos y las partes de la prensa de comprimidos. La cantidad de lubricante en la composición puede oscilar entre aproximadamente el 0,2 y aproximadamente el 5 % en peso de la composición, preferiblemente entre aproximadamente el 0,5 y aproximadamente el 2 %, más preferiblemente entre aproximadamente el 0,3 y aproximadamente el 1,5 % en peso.

15 Los antiapelmazantes son materiales que impiden el apelmazamiento y mejoran las características de flujo de las granulaciones, de modo que el flujo sea suave y uniforme. Algunos antiapelmazantes incluyen dióxido de silicio y talco. La cantidad de antiapelmazante en la composición puede oscilar entre el aproximadamente el 0,1 % y aproximadamente el 5 % en peso de la composición total, preferiblemente entre aproximadamente el 0,5 y aproximadamente el 2 % en peso.

Los agentes colorantes son excipientes que proporcionan coloración a la composición o la forma de dosificación. Tales excipientes pueden incluir colorantes con calidad para alimentos y colorantes con calidad para alimentos adsorbidos sobre un adsorbente adecuado tal como arcilla u óxido de aluminio. La cantidad del agente colorante
25 puede variar desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 5 % en peso de la composición, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 1 %.

Pueden encontrarse técnicas para la formulación y administración de los compuestos para su uso de la presente invención en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton Pa. Una composición adecuada que comprende al menos un compuesto de la invención puede ser una disolución del compuesto en un vehículo farmacéutico líquido adecuado o cualquier otra formulación tal como comprimidos, píldoras, comprimidos con película, comprimidos recubiertos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, polvos y depósitos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones espesas, emulsiones, y similares.

35 El término "tratar y/o prevenir" tal como se usa en el presente documento se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o impedir el trastorno o estado al que se aplica el término, o uno o más síntomas del trastorno o estado. El término "tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere al acto de tratar y/o prevenir tal como de se definió el término anteriormente. Preferiblemente, el sujeto tratado o que recibe la administración es un sujeto humano y más preferiblemente un sujeto humano que necesita tratamiento.

40 Los términos, "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significan una cantidad suficiente para producir cualquier diferencia observable o medible y preferiblemente la mejora en el estado o indicación de un sujeto, y preferiblemente del estado o indicación que busca tratarse.

45 A continuación se facilitan los números de registro para anticuerpos anti-MIF murinos:

para el AcM III.D.9: HB-12220

para el AcM XIV.15.5: HB-12221.

50 Preferiblemente, un estado "agudo", por ejemplo infarto de miocardio agudo, se distingue de un estado "crónico", por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva crónica.

55 Cuando se usa en el presente documento, el término, "anticuerpo" incluye de manera adecuada fragmento(s) derivados de anticuerpos, Fab, fragmento(s) de Fab, Fab₂, regiones derivadas de CDR, péptidos derivados de anticuerpos y/o anticuerpos de cadena sencilla) tal como conocen los expertos habituales en la técnica. Se prefiere Fab.

60 Cuando se usa en el presente documento, el término, "disfunción cardíaca" puede incluir de manera adecuada una o más indicaciones seleccionadas del grupo que incluye disfunción cardíaca, irregularidad en la actividad miocárdica, depresión en la actividad miocárdica, disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura, disfunción cardíaca tras infarto de miocardio agudo, cardiodepresión y una combinación de los mismos. Un médico experto habitual en la técnica entiende estos términos.

65 A continuación se facilitan otras realizaciones de la presente divulgación.

A. Un método para tratar y/o prevenir la cardiodepresión y/o la disfunción cardiaca asociadas con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

5 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF.

B. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

10 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF,

en el que la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura incluye irregularidad en la actividad miocárdica o depresión en la actividad miocárdica o ambas.

C. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

15 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.

D. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

20 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF,

25 en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF, y en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

E. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

30 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-MIF.

F. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

35 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF, en el que la composición se administra a través de al menos una vía seleccionada del grupo que incluye inyección intramuscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, inyección intravascular, y una combinación de las mismas.

G. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

45 al menos un anticuerpo anti-MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

H. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

50 al menos un inhibidor de MIF; y

55 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable en el que dicho inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.

I. Un método para tratar y/o prevenir la cardiodepresión y/o la disfunción cardiaca en un sujeto, incluyendo el método:

60 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un anticuerpo anti-CD74.

J. Un método para tratar y/o prevenir la cardiodepresión y/o la disfunción cardiaca en un sujeto, incluyendo el método:

65 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un anticuerpo anti-CD74, en el que la disfunción cardiaca y/o la cardiodepresión incluye irregularidad en la actividad miocárdica o depresión en la

actividad miocárdica, o ambas.

K. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto, incluyendo el método:

5 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD74, en el que la disfunción cardíaca incluye al menos una disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura.

L. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto, incluyendo el método:

10 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de CD74, en el que el inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo anti-CD74.

M. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca y/o la cardiodepresión en un sujeto, incluyendo el método:

15 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de CD74, en el que el inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-CD74.

N. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto, incluyendo el método:

20 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de CD74, en el que el inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-CD74.

O. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto, incluyendo el método:

25 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un anticuerpo anti-CD74, en el que la composición se administra a través de al menos una vía seleccionada del grupo que incluye inyección intramuscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, inyección intravascular, y una combinación de las mismas.

30 P. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca y/o la cardiodepresión en un sujeto, que incluye:

35 al menos un anticuerpo anti-CD74; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Q. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca en un sujeto, que incluye:

40 al menos un inhibidor de CD74; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable,

45 en el que el inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo anti-CD74.

R. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

50 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.

S. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

55 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.

T. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

60 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-MIF.

U. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

65 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-MIF.

V. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

5 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF y al menos un anticuerpo anti-CD74.

W. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

10 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF y al menos un inhibidor de CD74, en el que dicho inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo anti-CD74.

X. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

15 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF y al menos un inhibidor de CD74, en el que el inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-CD74.

Y. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

20 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF y al menos un inhibidor de CD74, y en la que el inhibidor de CD74 incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-CD74.

Z. Un método para mejorar la función cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

25 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un anticuerpo anti-MIF,

en el que la composición se administra a través de al menos una vía seleccionada del grupo que incluye inyección intramuscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, inyección intravascular, y una combinación de las mismas.

30 AA. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca y/o la cardiodepresión en un sujeto, que incluye:

al menos un anticuerpo anti-MIF; y

35 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

BB. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca y/o la cardiodepresión en un sujeto, que incluye:

40 al menos un anticuerpo anti-MIF;

al menos un anticuerpo anti-CD74; y

45 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

CC. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

50 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-TNFR y al menos un anticuerpo anti-MIF.

DD. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

55 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de TNFR y al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.

60 EE. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

65 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de TNFR y al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al

menos un anticuerpo anti-MIF,

en el que el anticuerpo anti-TNFR incluye al menos un anticuerpo monoclonal.

5 FF. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de TNFR y al menos un inhibidor de MIF,

10 en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF,

15 y en el que el anticuerpo anti-TNFR incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal.

GG. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

20 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de TNFR y al menos un inhibidor de MIF,

en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-MIF.

25 HH. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de TNFR y al menos un inhibidor de MIF,

30 en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-MIF.

35 II. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de TNFR y al menos un inhibidor de MIF,

40 en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-MIF.

JJ. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca y/o la cardiodepresión en un sujeto, que incluye:

45 al menos un anticuerpo anti-TNFR;

al menos un anticuerpo anti-MIF.

50 KK. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca en un sujeto, que incluye:

al menos un inhibidor de TNFR;

55 al menos un inhibidor de MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable;

en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR.

60 LL. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardíaca en un sujeto, que incluye:

al menos un inhibidor de TNFR;

65 al menos un inhibidor de MIF; y

- al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 5 en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.
- MM. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardiaca en un sujeto, que incluye:
- 10 al menos un inhibidor de TNFR;
- al menos un inhibidor de MIF; y
- al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 15 en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.
- NN. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardiaca en un sujeto, que incluye:
- 20 al menos un inhibidor de TNFR;
- al menos un inhibidor de MIF; y
- 25 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-MIF.
- 30 OO. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardiaca en un sujeto, que incluye:
- al menos un inhibidor de TNFR;
- 35 al menos un inhibidor de MIF; y
- al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 40 en el que el inhibidor de TNFR incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-TNFR y en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo humanizado monoclonal anti-MIF.
- PP. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto, incluyendo el método:
- 45 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF.
- QQ. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto, incluyendo el método:
- 50 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un anticuerpo anti-MIF,
- en el que la disfunción cardiaca incluye al menos una seleccionada del grupo que incluye irregularidad en la actividad miocárdica, depresión en la actividad miocárdica, y una combinación de los mismos.
- RR. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca y/o la cardiodepresión en un sujeto, incluyendo el método:
- 55 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF,
- en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.
- 60 SS. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto, incluyendo el método:
- administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF,
- 65 en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo monoclonal anti-MIF.
- TT. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto, incluyendo el método:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF, en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo humanizado anti-MIF.

5 UU. Una composición farmacéutica, que incluye:

una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

VV. Una composición farmacéutica, que incluye:

al menos un inhibidor de MIF; y

15

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable,
en el que el inhibidor de MIF incluye al menos un anticuerpo anti-MIF.

WW. Un método para identificar un inhibidor de MIF, incluyendo el método:

20

exponer al menos un miocito a MIF;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF;

exponer el miocito a al menos un MIF y al menos un agente candidato;

25

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF en presencia del agente candidato; y

determinar si el agente candidato afecta a la actividad de miocito relacionada con MIF.

30

XX. Un método para identificar un inhibidor de MIF, incluyendo el método:

exponer al menos un miocito a MIF;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF;

35

exponer el miocito a al menos un MIF y al menos un agente candidato;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF en presencia del agente candidato; y

40

determinar si el agente candidato afecta a la actividad de miocito relacionada con MIF,

en el que la actividad de miocito relacionada con MIF se determina mediante inmunoquímica.

45

YY. Un método para identificar un inhibidor de MIF, incluyendo el método:

exponer al menos un miocito a MIF;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF;

50

exponer el miocito a al menos un MIF y al menos un agente candidato;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF en presencia del agente candidato; y

55

determinar si el agente candidato afecta a la actividad de miocito relacionada con MIF,

en el que la actividad de miocito relacionada con MIF se determina mediante ensayo de Langendorff.

ZZ. Un método para identificar un inhibidor de MIF, incluyendo el método:

60

exponer al menos un miocito a MIF;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF;

65

exponer el miocito a al menos un MIF y al menos un agente candidato;

determinar al menos una actividad de miocito relacionada con MIF en presencia del agente candidato; y

determinar si el agente candidato afecta a la actividad de miocito relacionada con MIF,

en el que la actividad de miocito relacionada con MIF se determina mediante ecocardiografía.

5 AAA. Un método para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos, que incluye:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo.

15 BBB. Un método para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos, que incluye:

administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye:

al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo; y

25 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

CCC. Un método para tratar y/o prevenir la cardiodepresión y/o la disfunción cardiaca asociadas con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

30 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo.

DDD. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

35 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo,

en el que la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura incluye irregularidad en la actividad miocárdica o depresión en la actividad miocárdica o ambas.

40 EEE. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

45 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo.

FFF. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

50 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo, en el que la composición se administra a través de al menos una vía seleccionada del grupo que incluye inyección intramuscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, inyección intravascular, y una combinación de las mismas.

55 GGG. Una composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto, que incluye:

al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo; y

60 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

HHH. Un método para mejorar la función cardiaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

65 administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo.

III. Un método para mejorar la función cardiaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

5 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo, en el que la composición se administra a través de al menos una vía seleccionada del grupo que incluye inyección intramuscular, inyección peritoneal, inyección subcutánea, inyección intravascular, y una combinación de las mismas.

JJJ. Un método para tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto tras infarto de miocardio agudo, incluyendo el método:

10 administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que incluye al menos un inhibidor de MIF de molécula pequeña y/o sal del mismo.

15 KKK. Una composición farmacéutica eficaz para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos, que incluye una cantidad eficaz de
20 una combinación que incluye:

al menos un anticuerpo anti-TNFR;

25 al menos un anticuerpo anti-MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 LLL. Una composición farmacéutica eficaz para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos, que incluye una cantidad eficaz de
35 una combinación que incluye:

al menos un anticuerpo anti-CD-74;

40 al menos un anticuerpo anti-MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 MMM. Un método para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos, que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de
50 una combinación que incluye:

al menos un anticuerpo anti-TNFR;

al menos un anticuerpo anti-MIF; y

55 al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 NNN. Un método para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos, que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de
65 una combinación que incluye:

al menos un anticuerpo anti-CD-74;

al menos un anticuerpo anti-MIF; y

al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 OOO. Otra realización de la divulgación se refiere a administrar una cantidad eficaz de uno o más del receptor de MIF soluble y/o antagonista del receptor de MIF (opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable) a un sujeto que lo necesita para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos.

15 PPP. Otra realización de la divulgación se refiere a administrar una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes, en cualquier combinación:

inhibidor de MIF de molécula pequeña;

receptor de MIF soluble;

20 antagonista del receptor de MIF;

anticuerpo anti-CD74;

25 anticuerpo anti-MIF;

anticuerpo anti-TNFR; y

opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable

30 a un sujeto que lo necesita para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos.

35 QQQ. Otra realización de la divulgación se refiere a una composición, que incluye una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes, en cualquier combinación:

40 inhibidor de MIF de molécula pequeña;

receptor de MIF soluble;

45 antagonista del receptor de MIF;

anticuerpo anti-CD74;

anticuerpo anti-MIF;

50 anticuerpo anti-TNFR; y

opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable

55 en el que la composición es eficaz para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos.

60 RRR. Otra realización de la divulgación se refiere a administrar una cantidad eficaz de anticuerpo anti-TNFR; y

opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable

65 a un sujeto que lo necesita para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardiaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que

lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos.

5 SSS. Otra realización de la divulgación se refiere a una composición que incluye una cantidad eficaz de anticuerpo anti-TNFR; y

opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable

10 en el que la composición es eficaz para al menos uno seleccionado del grupo que incluye tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la irregularidad en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la depresión en la actividad miocárdica en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la disfunción cardíaca tras infarto de miocardio agudo en un sujeto que lo necesita, tratar y/o prevenir la cardiodepresión en un sujeto que lo necesita, y una combinación de los mismos.

Ejemplos

20 Habiendo descrito de manera general esta invención, puede obtenerse una comprensión adicional mediante determinados ejemplos específicos, que se proporcionan en el presente documento únicamente con los fines de ilustración, y no se pretende que sean limitativos a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1

25 Anticuerpos y citocinas. Se reconstituyeron IgG de cabra anti-MIFh y MIFhr (R&D Systems, Minneapolis, NIN) en PBS y BSA al 0,1 % en PBS respectivamente, se tomaron alícuotas, y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se almacenó anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP (BioRad Corp., Hercules, CA) a 4°C hasta su uso.

30 Animales y diseño experimental. Se obtuvieron ratones C57BL/6J y C3H/HeJ a las 6-10 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME). En este estudio, se usaron ratas Sprague-Dawley adultas (Harlan Laboratories, Houston, TX) que pesaban 325-360 g. Se hizo que estuvieran disponibles alimentos comerciales y agua corriente a voluntad. Se revisaron y aprobaron todos los protocolos de animales por el University of Texas Southwestern Medical Center Institutional Animal Care Advisory Committee y cumplían con las normas que regulan el uso de animales publicadas por el NIH. A los ratones C57BL/6J se les inyectaron por vía i.p. LPS de *E. coli* 0111:B4 4 mg/kg (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y se sacrificaron tras la inyección en puntos de tiempo indicados en el texto mediante asfixia con CO₂ y posterior dislocación cervical. Se usaron ratones no sometidos a inyección como controles. Se inyectaron (100 µg en 200 µl de PBS) dos anticuerpos anti-MIF (III.D.9 y XIV.15.5, Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) y su control de isotipo (HB-49, Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) i.p. 90 min antes de la exposición a LPS en los estudios de ecocardiograma. Se extirparon corazones enteros y se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C o se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % durante 24 h y se colocaron en etanol al 70 % para inmunohistoquímica.

Ejemplo 2

45 Extracción de proteínas e inmunotransferencia de tipo Western. Se descongelaron y homogenizaron los corazones sobre hielo en solución salina tamponada con Tris (TBS, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) que contenía NP40 al 1 %, ácido desoxicólico al 0,5 %, SDS al 0,1 %, EDTA 2 mM y PMSF 1 mM. Se cuantificó la concentración de lisado usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Hercules, CA). Se diluyó proteína (20 µg) 1:1 con tampón de muestra de Laemmli (Bio-Rad, Hercules, CA) y se resolvió en geles de poliacrilamida con SDS al 18 % en condiciones reductoras. Se transfirió el gel a membranas de PVDF (NEN, Boston, MA) usando un aparato de transferencia semiseco (Bio-Rad, Hercules, CA) a 15 V durante 15 min. Se bloquearon las membranas con TBS/Tween-20 al 0,1 % (TBS-T) con leche en polvo desnatada al 0,5 % durante 30 min y se incubaron con IgG de cabra anti-MIFh (1:750) en TBS/Tween-20 al 0,1 %/leche desnatada al 5 % durante la noche a 4°C. Se lavaron las membranas 3 veces durante 10 min en TBS-T, se incubaron con anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP (1:1000) durante 1 h a TA, y se lavaron 4 veces durante 10 min con TBS-T. Se expusieron las membranas a 5 ml de una mezcla de luminol más peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL) durante 5 min y se detectó la reacción de quimioluminiscencia resultante mediante película X-OMAT AR de Kodak (Eastman Kodak Co., Rochester, Nueva York).

Ejemplo 3

65 Extracción de ARN, preparación de sondas y transferencia de tipo Northern. Se extrajo ARN total con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) a partir de corazones descongelados sobre hielo según el protocolo del fabricante y se cuantificó por espectrofotometría. Se preparó una sonda de tipo Northern específica para MIF aislando ADN (DNeasy Tissue Kit, Qiagen, Valencia, CA) a partir del plásmido de MIF (Research Genetics, Huntsville, AL) y

5 cortándola posteriormente con enzimas de restricción ECOR1 y NOT I (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Se resolvió el ADN resultante en un gel de agarosa al 1,2 %, se purificó (GenElute Agarose Spin Columns, Supelco, Bellefonte, PA), se marcó con 5 µl de ³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) (PerkinElmer, Boston, MA) usando perlas de marcaje Ready-To-Go (Amersham Pharmacia, Piscatany, NJ), y se purificó en microcolumnas ProbeQuant (Amersham Pharmacia, Piscatany, NJ) según los protocolos del fabricante.

10 Se resolvió ARNm (10 µg) en geles de agarosa al 1,2 % a 100 V durante 1 h y se transfirió a membranas Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, Buckingham, Inglaterra) a 100 V durante 1 h en una unidad de electroforesis de transferencia (TransPhor PowerLid, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Se unió ARN a las membranas durante 2 min usando un dispositivo GS Gene Linker (Bio- Rad, Hercules, CA). Se hibridaron previamente las membranas en Perfect-Hyb Plus (Sigma, St. Louis, MO) durante 4-5 h a 42°C y entonces se incubaron con sonda de ADN para MIF marcada con ³²P a 42°C durante la noche. Se lavaron las membranas dos veces durante 30 min en 2X SSC/SDS al 0,1 % a 46°C, y se lavaron dos veces durante 30 min en 0,2X SSC/SDS al 0,1 % a 46°C, y se detectaron mediante película X-OMAT AR de Kodak (Eastman Kodak Co., Rochester, Nueva York). Entonces se examinaron con sonda las mismas membranas con β-actina radiomarcada para garantizar igual carga de proteína.

Ejemplo 4

20 Inmunohistoquímica. Se fijó tejido en formalina tamponada neutra y se procesó a parafina y posteriormente se sometió a inmunotinción a TA en un dispositivo de inmunotinción automatizado Techmate™ 1000 de BioTek Solutions (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) usando el sistema ultra de estreptavidina y biotina con peroxidasa de rábano y cromógeno diaminobencidina (DAB) (Signet Laboratories, Dedham, MA). Se predeterminaron diluciones de anticuerpo primario óptimas usando tejidos de control positivo conocidos (rata tras exposición a LPS). Se cortaron secciones de parafina en 3 µm en un microtomo rotatorio, se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (portaobjetos con hueco de capilaridad POP 100, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y se secaron al aire durante la noche. Entonces se desparafinizaron las secciones en xileno y etanol, se extinguieron con peróxido de hidrógeno al 3 % reciente durante 10 min para inhibir la actividad de peroxidasa tisular endógena, y se enjuagaron con agua desionizada. Se incubaron las secciones en suero de bloqueo sin marcar durante 15 min para bloquear la unión no específica del anticuerpo secundario y entonces se incubaron durante 25 min o bien con anticuerpo de conejo anti-MIF (1:400, Torrey Pines BioLabs, Inc., Houston, TX) diluido en tampón citrato al 1 % (BioPath, Oklahoma City, OK), o bien con tampón solo como control de reactivo negativo. Tras los lavados en tampón, se incubaron las secciones durante 25 min con una disolución de anticuerpo secundario polivalente biotinilado (que contenía inmunoglobulinas de cabra anti-conejo). Después, se lavaron las secciones con tampón, se incubaron en complejo de estreptavidina-biotina conjugado con peroxidasa de rábano durante 15 min, se lavaron de nuevo en tampón, y entonces se incubaron con 2 cambios, 5 en cada una, de una mezcla recién preparada de DAB y H₂O₂ en tampón, seguido de lavado en tampón y después agua. Entonces se sometieron las secciones a contratinción con hematoxilina, deshidratada en una serie graduada de etanol y xileno, y se colocó un cubreobjetos. Se revisaron los portaobjetos por microscopía óptica y se identificaron reacciones positivas con DAB como producto de reacción marrón oscuro.

Ejemplo 5

45 Determinación de la función cardíaca en respuesta a MIFr. Se usaron ratones C57BL/6J y C3H/HeJ en los ensayos de Langendorff. En resumen, se administraron 200 U de sulfato de heparina i.p., se sacrificaron los ratones 20 min más tarde, y se extirpó inmediatamente el corazón y se colocó sobre hielo en tampón de Krebs-Hanseleit (NaHCO₃ 2 mM, NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glucosa 11,1 mM, pH 7,4, que se preparó nuevo con agua desionizada, desmineralizada y se burbujeó con el 95 % de O₂ y el 5 % de CO₂ (pO₂ de 590 mmHg, pCO₂ de 38 mmHg)). Se canuló la aorta con tubo PE50, se sometió el corazón a perfusión de manera retrógrada a través de la raíz aórtica con tampón de Krebs-Hanseleit prefiltrado y oxigenado a una velocidad de flujo constante de 1,5 ml/min (T de 37°C) y un volumen de recirculación de 100 ml. Se colocó el corazón en una cámara con camisa de agua para mantener la temperatura y humedad constantes. Se conectó un tubo de polietileno PE60 de Intramedic a un transductor de presión Statham insertado en el ventrículo izquierdo (LV) para medir la presión de LV. Se monitorizó la temperatura usando una aguja termistora 27G insertada en el músculo del LV. Tras la instrumentación, se dejaron estabilizar los corazones durante 10 min y los corazones que no lograron alcanzar una presión estable o desarrollaron arritmias persistentes durante este tiempo se excluyeron del estudio. Tras la estabilización, se midieron simultáneamente la presión de LV y su primera derivada (dP/dt), frecuencia cardíaca y perfusión coronaria con un polígrafo multicanal 7D de Grass (Grass Instruments, Quincy, MA). Se determinó la función cardíaca para todos los corazones trazando valores pico de presión sistólica de LV y ±dP/dt, la., frente a cambios en la velocidad de flujo coronario. Se sometieron los corazones a perfusión con o sin MIFr 20 ng/ml añadido al perfundido.

Ejemplo 6

65 Determinación de la disfunción cardíaca mediante ecocardiografía. Se realizaron ecocardiogramas para evaluar la función sistólica usando mediciones en modo M. Se anestesiaron ratones con isoflurano al 5 % con 2,5 l/min de O₂ durante 20 segundos (hasta estado de inconsciencia) seguido por isoflurano al 2 % y O₂ durante un promedio de 12-

15 min. Se retiró el pelo del tórax y el abdomen superior usando crema depilatoria Nair® tras dejarla reposar durante 3 min usando una gasa. Se obtuvieron mediciones de ecocardiografía en ratones anestesiados aproximadamente 5-8 min tras la inducción para permitir que pasara cualquier depresión cardiaca transitoria. Se han notificado estos cambios mínimos y transitorios en la función cardiaca detectados mediante ecocardiografía usando isoflurano inhalado, aunque se ha notificado que FS (%) es estable. Se realizó ecocardiografía cardiaca usando un dispositivo Sonos 5500 de Hewlett-Packard (Agilent Technologies; Edmonton, Alberta, Canadá) con una velocidad de imágenes de 300-500 imágenes/s de manera aleatoria y ciega. Se colocó un transductor lineal de 12 MHz en el hemitórax izquierdo interconectado con una capa de gel de transmisión de US (Aquasonic 100, Parker Laboratories; Fairfield, NJ). El plano de obtención de imágenes de eje corto paraesternal bidimensional guió la obtención de perfiles en modo M de LV cerca del nivel del músculo papilar. La profundidad se fijó a un mínimo de 2 cm con una velocidad de barrido de 150 m/s. Se imprimieron los perfiles en una impresora a color de Sony (UP-5200, Sony).

Ejemplo 7

Mediciones en modo M. Los datos representaron el promedio de al menos dos exploraciones independientes, cada una de las cuales representa el promedio de al menos tres latidos seleccionados. Se definió la diástole final como la dimensión diastólica de LV máxima, y se definió la sístole final como el pico del movimiento de la pared posterior. Se calculó la función sistólica a partir de dimensiones de LV como acortamiento fraccional (FS) tal como sigue: FS (%): $LVED-LVES/LVED \times 100$, tal como se muestra en la figura 5A.

Ejemplo 8

Análisis estadístico. Los datos de transferencia tipo Northern e inmunotransferencia tipo Western se expresan como media \pm error estándar y se analizan estadísticamente usando un análisis de varianza de una vía. Se realizó la determinación de la significación entre grupos de control y experimentales usando el método de Tukey ($p < 0,05$). La función cardiaca determinada mediante la preparación de Langendorff se expresa como media \pm error estándar y se realizaron análisis independientes para cada uno de LVP, $+dP/dt_{máx}$, y $-dP/dt_{máx}$, como función del grupo de tratamiento y la velocidad de flujo coronario usando un análisis de varianza de mediciones repetidas. Se usó un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). La función cardiaca determinada por ecocardiograma se expresa mediante % de acortamiento fraccional $(LVED-LVES/LVED \times 100) \pm$ desviación estándar y se analiza usando un análisis de varianza de una vía de mediciones repetidas. Se realizaron comparaciones adicionales usando la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos específicos ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando SigmaStat 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL) y Microsoft Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA).

Ejemplo 9

La proteína MIF se expresa de forma constitutiva por miocitos cardiacos *in vivo* y se libera en respuesta a la exposición a LPS. Tanto la inmunoquímica como el análisis de tipo Western realizados en tejido cardiaco documentaron la presencia de MIF en células cardiacas, incluyendo miocitos auriculares y ventriculares, en condiciones de control del nivel inicial (figuras 1 y 2). Tras la exposición a endotoxinas, tanto la inmunoquímica como el análisis de inmunotransferencia documentan un descenso significativo en MIF de tejido cardiaco tras las endotoxinas. Este descenso fue el más intenso (descenso del 75 %) a las 12 h, pero volvió hasta cerca de los niveles de control de nivel inicial a las 24 h. Este patrón de expresión en el corazón es similar al presenciado en el hígado y el bazo (figura 2), y concuerda con la hipótesis de que se libera MIF a partir de reservas previamente formadas dentro del tejido tras exposición a LPS. La liberación de MIF del tejido es evidente a las 4 horas en inmunotransferencia (figura 1) y se correlaciona con el aumento en los niveles séricos tras la exposición a endotoxinas (tabla 1).

Tabla 1. Niveles séricos de MIF tras una exposición a endotoxinas 4 mg/kg. 3 ratones/grupo; realización de estadística (ANOVA de una vía)					
Nivel inicial	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas	48 horas
79,1 \pm 4,6	90,9 \pm 8,7	118,1 \pm 5,6*	81,4 \pm 5,8	70,1 \pm 5,1	69,9 \pm 9,0

Ejemplo 10

Expresión de ARNm de MIF de miocardio tras la exposición a endotoxinas. El análisis de tipo Northern de ARN obtenido a partir de corazones o bien de ratones de control o bien de ratones expuestos a LPS en puntos de tiempo dados indica que ARNm de MIF se expresa de forma constitutiva en ratones de control, y que tras la exposición a LPS, no puede detectarse ningún cambio significativo en la concentración ARNm de MIF en preparaciones de corazones enteros (figura 3).

