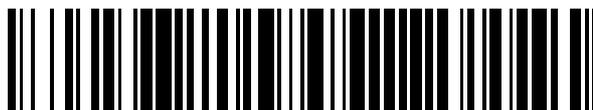


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 837**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2010** **E 10807012 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 2462165**

54 Título: **Método para la expansión in vivo de linfocitos T reguladores**

30 Prioridad:

03.08.2009 US 273299 P

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

19.10.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1475 N.W. 12th Avenue Suite 2012
Miami, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**PODACK, ECKHARD, R.;
SCHREIBER, TAYLOR y
WOLF, DIETLINDE-MARIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 586 837 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 para la expansión *in vivo* de linfocitos T reguladores

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos con n.º de serie 61/273.299, presentada el 3 de agosto de 2009.

10 Campo de la invención

Las realizaciones de la divulgación se refieren a composiciones y métodos para regular los linfocitos T *in vivo*. En particular, las composiciones y métodos regulan los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ humanos.

15 Antecedentes

La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF) consiste en al menos 19 ligandos y 30 receptores (TNFRSF) que se expresan diferencial y temporalmente en células linfoides y no linfoides. En los linfocitos TCD3⁺, la señalización de TNFSF funciona de manera específica y no específica del antígeno para soportar varias fases de la respuesta inmunitaria, incluyendo la polarización, la expansión, la función efectora, la contracción, la memoria y la muerte. TNFSF15 (TL1A) es el ligando para TNFRSF25 (DR3, denominado a partir de ahora en el presente documento TNFR25). El ligando 1A análogo a TNF (TL1A) se describe en Meylan et al. 2008. Immunity 29: 79-89, Migone et al. 2002. Immunity 16: 479-492, Prehn et al. 2004. Clinical Immunology 112: 66-77, Takedatsu et al. 2008. Gastroenterology 135: 552-567 y Bamias et al. 2006. PNAS 103: 22: 8441-8446. TL1A puede modular los linfocitos T y NKT que expresan TNFR25 tanto positiva como negativamente, estimulando las cascadas de señalización de TRADD o FADD mediante la cola citoplásmica que contiene el dominio muerte de TNFR25. La señalización de TNFR25 es un importante contribuyente a la patología observada en una gama de dolencias autoinflamatorias, incluyendo asma, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) y artritis reumatoide (AR). El bloqueo de anticuerpos de TL1A puede evitar el asma aguda en ratones y la inactivación genética de TNFR25 debilita significativamente los acontecimientos patológicos en modelos experimentales de EAE o AR. TL1A contribuye al desarrollo de esta enfermedad potenciando la polarización, la diferenciación y la función efectora de los linfocitos NKT, Th2 y Th17.

El documento WO 2007/027751 describe agonistas de TNFR25 que tienen una actividad antiinflamatoria y un efecto de cicatrización y en particular que representan modificadores de la respuesta biológica que alteran la interacción entre las defensas inmunitarias celulares del cuerpo y las células cancerosas para reforzar, dirigir, o restaurar la capacidad del cuerpo de combatir el cáncer cuando se administra con vacunas tumorales.

Sanchez-Fueyo et al. 2004. Inmunología 23: 2: 231-238 describen que los linfocitos T_{Reg} CD4⁺CD25⁺ juegan un papel central en la inducción de tolerancia al aloinjerto periférico y que la transferencia de linfocitos T_{Reg} CD4⁺CD25⁺ en un modelo de transferencia adoptivo de aloinjerto de piel puede evitar el rechazo al aloinjerto.

Sumario

45 Se muestran aspectos de la presente invención en las reivindicaciones independientes. Se muestran las características preferidas de estos aspectos en las reivindicaciones dependientes. El siguiente Sumario se proporciona para indicar brevemente la naturaleza y sustancia de la invención. Se afirma con el entendimiento de que este no se usará para interpretar o limitar el alcance o significado de las reivindicaciones.

50 La señalización a través del miembro 25 de la superfamilia del receptor TNF (TNFRSF25, DR3) en linfocitos T CD4⁺ cuando se expresa constitutivamente, potencia la producción de las citoquinas T_{H2} y T_{H17} y contribuye a la inflamación patológica en modelos de enfermedad del asma, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple (MS), encefalitis autoinmunitaria experimental y artritis reumatoide.

55 En las realizaciones preferidas, los agentes que modulan la señalización de TNFRSF25, modulan la respuesta celular inmunitaria. Estos agentes proporcionan novedosos tratamientos para sus enfermedades y dolencias. Por ejemplo, un agonista de TNFRSF25 conduce a la rápida y extensa expansión *in vivo* de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ al 30-35 % de todos los linfocitos CD4⁺ en cuatro días de administración. La sensibilización de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ era debida a la proliferación aumentada de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺ que expresan elevados niveles de GITR y CD 103. El agonista de TNFRSF25 expandió los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de la actividad supresora dependiente de TGF-β retenida *ex vivo*, que sin embargo era susceptible a la abrogación mediante la señalización continuada de TNFRSF25. La señalización de TNFRSF25, además de modular las respuestas de las células efectoras, juega un importante papel en la inducción y la resolución de respuestas inflamatorias mediante el control de la expansión y actividad de los linfocitos T reguladores.

65

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C: muestran que TNFR25 estimula la rápida proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ *in vivo*. Figura 1A: Expresión diferencial de TNFR25, GITR, OX40 y 4-1BB sobre linfocitos T convencionales y reguladores. Se determinó la expresión de TNFRSF mediante citometría de flujo sobre linfocitos (Tconv) CD4⁺FoxP3⁻ muy purificados y linfocitos Treg CD4⁺FoxP3⁺ procedentes de esplenocitos recogidos de ratones FIR no tratados. Figura 1B: Cinética y la expansión dependiente de la dosis de los linfocitos Treg CD4⁺FoxP3⁺ en sangre periférica tras la inyección de 4C12. Se inyectaron ratones (FIR) con el iniciador FoxP3-RFP por vía intraperitoneal (i.p.) con la cantidad de 4C12 indicada. Los ratones se sangraron diariamente y se analizó la expresión de FoxP3-RFP en células de sangre periférica mediante citometría de flujo. Figura 1C: Se comparó la expansión de los linfocitos Treg tras el tratamiento con otros anticuerpos agonísticos de TNFR. Se inyectaron los ratones por vía i.p. con los anticuerpos indicados (100 µg) en el día 0. Los ratones se sangraron diariamente como en la Figura 1B durante 6 días, se muestra el porcentaje de linfocitos Treg de sangre periférica de los linfocitos T CD4⁺ totales en el día 4. Estos datos se han reproducido en 8 experimentos independientes. Las barras de errores indican promedio ± SEM. Se determinó la significancia mediante el test de la t de student (Figura 1B) o mediante un ANOVA monolateral con la prueba posterior de Tukey (Figura 1C). * indica p<0,05, ** indica p<0,01, *** indica p<0,001.

Las Figuras 2A-2F muestran que TNFR25 indujo que la expansión de los linfocitos Treg requiere la señalización de TCR e IL-2. Los linfocitos CD4⁺ estaban muy purificados mediante la técnica de clasificación de FACS a partir de ratones FIR y se transfirió adoptivamente en ratones MHCII^{-/-} o CD4^{-/-}. Tras la transferencia adoptiva, se trataron los ratones receptores tanto con 4C12 como con un anticuerpo control isotipo y se analizó el porcentaje (Figura 2A) y el número absoluto de células positivas (Figura 2B) de FoxP3-RFP 4 días después del tratamiento con anticuerpos. Se trataron ratones FIR con ciclosporina-A (Figura 2C) o FK506 (Figura 2D) o un vehículo control desde el día 1 al día 4 mediante inyección i.p. como se describe en los métodos. Se trataron los ratones tanto con anticuerpo 4C12 como con anticuerpo IgG control y se analizó la proporción de células positivas para FoxP3-RFP con respecto a los linfocitos CD4⁺ totales en la sangre periférica en el día 4. Se analizaron ratones deficientes en el receptor β de IL-2 (Figura 2E) o ratones CD80/86^{-/-} (Figura 2F) para la proporción de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de los esplenocitos CD4⁺ totales 4 días después del tratamiento tanto con 4C12 como isotipo del anticuerpo control, en comparación con los ratones C57BL/6 del control. Estos datos se representan como el promedio ± S.E.M. de al menos 2 experimentos independientes con ±3 ratones por grupo por experimento. **indica p<0,01, ***indica p<0,001.