Ejemplo 11

MIF induce disfunción cardiaca diastólica y sistólica. Para determinar si MIF influye directamente en la función cardiaca, se sometieron corazones de ratón normal con latido espontáneo (preparación de Langendorff) a perfusión

con MIF recombinante (MIFr) a una concentración de 20 ng/ml, aproximándose a la documentada en suero de humanos con choque séptico (20). Se determinaron las respuestas a MIF en corazones tanto de ratones C57BL/6J como de ratones C3H/HeJ. Los ratones C3H/HeJ son resistentes a endotoxina (41-43), controlando por tanto la posibilidad de que cualquier depresión observada pueda deberse a trazas de endotoxina en el perfundido. La tabla 2 ilustra las respuestas de ambas variedades de ratón a la perfusión aórtica retrógrada a 1,5 ml/min con perfundido de control o perfundido que contiene MIF recombinante 20 ng/ml. La perfusión con MIF condujo a un descenso significativo en LVP, $+dP/dt_{m\acute{a}x}$, y $-dP/dt_{m\acute{a}x}$ en ambas variedades de ratón. La figura 4 ilustra el efecto de MIF a lo largo de un intervalo de velocidades de flujo coronario. Existe un aumento gradual en el rendimiento contráctil en todos los corazones independientemente de la asignación de grupo experimental. La comparación de los corazones expuestos a MIF con corazones de control reveló un cambio descendiente en las curvas de función, indicando depresión significativa diastólica y sistólica en respuesta a MIFr 20 ng/ml ($p < 0,05$). El efecto de MIF fue estadísticamente idéntico en las variedades tanto sensible a endotoxina (C57BL/6J) como resistente a endotoxina (C3H/HeJ). Del mismo modo, no hubo diferencias en LVP, $+dP/dt_{m\acute{a}x}$, y $-dP/dt_{m\acute{a}x}$, entre los corazones de estudio de C57BL/6J y C3H/HeJ sometidos a perfusión con MIFr.

Tabla 2. Función cardíaca pico media antes y después del tratamiento con MIFr en una preparación de Landendorf en ratones C57BL/6J y ratones C3H/HeJ resistentes a LPS. * $p < 0,05$.			
	LVP (mm de Hg)	+ $dP/dt_{m\acute{a}x}$ (mm de Hg/s)	-$dP/dt_{m\acute{a}x}$ (mm de Hg/s)
C57BL/6J Control (n=10)	92,9 ± 2,3	2180 ± 60	1856 ± 65
C57BL/6J MIFr (n=10)	77,9 ± 5,1*	1920 ± 89*	1545 ± 122*
C3H/HeJ Control (n=7)	93,7 ± 3,5	2250 ± 42	1809 ± 84
C3H/HeJ MIFr (n=7)	75,2 ± 5,5*	1800 ± 106*	1343 ± 138*

Ejemplo 12

Anticuerpos anti-MIF mejoran la depresión cardíaca inducida por LPS *in vivo*. Para determinar la influencia de MIF en la patogénesis de la disfunción cardíaca *in vivo*, se realizó ecocardiografía en serie (modo M) en ratones expuestos a LPS que se habían tratado previamente (90 minutos antes) con cualquiera de anticuerpos monoclonales anti-MIF, un anticuerpo de control de isotipo o sin tratamiento (figura 5). A las cuatro horas tras la exposición a LPS, el % de acortamiento fraccional (% FS) de todos los ratones expuestos a LPS se deprimió de manera similar (reducción del 50 % en (% FS), independientemente de la asignación de grupo. Sin embargo, ocho horas tras la exposición a LPS los ratones a los que se les inyectó cualquier anticuerpo monoclonal anti-MIF demostraron recuperación estadísticamente significativa de (% FS en comparación con los grupos expuestos a LPS que o bien no recibieron ningún tratamiento o bien recibieron control de anticuerpo de isotipo (figura 5). Esta recuperación mejorada de la función continuó a las 12, 24 y 48 h. A las 48 horas tras la exposición, los grupos tratados con anti-MIF tenían una recuperación casi total de (% FS, mientras que los grupos expuestos a LPS permanecieron intensamente deprimidos. A lo largo de las 48 horas, (% FS) de ratones de simulación no cambió significativamente, indicando que la función cardíaca no se veía afectada por la anestesia o el régimen de pruebas en sí mismo. Además, en todos los puntos de tiempo, los ratones a los que se les inyectaron controles de anticuerpo de isotipo fueron idénticos a animales expuestos a LPS, indicando especificidad de los efectos de anticuerpo anti-MIF.

Ejemplo 13

Materiales y métodos

Anticuerpos y citocinas. Se usó una IgG policlonal de conejo anti-MIF de rata (Torrey Pines BioLabs, Inc., Houston, TX) para inmunotransferencia de tipo Western e inmunohistoquímica. Anteriormente se ha demostrado que este anticuerpo reacciona de manera cruzada con MIF murino y se preparó tal como se describió previamente (23). Se usó un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo-HRP (BioRad Corp., Hercules, CA) como anticuerpo secundario para inmunotransferencias de tipo Western y se almacenó a 4°C. Se usaron dos anticuerpos IgG1 monoclonales de ratón anti-MIF de ratón (y humano) (XIV. 15.5 y III.D.9, cortesía de Cytokine PharmaSciences, Inc.) y un anticuerpo de control de isotipo de IgG1 monoclonal de ratón (HB-49, cortesía de Cytokine PharmaSciences, Inc.) en los estudios de ecocardiografía. Se ha demostrado previamente la neutralización *in vivo* de la actividad de MIF por ambos clones XIV.15.5 y III.D.9.

Animales, diseño experimental y lesión por quemadura. Se mantuvieron ratones C57BL/6J macho con edades de 6-10 semanas (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) en un ambiente específico libre de patógenos. Se hizo que estuvieran disponibles alimentos comerciales y agua corriente a voluntad. Se revisaron y aprobaron todos los protocolos de animales por el University of Texas Southwestern Medical Center Institutional Animal Care Advisory Committee y cumplían con las normas que regulan el uso de animales publicadas por el NIH. Se sometieron los ratones a una

lesión por quemadura del 40 % de TBSA. En resumen, se anestesiaron ratones con isoflurano (1-2 %) con oxígeno a 2,5 l/minuto hasta su efecto. Entonces se eliminó el pelo de sus espaldas y costados usando una cuchilla preparada quirúrgicamente y etanol al 70 %. Entonces se aplicaron sondas de latón calentadas hasta 100°C en agua en ebullición en pares (total de 8 áreas de superficie de sonda) en la espalda y costado del animal durante 5 segundos.

5 Alternativamente, los ratones de simulación recibieron anestesia y se afeitaron pero no se les sometió a lesión por quemadura. Se administró inyección por vía intraperitoneal de solución de Ringer lactato (LR) con Buprenex (2 cc de LR + 0,2 cc de Buprenex (=0,05 mg/kg)) tras la lesión por quemadura después de que se retirara la anestesia (con oxígeno continuado). Entonces se colocaron los ratones en jaulas individuales bajo una lámpara de calor durante aproximadamente 1 hora y en una manta eléctrica durante la duración del estudio y se monitorizaron atentamente.

10 Se sacrificaron los ratones en los puntos de tiempo indicados en las figuras mediante asfixia con CO₂ seguido por dislocación cervical. Se inyectaron anticuerpos monoclonales anti-MIF (III.D.9 y XIV.15.5) o un control de isotipo (HB-49) (100 µg en 200 µl de PBS) por vía intraperitoneal 90 minutos antes de la lesión por quemadura en los estudios de ecocardiograma. Se extirparon corazones enteros, se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. En experimentos paralelos, se fijaron los corazones en formalina neutra

15 tamponada al 10 % durante 24 horas y entonces se colocaron en etanol al 70 % hasta que se procesaron para inmunohistoquímica. Se extrajo sangre completa por sangrado retroorbital y se recogió el suero y se almacenó.

Extracción de proteínas e inmunotransferencia de tipo Western. Los corazones almacenados a -80°C se homogenizaron sobre hielo en tampón de lisado (HEPES 10 mM, EDTA 2 mM, CHAPS al 0,1 %, pH 7,4 con un comprimido entero de mini cóctel de inhibidor de proteasa libre de EDTA por 10 ml de tampón, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se cuantificó la concentración de proteínas usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Hercules, CA). Entonces se resolvieron cincuenta µg de proteína total (lisado) diluidos en tampón de muestra de Laemmli (Bio-Rad) en una razón de 1:1 hasta un volumen final de 10 µl en un gel de poliacrilamida con SDS al 12 % en condiciones reductoras. Se corrieron patrones previamente teñidos de SDS-PAGE (Kaleidoscope Broad range, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) con cada gel con el fin de determinar el PM aproximado de bandas detectadas. Se transfirió el gel a una membrana de PVDF (NEN, Boston, MA) usando un aparato de transferencia Mini-Transblot (Bio-Rad, Hercules, CA) a 100 V durante 70 minutos y se enfrió con bolsas de hielo. Volvió a humedecerse la membrana con metanol, se lavó un mínimo de 3 veces con 100+ ml agua, y se bloqueó (leche en polvo desnatada al 5 % (Bio-Rad)/TBS/Tween-20 al 0,1 % (TBS-T) durante la noche a 4°C). Entonces se incubó la

20 membrana con el anticuerpo de conejo primario anti-MIF (dilución 1:1250) durante 2 horas a temperatura ambiente en leche al 5%/TBS-T y se lavó una vez durante 15 minutos en TBS-T, seguido por cinco lavados (cada uno de 5 minutos) en TBS-T. Entonces se incubó durante 1 hora con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP en TBS-T (1:5000) a temperatura ambiente, se lavó dos veces durante 15 minutos, seguido por cinco lavados adicionales (cada uno de 5 minutos) en TBS-T. Para el revelado, se colocaron 5 ml de reactivo ECL (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL) en las membranas de PVDF durante 5 minutos, y se detectó la reacción resultante de quimioluminiscencia mediante película X-OMAT AR de Kodak (Eastman Kodak Co., Rochester, Nueva York).

Se determinó la cuantificación de la densidad de banda única con el peso molecular aproximado de MIF (12,5 kD) usando el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, Ver. 4.4.0, compilación 36) tras la conversión de película radiográfica en archivos TIFF (escala de grises de 8 bits) usando un Scanjet 3400c (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) y se notificó en unidades arbitrarias (UA)/mm².

40

Inmunohistoquímica. Se fijó tejido en formalina tamponada neutra, se procesó a parafina, y posteriormente se sometió a inmunotinción a temperatura ambiente en un dispositivo de inmunotinción automatizado Techmate™ 1000 de BioTek Solutions (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) usando el sistema ultra de estreptavidina y biotina con peroxidasa de rábano y cromógeno diaminobencidina (DAB) (Signet Laboratories, Dedham, MA). Se predeterminaron las concentraciones óptimas de anticuerpo primario usando tejidos de control positivo conocidos (rata expuesta a LPS). Se cortaron secciones de parafina en 3 µm en un microtomo rotatorio, se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (portaobjetos con hueco de capilaridad POP 100, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), y se secaron al aire durante la noche. Entonces se desparafinizaron las secciones en xileno y etanol, se extinguieron con peróxido de hidrógeno al 3 % reciente durante 10 min para inhibir la actividad de peroxidasa tisular endógena, y se enjuagaron con agua desionizada. Se incubaron las secciones en suero de bloqueo sin marcar durante 15 minutos para la bloquear unión no específica del anticuerpo secundario y entonces se incubaron durante 25 minutos o bien con la IgG policlonal de conejo anti-MIF de rata (1:400, Torrey Pines BioLabs, Inc., Houston, TX) diluida en tampón citrato al 1 % (BioPath, Oklahoma City, OK) o bien con tampón solo como control de reactivo negativo. Se realizó un control negativo de reactivo para cada punto de tiempo y para cada órgano. Tras los lavados en tampón, se incubaron las secciones durante 25 minutos con una disolución de anticuerpo secundario polivalente biotilado (que contenía inmunoglobulinas de cabra anti-conejo). Después, se lavaron las secciones con tampón, se incubaron en complejo de estreptavidina-biotina conjugado con peroxidasa de rábano durante 15 minutos, se lavaron de nuevo en tampón, y entonces se incubaron con 2 cambios, cada uno de 5 minutos, de una mezcla recién preparada de DAB y H₂O₂ en tampón, seguido de lavado en tampón y después agua. Entonces se sometieron las secciones a contratinción con hematoxilina, deshidratada en una serie graduada de etanol y xileno, y se colocó un cubreobjetos. Se revisaron los portaobjetos por microscopía óptica, y se identificaron reacciones positivas con DAB como producto de reacción marrón oscuro.

55

60

65

Determinación de niveles séricos de MIF. Se sometieron a ensayo sueros de seis ratones para detectar MIF de ratón

usando el kit de EIA de factor inhibidor de macrófagos (MIF) de rata/ratón Chemikine™ (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 5 µl de patrones, muestras, o tampón de reacción (blanco) a cada pocillo por triplicado. Después, se añadieron 100 µl de conjugado diluido de anticuerpo frente a MIF-HRP a cada pocillo y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Entonces se lavaron los pocillos cinco veces, y se añadieron 100 µl de sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencideno (TMB) y se dejó incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el reactivo de detención a cada pocillo, se mezcló suavemente, y se leyó el ELISA en un lector de placas ELISA (EL 312e Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) a 450 nm (fondo de 630 nm) en el plazo de 30 minutos tras la finalización del ensayo.

Detección multiplex de citocinas mediante Luminex. Se determinaron las concentraciones de citocinas inflamatorias en plasma (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN-γ, TNF-α, y GM-CSF) usando el kit de perlas de anticuerpo de ratón Cytokine Ten-Plex (Biosource International, Inc., Camarillo, CA) en un sistema Luminex xMAP™ (Luminex Corp., Austin, TX) según las instrucciones del fabricante. Se cargó la placa en la plataforma Luminex XYP™, se configuró el instrumento para retirar 50 µl, y se configuraron los eventos totales para que equivalieran a la configuración de 100 por perla. Se recogieron al menos 100 eventos (la mayoría >200) para cada citocina en cada muestra con el fin de determinar resultados estadísticamente significativos. Se recogieron los datos usando el software de recogida de datos Luminex™ (Luminex Corp., Austin, TX). Se introdujeron en el software las concentraciones de los patrones reconstituídos específicos de lote usados en cada serie y entonces se extrapolaron las concentraciones de analito para muestras desconocidas a partir de la curva patrón específica de citocinas usando el software MasterPlex™ QT (versión 1.2.8.58, Mirai Bio, Inc., Alameda, CA). Se multiplicaron las concentraciones finales por 2 con el fin de tener en cuenta el factor de dilución inicial. No se detectaron muestras que fueran superiores a las curvas patrón para ninguna citocina.

Aislamiento de ARN total, preparación de sondas de MIF y β-actina, y transferencia de tipo Northern. Los corazones almacenados a -80°C se colocaron en una mano de almirez llena de nitrógeno líquido y se molieron para dar un polvo fino con un almirez. Entonces se colocó inmediatamente cada corazón en polvo en 2 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se aisló el ARN total según los protocolos del fabricante y se cuantificó por espectrofotometría. Se preparó una sonda de tipo Northern específica de MIF a partir de un plásmido que contenía MIF (Image Clone I.D. 634910, Research Genetics, Huntsville, AL) aislado usando el kit Genelute HP Plasmid MidiPrep (Sigma, St. Louis, MO). Se preparó el fragmento por una digestión con EcoR1 y Not1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se purificó en gel y se aisló en un gel de agarosa al 1,2 % usando columnas de centrifugación con agarosa GenElute (Supelco, Bellefonte, PA). El fragmento de ADN de sonda de β-actina se adquirió de Ambion (Austin, TX). Las sondas tanto de MIF como de β-actina se marcaron con 5 µl de [α-³²P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) (PerkinElmer, Boston, MA) usando el kit de síntesis de sondas de ADN Strip-EZ™ (Ambion, Austin, TX) y se purificaron en microcolumnas ProbeQuant (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) según protocolos del fabricante.

Se resolvió ARN (10 µg) en geles de agarosa al 1,2 % a 100 voltios durante 1 hora y se transfirió a una membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, Buckingham, Inglaterra) a 1,5 amperios durante 70 minutos en una unidad de electroforesis de transferencia (TransPhor PowerLid, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Se unió el ARN a la membrana durante aproximadamente 2 minutos usando un GS Gene Linker (Bio-Rad, Hercules, CA). Se hibridó previamente la membrana en un horno de hibridación (Sorvall Life Science, Inc., Greensboro, NC) en Perfect-Hyb Plus (Sigma, St. Louis, MO) durante 1 hora a 68°C. Entonces se añadió ADN de testículo de arenque o salmón desnaturalizado sometido a cizalladura (100 µg/ml) durante 1 hora, seguido por la adición de aproximadamente 0,1 µg de sonda marcada a >5 x 10⁸ cpm/µg. Entonces se hibridó la transferencia durante 12 horas a 68°C en el horno de hibridación seguido de lavado a 68°C en 2X SSC, SDS al 0,1 %. Se lavó la membrana durante 1 hora, se cambió el tampón, y entonces se lavó la membrana durante una hora adicional a 68°C. Se envolvió la membrana en envoltorio Saran, y se detectó ARNm mediante película X-OMAT AR de Kodak tras 24 horas (Eastman Kodak Co., Rochester, Nueva York). Entonces, volvió a analizarse con sonda la misma membrana de una manera similar con β-actina radiomarcada (0,1 µg de sonda marcada a >5 x 10⁸ cpm/mg) (Ambion, Austin, TX). Se realizó densitometría tal como se describió anteriormente para las inmunotransferencias de tipo Western. Las bandas de ARNm de β-actina sirvieron como control frente al que normalizar la densitometría de ARNm de MIF.

Determinación de la función cardíaca *ex vivo* por Langendorff. Se determinó la función cardíaca de ratón usando el procedimiento de ensayo de Langendorff. En resumen, se inyectaron 200 unidades de sulfato de heparina por vía intraperitoneal y se sacrificaron los ratones 20 minutos más tarde. Se extirpó inmediatamente el corazón y se colocó sobre hielo en tampón de Krebs-Henseleit (NaHCO₃ 2 mM, NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glucosa 11,1 mM, pH 7,4, que se preparó nuevo con agua desionizada, desmineralizada y se burbujeó con el 95 % de O₂ y el 5 % de CO₂ (pO₂ de 590 mmHg, pCO₂ de 38 mmHg)). Se canuló la aorta con tubo PE50, se sometió el corazón a perfusión de manera retrógrada a través de la raíz aórtica con tampón de Krebs-Henseleit prefiltrado y oxigenado a una velocidad de flujo constante de 1,5 ml/minuto (T de 37°C, 100 ml de volumen de recirculación). Se colocó el corazón en una cámara con camisa de agua para mantener temperatura y humedad constantes. Se insertó un tubo de polietileno PE60 de Intramedic, conectado a un transductor de presión Statham, en el ventrículo izquierdo (LV) para medir la presión de LV. Se monitorizó la temperatura usando una aguja termistora 27G insertada en el músculo de LV. Tras la instrumentación, se dejaron estabilizar los corazones durante 10 minutos, y los corazones que no lograron alcanzar una presión estable o desarrollaron arritmias persistentes

durante este tiempo se excluyeron del estudio. Tras la estabilización, se midieron simultáneamente la presión de LV y su primera derivada (dP/dt), frecuencia cardiaca y perfusión coronaria con un polígrafo multicanal 7D de Grass (Grass Instruments, Quincy, MA). Se determinó la acción ventricular como función de la perfusión coronaria para todos los corazones trazando valores pico de presión sistólica de LV y $\pm dP/dt_{\text{máx}}$ frente a aumentos graduales en la velocidad de flujo coronario.

Determinación de la disfunción cardiaca mediante ecocardiografía. Se realizaron ecocardiogramas para evaluar la función sistólica usando mediciones en modo M. Se anestesiaron ratones con isoflurano al 5 % con 2,5 l/min de O_2 durante 20 segundos (hasta estado de inconsciencia) seguido por isoflurano al 2 % y O_2 durante un promedio de 12-15 minutos. Se retiró el pelo del tórax y el abdomen superior usando crema depilatoria Nair® y gasa tras dejarlo durante 3 minutos. Se obtuvieron mediciones de ecocardiografía en ratones anestesiados aproximadamente 5-8 minutos tras la inducción. Se realizó la ecocardiografía usando un dispositivo Sonos 5500 de Hewlett-Packard (Agilent Technologies; Edmonton, Alberta, Canadá) con una velocidad de imágenes de 300-500 imágenes/segundo de manera aleatoria y ciega. Se colocó un transductor lineal de 12 MHz en el hemitórax izquierdo interconectado con una capa de gel de transmisión de US (Aquasonic 100, Parker Laboratories; Fairfield, NJ). El plano de obtención de imágenes de eje corto paraesternal bidimensional guió la obtención de perfiles en modo M de LV cerca del nivel del músculo papilar. La profundidad se fijó a un mínimo de 2 cm con una velocidad de barrido de 150 m/s. Se imprimieron los perfiles en una impresora a color de Sony (UP-5200, Sony).

Mediciones en modo M. Los datos representan el promedio de nueve ciclos cardiacos seleccionados de al menos dos exploraciones independientes. Se definió la diástole final como la dimensión diastólica de LV máxima, y se definió la sístole final como el pico del movimiento de la pared posterior. Se calculó el % de acortamiento fraccional ((% FS), un sustituto de la función sistólica, a partir de dimensiones de LV tal como sigue: FS (%) = $(LVED - LVES) / LVED \times 100$, tal como se muestra en la figura 12.

Análisis estadístico. Los datos de transferencia tipo Northern e inmunotransferencia tipo Western se expresan como media \pm error estándar (EE) y se analizan estadísticamente usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se empleó un procedimiento de comparación múltiple usando el método de Tukey para determinar la significación estadística entre grupos. La función cardiaca determinada mediante la preparación de Langendorff (incluyendo datos de estabilización) se expresa como la media \pm EE y se realizaron análisis independientes para cada LVP, $+dP/dt_{\text{máx}}$, y $-dP/dt_{\text{máx}}$ en función del grupo de tratamiento y la velocidad de flujo coronario usando un ANOVA de mediciones repetidas. Se usó un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre grupos. Los niveles séricos de MIF se expresan como la media \pm EE y se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía, con un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar la significación entre grupos. La función cardiaca determinada mediante ecocardiografía en modo M se expresa como el % de acortamiento fraccional \pm EE y se analizó usando un ANOVA de una vía de mediciones repetidas. Se realizaron comparaciones adicionales usando la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos específicos. Se definió la significación estadística para todos los análisis como $p \leq 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando SigmaStat 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL) y Microsoft Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA).

Resultados - Ejemplo 13

Se expresa proteína MIF de forma constitutiva por miocitos cardiacos *in vivo* y se libera en respuesta a la lesión por quemadura. El factor inhibidor de la migración de macrófagos de citocina (MIF) está presente en miocitos tanto ventriculares como auriculares en el nivel inicial tal como se demuestra por inmunotransferencia de tipo Western e inmunohistoquímica (figuras 7 y 8). Tras la lesión por quemadura, se identificó un descenso significativo (2,1 veces) a las 8 horas volviendo las concentraciones tisulares de MIF a los niveles iniciales a las 12 horas (figura 7). Este patrón de expresión fue paralelo en el hígado, bazo y el pulmón tras la lesión por quemadura (figura 8) y concuerda con la hipótesis de que se libera MIF en mediadores de respuesta de lesión por quemadura.

Los niveles de IL-6 y MIF sistémicos aumentan tras la lesión por quemadura. Se identificó la liberación sistémica máxima de MIF (aumento de 2,2 veces) en suero a las 4 horas y volvió a los niveles iniciales a las 8 horas (figura 9). Se identificaron niveles séricos máximos de IL-6 a las 12 horas que volvieron a los niveles iniciales a las 48 horas. Los niveles de IL-12 séricos descendieron tras la lesión por quemadura y fueron mínimos a las 24 horas y volvieron a los niveles iniciales a las 48 horas. No se detectó ninguna otra citocina sometida a prueba (tal como se indican en los materiales y métodos) en el suero.

El ARNm de MIF en el corazón aumenta significativamente en el corazón a las 8 horas tras la lesión por quemadura. Los niveles de ARNm de MIF se detectaron por análisis de tipo Northern a partir del ARN aislado total de corazones o bien de ratones de simulación o bien de ratones a las 4, 8, 12, 24 y 48 horas tras la lesión por quemadura (figura 10). El ARNm de MIF se expresa de forma constitutiva en el corazón, e inicialmente se producen aumentos significativos en la transcripción a las 8 horas, que se regulan por incremento durante el resto del transcurso de tiempo examinado (48 horas) (figura 10).

Los anticuerpos anti-MIF mejoran la depresión cardiaca inducida por LPS *ex vivo*. Se determinaron las respuestas

de corazones a la perfusión aórtica retrógrada a 1,5 ml/minuto de ratones que se sometieron a operación simulada, lesión por quemadura, o lesión por quemadura con tratamiento previo con anticuerpos anti-MIF usando un análisis de Langendorff de la función cardíaca. Se identificaron descensos significativos en LVP, $+dP/dt_{máx}$, $-dP/dt_{máx}$, DR, dP40, TPP, RT90 y tiempo hasta $-dP/dt_{máx}$ en ratones 18 horas después de someterse a lesión por quemadura (tabla 3). Los ratones tratados previamente con anticuerpo anti-MIF (clon III.D.9) que se sometieron a lesión por quemadura estaban completamente protegidos a las 18 horas (tabla 3), mientras que los ratones tratados con el control de isotipo no difirieron significativamente de la lesión por quemadura sola (datos no mostrados).

La figura 11 ilustra la función de los corazones a lo largo de un intervalo de velocidades de flujo coronario de ratones de simulación, ratones con lesión por quemadura, y ratones con lesión por quemadura tratados previamente con anticuerpos anti-MIF 18 horas después de la lesión por quemadura o el procedimiento de simulación. Aumentos en la velocidad coronaria dieron como resultado aumentos graduales en el rendimiento contráctil en todos los corazones (grupos) sometidos a prueba. Los ratones que se someten a lesión por quemadura demostraron un cambio descendiente en las curvas de función LVP, $+dP/dt_{máx}$, y $-dP/dt_{máx}$ demostrando disfunción diastólica y sistólica significativa (figura 11). Sin embargo, esta disfunción no estaba presente cuando se administraron anticuerpos anti-MIF en los que no se identificaron diferencias significativas con respecto a ratones de simulación (figura 11).

La terapia con anticuerpo monoclonal anti-MIF mejora la depresión cardíaca asociada con lesión por quemadura *in vivo*. Se realizó ecocardiografía en serie (modo M) en ratones que recibieron lesión por quemadura, y ratones tratados previamente 90 minutos antes de la lesión por quemadura con cualquiera de dos anticuerpos anti-MIF, un control de isotipo, o sin tratamiento (figura 12). A las 4 y 8 horas, el porcentaje de acortamiento fraccional (% FS) de todos los ratones tratados con lesión por quemadura se deprimieron de manera similar 21,4 FS (56,2 % de FS-34,8 % de FS), independientemente del tratamiento con anticuerpo anti-MIF. Sin embargo, a las 12 horas tras la lesión por quemadura los ratones a los que se les inyectó cualquiera de los dos anticuerpos monoclonales anti-MIF demostraron recuperación estadística significativa de (% FS en comparación con ratones con lesión por quemadura que o bien no recibieron ningún tratamiento o bien recibieron un control de anticuerpo de isotipo (figura 12). A las 24 horas, (% FS de los ratones tratados no era significativamente diferente de los controles indicando protección completa de la disfunción cardíaca asociada. A lo largo de las 48 horas, (% FS de ratones de simulación no cambió significativamente indicando que el régimen de prueba y la anestesia no afectaron a la función cardíaca. Por último, los ratones que recibieron anticuerpos de control de isotipo no demostraron diferencias significativas de animales que se sometieron a lesión por quemadura sola, indicando especificidad de los efectos de anticuerpo anti-MIF.