Las Figuras 3A-3E muestran que TNFR25 expandió los linfocitos Treg son hipersensibles a IL-2 y requieren la activación de Akt. Figura 3A: Se purificaron linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ procedentes de ratones FIR en el día 4 después del tratamiento IgG del control o anticuerpos 4C12 y se incubaron con las cantidades indicadas de IL-2 *in vitro*. Se midió la proliferación de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ en el día 3 del cultivo mediante la incorporación de timidina tritiada. Figura 3B: Se purificaron los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ como en la (Figura 3A) y se determinó la expresión superficial de IL-2Ry (CD 132) o IL-2Rp (CD 122) mediante citometría de flujo. Figura 3C: Linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ purificados a partir de ratones FIR 4 días después del tratamiento con IgG o anticuerpo 4C12 se analizaron para la expresión de pSTAT5 15 minutos después del tratamiento con 10 ng/ml de IL-2 *in vitro*. Se trataron los ratones FIR una vez al día con rapamicina (Figura 3D) o dos veces al día con inhibidor V de Akt (Figura 3E) o un vehículo control desde el día 1 al día 4 mediante inyección i.p. como se describe en los métodos. Se trataron los ratones tanto con anticuerpo 4C12 como con anticuerpo IgG control en el día 0 y se analizó la proporción de células positivas para FoxP3-RFP con respecto a los linfocitos CD4⁺ totales en la sangre periférica en el día 4. Estos datos se representan como el promedio ± S.E.M. de al menos 2 experimentos independientes con ± 2 ratones por grupo por experimento. ns indica no significativo, *** indica p<0,001.

Las Figuras 4A-4E muestran que la expansión de los linfocitos Treg *in vivo* mediante TNFR25 inhibe la inflamación en el asma alérgica. Se indujo asma alérgica mediante inmunización con ova/alum seguida por estímulo con aerosol con ova/PBS como se describe en materiales y métodos. Figura 4A: Se recogió sangre periférica y se analizó para la fracción de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de los linfocitos T CD4⁺ totales de los ratones inmunizados con ova/alum en comparación con los ratones no inmunizados tras el tratamiento tanto con 4C12 como el isotipo del anticuerpo control. Los datos representan el promedio ± SEM. Figura 4B: Se recogieron células pulmonares totales y se analizaron mediante citometría de flujo. Se muestran las cantidades totales de cada población celular indicada. Los datos indican el promedio ± SEM. Figura 4C: el porcentaje de linfocitos Treg CD4⁺FoxP3⁺ del total de linfocitos T CD4⁺ T. Figura 4D: Se recogió el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF) 3 días después de la aerosolización con ova/PBS como se ha descrito. Se muestra el número total de eosinófilos. Los datos representan el promedio ± SEM. Figura 4E: Se extrajo el ARN total de las células pulmonares totales y se usó para la RT-PCR en tiempo real. Se muestran los niveles de expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 en 4C12 o los ratones tratados con el isotipo del control con respecto a las células pulmonares del control aerosolizadas con solución salina. Figura 4F: Se recogieron los pulmones y se seccionaron para las secciones histológicas. Se obtuvieron las secciones teñidas con H&E (paneles de la izquierda) así como las secciones teñidas con PAS (paneles de la derecha) de cada grupo de tratamiento. Se muestran las imágenes representativas. Se han repetido estos datos en cuatro experimentos independientes con al menos 3 ratones/grupo/experimento. Figura 4G: Se cuantificaron las secciones teñidas con PAS utilizando el software Image J como se describe en los métodos. Se cuantificaron dos imágenes representativas de cada uno de ± 5 ratones procedentes de 2 experimentos separados. Se determinó la significancia estadística mediante ANOVA

monolateral con la prueba posterior de Tukey. * indica $p < 0,05$, ** indica $p < 0,01$, *** indica $p < 0,001$ tanto de 4C12 como de IAC en comparación con el grupo IgG o el grupo control con solución salina, como se ha indicado.