Tabla 3. Datos de estabilización *in vitro* a partir de corazones aislados en los experimentos de perfusión de Langendorff. La función cardíaca se expresa como la media \pm EE. Se realizaron análisis independientes para cada parámetro (columna izquierda) como función del grupo de tratamiento. Se usó un ANOVA de mediciones repetidas con un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre grupos (* $p < 0,05$ en comparación con el control de simulación).

Función cardíaca sometida a prueba	Simulación (n=11)	Lesión por quemadura (n=9)	Lesión por quemadura + anticuerpo anti-MIF (n=5)
LVP (mmHg)	96,5 \pm 1,5	63,2 \pm 3,3*	91,2 \pm 9,6
$+dP/dt_{máx}$ (mmHg/s)	2217 \pm 44	1631 \pm 40*	2256 \pm 171
$-dP/dt_{máx}$ (mmHg/s)	1855 \pm 45	1187 \pm 70*	1840 \pm 235
DR	1,22 \pm 0,04	1,40 \pm 0,05*	1,29 \pm 0,1
dP40 (mmHg/s)	1868 \pm 24	1383 \pm 31*	1960 \pm 150
TPP (ms)	82,0 \pm 2,5	72,8 \pm 2,5*	86,2 \pm 2,0
RT90 (ms)	79,6 \pm 4,5	68,8 \pm 1,9*	84,2 \pm 2,8
Tiempo hasta $+dP/dt_{máx}$ (ms)	49,1 \pm 0,7	47,6 \pm 0,6	53,0 \pm 1,2
Tiempo hasta $-dP/dt_{máx}$ (ms)	50,1 \pm 0,5	45,7 \pm 1,3*	53,6 \pm 1,7
CPP (mmHg)	89,2 \pm 4,9	91,0 \pm 6,3	84,2 \pm 5,7
CVR (mmHg)	59,4 \pm 3,3	60, \pm 64,2	56,1 \pm 3,8
HR (lpm)	321 \pm 6	315 \pm 7	322 \pm 16

35 Ejemplo 14

Para determinar el papel que tiene la señalización de TNF- α en la secreción de MIF y su disfunción cardíaca asociada en un modelo de endotoxicosis subletal, se llevaron a cabo los siguientes experimentos en el ejemplo 14.

40 Materiales y métodos

Anticuerpos y citocinas. Se usó una IgG policlonal de conejo anti-MIF de rata (Torrey Pines BioLabs, Inc., Houston, TX) que reacciona de manera cruzada con MIF murino para inmunotransferencia de tipo Western e inmunohistoquímica. Se usó un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo-HRP (BioRad Corp., Hercules, CA)

como anticuerpo secundario para inmunotransferencias de tipo Western. Se usaron dos anticuerpos IgG1 monoclonales de ratón anti-MIF de ratón (y humano) (XIV. 15.5 y III.D.9, cortesía de Cytokine PharmaSciences, Inc., King of Prussia, PA) y un anticuerpo de control de isotipo de IgG1 monoclonal de ratón (HB-49, cortesía de Cytokine PharmaSciences, Inc.) en los estudios de ecocardiografía. Se ha demostrado previamente la neutralización *in vivo* de la actividad de MIF por ambos clones XIV.15.5 y III.D.9. TNFR:Fc humano recombinante (Enbrel®) usado para neutralizar TNF- α fue cortesía de Immunex Corp./Amgen, Inc. (Thousand Oaks, CA). Se sintetizó MIF humano recombinante según el método de Bernhagen *et al.* y lo proporcionó Cytokine PharmaSciences, Inc.

Animales y diseño experimental. Se obtuvieron ratones C57BL/6J macho adultos libres de patógenos a las 6-10 semanas de edad y se utilizaron a aproximadamente las 12 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Se adquirieron parejas reproductoras de ratones B6:129PF1/J y B6;129S-Tnfrsf1a^{tm1.1mx}Tnfrsf1b^{tm1.1mx} (TNFR-/-) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se utilizaron las crías macho después de realizar el genotipado a las 20-24 semanas (30-40 gramos). Se hizo que estuvieran disponibles alimentos comerciales estériles y agua a voluntad. Se revisaron y aprobaron todos los protocolos de animales por el University of Texas Southwestern Medical Center Institutional Animal Care Advisory Committee y cumplían con las normas que regulan el uso de animales publicadas por el NIH.

A los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal LPS de *E. coli* 0111:B4 4 mg/kg (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ y posterior dislocación cervical. Se usaron ratones no sometidos a inyección como controles. Se inyectaron los dos anticuerpos anti-MIF (III.D.9 y XIV.15.5, cortesía de Cytokine PharmaSciences, Inc., King of Prussia, PA) y su control de isotipo (HB-49, cortesía de Cytokine PharmaSciences, Inc.) (100 μ g en 200 μ g de PBS) por vía intraperitoneal 90 minutos antes de la exposición a LPS en los estudios de ecocardiograma. Se inyectó Enbrel® (rhTNFR:Fc) por vía intraperitoneal (5 mg/kg o 300 μ g en 0,5 ml de PBS) 75 minutos antes de la exposición a LPS en ratones de tipo silvestre.

Se extirparon corazones enteros y se sometieron a congelación instantánea en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C o se fijaron en formalina neutra tamponada al 10 % durante 24 horas y se colocaron en etanol al 70 % para inmunohistoquímica. Se extrajo sangre completa mediante sangrado retroorbital y se separó el suero usando tubos separadores. Se transfirió el suero a un tubo estéril de cierre a presión y se congeló -80°C hasta que se sometió a ensayo mediante ELISA.

Determinación de niveles séricos de MIF. Se sometieron a ensayo sueros de seis ratones para detectar MIF de ratón usando el kit de EIA de factor inhibidor de macrófagos (MIF) de rata/ratón Chemikine™ (Chemicon International, Inc., Temecula, CA) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron 5 μ l de patrones, muestras o tampón de reacción (blanco) a cada pocillo por duplicado. A continuación, se añadieron 100 μ l de conjugado diluido de anticuerpo frente a MIF-HRP a cada pocillo (100 μ l) y se dejó incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Entonces se lavaron los pocillos cinco veces, y se dejó incubar sustrato TMB (100 μ l) se dejó incubar en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió el reactivo de parada a cada pocillo, se mezcló suavemente, y se leyó el ELISA en un lector de placas de ELISA (EL 312e Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) a 450 nm (fondo de 630 nm) en el plazo de 30 minutos tras la finalización del ensayo.

Extracción de proteínas e inmunotransferencia de tipo Western. Los corazones almacenados a -80°C se homogenizaron sobre hielo en tampón de lisado (HEPES 10 mM, EDTA 2 mM, CHAPS al 0,1 %, pH 7,4) con un comprimido entero de mini cóctel de inhibidor de proteasa libre de EDTA por 10 ml de tampón (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Se cuantificó la concentración de proteínas usando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Hercules, CA) y se añadieron 50 μ g de proteína diluida en tampón de muestra de Laemmli (Bio-Rad) en una razón de 1:1 hasta un volumen final de 10 μ l y se resolvió en un gel de poliacrilamida con SDS al 12 % en condiciones reductoras. Se corrieron patrones de SDS-PAGE previamente teñidos (Kaleidoscope Broad range, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) (10 μ l/banda) con cada gel con el fin de determinar el PM aproximado de bandas detectadas. Se transfirió el gel a una membrana de PVDF (NEN, Boston, MA) usando la célula de transferencia electroforética Mini Transblot® (Bio-Rad, Hercules, CA) a 100 V durante 70 minutos y se enfrió con bolsas de hielo. Posteriormente, volvió a humedecerse la membrana con metanol, se lavó un mínimo de 3 veces con 100 ml agua, y se colocó en bloque (leche en polvo desnatada al 5 % (Bio-Rad)/TBS/Tween-20 al 0,1 % (TBS-T) durante la noche a 4°C). Entonces se incubó la membrana con el anticuerpo anti-MIF primario de conejo (dilución 1:1250) durante 2 horas a temperatura ambiente en leche al 5 %/TBS-T. Se lavó la membrana 1 vez durante 15 minutos en TBS-T, seguido por cinco lavados (cada uno de 5 minutos). Entonces se incubó la membrana durante 1 hora con un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con HRP (diluido 1:5000) en TBS-T a temperatura ambiente. Entonces se lavó la membrana dos veces durante 15 minutos, seguido por cinco lavados adicionales (cada uno de 5 minutos). Entonces se desarrolló la membrana durante 5 minutos con 5 ml de reactivos ECL (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL), y se detectó la reacción resultante de quimioluminiscencia mediante película X-OMAT AR de Kodak (Eastman Kodak Co., Rochester, Nueva York).

La cuantificación de la densidad de banda única con el peso molecular aproximado de MIF (12,5 kD) se determinó usando el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, Ver. 4.4.0, compilación 36) tras la conversión de película radiográfica en archivos TIFF (escala de grises de 8 bits) usando un Scanjet 3400c (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) y se notificó en unidades arbitrarias (UA)/mm².

Inmunohistoquímica. Se fijó tejido en formalina tamponada neutra y se procesó a parafina y posteriormente se sometió a inmunotinción a temperatura ambiente en un dispositivo de inmunotinción automatizado Techmate™ 1000 de BioTek Solutions (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) usando el sistema ultra de estreptavidina y biotina con peroxidasa de rábano y cromógeno diaminobencidina (DAB) (Signet Laboratories, Dedham, MA). Se cortaron secciones de parafina en 3 µm en un microtomo rotatorio, montado en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (portaobjetos con hueco de capilaridad POP 100, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) y se secaron al aire durante la noche. Entonces se desparafinizaron las secciones en xileno y etanol, se extinguieron con peróxido de hidrógeno al 3 % reciente durante 10 minutos para inhibir la actividad de peroxidasa tisular endógena, y se enjuagaron con agua desionizada. Se incubaron las secciones en suero de bloqueo sin marcar durante 15 minutos para bloquear la unión no específica del anticuerpo secundario y entonces se incubaron durante 25 minutos o bien con anticuerpo anti-MIF de conejo (1:400, Torrey Pines BioLabs, Inc., Houston, TX) diluido en tampón citrato al 1 % (BioPath, Oklahoma City, OK), o bien con tampón solo como control de reactivo negativo. Tras los lavados en tampón, se incubaron las secciones durante 25 minutos con una disolución de anticuerpo secundario polivalente biotinilado (que contenía anticuerpos de cabra anti-conejo). Después, se lavaron las secciones con tampón, se incubaron en complejo de estreptavidina-biotina conjugado con peroxidasa de rábano durante 15 minutos, se lavaron de nuevo en tampón, y entonces se incubaron con 2 cambios, cada uno de 5 minutos, de una mezcla recién preparada de DAB y H₂O₂ en tampón, seguido de lavado en tampón y después agua. Entonces se sometieron las secciones a contratinción con hematoxilina, se deshidrataron en una serie graduada de etanol y xileno, y se colocó un cubreobjetos. Se revisaron los portaobjetos por microscopía óptica y se identificaron reacciones positivas con DAB como producto de reacción marrón oscuro.

Aislamiento de ARN total, preparación de sondas de MIF y β-actina y transferencia de tipo Northern. Los corazones almacenados a -80°C se colocaron en una mano de almirez llena de nitrógeno líquido y se molieron para dar un polvo fino con un almirez. Después se colocó inmediatamente cada corazón en polvo en 2 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se aisló el ARN total según los protocolos del fabricante y se cuantificó por espectrofotometría. Se preparó una sonda de tipo Northern específica de MIF a partir de un plásmido que contenía MIF (Image Clone I.D. 634910, Research Genetics, Huntsville, AL) aislado usando el kit Genelute HP Plasmid MidiPrep (Sigma, St. Louis, MO). Se preparó el fragmento por una digestión con EcoR1 y Not1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y se purificó en gel y se aisló en un gel de agarosa al 1,2 % usando columnas de centrifugación con agarosa GenElute (Supelco, Bellefonte, PA). El fragmento de ADN de sonda de β-actina se adquirió de Ambion (Austin, TX). Se marcaron las sondas tanto de MIF como de β-actina con 5 µl de [³²P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) (PerkinElmer, Boston, MA) usando el kit de síntesis de sondas de ADN Strip-EZ™ (Ambion, Austin, TX) y se purificaron en microcolumnas ProbeQuant (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) según protocolos del fabricante.

Se combinó ARN total aislado (10 µg) con tinte de carga de formaldehído (Ambion, Inc.) a una razón de muestra:tinte de carga de 1:3 según los protocolos del fabricante. Cada gel tenía un marcador de peso molecular de ARN de 0,24-9,5 kB (Invitrogen Corp.) que se hizo correr en paralelo con las muestras (10 µg). Se colocaron las muestras y el marcador de peso molecular de ARN a 65°C durante 10 minutos antes de la electroforesis y se resolvieron en un gel de agarosa al 1,2 % con 1X tampón TAE (Ambion, Inc.) a 100 voltios durante 1 hora y se transfirieron a una membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia, Buckingham, Inglaterra) a 1,5 amperios durante 70 minutos en una unidad de electroforesis de transferencia (TransPhor PowerLid, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) en 0,5 X TAE. El ARN se unió a la membrana durante aproximadamente 2 minutos usando un GS Gene Linker (Bio-Rad, Hercules, CA). Se hibridó previamente la membrana en un horno de hibridación (Sorvall Life Science, Inc., Greensboro, NC) en Perfect-Hyb Plus (Sigma, St. Louis, MO) con ADN de esperma de salmón desnaturalizado sometido a cizalladura (100 µg/ml) durante 1 hora a 68°C. Se prepararon las sondas calentando hasta 90°C durante 10 minutos (10 µl de sonda con 100 µl de EDTA 10 mM), seguido por la adición de aproximadamente 0,1 µg de sonda marcada a >5 x 10⁸ cpm/µg al tampón de hibridación. Entonces se hibridó la transferencia durante 12 horas a 68°C seguido de lavado a 68°C en 2X SSC, SDS al 0,1 %. Se lavó la membrana durante 1 hora, se cambió el tampón, y entonces se lavó la membrana durante una hora adicional a 68°C. Se envolvió la membrana en envoltorio Saran, y se detectó ARNm mediante película X-OMAT AR de Kodak tras 24 horas (Eastman Kodak Co., Rochester, Nueva York). Entonces volvió a analizarse con sonda la misma membrana de una manera similar con β-actina radiomarcada (0,1 µg de sonda marcada a >5 x 10⁸ cpm/mg) (Ambion, Austin, TX). Se realizó densitometría tal como se describió anteriormente para las inmunotransferencias de tipo Western. Las bandas de ARNm de β-actina sirvieron como control frente al que normalizar la densitometría de ARNm de MIF.

Determinación de la función cardíaca *ex vivo* por Langendorff. Se determinó la función cardíaca de ratón usando el procedimiento de ensayo de Langendorff. En resumen, se inyectaron 200 unidades de sulfato de heparina por vía intraperitoneal y se sacrificaron los ratones 20 minutos más tarde. Se extirpó inmediatamente el corazón y se colocó sobre hielo en tampón de Krebs-Henseleit (NaHCO₃ 2 mM, NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glucosa 11,1 mM, pH 7,4, que se preparó nuevo con agua desionizada, desmineralizada y se burbujeó con el 95 % de O₂ y el 5 % de CO₂ (pO₂ de 590 mmHg, pCO₂ de 38 mmHg)). Se canuló la aorta con tubo PE50, se sometió el corazón a perfusión de manera retrógrada a través de la raíz aórtica con tampón de Krebs-Henseleit prefiltrado y oxigenado a una velocidad de flujo constante de 1,5 ml/minuto (temperatura constante de 37°C, 100 ml de volumen de recirculación). Se colocó el corazón en una cámara con camisa de agua para mantener la temperatura y humedad constantes. Se insertó un tubo de polietileno (PE60) de Intramedic conectado a un

transductor de presión Statham en el ventrículo izquierdo (LV) para medir presión de LV. Se monitorizó la temperatura usando una aguja termistora 27G insertada en el músculo de LV. Tras la instrumentación, se dejaron estabilizar los corazones durante 10 minutos, y los corazones que no lograron alcanzar una presión estable o desarrollaron arritmias persistentes durante este tiempo se excluyeron del estudio. Tras la estabilización, se midieron la presión de LV y su primera derivada (dP/dt), frecuencia cardíaca, y perfusión coronaria simultáneamente con un polígrafo multicanal 7D de Grass (Grass Instruments, Quincy, MA). Se determinó la acción ventricular como función de la perfusión coronaria para todos los corazones trazando valores pico de presión sistólica de LV y $\pm dP/dt_{\text{máx}}$ frente a aumentos graduales en la velocidad de flujo coronario. Se sometieron los corazones a perfusión con o sin MIF 20 ng/ml añadido al perfundido.

Determinación de la disfunción cardíaca mediante ecocardiografía. Se realizaron ecocardiogramas para evaluar la función sistólica usando mediciones en modo M. Se anestesiaron ratones con isoflurano al 5 % con 2,5 l/min de O₂ durante 20 segundos (hasta estado de inconsciencia) seguido por isoflurano al 2 % y O₂ durante un promedio de 12-15 minutos. Se retiró el pelo del tórax y el abdomen superior usando crema depilatoria Nair® y gasa tras dejarlo durante 3 minutos. Se obtuvieron mediciones de ecocardiografía en ratones anestesiados aproximadamente 5-8 minutos tras la inducción. Se realizó la ecocardiografía usando un dispositivo Acuson Sequoia™ modelo C256 (Siemens Medical Solutions, USA, Inc., Mountain Vista, CA) con una velocidad de imágenes de 300-500 imágenes/segundo de manera aleatoria y ciega. Se colocó un transductor lineal de 15 MHz (15L8, Siemens Medical Solutions, USA, Inc.) en el hemitórax izquierdo interconectado con una capa de gel de transmisión de ultrasonidos (Aquasonic 100, Parker Laboratories; Fairfield, NJ). El plano de obtención de imágenes de eje corto paraesternal bidimensional guió la obtención de perfiles en modo M de LV cerca del nivel del músculo papilar. La profundidad se fijó a un mínimo de 2 cm con una velocidad de barrido de 200 m/segundo.

Mediciones en modo M. Los datos representan el promedio de nueve ciclos cardíacos seleccionados de al menos dos exploraciones independientes. Se definió la diástole final como la dimensión diastólica de LV máxima, y se definió la sístole final como el pico del movimiento de la pared posterior. Se calculó el % de acortamiento fraccional ((% FS), un sustituto de la función sistólica, a partir de dimensiones de LV tal como sigue: FS (%) = $(LVED - LVES) / LVED \times 100$, tal como se muestra en la figura 18.

Detección multiplex de citocinas mediante Luminex. Se determinaron las concentraciones de citocinas inflamatorias en plasma (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF) usando el kit de perlas de anticuerpo de ratón Cytokine Ten-Plex (Biosource International, Inc., Camarillo, CA) en un sistema Luminex xMAP™ (Luminex Corp., Austin, TX) según las instrucciones del fabricante. Se cargó la placa en la plataforma Luminex XYP™, se configuró el instrumento para retirar 50 μ l, y se configuraron los eventos totales para que equivalieran a la configuración de 100 por perla (200 recogidas como máximo). Se recogieron los datos usando el software de recogida de datos Luminex™ (Luminex Corp., Austin, TX). Se introdujeron en el software las concentraciones de los patrones reconstituidos específicos de lote usados en cada serie y entonces se extrapolaron las concentraciones de analito para muestras desconocidas a partir de la curva patrón específica de citocinas usando el software MasterPlex™ QT (Versión 1.2.8.58, Mirai Bio, Inc., Alameda, CA). Se multiplicaron las concentraciones finales por 2 con el fin de tener en cuenta el factor de dilución inicial. No se detectaron muestras que fueran superiores a las curvas patrón para ninguna citocina.

Análisis estadístico. Los datos de transferencia tipo Northern e inmunotransferencia tipo Western se expresan como media \pm error estándar (EE) y se analizan estadísticamente usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Se empleó un procedimiento de comparación múltiple usando el método de Tukey para determinar la significación estadística entre grupos. La función cardíaca determinada mediante la preparación de Langendorff (incluyendo datos de estabilización) se expresa como la media \pm EE y se realizaron análisis independientes para cada LVP, $+dP/dt_{\text{máx}}$, y $-dP/dt_{\text{máx}}$ en función del grupo de tratamiento y la velocidad de flujo coronario usando un ANOVA de mediciones repetidas. Se usó un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre grupos. Los niveles séricos de MIF se expresan como la media \pm EE y se analizaron estadísticamente usando un ANOVA de una vía, con un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar la significación entre grupos. La función cardíaca determinada mediante ecocardiografía en modo M se expresa como el % de acortamiento fraccional \pm EE y se analizó usando un ANOVA de una vía de mediciones repetidas. Se realizaron comparaciones adicionales usando la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas entre grupos específicos. Se definió la significación estadística para todos los análisis como $p \leq 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando SigmaStat 2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL) y Microsoft Excel (Microsoft Corp., Seattle, WA).

Resultados - Ejemplo 14

Niveles séricos de MIF en ratones WT, ratones WT tratados previamente con Enbrel® y ratones TNFR-/. Los niveles séricos de MIF alcanzan un máximo (~1,5 veces con respecto al nivel inicial) a las 8 horas en ratones de tipo silvestre tras la exposición a LPS (figura 13A). Cuando se exponen ratones TNFR-/ a LPS, los niveles séricos máximos de MIF se producen a las 12 horas (~1,7 veces con respecto al nivel inicial) (figura 13B). Los niveles séricos máximos de MIF (\square 2,3 veces con respecto al nivel inicial) se identificaron en ratones de tipo silvestre

tratados previamente (60 minutos) con Enbrel® y expuestos a LPS a las 24 horas (figura 13C).

El MIF cardiaco no se libera del corazón, el bazo ni el hígado en ratones TNFR^{-/-} tras la exposición a LPS. Tanto los análisis de inmunotransferencia de tipo Western como de inmunohistoquímica realizados en corazón, hígado y bazo demostraron que la liberación documentada previamente en ratones de tipo silvestre tras la exposición a LPS no se producía en ningún momento en ratones TNFR^{-/-} o ratones de tipo silvestre tratados previamente con Enbrel®, impidiendo ambos la señalización de TNF- α (figuras 14 y 15).

La transcripción cardiaca de MIF no se modula en ratones TNFR^{-/-} tras la exposición a LPS. La detección de ARNm de MIF a partir del ARN total aislado de tejido de corazón de ratones TNFR^{-/-} expuestos a LPS demuestra que la transcripción de MIF no se regula por incremento tras la exposición a LPS (figura 16), lo que se ha identificado en ratones de tipo silvestre previamente a las 48 horas.

MIF tiene efectos cardiodepresores directos en ratones TNFR^{-/-} en el mismo grado que en ratones WT. Para determinar si MIF influye directamente en la función cardiaca independientemente de TNF, se sometieron corazones de ratón normal con latido espontáneo (preparación de Langendorff) a perfusión con MIF humano recombinante (MIFr) a una concentración de 20 ng/ml, aproximándose a los niveles séricos documentados en pacientes con choque séptico (25). Se ha demostrado que el MIF humano usado en los estudios de perfusión de Langendorff tiene una homología de aproximadamente el 90 % con el MIF murino y se ha demostrado que tiene función biológica entre especies.

La tabla 4 demuestra que las respuestas de la variedad de fondo de ratones TNFR^{-/-}, ratones C57BL/6 y los ratones TNFR^{-/-} a la perfusión aórtica retrógrada a 1,5 ml/minuto con perfundido de control o perfundido que contiene MIFr 20 ng/ml. La perfusión con MIFr condujo a un descenso significativo en LVP, +dP/dt_{máx}, -dP/dt_{máx}, y dp40 (mm de Hg/s) en ambas variedades de ratón mientras que otros parámetros (tiempo hasta \pm dP/dt máxima, CPP, CVR y HR) no resultaron afectados. La figura 18 ilustra el efecto de MIFr a lo largo de un intervalo de velocidades de flujo coronario. Los aumentos en la actividad coronaria dieron como resultado un aumento gradual en el rendimiento contráctil independientemente de la asignación de grupo experimental. Los corazones expuestos a MIF demostraron un cambio descendiente en las curvas de función, dando como resultado curvas de función sistólica (+dP/dt) y diastólica (-dP/dt) significativas en respuesta a 20 ng/ml ($p < 0,05$).

La neutralización de MIF mediante anticuerpos anti-MIF da como resultado la protección completa a las 24-48 horas tras la exposición a LPS en ratones TNFR^{-/-}. Para determinar la influencia de la señalización de TNF sobre MIF en la patogénesis de la disfunción cardiaca *in vivo*, se realizó ecocardiografía en serie (modo M) en ratones TNFR^{-/-} expuestos a LPS tratados previamente (90 minutos antes) con cualquiera de dos anticuerpos monoclonales anti-MIF, un anticuerpo de control de isotipo o sin tratamiento (figura 17). A las 4, 8 y 12 horas tras la exposición a LPS, el porcentaje de acortamiento fraccional (% FS) de todos los ratones expuestos a LPS se deprimió de manera similar (27,7 \pm 0,01 de % FS) en comparación con el nivel inicial (45,9 \pm 0,002 % FS), independientemente de la asignación de grupo (figura 17B, C, E). Sin embargo, a las 24 horas tras la exposición a LPS los ratones tratados con cualquiera de los dos anticuerpos monoclonales anti-MIF demostraron recuperación estadísticamente significativa de % FS en comparación con el grupo expuesto a LPS que recibió o LPS o LPS y el anticuerpo de isotipo (figura 17). Esta recuperación mejorada de la función persistió a las 48 horas cuando la función estaba completamente restablecida y los ratones expuestos a LPS que recibieron el control de isotipo estaban todavía profundamente deprimidos (figuras 17D, 17E). A lo largo de las 48 horas, el % FS de los ratones TNFR^{-/-} control no tratados no cambió significativamente lo que indica que la función cardiaca no resultó afectada por el régimen de pruebas.

Liberación de citocinas séricas en ratones de tipo silvestre y ratones TNFR^{-/-}. Puesto que se ha demostrado que otras citocinas inflamatorias desempeñan un papel en la disfunción cardiaca además de TNF- α de manera temprana tras la exposición a LPS (es decir IL-1 β , IL-6), se determinaron los niveles séricos de un panel inflamatorio en ratones de tipo silvestre y TNFR^{-/-} (figura 19). En esta figura no resulta obvia la liberación de TNF- α , IL-1 β en ratones de tipo silvestre debido a los aumentos significativos en estas citocinas en ratones TNFR^{-/-} (aumentos de 31,2 veces (4934/158 pg/ml) y 94,7 veces (7099/75 pg/ml) con respecto al tipo natural a las 4 horas tras la exposición a LPS) tal como se muestra en las figuras 19A y 19B. De manera similar, IL-12 estaba aumentada en los ratones TNFR^{-/-} en comparación con los de tipo silvestre (y 1,7 veces (5128/2937 pg/ml)) (figura 19C), mientras que los niveles de IFN- γ disminuyeron 3,6 veces (210/58 pg/ml) (figura 19D). IL-10 e IL-6 aumentaron de manera similar en ratones de tipo silvestre y TNFR^{-/-}, aunque el retardo de cada una de estas citocinas estaba disminuido en los ratones TNFR^{-/-} (figura 19E y 19F). Los niveles de IL-6 fueron 8,5 veces en los ratones TNFRKO a las 4 horas en comparación con los de tipo silvestre (7099/835 pg/ml). Se identificaron aumentos sistémicos en GM-CSF tanto en ratones de tipo silvestre como TNFR^{-/-} y la respuesta temporal fue casi idéntica (figura 19G). Las citocinas IL-2, IL-4 e IL-5 demostraron modulación no despreciable tras la exposición a LPS en los ratones o bien de tipo silvestre o bien TNFR^{-/-}.

Liberación de citocinas séricas tras neutralización de MIF en ratones de tipo silvestre TNFR^{-/-}. De las 10 citocinas sometidas a ensayo para en este estudio, los anticuerpos neutralizantes frente a MIF (antes de la exposición a LPS)

sólo afectaron a la modulación (aumento o disminución) de los niveles séricos de IFN- γ e IL-10 tras la exposición a LPS en ratones de tipo silvestre (figura 20). Específicamente, la liberación del máximo de IFN- γ a las 8 horas tras la exposición a LPS (figura 19C) se atenuó 3 veces (210/69 pg/ml) (figura 20A). La liberación retardada de IL-10 en ratones de tipo silvestre que alcanzó un máximo a las 48 horas se atenuó 2,9 veces (244/84 pg/ml) (figura 20B) tras la exposición a LPS en ratones de tipo silvestre.

5

Tabla 4. Datos de estabilización *in vitro* a partir de corazones aislados en los experimentos de perfusión de Legendorff. La función cardíaca se expresa como la media ± EE. Se realizaron análisis independientes para cada parámetro (columna izquierda) en función del grupo de tratamiento y la velocidad de flujo coronario. Se usó un ANOVA de mediciones repetidas con un procedimiento de comparación múltiple empleando el método de Bonferroni para determinar diferencias significativas entre grupos (*p<0,05 en comparación con control).

	TNF KO (n=8)	Tipo natural (WT) (n=6)	P	TNF KO + Krebs (n=4)	p	TNF KO + MIFr (n=4)	P	WT + MIFr (n=5)	P
LVP (mmHg)	101,5±4,3	103,3±3,1	NS	102,5±2,5	NS	66,0±4,7	0,005	55,6±5,9	0,001
+dP/dt máx. (mmHg/s)	2488±74	2280±70	NS	2475±48	NS	1800±100	0,002	1400±158	0,001
-dP/dt máx. (mmHg/s)	2016±59	1976±87	NS	2175±63	NS	1413±151	0,03	1070±146	0,005
DR	1,24±0,05	1,16±0,05	NS	1,14±0,02	NS	1,30±0,10	NS	1,32±0,06	NS
dP40 (mmHg/s)	2106663	1940±51	NS	2175±94	NS	1613±105	0,006	1240±174	0,005
TPP (ms)	70,4±2,1	64,2±4,1	NS	71,5±2,5	NS	67,0±2,4	NS	71,6±1,6	NS
RT90 (ms)	71,1±2,1	72,2±4,6	NS	68,0±3,0	NS	71,3±4,2	NS	75,2±2,9	NS
Tiempo hasta -dP/dt máx. (ms)	49,3±0,4	44,6±2,0	NS	48,3±1,2	NS	47,0±2,4	NS	49,2±0,5	NS
Tiempo hasta +dP/dt máx. (ms)	50,0±1,0	49,4±0,8	NS	50,0±3,5	NS	47,0±2,4	NS	52,4±1,7	NS
CPP (mmHg)	89,3±5,7	86,4±5,3	NS	70,0±5,3	NS	91,5±6,6	NS	84,8±8,6	NS
CVR (mmHg)	59,5±3,8	57,6±3,5	NS	46,7±3,5	NS	61,0±4,4	NS	56,5±5,7	NS
HR (lpm)	330±14	362±16	NS	318±21	NS	335±20	NS	338±10	NS

Ejemplo 15

Animales: Se mantuvieron ratones C57BL/6 de Charles River (12-15 semanas de edad) con alimentos comerciales y agua corriente a voluntad. Se revisaron y aprobaron todos los protocolos de animales por el University of Texas Southwestern IACAC de conformidad con las normas que regulan el uso de animales publicadas por el NIH.

Ligadura de arteria coronaria: Se anestesiaron ratones con isoflurano al 1-1,5 % tras lo que se realizó la ligadura de arteria coronaria. Se administraron preoperatoriamente atropina (0,75 mg/kg administrados por vía intramuscular), lidocaína (1 mg/ml por vía intramuscular) y solución salina (1 ml por vía intraperitoneal). Se logró ventilación usando una máscara adaptada ajustada al hocico del ratón y un pequeño ventilador para animales (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA). Se practicó una incisión (~5 mm) en la parte izquierda del tórax en el cuarto espacio intercostal y se realizó pericardiotomía para exponer el ventrículo izquierdo. Se ocluyó la arteria coronaria izquierda usando Prolene 8-0 aproximadamente 2 mm bajo la aurícula izquierda. Posteriormente, se cerró el tórax en capas y volvió la presión negativa del tórax mediante evacuación por jeringa. Se administró buprenorfina (0,10 mg/kg) una vez de manera posoperatoria para el dolor. Se realizaron procedimientos simulados de manera idéntica sin la ligadura coronaria.

Anticuerpo anti-MIF: Se usaron un anticuerpo monoclonal IgG1 anti-MIF de ratón (III.D.9, cortesía de Cytokine PharmaScience, Inc.) y un anticuerpo monoclonal de control de isotipo IgG1 (HB-49, cortesía de Cytokine PharmaScience, Inc.) en los estudios de ecocardiografía. Estudios anteriores han demostrado la neutralización *in vivo* de la actividad de MIF. Las figuras 21-25 muestran los resultados obtenidos en este ejemplo. La figura 21 compara la función cardíaca (acortamiento fraccional) tras ligadura de LAD con LAD solo y anticuerpo anti-MIF + LAD. La figura 22 muestra el efecto de la terapia con anticuerpos anti-MIF antes de LAD, con LAD solo y con anticuerpo anti-MIF + LAD. La figura 23 presenta datos de función cardíaca 48 horas tras LAD para varios grupos de tratamiento. La figura 24 muestra la concentración sérica de troponina 48 h tras LAD con tratamiento con anticuerpos anti-MIF previo y retardado. La figura 25 las concentraciones séricas de troponina I y MIF durante dos semanas tras la ligadura.

Ejemplo 16

El MIF se secreta de los cardiomiocitos tras la exposición a LPS, y media directamente una disfunción cardíaca de comienzo tardío (>6 horas). En células inmunitarias, se determinó recientemente que CD74 era el receptor de MIF, que ejerce efectos a través de rutas de señalización intracelulares de ERK1/2. Para determinar si CD74 media en la disfunción cardíaca inducida por MIF en septicemia, se expusieron: 1) ratones de tipo silvestre (C57BL/6) a LPS; 2) ratones de tipo silvestre tratados previamente con anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-CD74; y expuestos a LPS, y 3) ratones deficientes en CD74 a LPS (4 mg/kg). Se realizó ecocardiografía en serie y se determinó el acortamiento fraccional (% FS). A las 24 horas, se observó disfunción significativa en ratones WT a los que se había administrado LPS (% FS=31,6 %±3,3 %) en comparación con los controles ((% FS=58±1 %). Tanto en los ratones tratados con anticuerpos anti-CD74 como en los deficientes para CD74 expuestos a LPS, la función cardíaca mejoró significativamente en comparación con los ratones de tipo silvestre a los que se había administrado LPS solo ((% FS=49±3,6 % y 53,3±2,4 %, respectivamente, p<0,05). Puesto que nunca se ha documentado la expresión de CD74 en el corazón, se realizaron inmunotransferencias e histoquímica que confirmaron que CD74 está presente de manera constitutiva en las membranas de células cardíacas y en el citosol; y que se regulaba sustancialmente tras la exposición a LPS (casi ausente a las 12 horas ->disminución de 4 veces). Figuras 26-30 y tablas 5-7. Los datos son los primeros en demostrar que CD74 se expresa en cardiomiocitos y es un mediador crítico de la disfunción cardíaca.

Tabla 5

Nombre de gel: Serie 1 de CD74 (Imagen 1-D sin procesar)

Índice	Área mm ²	Valor medio INT	Desviación estándar	Densidad INT/mm ²
1	60,752571	0,194609751	0,189491850143	27,14811295
2	60,752571	0,287409566	0,248436881024	40,09371219
3	60,752571	0,233961015	0,202269192827	32,63762488
4	60,752571	0,193959627	0,180271350955	27,05742043
5	60,752571	0,395414888	0,260615830635	55,16048369
6	60,752571	0,324963155	0,260421026338	45,33244800
7	60,752571	0,383720515	0,267718631786	53,52911561
8	60,752571	0,445625310	0,256556738182	62,16485123
9	60,752571	0,424732026	0,248033724362	59,25023237
10	60,752571	0,391370235	0,243462155963	54,59625355
11	60,752571	0,607251315	0,202530867340	84,71172258
12	60,752571	0,620208919	0,184951399717	86,51931171

Método de sustracción de fondo: local
Unidades de datos: intensidad (INT)

Tabla 6 RATÓN CD74 KO – MIF/hr añadido a perfundido

	CD74 KO (n=3)	CD74 KO + MIFrh (n=3)	p	C57BL/6 (n=3)	p CD74 KO	C57BL/6 + MIFrh (n=3)	p	p CD74 KO MIFrh
Presión ventricular izquierda (mmHg)	104,7±12,9	67,3±14,4	NS	96,0±3,0	NS	52,7±6,6	0,004	NS
+dP/dt máx. (mmHg/s)	2253±260	1867±176	NS	2333±33	NS	1417±164	0,005	NS
-dP/dt máx. (mmHg/s)	2250±150	1433±202	0,03	2033±33	NS	1233±159	0,008	NS
Razón diferencial	1,12±0,06	1,32±0,18	NS	1,15±0,05	NS	1,15±0,02	NS	NS
dP40 (mmHg/s)	2200±115	1662±120	0,03	1867±67	NS	1200±115	0,007	0,05
Tiempo hasta presión máxima (ms)	77,3±6,3	69,3±3,5	NS	78,0±4,1	NS	74,0±3,1	NS	NS
Tiempo hasta relajación del 90% (ms)	73,3±3,3	77,3±2,7	NS	81,0±5,9	NS	73,3±4,4	NS	NS
Tiempo hasta +dP/dt máx. (ms)	51,0±2,1	45,0±2,9	NS	51,0±2,1	NS	47,0±2,1	NS	NS
Tiempo hasta -dP/dt máx. (ms)	49,7±3,3	52,7±0,3	NS	51,7±1,7	NS	49,0±1,5	NS	NS
Presión de perfusión coronaria (mmHg)	80,0±15,5	86,0±23,6	NS	80,0±20,0	NS	86,0±23	NS	NS
Resistencia vascular coronaria (mmHg)	56,3±7,6	56,3±7,7	NS	53,3±13,3	NS	57,3±7,7	NS	NS
Frecuencia cardiaca (lpm)	313±2	322±2	NS	325±8	NS	318±2	NS	NS

Tabla 7

CD74 K/O												
	LVP	+dP/dt	-dP/dt	DR	dP40	TPP	RT90	+d máx.	-d máx.	CPP	CVR	HR
10/24/03	124	3000	2400	1,25	2400	90	80	55	56	102	45	250
11/4/03,1	80	2100	1950	1,07692,3	2000	72	70	48	45	50	53	370
11/4/03,2	110	2500	2400	1,041667	2200	70	70	50	48	88	71	320
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
x	104,6666667	2533,333	2250	1,122863	2200	77,33333	73,33333	51	49,66667	80	56,33333	313,3333
de	22,4796204	450,925	259,8076	0,111506	200	11,01514	5,773503	3,605551	5,686241	26,90725	13,31666	60,27714
ee	12,97861489	260,3417	150	0,064378	115,470	6,359595	3,333333	2,081666	3,282953	15,53491	7,688375	34,80102
CD74 K/O +m MIFhr												
	LVP	+dP/dt	-dP/dt	DR	dP40	TPP	RT90	+d máx.	-d máx.	CPP	CVR	HR
10/24/03	64	1800	1400	1,285714	1600	70	80	45	53	118	45	320
11/4/03,1	50	1600	1100	1,454545	1500	75	80	50	52	40	53	320
11/4/03,1	88	2200	1800	1,222222	1900	63	79	40	53	100	71	325
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
x	67,33333333	1866,667	1433,333	1,320827	1666,667	69,33333	77,33333	45	52,66667	86	56,33333	321,6667
de	19,21804707	305,505	351,1885	0,120076	208,1666	6,027714	4,618802	5	0,57735	40,84116	13,31666	2,886751
ee	11,09554465	176,3834	202,7588	0,069326	120,185	3,480102	2,666667	2,886751	0,333333	23,57965	7,688375	1,666667
p	0,094066011	0,101343	0,031734	0,104538	0,032901	0,331722	0,401788	0,167103	0,414702	0,842117	1	0,82272

C57BL/6											
C57BL/6						C57BL/6+MIFhr					
LVP	+dP/dt	-dP/dt	DR	dP40	TPP	RT90	+d máx.	-d máx.	CPP	CVR	HR
10/27/03,1	2300	2000	1,15	2000	84	83	50	50	100	66,66667	315
10/27/03,2	2400	2000	1,2	1800	80	90	55	55	100	66,66667	320
10/27/03,3	2300	2100	1,095238	1800	70	70	48	50	40	26,66667	340
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
x	2333,333	2033,333	1,148413	1,866,667	78	81	51	51,66667	80	53,33333	325
de	5,291502622	57,73503	0,052399	115,4701	7,211103	10,14889	3,605551	2,886751	34,64102	23,09401	13,22876
ee	3,055050463	33,33333	0,030253	66,66667	4,16332	5,859465	2,081666	1,666667	20	13,33333	7,637626
pCD74	0,488514	0,231336	0,737615	0,066767	0,934326	0,318926	1	0,615837	1	0,854958	0,759751
C57BL/6+MIFhr											
LVP	+dP/dt	-dP/dt	DR	dP40	TPP	RT90	+d máx.	-d máx.	CPP	CVR	HR
10/27/03,1	1650	1500	1,1	1400	72	80	48	52	108	72	320
10/27/03,2	1100	950	1,157895	1000	80	75	50	48	110	73,33333	320
10/27/03,3	1500	1250	1,2	1200	70	65	43	47	40	26,66667	315
n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
x	52,66666667	1416,667	1,152632	1200	74	73,33333	47	49	86	57,33333	318,3333
de	11,37248141	284,312	0,050207	200	5,291503	7,637626	3,605551	2,645751	39,84972	26,56648	2,886751
ee	6,565905201	164,1476	0,028987	115,4701	3,05505	4,409586	2,081666	1,527525	23,00725	15,33816	1,666667
p	0,003921349	0,005425	0,0924639	0,00749	0,481817	0,354827	0,245802	0,303548	0,853566	0,853566	0,441823
p-CD74MIF	0,318808435	0,135201	0,088782	0,048812	0,37059	0,480962	0,604145	0,078928	1	0,956318	0,2302

Ejemplo 17

Ligadura de arteria coronaria. Se anestesiaron ratones con isoflurano al 1-1,5 % tras lo que se realizó la ligadura de arteria coronaria. Se administraron preoperatoriamente atropina (0,075 mg/kg administrados por vía intramuscular), lidocaína (1 mg/kg por vía intramuscular) y solución salina (1 ml por vía intraperitoneal). Se logró ventilación usando una máscara adaptada ajustada al hocico del ratón y un pequeño ventilador para animales (Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA). Se practicó una incisión (~5 mm) en la parte izquierda del tórax en el cuarto espacio intercostal y se realizó pericardiotomía para exponer el ventrículo izquierdo. Se ocluyó la arteria coronaria izquierda usando Prolene 8-0 aproximadamente 2 mm bajo la aurícula izquierda. Posteriormente, se cerró el tórax en capas y volvió la presión negativa del tórax mediante evacuación por jeringa. Se administró el éster metílico del ácido (R)-3-(4-hidroxifenil)-4,5-dihidro-5-isoxazolinacético ("ISO-1", "CPSI-26" o éster metílico de p-hidroxifenol-isoxazolina) a una dosificación de 200 mg/kg en 25 microlitros de DMSO por vía intraperitoneal diariamente durante dos semanas. Se administró buprenorfina (0,10 mg/kg) una vez de manera posoperatoria para el dolor. Se realizaron procedimientos simulados de manera idéntica sin la ligadura coronaria. Los resultados se muestran en la figura 31.

Abreviaturas: Transportadores ABC, transportadores de casete de unión a ATP; % de FS, de acortamiento fraccional; IL-10, interleucina-1beta; IRAK, cinasa M asociada al receptor de IL-1; LPS, lipopolisacáridos; MDA, malondialdehído; MIF, factor de inhibición de la migración de (macrófagos); Tlr-4, receptor 4 de tipo toll; CLP, ligadura y punción cecal; Enbrel®, nombre comercial de TNFR humano recombinante:Fc (receptor soluble de TNF que neutraliza la actividad de TNF *in vivo*); IL-1 β , interleucina-1beta; TNF- α , factor de necrosis tumoral-alfa; TNFR-/-, ratones deficientes en el receptor de TNF- α I/II.

Abe R, Shimizu T, Ohkawara A, and Nishihira J. Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1500: 1-9, 2000.

Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, and Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 351: 929-933, 1998.

Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Pert TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, and *et al.* Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *Jama* 273: 934-941, 1995.

Ammann, P., *et al.*, "Elevation of Troponin I in Sepsis and Septic Shock", *Intensive Care Med.*, 27, 965-969 (2001).

Bacher, M, *et al.*, "Migration Inhibitory Factor Expression in Experimentally Induced Endotoxemia", *Am. J. Pathol.*, 150, 235-246 (1997).

Baron P, Traber LD, Traber DL, Nguyen T, Hollyoak M, Hegggers JP, and Herndon DN. Gut failure and translocation following burn and sepsis. *J Surg Res* 57: 197-204, 1994.

Bernhagen, J., *et al.*, "An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Tuberculin Delayed-Type Hypersensitivity Reaction", *J. Exp. Med.*, 183, 277-282 (1996).

Bernhagen, J, *et al.*, "Regulation of the Immune Response by Macrophage Migration Inhibitory Factor: Biological and Structural Features", *J. Mol. Med.*, 76, 151-161 (1998).

Bernhagen, J., *et al.*, "MIF is a Pituitary-Derived Cytokine that Potentiates Lethal Endotoxaemia", *Nature*, 365, 756-759 (1993).

Beutler B, Milsark IW, and Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229: 869-871, 1985.

Bhatia M and Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202: 145-156, 2004.

Bozza, M., *et al.*, "Targeted Disruption of Migration Inhibitory Factor Gene Reveals Its Critical Role in Sepsis", *J. Exp. Med.* 189, 341-346 (1999).

Bryant, D., *et al.*, "Cardiac Failure in Transgenic Mice with Myocardial Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF)", *Circulation*, 97, 1375-1381 (1998).

Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, Kleemann R, Bernhagen J, and Ihling C. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis.

- Circulation 105: 1561-1566, 2002.
- Calandra, T., *et al.*, "MIF as a Glucocorticoid-Induced Modulator of Cytokine Production", *Nature*, 377, 68-71 (1995).
- 5 Calandra, T., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): A Glucocorticoid Counter-Regulator Within the Immune System", *Crit. Rev. Immunol.*, 17, 77-88 (1997).
- Calandra, T., *et al.*, "Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor", *Nat. Med.*, 6, 164-170 (2000).
- 10 Calandra, T., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor is a Critical Mediator of the Activation of Immune Cells by Exotoxins of Gram-Positive Bacteria", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11383-11388 (1998).
- Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, and Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179: 1895-1902, 1994.
- 15 Carlson DL, White DJ, Maass DL, Nguyen RC, Giroir B, and Horton JW. I kappa B overexpression in cardiomyocytes prevents NF-kappa B translocation and provides cardioprotection in trauma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H804-814, 2003.
- 20 Chen G, Cao P, and Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9: 401-410, 2002.
- Chen G and Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635, 2002.
- 25 Chesney, J., *et al.*, "An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Angiogenesis and the Growth of a Murine Lymphoma", *Mol. Med.*, 5, 181-191 (1999).
- Court, O, *et al.*, "Clinical Review: Myocardial Depression Sepsis and Septic Shock", *Crit. Care*, 6, 500-508 (2002).
- 30 Daryani R, LaLonde C, Zhu D, Weidner M, Knox J, and Demling RH. Effect of endotoxin and a burn injury on lung and liver lipid peroxidation and catalase activity. *J Trauma* 30: 1330-1334, 1990.
- Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 30: S184-189, 1990.
- 35 Deitch EA. Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury. *Surgery* 107: 411-416, 1990.
- Deitch EA, Maejima K, and Berg R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J Trauma* 25: 385-392, 1985.
- 40 de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C, and Sahli MA. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2: 1061-1066, 2001.
- 45 del Vecchio, M.T., *et al.* "Macrophage Migration Inhibitory Factor in Prostatic Adenocarcinoma: Correlation with Tumor Grading and Combination Endocrine Treatment-Related Changes", *Prostate*, 45, 51-57 (2000).
- Dios A., *et al.*, "Inhibition of MIF Bioactivity by Rational Design of Pharmacological Inhibitors of MIF Tautomerase Activity", *J. Med. Chem.*, 45, 2410-2416 (2002).
- 50 Donnelly, S.C., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Regulator of Glucocorticoid Activity with a Critical Role in Inflammatory Disease", *Mol. Med. Today.*, 3, 502-507 (1997).
- Donnelly, S.C., *et al.*, "Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Respiratory Distress Syndrome", *Nat. Med.*, 3, 320-323 (1997).
- 55 Eickhoff R, Wilhelm B, Renneberg H, Wennemuth G, Bacher M, Linder D, Bucala R, Seitz J, and Meinhardt A. Purification and characterization of macrophage migration inhibitory factor as a secretory protein from rat epididymis: evidences for alternative release and transfer to spermatozoa. *Mol Med* 7: 27-35, 2001.
- 60 Emmanuilidis K, Weighardt H, Matevossian E, Heidecke CD, Ulm K, Bartels H, Siewert JR, and Holzmann B. Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome. *Shock* 18: 301-305, 2002.
- 65 Evans HG, Lewis MJ, and Shah AM. Interleukin-1 beta modulates myocardial contraction via dexamethasone sensitive production of nitric oxide. *Cardiovasc Res* 27: 1486-1490, 1993.

- Fingerle-Rowson, G., *et al.*, "Regulation of Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression by Glucocorticoids in vivo", *Am. J. Pathol.*, 162, 47-56 (2003).
- 5 Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, and Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumornecrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 334: 1697-1702, 1996.
- 10 Fisher CJ, Jr., Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL, and *et al.* Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 21: 318-327, 1993.
- 15 Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL, and *et al.* Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhlL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *Jama* 271: 1836-1843, 1994.
- 20 Fisher CJ, Jr., Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, and Catalano MA. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. The IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 22: 12-21, 1994.
- 25 Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, and Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett* 551: 78-86,2003.
- Fukuzawa J., *et al.*, "Contribution of Macrophage Migration Inhibitory Factor to Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by Oxidative Stress in Cardiomyocytes", *J. Biol. Chem.*, 277,24889-24895 (2002).
- 30 Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, and Kettman JR, Jr. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 43: 1749-1756, 1997.
- Gando, S., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor is a Critical Mediator of Systemic Inflammatory Response Syndrome", *Intensive Care Med.*, 27, 1187-1193 (2001).
- 35 Garner *et al.*, Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2500-H2509, 2003.
- 40 Garner LB, Willis MS, Carlson DL, DiMaio JM, White MD, White DJ, Adams GA, Horton JW, and Giroir BP. Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2500-2509, 2003.
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, and Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3: 995-1001, 2002.
- 45 Giroir, B.P., *et al.*, "Inhibition of Tumor Necrosis Factor Prevents Myocardial Dysfunction During Burn Shock", *Am. J. Physiol.*, 267, H118-H124 (1994).
- 50 Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Chen ZJ, and Giroir BP. Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxininduced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H962-968, 2001.
- Haudek, *et al.*, "Differential Regulation of Myocardial NF Kappa B Following Acute or Chronic TNF-Alpha Exposure", *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33, 1263-1271 (2001).
- 55 Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA, Jr., Cerami A, Shires GT, and Lowry SF. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 166: 147-153, 1988.
- 60 Horton JW, Garcia NM, White DJ, and Keffer J. Postburn cardiac contractile function and biochemical markers of postburn cardiac injury. *J Am Coll Surg* 181: 289-298, 1995.
- Horton JW, White DJ, Maass DL, Hybki DP, Haudek S, and Giroir B. Antioxidant vitamin therapy alters burn traumamediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion. *J Trauma* 50: 397-406; discussion 407-398, 2001.
- 65 Hudson, J.D., *et al.*, "A Proinflammatory Cytokine Inhibits p53 Tumor Suppressor Activity", *J. Exp. Med.*, 190, 1375-1382 (1999).

- Kamimura, A., *et al.*, "Intracellular Distribution of Macrophage Migration Inhibitory Factor Predicts the Prognosis of Patients with Adenocarcinoma of the Lung", *Cancer*, 89, 334-341 (2000).
- 5 Kettman JR, Davies T, Chandler D, Oliver KG, and Fulton RJ. Classification and properties of 64 multiplexed microsphere sets. *Cytometry* 33: 234-243, 1998.
- Kadokami T, McTiernan CF, Kubota T, Frye CS, Bounoutas GS, Robbins PD, Watkins SC, and Feldman AM. Effects of soluble TNF receptor treatment on lipopolysaccharide-induced myocardial cytokine expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2281-2291, 2001.
- 10 Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, and Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 408: 211-216, 2000.
- 15 Kleemann R, Kapurniotu A, Frank RW, Gessner A, Mischke R, Flieger O, Juttner S, Brunner H, and Bernhagen J. Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol* 280: 85-102, 1998.
- 20 Krishnagopalan, S., *et al.*, "Myocardial Dysfunction in the Patient with Sepsis", *Curr. Opin. Crit. Care*, 8, 376-388 (2002).
- Kumar, A, *et al.*, "Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1 Beta are Responsible for in vitro Myocardial Cell Depression Induced by Human Septic Shock Serum", *J. Exp. Med.*, 183, 949-958 (1996).
- 25 Lai KN, Leung JC, Metz CN, Lai FM, Bucala R, and Lan HY. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 199: 496-508, 2003.
- Lan, H.Y., *et al.*, "De Novo Renal Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor During the Development of Rat Crescentic Glomerulonephritis", *Am. J. Pathol.*, 149, 1119-1127 (1996).
- 30 Lan, H.Y., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor Expression in Human Renal Allograft Rejection", *Transplantation*, 66, 1465-1471 (1998).
- 35 Lan, H.Y., *et al.*, "TNF-Alpha Up-Regulates Renal MIF Expression in Rat Crescentic Glomerulonephritis", *Mol. Med.*, 3, 136-144 (1997).
- Last-Barney K, Homon CA, Faanes RB, and Merluzzi VJ. Synergistic and overlapping activities of tumor necrosis factor-alpha and IL-1. *J Immunol* 141: 527-530, 1988.
- 40 Leech, M, *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor in Rheumatoid Arthritis: Evidence of Proinflammatory Function and Regulation by Glucocorticoids", *Arthritis Rheum*, 42, 1601-1608 (1999).
- 45 Leech, M., *et al.*, "Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Evolution of Rat Adjuvant Arthritis", *Arthritis Rheum.*, 41, 910-917 (1998).
- Leech M, Metz C, Santos L, Peng T, Holdsworth SR, Bucala R, and Morand EF. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 41: 910-917, 1998.
- 50 Lefer AM. Mechanisms of cardiodepression in endotoxin shock. *Circ Shock Suppl* 1: 1-8, 1979. Lehmann, L.E., "Plasma Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor Are Elevated in Patients with Severe Sepsis", *Intensive Care Med.*, 27, 1412-1415 (2001).
- Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, and Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197: 1467-1476, 2003.
- 55 Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, Lolis E, and Al-Abed Y. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem* 277: 24976-24982, 2002.
- 60 Lue, H., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): Mechanisms of Action and Role in Disease", *Microbes Infect.*, 4, 449-460 (2002).
- 65 Makita, H., *et al.*, "Effect of Anti-Macrophage Migration Inhibitory Factor Antibody on Lipopolysaccharide-Induced Pulmonary Neutrophil Accumulation", *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 158, 573-579 (1998).