5 Las Figuras 5A-5F muestran que la estimulación de TNFR25 conduce a la expansión de los linfocitos Treg *in vivo* induciendo la proliferación de los linfocitos $CD4^+FoxP3^+CD25^{int}$ existentes. Figura 5A: Se trataron ratones FIR con IgG o 4C12 en el día 0 y se recogieron esplenocitos 4 días después y se analizaron mediante citometría de flujo. Gráficos de citometría de flujo representativos procedentes de glóbulos rojos recogidos de ratones 4 días después del tratamiento indicado. Figura 5B: La relación promedio de los linfocitos Treg $CD25^{hi}$ frente a los linfocitos Treg $CD25^{int}$ en esplenocitos 4 días después del tratamiento indicado. Figura 5C: Se muestran gráficos de puntos representativo que se preclasificaron con linfocitos $CD4^+$, $FoxP3^+$. Los porcentajes indican la contribución de cada fenotipo hacia la fracción total de linfocitos $CD4^+FoxP3^+$. Figura 5D: Se muestra la proporción promedio de linfocitos Treg $Ki67^+$ o $Ki67^-$ entre $CD25^{hi}$ y $CD25^{int}$ tras el tratamiento indicado como se describe en la Figura 5A. Los datos son el promedio \pm SEM. Figura 5E: Linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ y Figura 5F: Se clasificaron los linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ procedentes de ratones FIR $CD45.2^+$ hasta $>99\%$ de pureza y se transfirieron adoptivamente 2×10^6 células de cada subconjunto en ratones B6-SJL $CD45.1$ congénicos. 24 h después, se inyectaron los ratones por vía i.p. con 20 mg de 4C12 o IgG, respectivamente. Figuras 5E, 12G: Transferencia de linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ y linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ (Figuras 5F, 5H) en ratones $CD45.1$ B6-SJL congénicos. Figuras 5E, 5F: Histograma que muestra el porcentaje de $CD45.2^+$ y linfocitos RFP^+ ($FoxP3^+$) entre los linfocitos $CD4^+$ en el día 5 tras la transferencia adoptiva. Figuras 5G, 5H: Cinética de contracción de las células transferidas tras el tratamiento con 4C12 o IgG de hámster. Se muestran los porcentajes de linfocitos transferidos ($CD45.2^+CD4^+$) de los linfocitos hospedadores $CD45.1^+CD4^+FoxP3^+$ (Figura 5E) o de los linfocitos $CD45.2^+CD4^+FoxP3^+$ de los linfocitos hospedadores $CD45.1^+CD4^+$ (Figura 5F). Las barras de errores indican el porcentaje promedio \pm SEM de 3 ratones por grupo por cada dos experimentos independientes. ** indica $p < 0,05$, y *** indica $p < 0,01$.

25 Las Figuras 6A-6F muestran la actividad supresora de los linfocitos Treg expandidos *in vivo*. Se clasificaron los linfocitos Treg $CD4^+FoxP3^+$ procedentes de ratones inyectados con 4C12 y el isótopo del control IgG en el día 4 y se sometieron a un ensayo de supresión normalizado *in vitro* utilizando linfocitos $CD4^+FoxP3^-CD25^-$ como linfocitos Tconv α -CD3 solubles (2 μ g/ml) durante 72 h (96 pocillos, placa con el fondo redondeado). El ensayo se llevó a cabo en ausencia (Figuras 6A, 6C) o presencia (Figura 6B, 6D) de 1:1 de células presentadoras de antígenos (APC) utilizando diferentes relaciones de linfocitos Treg: linfocitos Tconv (Figuras 6A, 6B). En las Figuras 6C y 6D, IgG, 4C12 o DTA1 (10 g/ml) se añadieron anticuerpos al ensayo de supresión. La relación linfocitos Treg : linfocitos Teff se mantuvo constante en una relación 1:2. Figura 6E: Se utilizaron linfocitos Teff procedentes de ratones dominantes negativos (DN) TNFR25 y de linfocitos Treg procedentes de ratones silvestres. Se añadieron anticuerpos IgG o 4C12 (10 μ g/ml) al ensayo de supresión. La relación linfocitos Treg : Teff es 1:2. Figura 6F: Se utilizaron linfocitos Treg $CD4^+CD25^{hi}$ y $CD4^+CD25^{int}$ procedentes de ratones a los que se había inyectado IgG o 4C12. Se añadió 3H -timidina durante las últimas 6 h antes de que el ensayo se analizara en un contador por centelleo. Se calculó el porcentaje de proliferación utilizando los recuentos obtenidos para la condición indicada como porcentaje de los recuentos totales en pocillos que contenían linfocitos Teff en ausencia de linfocitos Treg. Los datos se expresan como promedio \pm SEM con \pm 4 muestras para cada condición en cada uno de dos experimentos independientes con > 6 ratones por grupo por experimento.