- Maass DL, White J, and Horton JW. IL-1 β and IL-6 act synergistically with TNF- α to alter cardiac contractile function after burn trauma. *Shock* 18: 360-366, 2002.
- 5 Meng X, Ao L, Meldrum DR, Cain BS, Shames BD, Selzman CH, Banerjee A, and Harken AH. TNF- α and myocardial depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am J Physiol* 275: R502-508, 1998.
- Meyer-Siegler, K., *et al.*, "Increased Stability of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in DU-145 Prostate Cancer Cells", *J. Interferon Cytokine Res.*, 20, 769-778 (2000).
- 10 Mikulowska, A., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor is Involved in the Pathogenesis of Collagen Type 11-Induced Arthritis in Mice", *J. Immunol.*, 158, 5514-5517 (1997).
- Mitchell, R.A., *et al.* "Tumor Growth-Promoting Properties of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)", *Semin. Cancer Biol.*, 10, 359-366 (2000).
- 15 Mitchell RA, Metz CN, Peng T, and Bucala R. 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.
- 20 Mozetic-Francky B, Cotic V, Ritonja A, Zerovnik E, and Francky A. High-yield expression and purification of recombinant human macrophage migration inhibitory factor. *Protein Expr Purif* 9: 115-124, 1997.
- Murphy JT, Horton JW, Purdue GF, and Hunt JL. Evaluation of troponin-I as an indicator of cardiac dysfunction after thermal injury. *J Trauma* 45: 700-704, 1998.
- 25 Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, and Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med* 120: 771-783, 1994.
- 30 Natanson, C., *et al.*, "Endotoxin and Tumor Necrosis Factor Challenges in Dogs Simulate the Cardiovascular Profile of Human Septic Shock", *Journal of Experimental Medicine*, 169, 823-932 (1989).
- Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, Calandra T, Dohi K, and Bucala R. Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* 1: 781-788, 1995.
- 35 Ohkawara T, Nishihira J, Takeda H, Hige S, Kato M, Sugiyama T, Iwanaga T, Nakamura H, Mizue Y, and Asaka M. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis by anti-macrophage migration inhibitory factor antibody in mice. *Gastroenterology* 123: 256-270, 2002.
- 40 Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, and Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 81: 1162-1172, 1988.
- 45 Ono S, Ueno C, Aosasa S, Tsujimoto H, Seki S, and Mochizuki H. Severe sepsis induces deficient interferon- γ and interleukin-12 production, but interleukin-12 therapy improves survival in peritonitis. *Am J Surg* 182: 491-497, 2001.
- Orita, M., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor and the Discovery of Tautomerase Inhibitors", *Curr. Pharm. Des.*, 8, 1297-1317 (2002).
- 50 Parker, M.M., *et al.*, "Right Ventricular Dysfunction and Dilatation, Similar to Left Ventricular Changes, Characterize the Cardiac Depression of Septic Shock in Humans", *Chest*, 97, 126-131 (1990).
- Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, and Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 76: 1539-1553, 1985.
- 55 Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, and Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol* 160: 943-952, 1998.
- 60 Poltorak, A., *et al.*, "Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene", *Science*, 282, 2085-2088 (1998).
- 65 Poltorak, A. *et al.*, "Genetic and Physical Mapping of the Lps Locus: Identification of the Toll-4 Receptor as a Candidate Gene in the Critical Region", *Blood Cells Mol. Dis.*, 24, 340-355 (1998).

- Pyle ME, Korbonits M, Gueorguiev M, Jordan S, Kola B, Morris DG, Meinhardt A, Powell MP, Claret FX, Zhang Q, Metz C, Bucala R, and Grossman AB. Macrophage migration inhibitory factor expression is increased in pituitary adenoma cell nuclei. *J Endocrinol* 176: 103-110, 2003.
- 5 Qureshi, S.T., *et al.*, "Endotoxin-Tolerant Mice Have Mutations in Toll-Like Receptor 4 (Tlr4)", *J. Exp. Med.*, 189, 615-625 (1999).
- Raeburn CD, Dinarello CA, Zimmerman MA, Calkins CM, Pomerantz BJ, McIntyre RC, Jr., Harken AH, and Meng X. Neutralization of IL-18 attenuates lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H650-657, 2002.
- 10 Rice EK, Tesch GH, Cao Z, Cooper ME, Metz CN, Bucala R, Atkins RC, and Nikolic-Paterson DJ. Induction of MIF synthesis and secretion by tubular epithelial cells: A novel action of angiotensin II. *Kidney Int* 63: 1265-1275, 2003.
- 15 Reilly JM, Cunnion RE, Burch-Whitman C, Parker MM, Shelhamer JH, and Parrillo JE. A circulating myocardial depressant substance is associated with cardiac dysfunction and peripheral hypoperfusion (lactic acidemia) in patients with septic shock. *Chest* 95: 1072-1080, 1989.
- 20 Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, Kaul M, Withington S, Treacher D, Eckart J, Willatts S, Bouza C, Krausch D, Stockenhuber F, Eiselstein J, Daum L, and Kempeni J. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med* 24: 733-742, 1996.
- 25 Reinhart K and Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 29: S121-125, 2001.
- Reynolds EM, Ryan DP, Sheridan RL, and Doody DP. Left ventricular failure complicating severe pediatric burn injuries. *J Pediatr Surg* 30: 264-269; discussion 269-270, 1995.
- 30 Roger, T., *et al.*, "MIF Regulates Innate Immune Responses Through Modulation of Toll-Like Receptor 4", *Nature*, 414, 920-924 (2001).
- Rossi, A.G., *et al.*, "Human Circulating Eosinophils Secrete Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). Potential Role in Asthma", *J. Clin. Invest.*, 101, 2869-2874 (1998).
- 35 Rosengren E, Bucala R, Aman P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, and Rorsman H. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med* 2: 143-149, 1996.
- 40 Roth, D.M., *et al.*, "Impact of Anesthesia on Cardiac Function During Echocardiography in Mice", *Am. J. Physiol., Heart Circ. Physiol.*, 282, H2134-H2140 (2002).
- Saito H, Patterson C, Hu Z, Runge MS, Tipnis U, Sinha M, and Papaconstantinou J. Expression and self-regulatory function of cardiac interleukin-6 during endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H2241-2248, 2000.
- 45 Sanders DB, Larson DF, Hunter K, Gorman M, and Yang B. Comparison of tumor necrosis factor- α effect on the expression of iNOS in macrophage and cardiac myocytes. *Perfusion* 16: 67-74, 2001.
- Sambol JT, White J, Horton JW, and Deitch EA. Burn-induced impairment of cardiac contractile function is due to gut-derived factors transported in mesenteric lymph. *Shock* 18: 272-276, 2002.
- 50 Schwacha MG, Schneider CP, and Chaudry IH. Differential expression and tissue compartmentalization of the inflammatory response following thermal injury. *Cytokine* 17: 266-274, 2002.
- 55 Senter PD, Al-Abed Y, Metz CN, Benigni F, Mitchell RA, Chesney J, Han J, Gartner CG, Nelson SD, Todaro GJ, and Bucala R. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor (MIF) tautomerase and biological activities by acetaminophen metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 144-149, 2002.
- Sessler, C.N., *et al.*, "New Concepts in Sepsis", *Curr. Opin. Crit. Care*, 8, 465-472 (2002). Shimizu, T, *et al.*, "High Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Human Melanoma Cells and Its Role in Tumor Cell Growth and Angiogenesis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 751-758 (1999).
- 60 Shimizu T, Abe R, Ohkawara A, Mizue Y, and Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor is an essential immunoregulatory cytokine in atopic dermatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 240: 173-178, 1997.
- 65 Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, and Sakamoto W. Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF)

- in human skin and its immunohistochemical localization. FEBS Lett 381: 199-202, 1996.
- Shimizu, T., *et al.*, "Increased production of Macrophage Migration Inhibitory Factor by PBMCs of Atopic Dermatitis", J. Allergy Clin. Immunol., 104, 659-664 (1999).
- 5 Shimomura Y, Shimizu H, Takahashi M, Sato N, Uehara Y, Suwa K, Kobayashi I, Tadokoro S, and Kobayashi S. Changes in ambulatory activity and dopamine turnover in streptozotocin-induced diabetic rats. Endocrinology 123: 2621-2625, 1988.
- 10 Shoemaker WC, Vladeck BC, Bassin R, Printen K, Brown RS, Amato JJ, Reinhard JM, and Kark AE. Burn pathophysiology in man. I. Sequential hemodynamic alterations. J Surg Res 14: 64-73, 1973.
- Shu HB, Takeuchi M, and Goeddel DV. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. Proc Natl Acad Sci USA 93: 13973-13978, 1996.
- 15 Suffredini, A.F., *et al.*, "The Cardiovascular Response of Normal Humans to the Administration of Endotoxin", New England Journal of Medicine, 321, 280-287 (1989).
- 20 Takahashi, M., *et al.*, "Elevation of Plasma Levels of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction", Am. J. Cardiol., 89, 248-249 (2002).
- Takahashi, M., *et al.*, "Macrophage Migration Inhibitory Factor as a Redox-Sensitive Cytokine in Cardiac Myocytes", Cardiovasc Res., 52, 438-445 (2001).
- 25 Takahashi, *et al.*, "Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the Mechanism of Tumor Cell Growth", Mol. Med., 4, 707-714 (1998).
- Thomas JA, Tsen MF, White DJ, and Horton JW. IRAK contributes to burn-triggered myocardial contractile dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H829-836, 2002.
- 30 Thomas JA, Tsen MF, White DJ, and Horton JW. TLR4 inactivation and rBPI(21) block burn-induced myocardial contractile dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 283: H1645-1655, 2002.
- 35 Utsunomiya T, Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB, and Suzuki F. A mechanism of interleukin-12 unresponsiveness associated with thermal injury. J Surg Res 96: 211-217, 2001.
- Vignali DA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. J Immunol Methods 243: 243-255, 2000.
- 40 Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, and Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. Faseb J5: 338-343, 1991.
- White, J., *et al.*, "Development of an Acute Burn Model in Adult Mice for Studies of Cardiac Function and Cardiomyocyte Cellular Function", Shock, 16, 122-129 (2001).
- 45 White J, Carlson DL, Thompson M, Maass DL, Sanders B, Giroir B, and Horton JW. Molecular and pharmacological approaches to inhibiting nitric oxide after burn trauma. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H1616-1625, 2003.
- White J, Maass DL, Giroir B, and Horton JW. Development of an acute burn model in adult mice for studies of cardiac function and cardiomyocyte cellular function. Shock 16: 122-129, 2001.
- 50 Wolfe RR. Review: acute versus chronic response to burn injury. Circ Shock 8: 105-115, 1981.
- Yang H, COchani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris H, Susarla S, Ulloa L, Wang H, DiRaimo R, Czura C, Wang H, Roth J, Warren H, Fink M, Fenton M, Andersson U, and Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. PNAS 101: 296-301, 2004.
- 55 Yu CM, Lai KW, Chen YX, Huang XR, and Lan HY. Expression of macrophage migration inhibitory factor in acute ischemic myocardial injury. J Histochem Cytochem 51: 625-631, 2003.
- 60 Yu, C.M., *et al.*, "Elevation of Plasma Level of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Patients with Acute Myocardial Infarction", Am. J. Cardiol., 88, 774-777 (2001).

REIVINDICACIONES

- 5
1. Una composición farmacéutica eficaz para su uso en el tratamiento o la prevención de la disfunción cardíaca asociada con lesión por quemadura en un sujeto que lo necesita, que comprende:
- una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-MIF; y
- al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende además al menos un inhibidor de CD74, en la que el inhibidor de CD74 comprende al menos un anticuerpo anti-CD74.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende además una cantidad eficaz de al menos un anticuerpo anti-TNFR.
- 15
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en la que el uso da como resultado una mejora de la función cardíaca medida por un acortamiento fraccional en el sujeto.

FIGURA 1

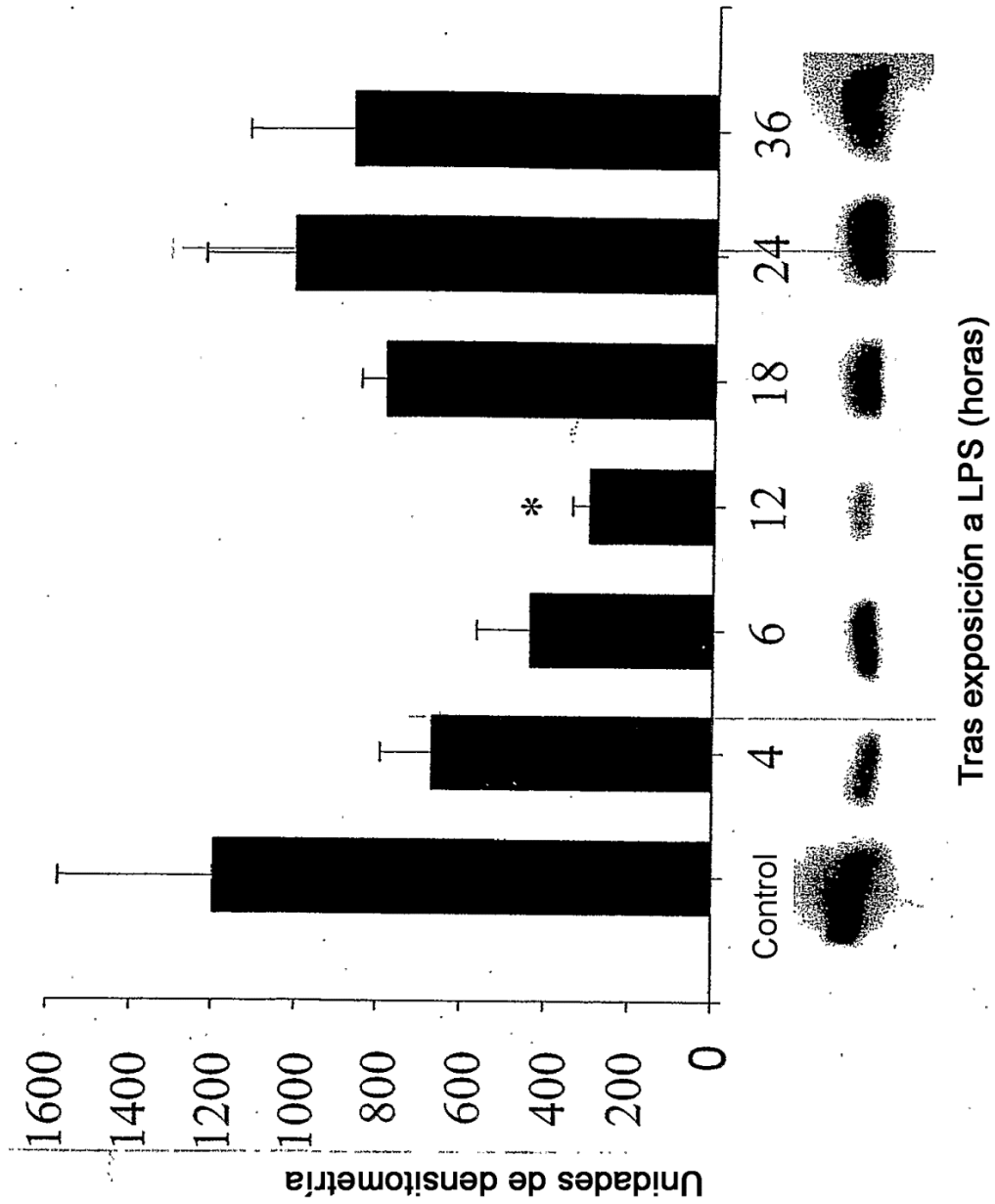


FIGURA 2

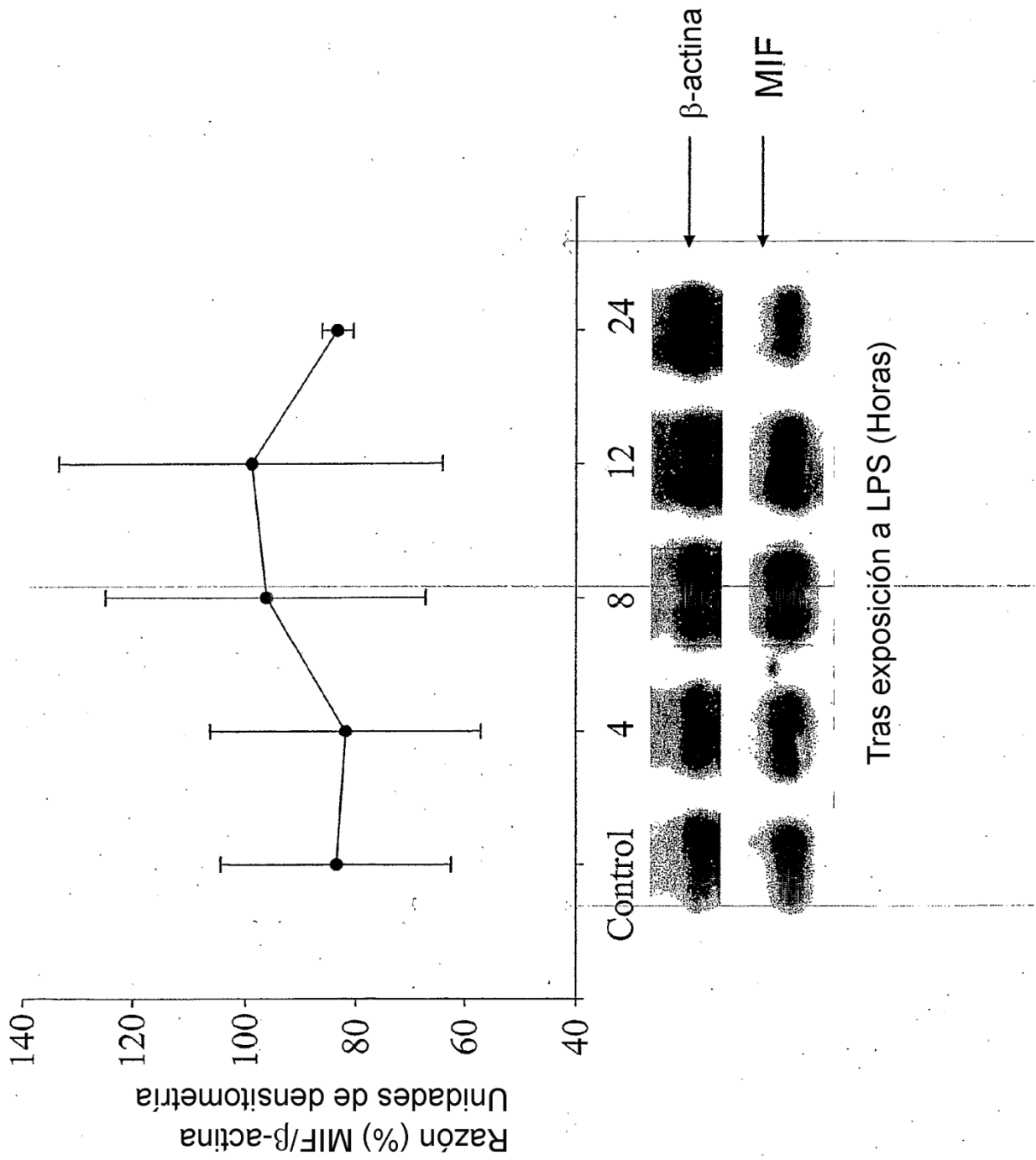


FIGURA 3

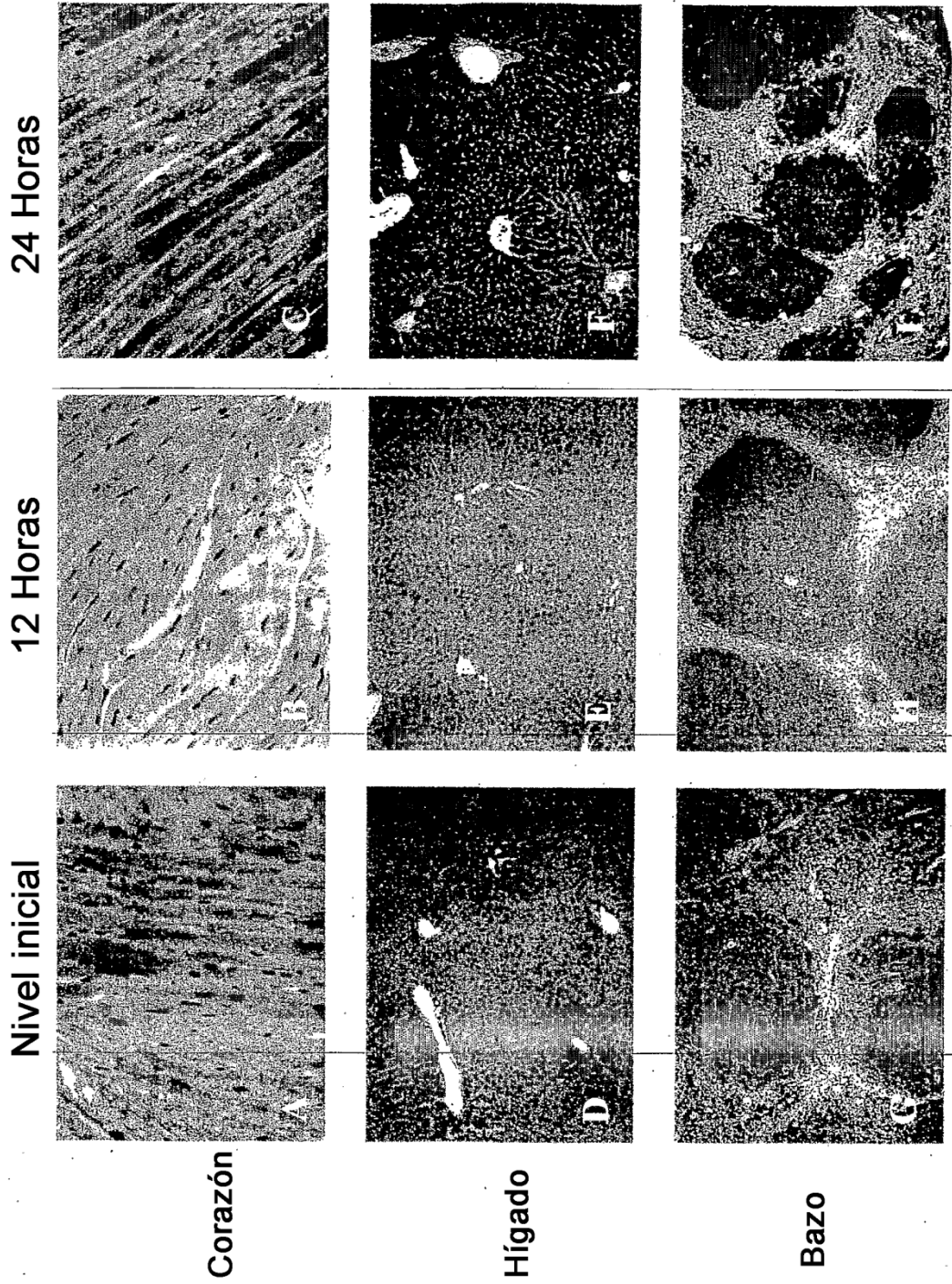


FIGURA 4

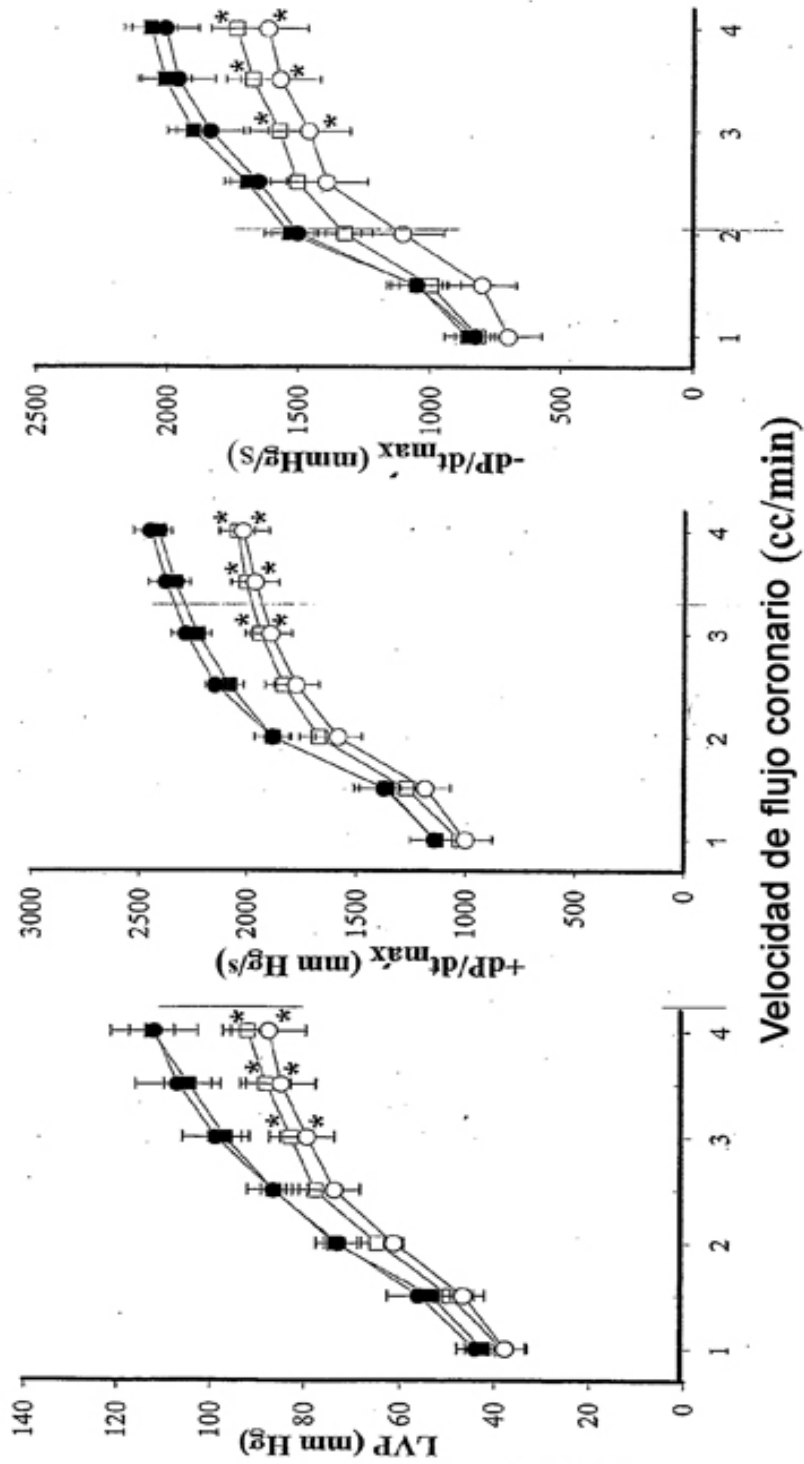


FIGURA 5

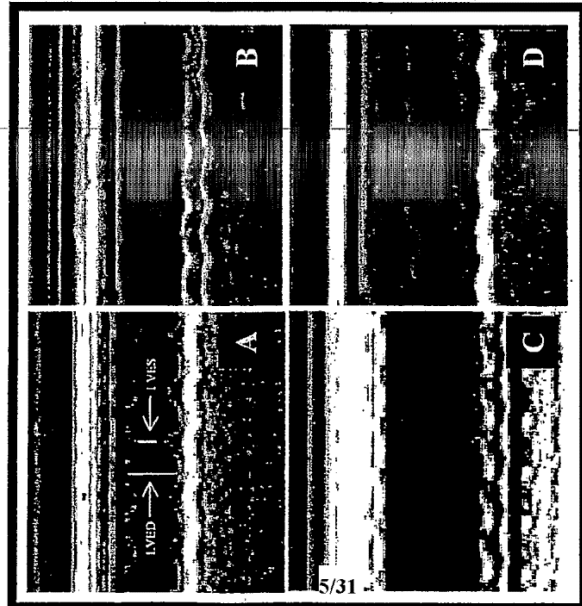
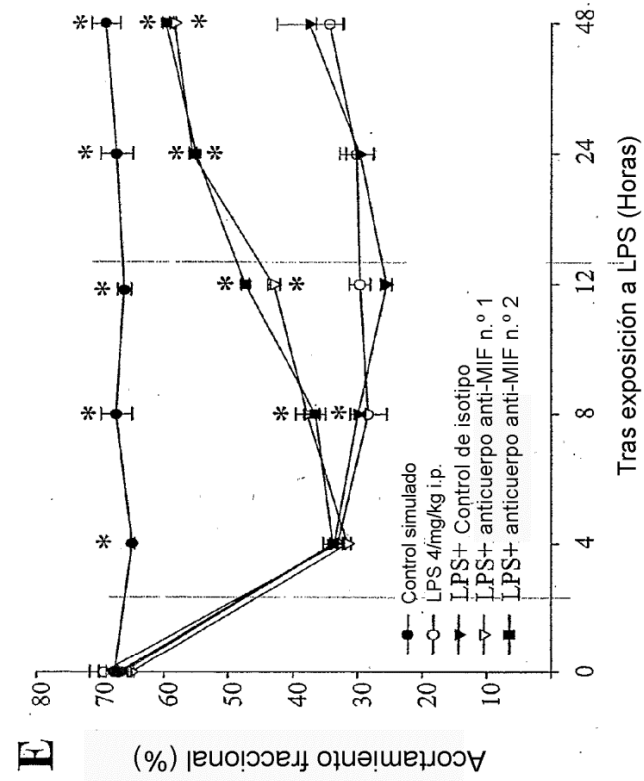


FIGURA 6

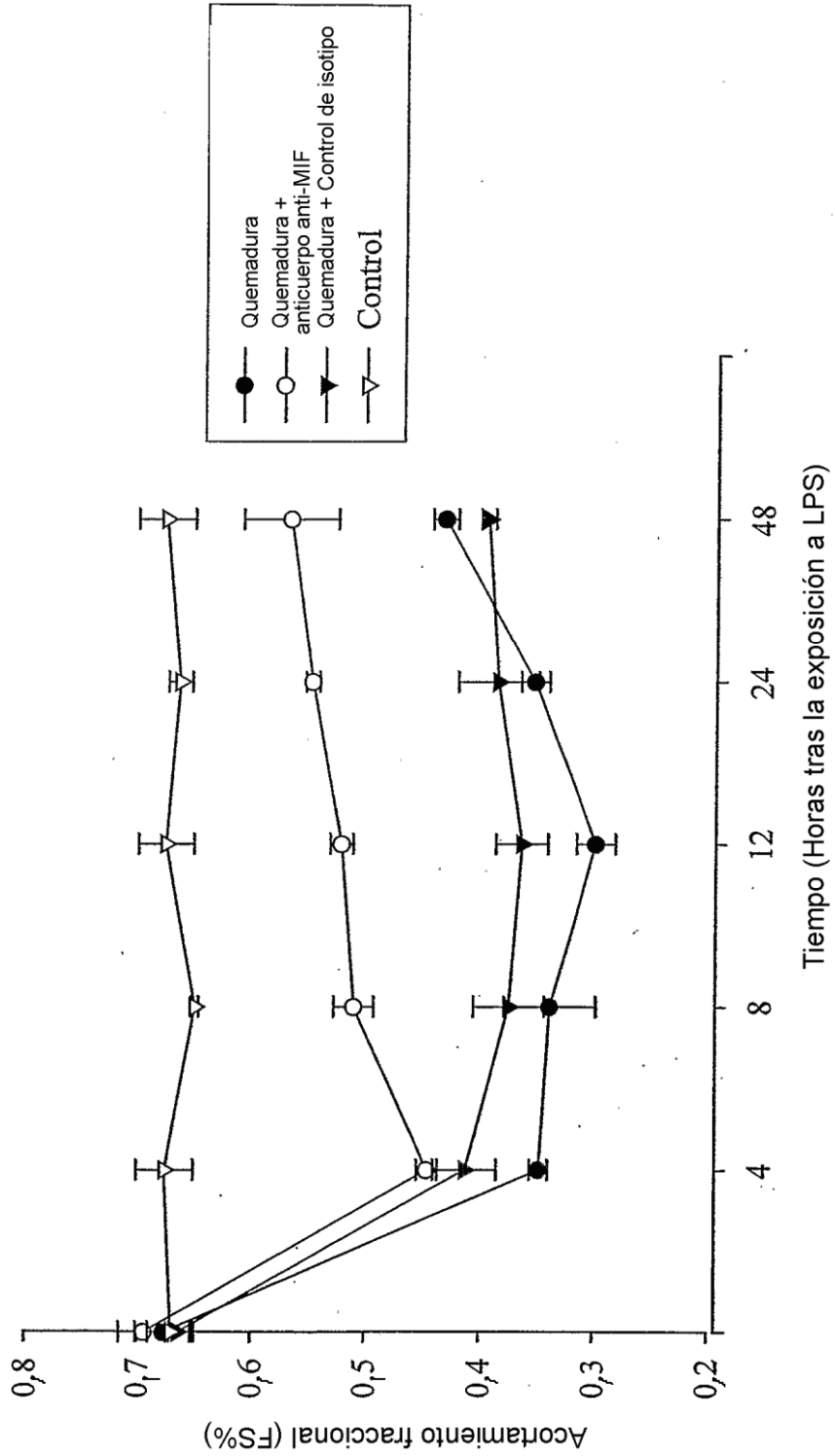


FIGURA 7

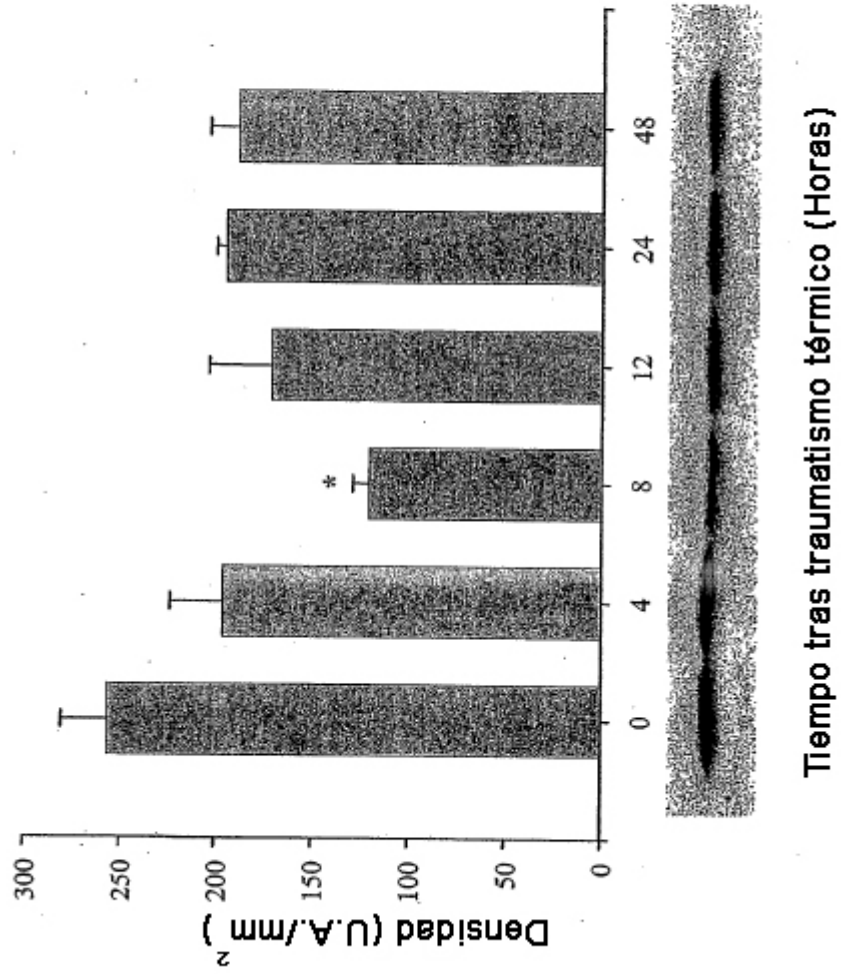


FIGURA 8

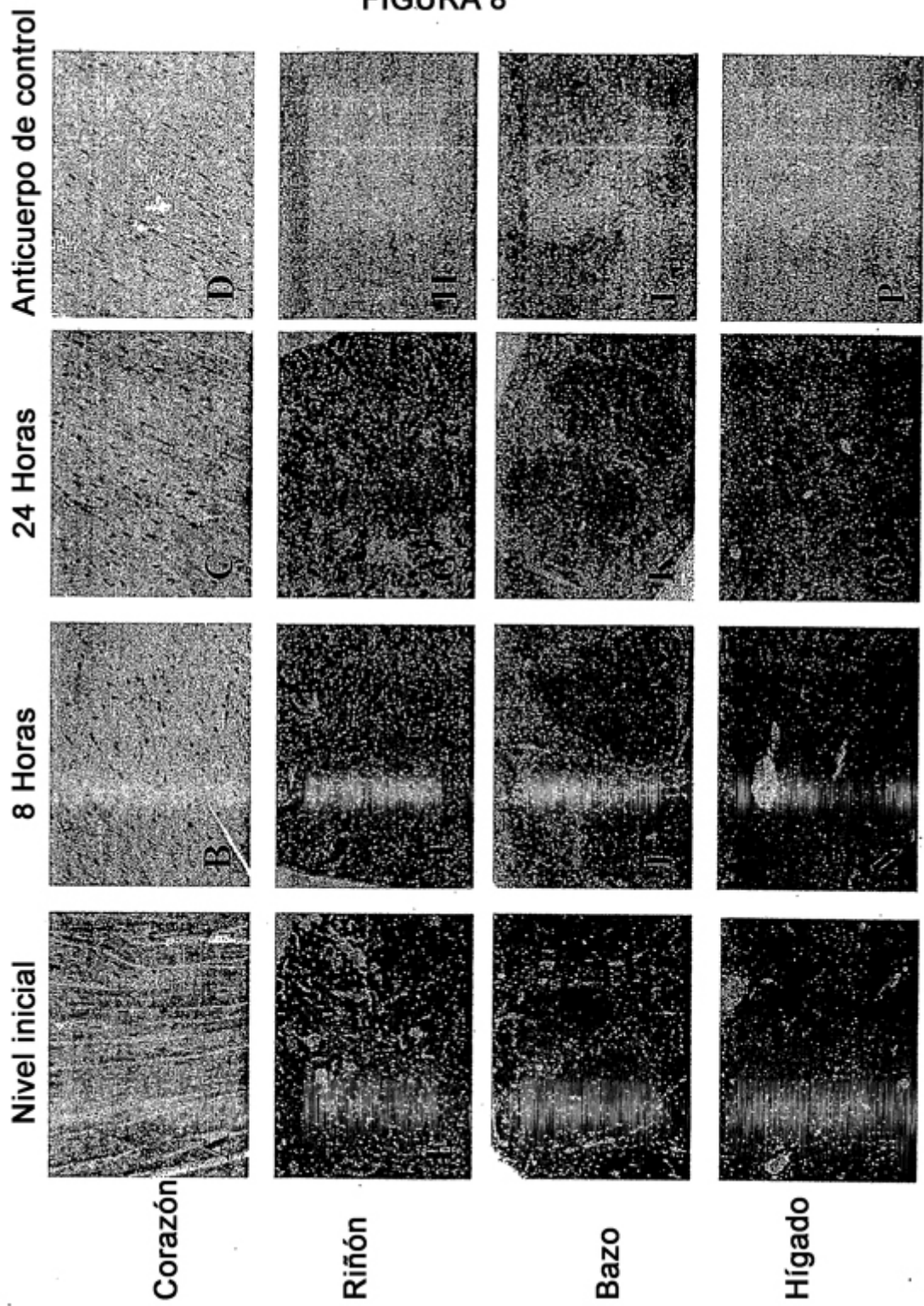


FIGURA 9

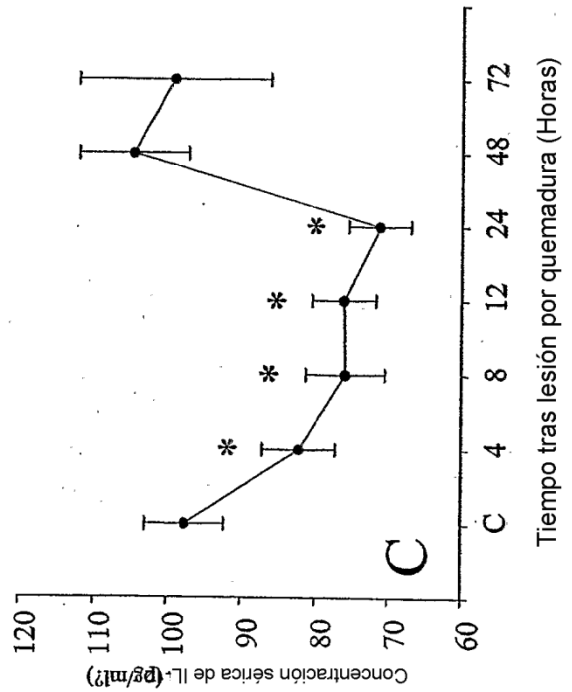
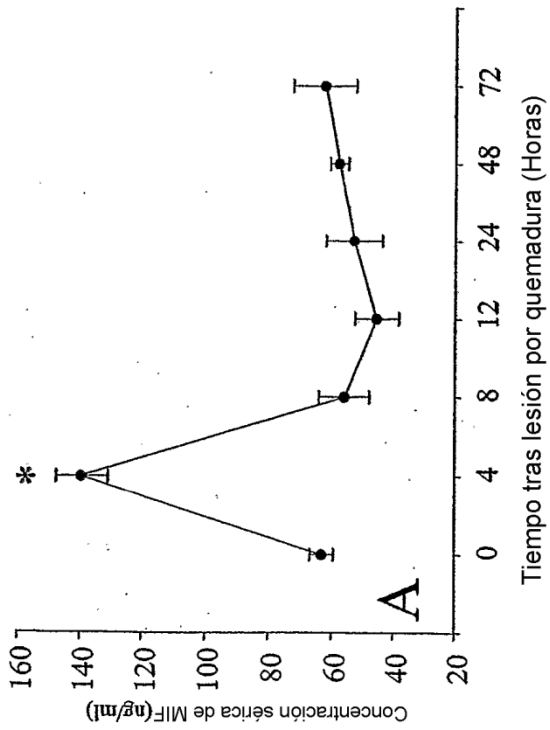
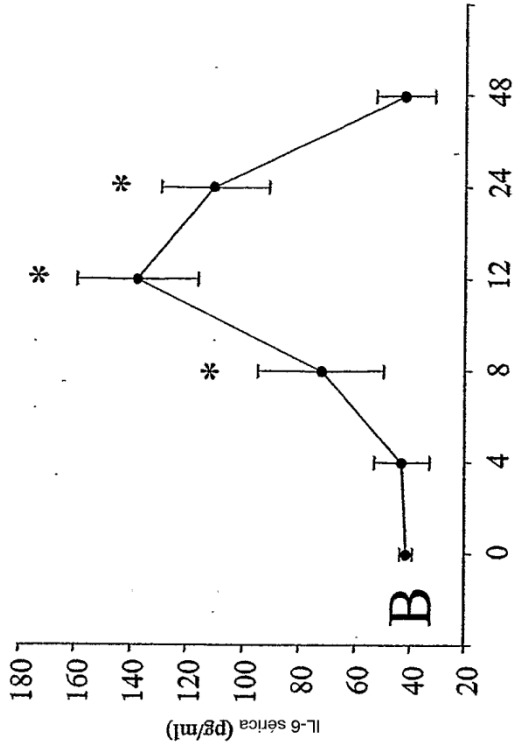


FIGURA 10

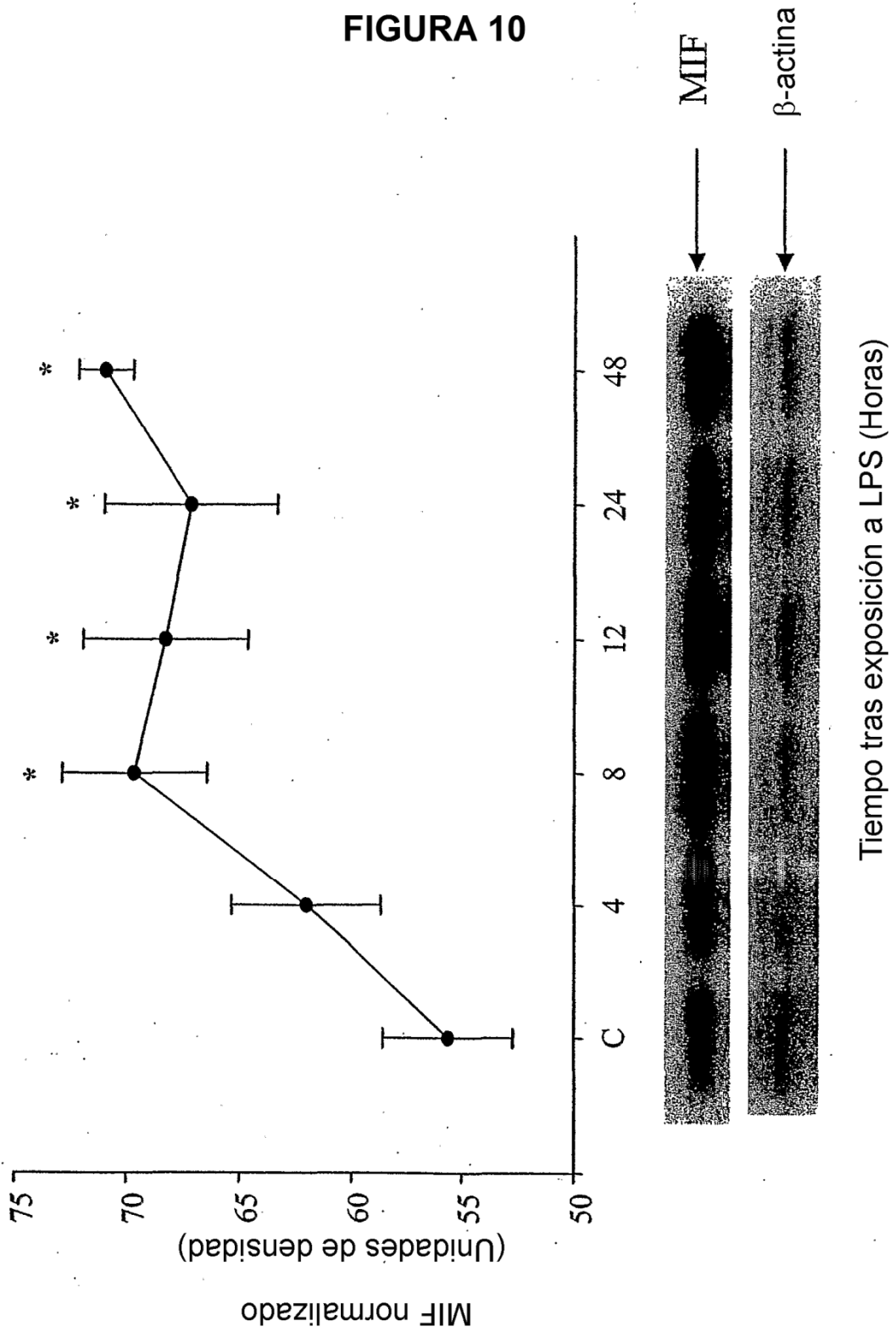


FIGURA 11

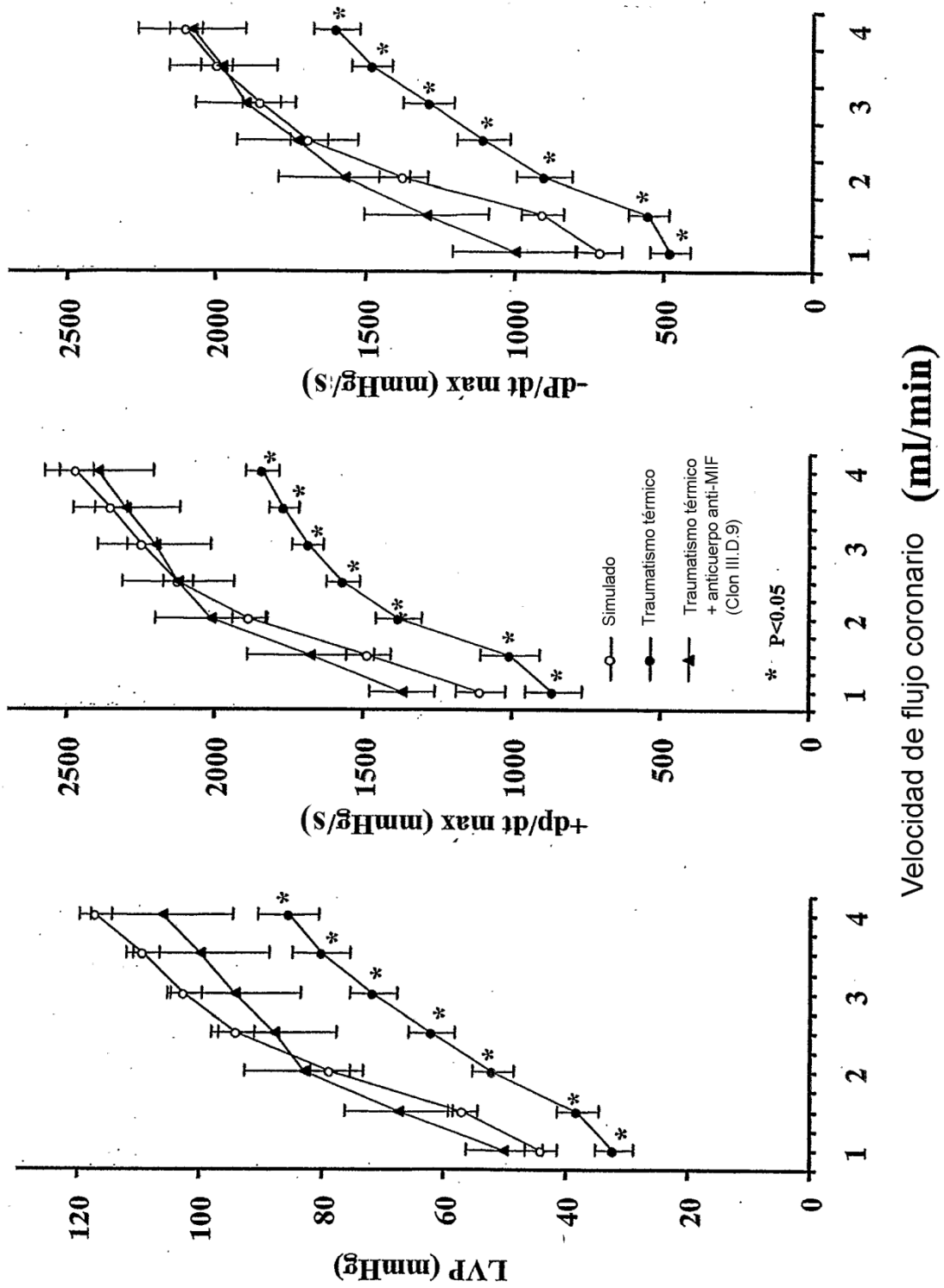


FIGURA 12

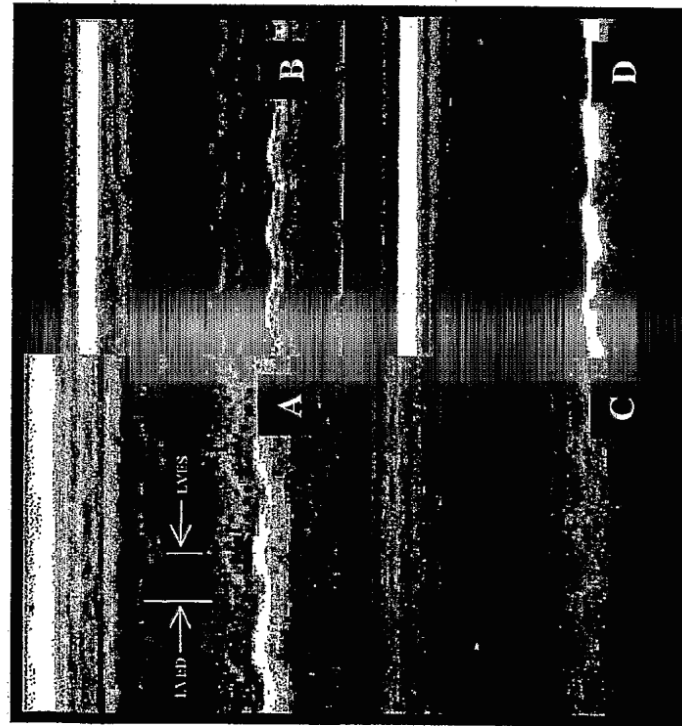
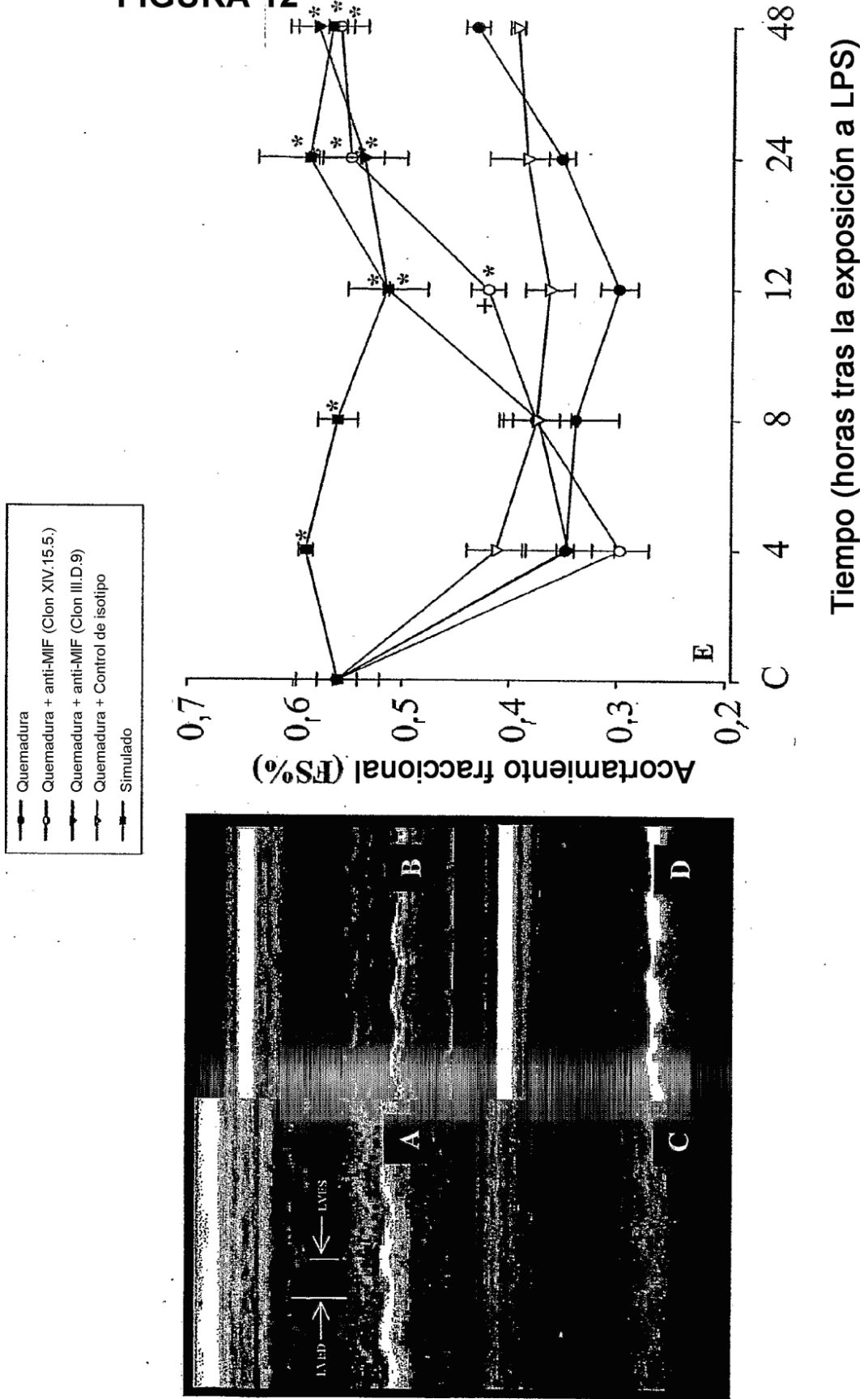
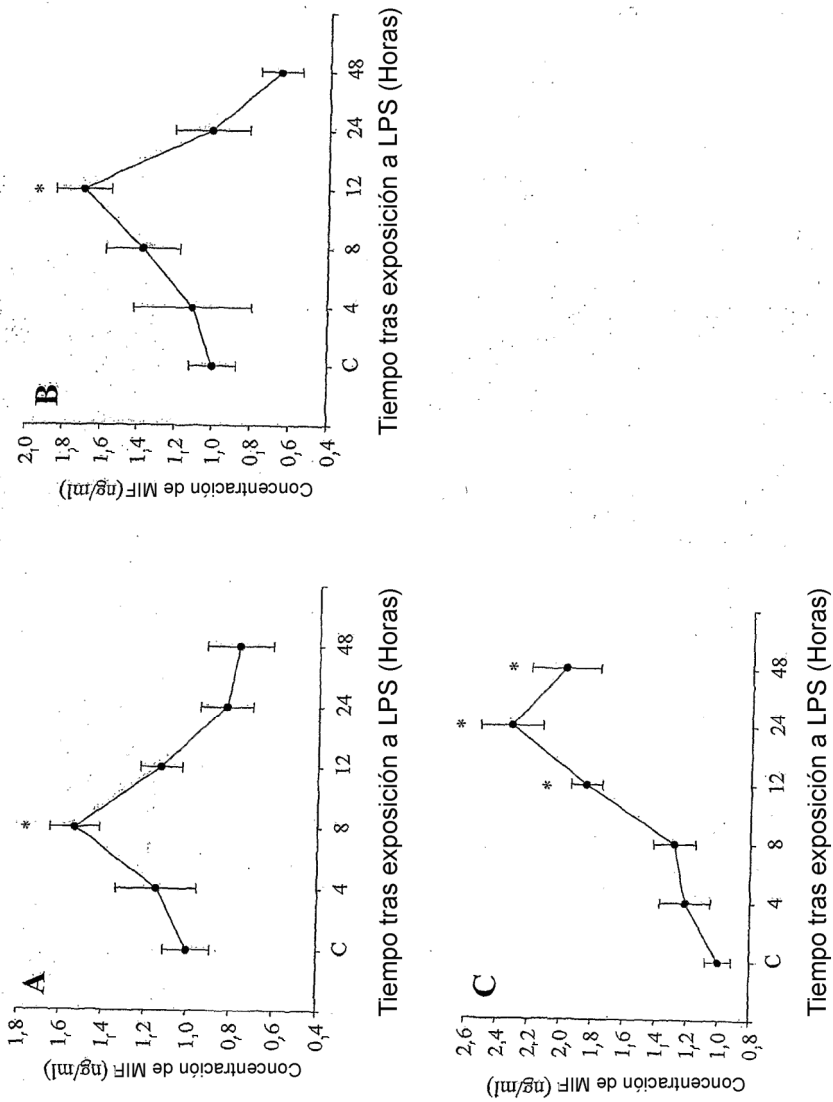


FIGURA 13



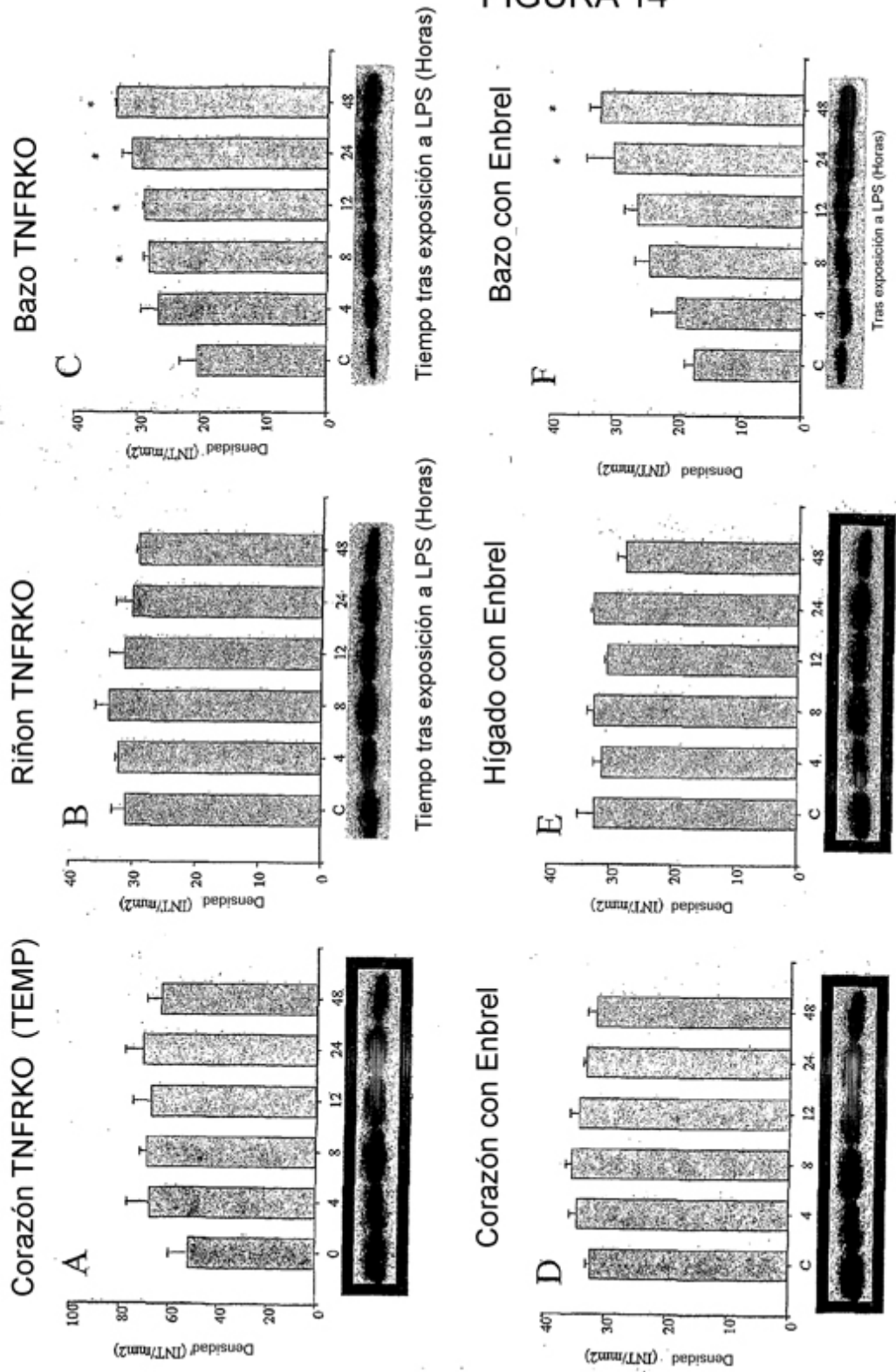


FIGURA 15

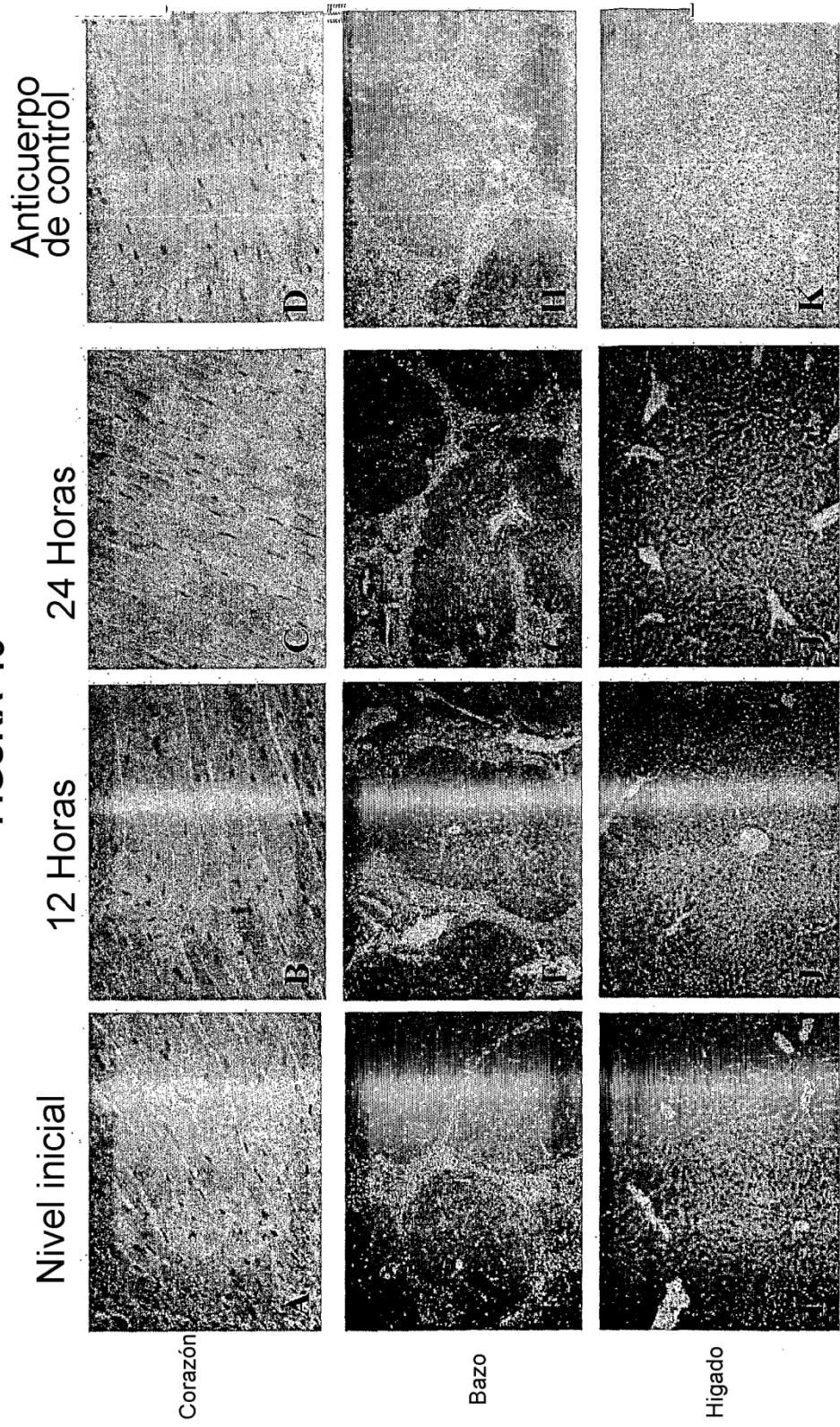


FIGURA 16

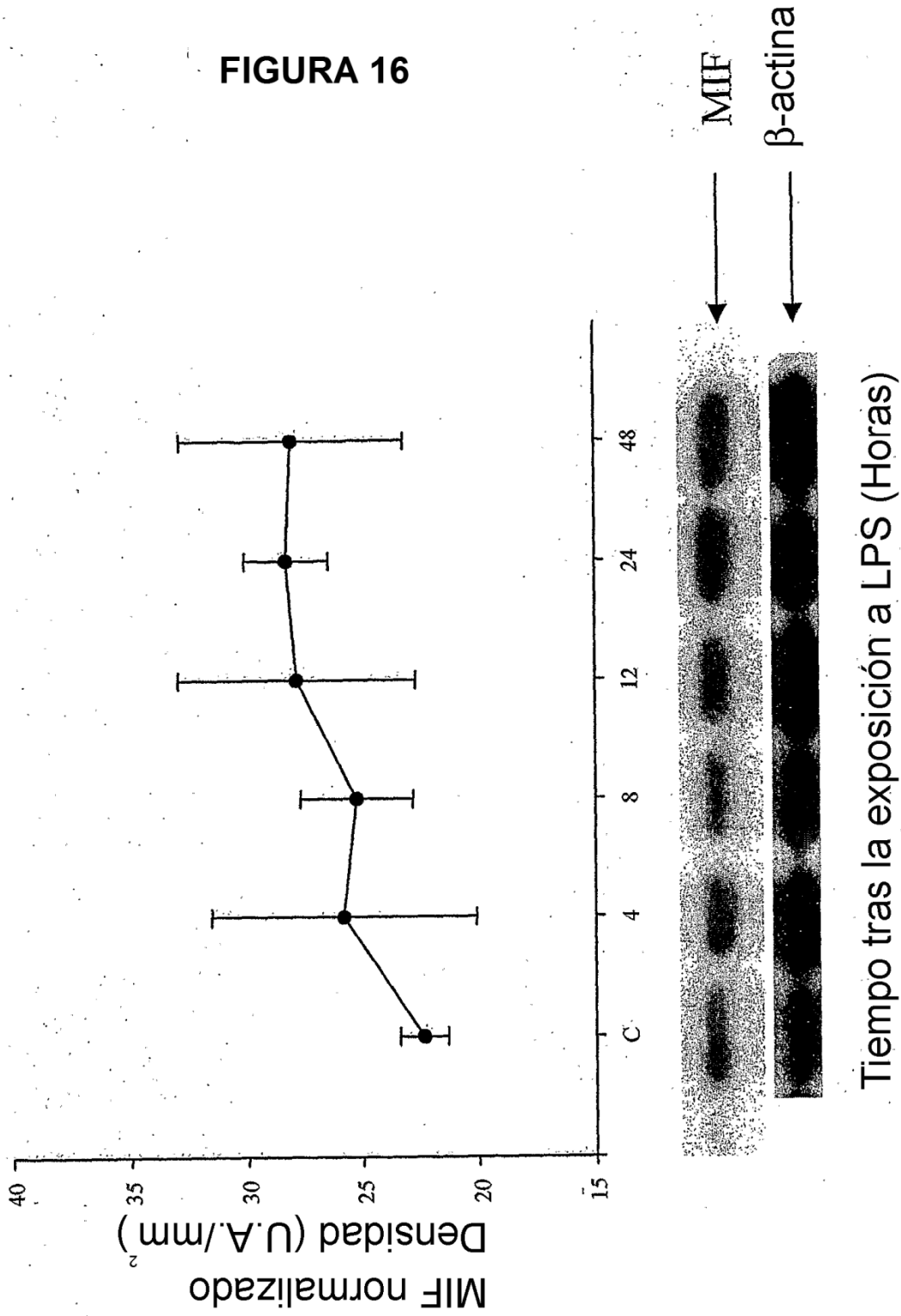
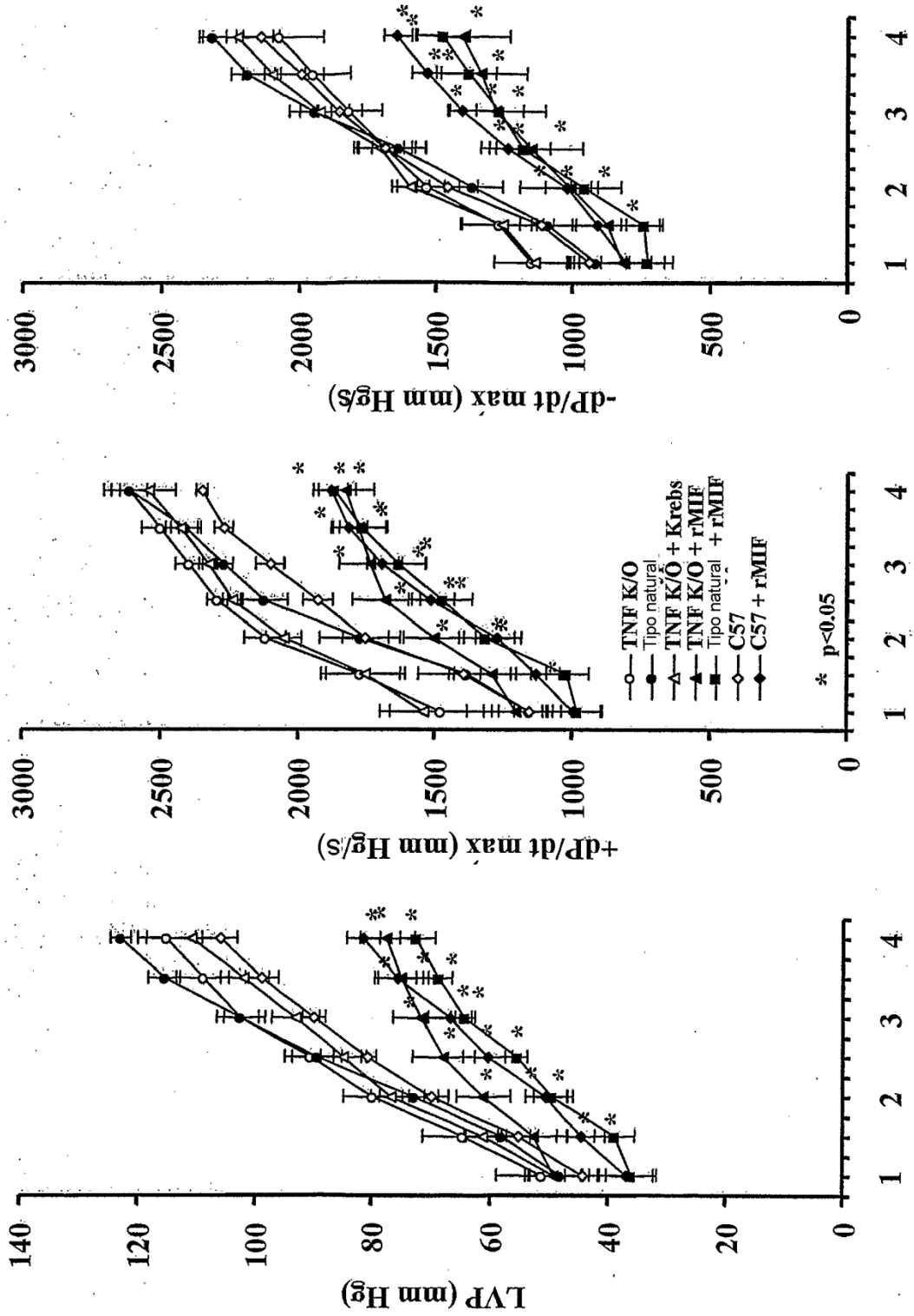


FIGURA 17



Velocidad de flujo coronario (ml/min)

FIGURA 18

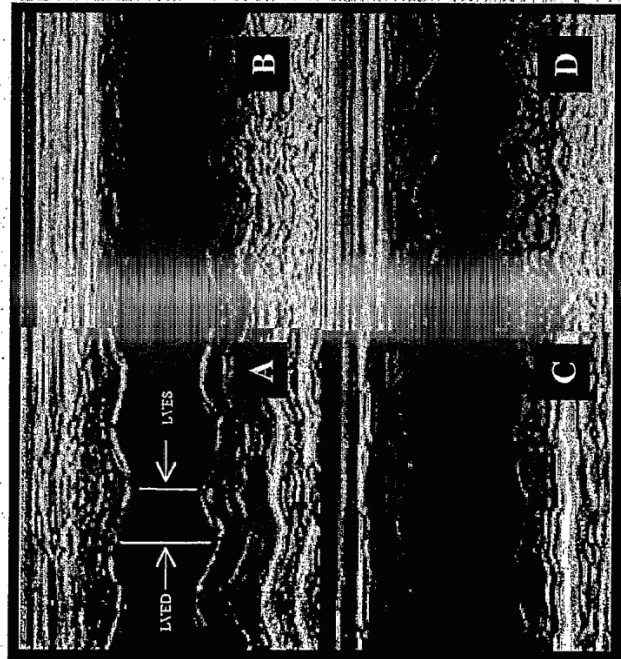
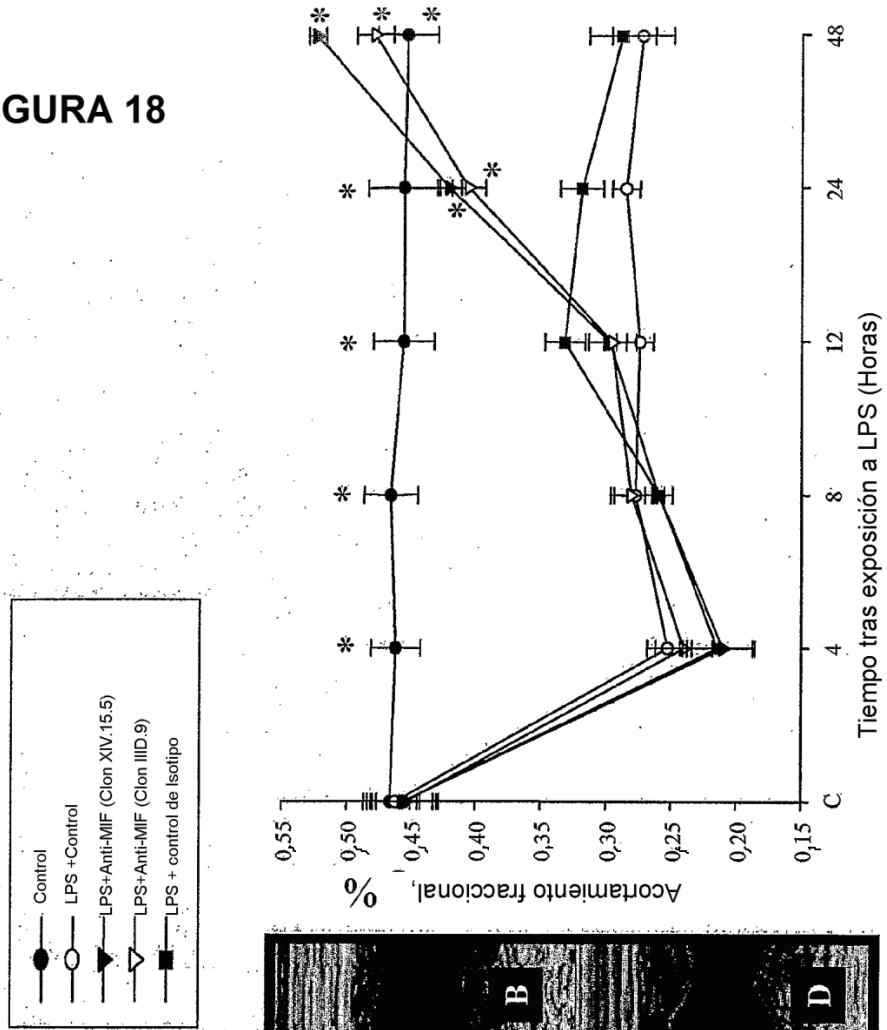


FIGURA 19

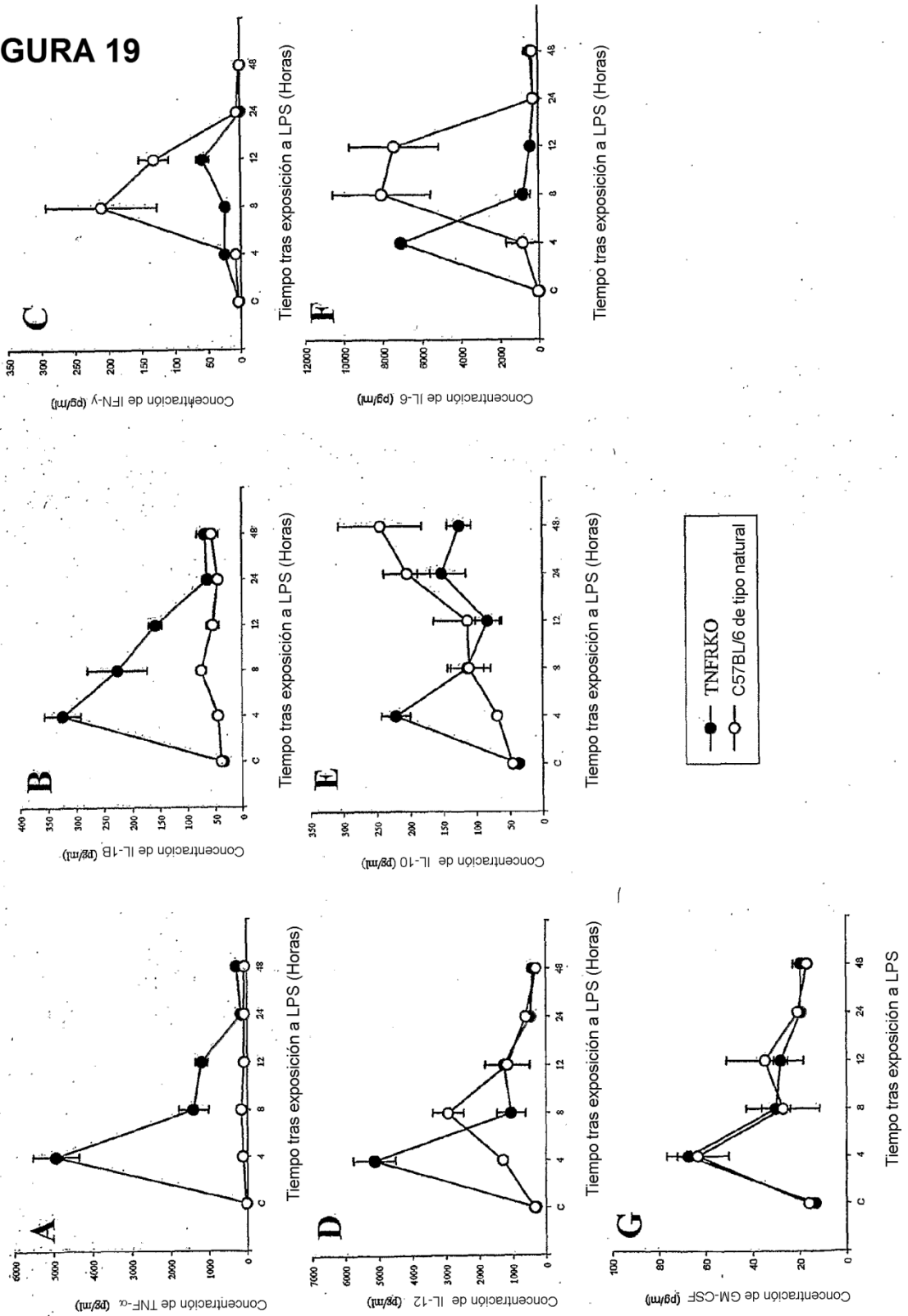


FIGURA 20

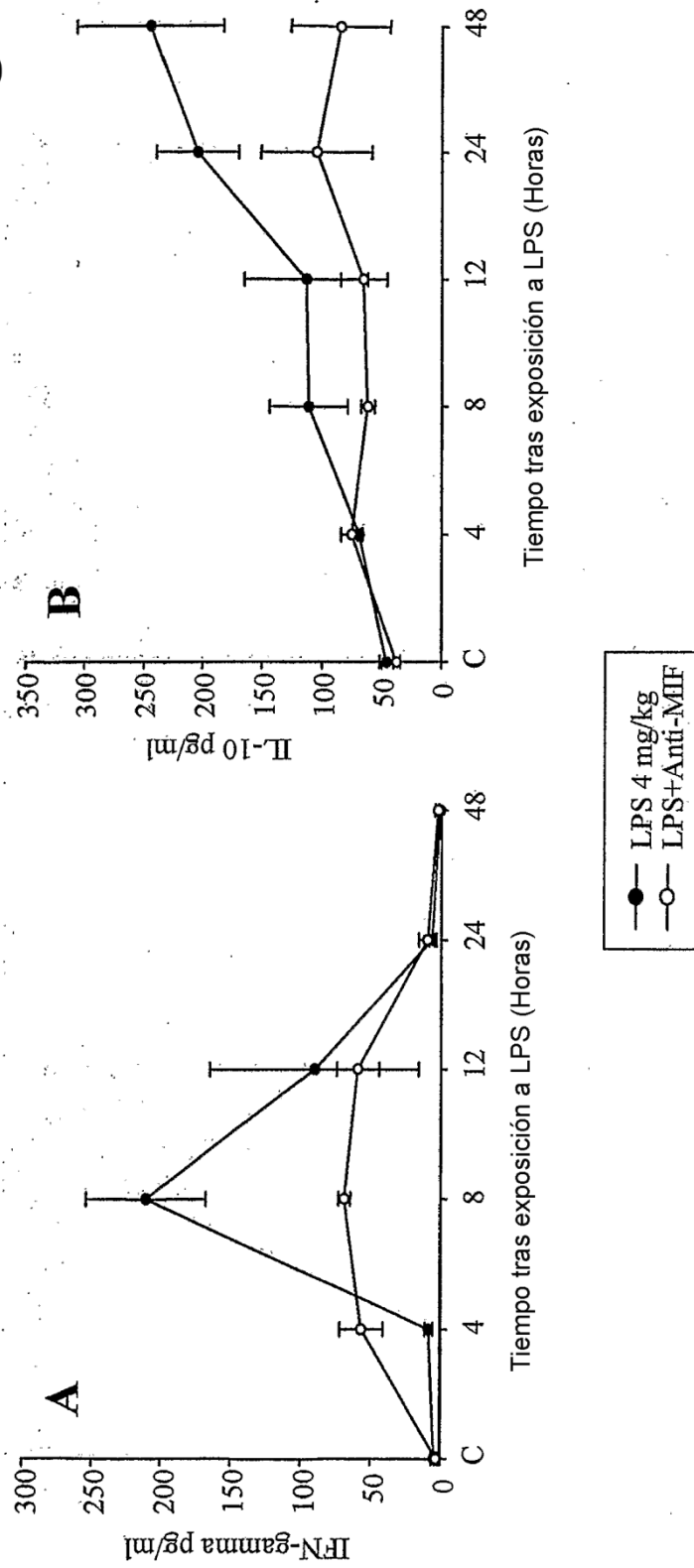


FIGURA 21

Función cardíaca tras ligadura de LAD

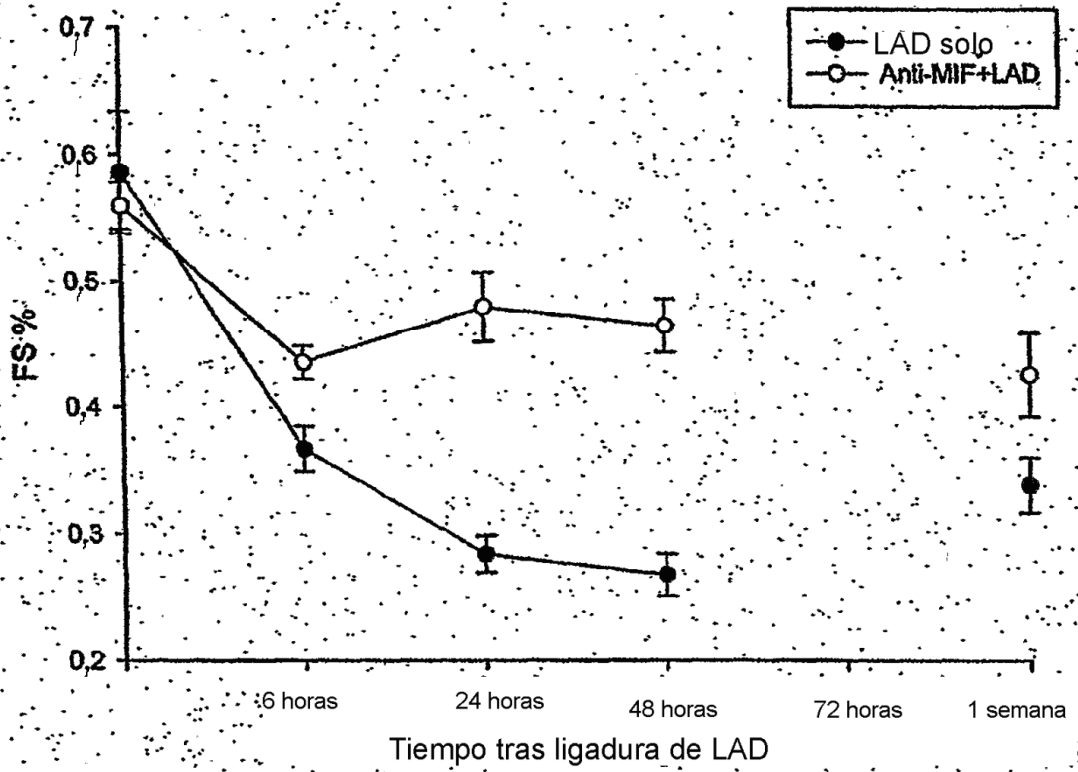


FIGURA 22

Terapia con anticuerpos anti-MIF antes de LAD

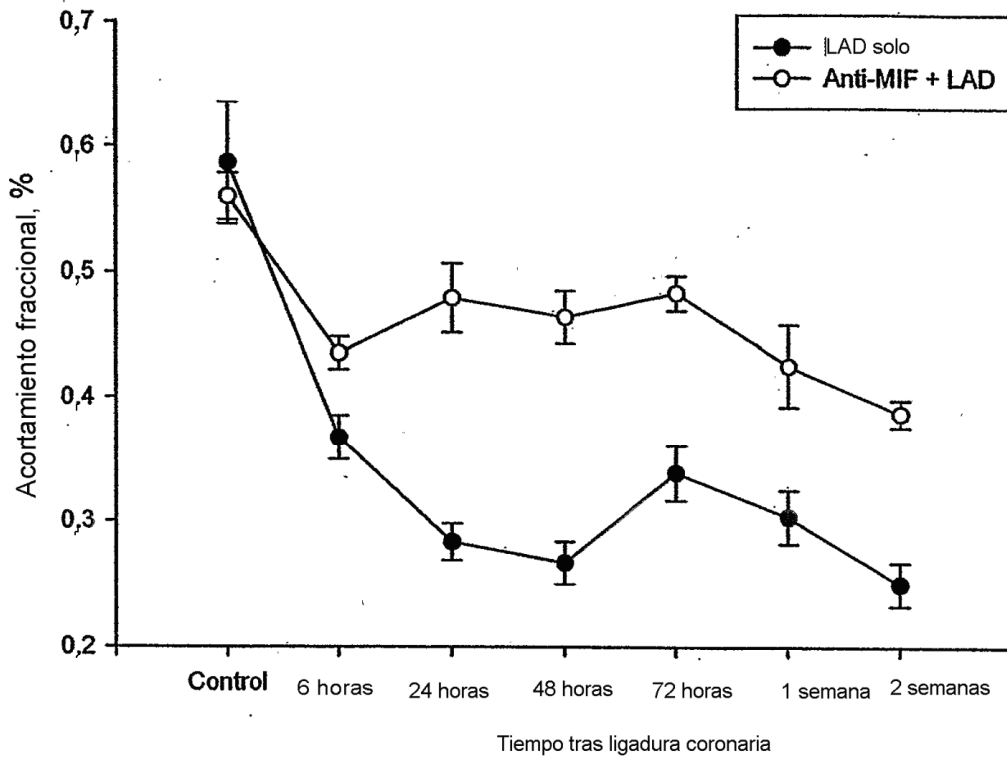
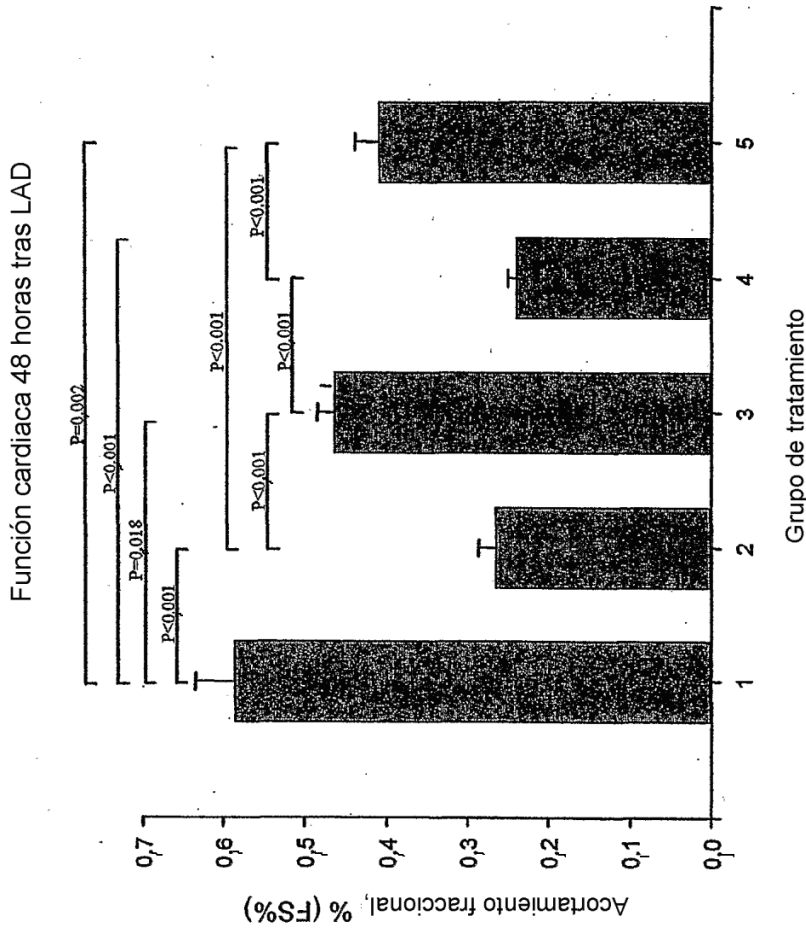


FIGURA 23



Datos estadísticos: Se realizó inicialmente un Anova de una vía (mediciones repetidas) para determinar qué significación estadística se alcanzaba. Posteriormente, se realizó una prueba de Tukey entre grupos para determinar la significación. Se realizó el análisis estadístico usando SigmaStat.

FIGURA 24

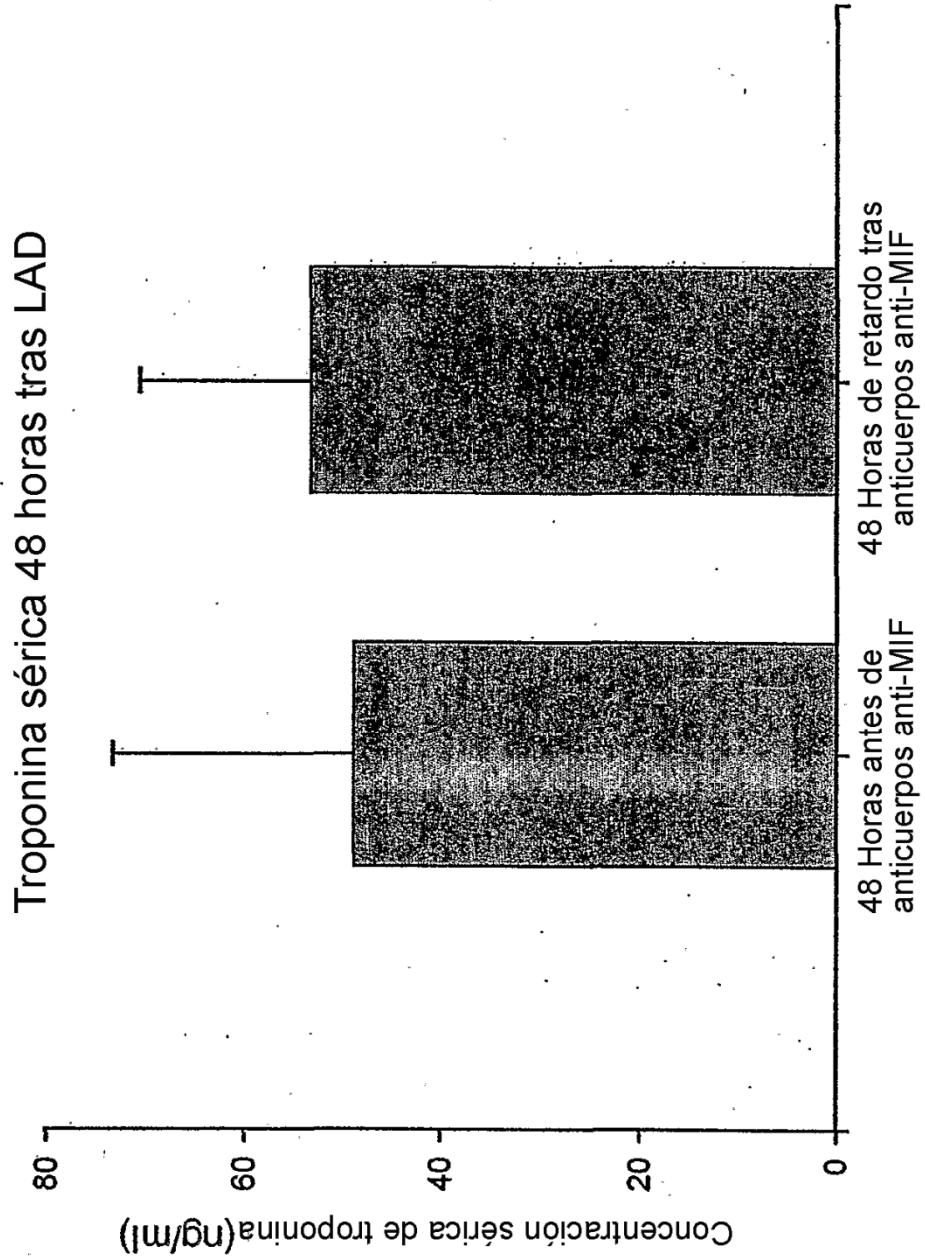
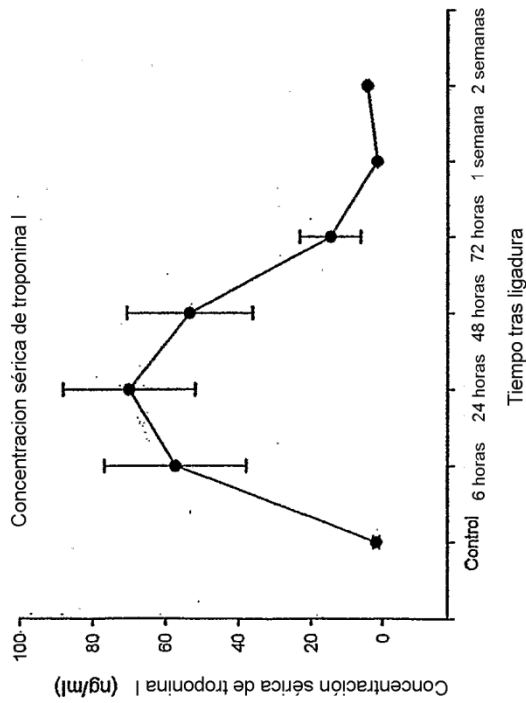
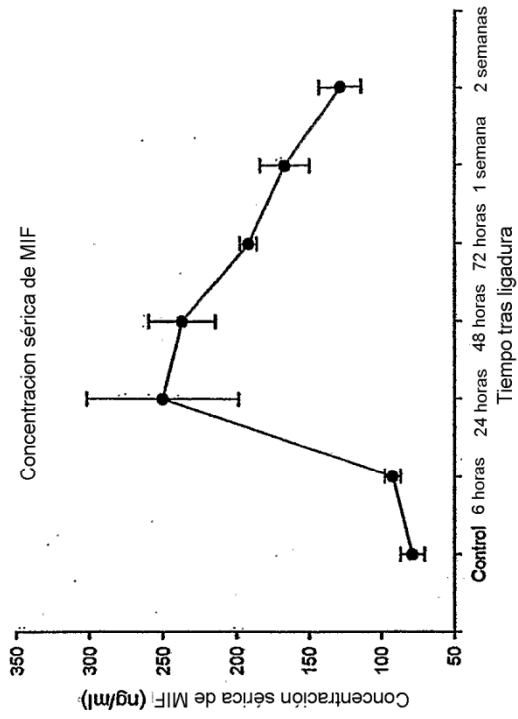


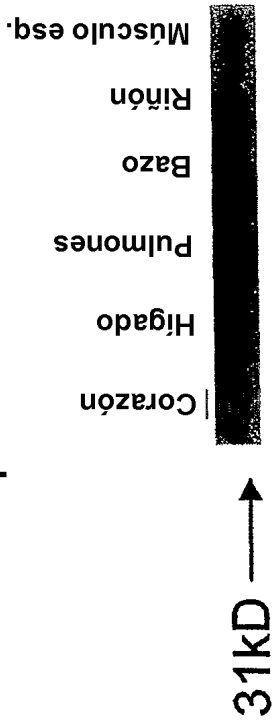
FIGURA 25



Las cantidades de troponina I incluyen tanto LAD solo como las cantidades de anticuerpos anti-MIF ya que no aparecen diferencias significativas entre los grupos. Los niveles séricos de MIF solo incluyen grupos con LAD solo; la terapia con anticuerpos anti-MIF interfiere con ELISA tal como se esperaba (disminuyendo de manera falsa los niveles de MIF).

FIGURA 26

A. Expresión constitutiva de CD74 en órgano



B. Expresión de CD74 en corazón tras exposición a LPS

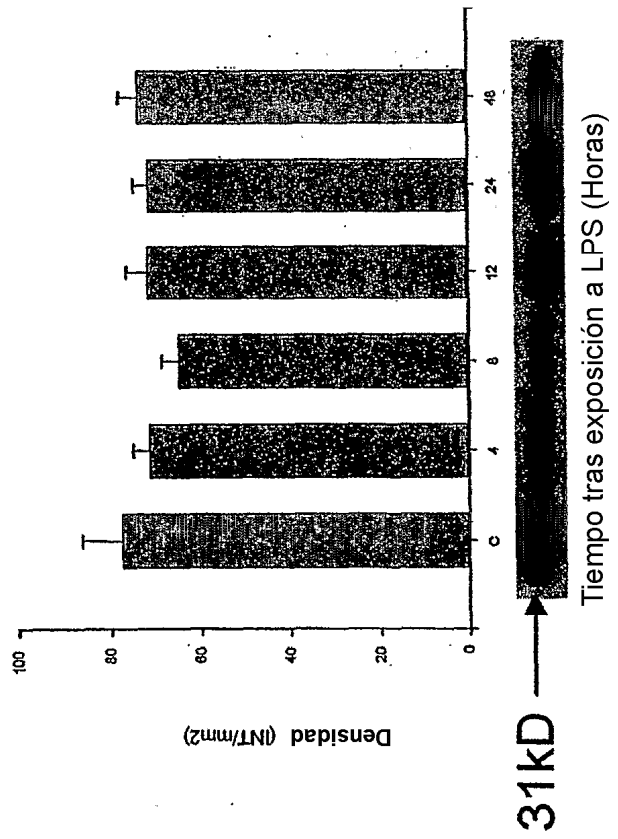


FIGURA 27

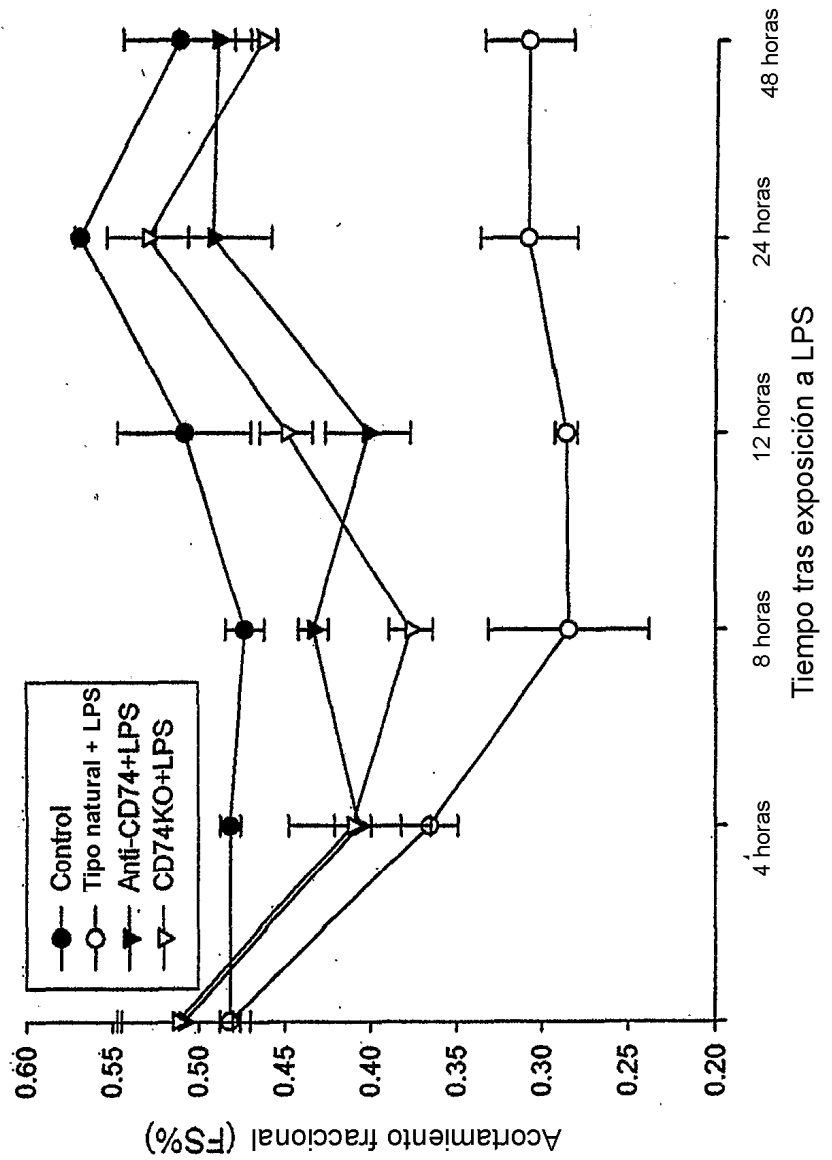


FIGURA 28

Liberación de sCD74 sérico tras exposición a LPS

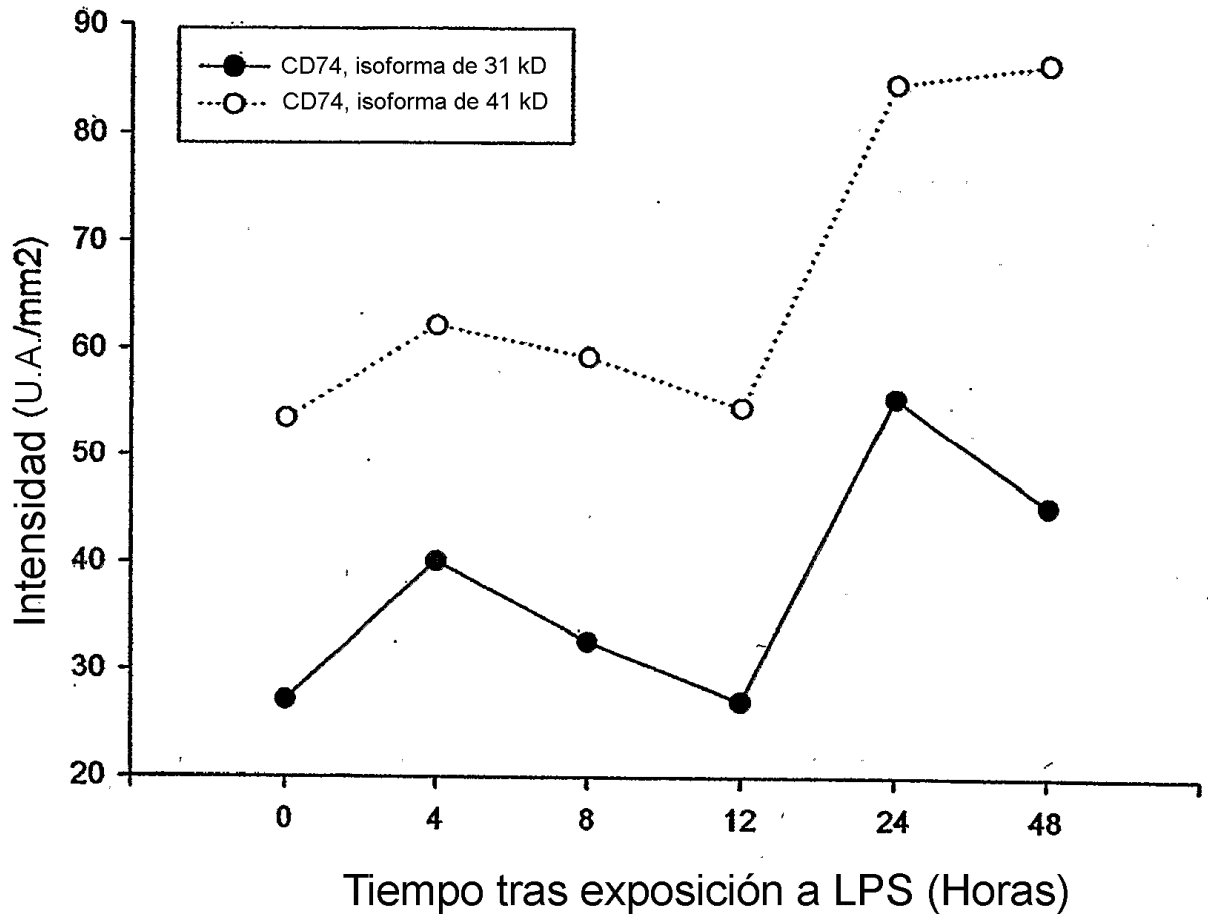


FIGURA 29

Nombre de gel: CD74 Serie 1 (Imagen 1-D sin procesar)

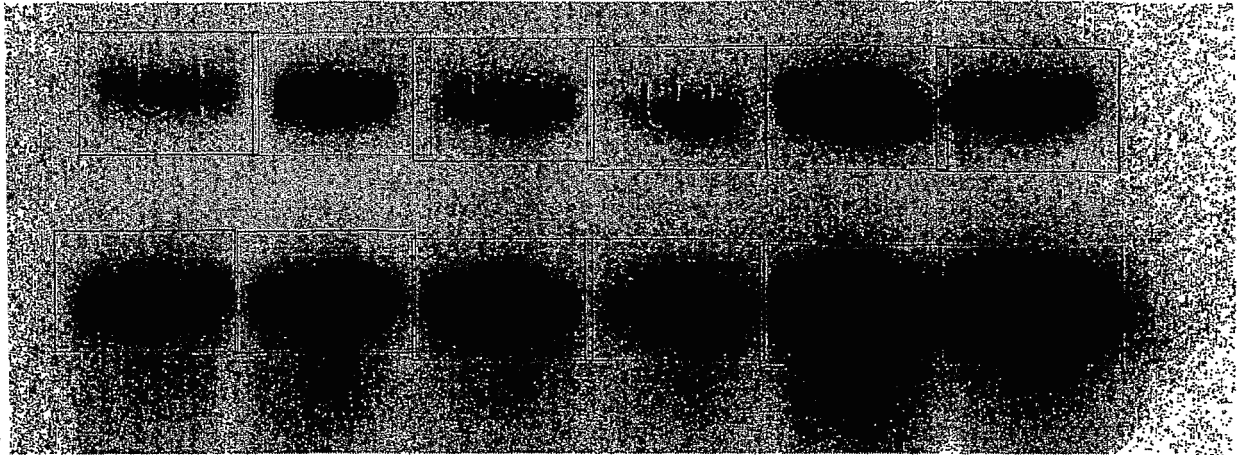


FIGURA 30

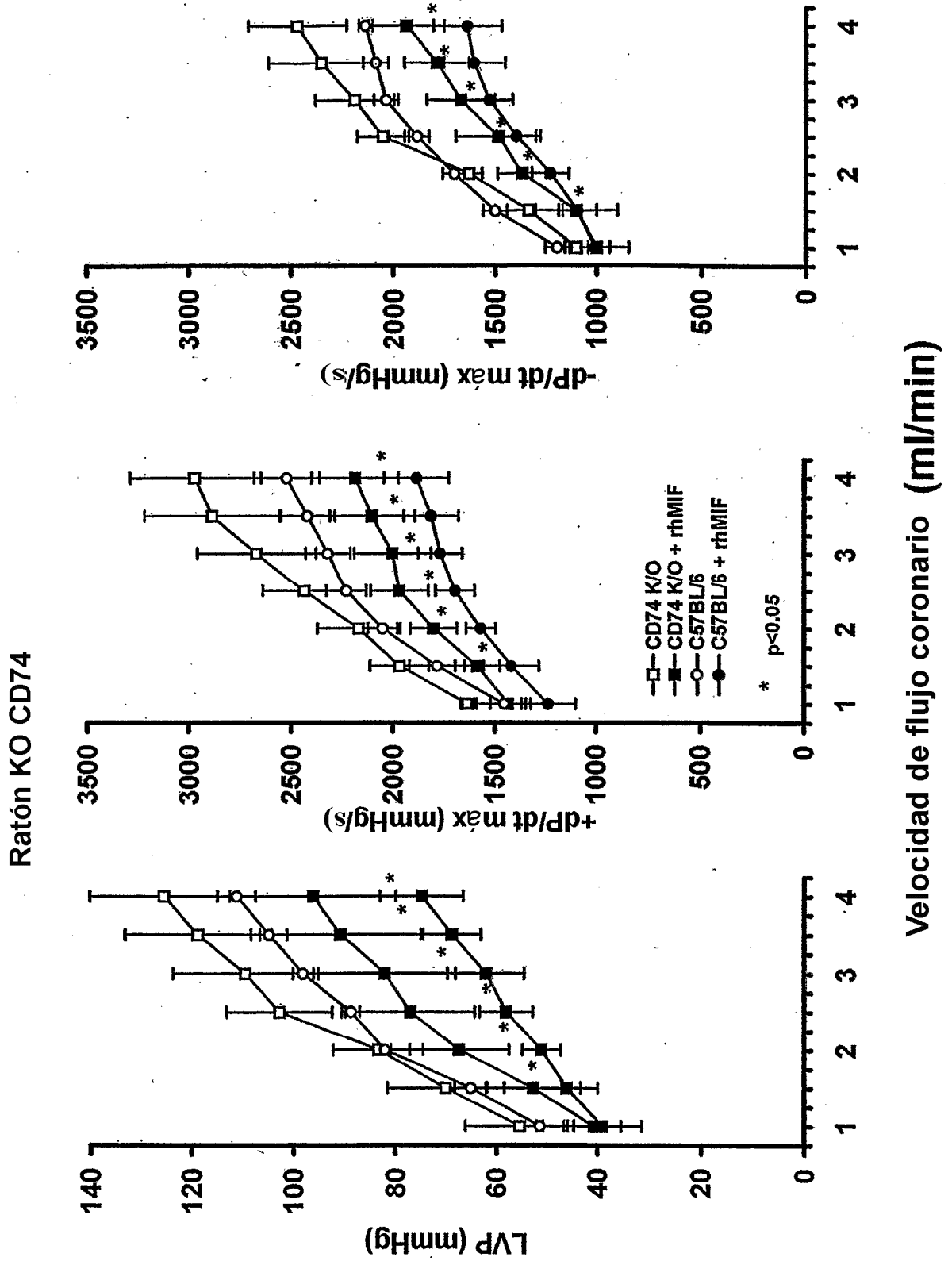


FIGURA 31