Las Figuras 7A, 7B muestran la comparación de los linfocitos Treg expandidos mediante tratamiento con 4C12 o complejo de IL-2 recombinante/anticuerpo dirigido contra IL-2 (IAC). Figura 7A: Se trataron ratones FIR con 4C12 (10 μ g) en el día 0 o con una serie de tres inyecciones con IAC en los días 0-2. Se midió la proporción de linfocitos $FoxP3^+$ en la población de linfocitos T $CD4^+$ en la sangre periférica diariamente mediante citometría de flujo. Figura 7B: Se aislaron esplenocitos procedentes de 4 ratones FIR en el día 4 después del tratamiento con IAC, 4C12 o la IgG de control de isotipo. Se muestran la proporción de linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ que expresan CD25 y el marcador de proliferación Ki67.

50 Las Figuras 8A-8D muestran que el tratamiento con 4C12 induce la expansión de los linfocitos Treg en todos los tejidos analizados. Figura 8A: Un ejemplo de un gráfico de puntos de citometría de flujo típico para la tinción de linfocitos CD4 y FoxP3 (RFP). Los linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ procedentes del cuadrante Q2-1 se clasificaron para el posterior análisis de linfocitos $CD25^{hi}$ y $CD25^{int}$ como se muestra en las Figuras 8B-8D. Figura 8B: La relación de G1TR y la Figura 8C: Expresión de CD103 entre linfocitos Treg $CD25^{hi}$ frente a linfocitos Treg $CD25^{int}$ en esplenocitos 4 días después del tratamiento indicado. Figura 8D: Los datos se representan como el promedio \pm S.E.M. de al menos 8 experimentos independientes con al menos ± 3 ratones por grupo por experimento. Se llevaron a cabo análisis emparejados utilizando el test de la T de students. ** indica $p < 0,01$, y *** indica $p < 0,001$.

60 Las Figuras 9A-9B muestran un ejemplo de estrategia de clasificación y los resultados obtenidos. Figura 9A: Se recogieron esplenocitos de ratones FIR, enriquecidos para linfocitos T $CD4^+$ y se clasificaron sobre la base de los linfocitos $CD4^+$ y $FoxP3^+$ (RFP). El panel izquierdo ilustra una población típica de esplenocitos enriquecidos en linfocitos CD4. Los paneles intermedio y derecho ilustran el análisis de la clasificación posterior representativa para las poblaciones de linfocitos $CD4^+FoxP3^-$ (clasificados P3) y linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ (clasificados P4). Figura 9B: Para algunos experimentos, los linfocitos $CD4^+FoxP3^+$ (clasificados P3) se clasificaron basándose en la expresión de CD25. Se muestran los gráficos representativos demostrando la estrategia de clasificación de los linfocitos $CD25^{hi}$ y los linfocitos $CD25^{int}$.

Las Figuras 10A-10E demuestran que los agonistas de TNFRSF25 pueden proteger de la colitis inducida por sulfato de sodio-dextrano, un modelo de ratón de la enfermedad de Crohn. Se proporcionaron ratones C57BL/6 o TL1A inactivados genéticamente con sulfato de sodio dextrano al 3 % (DSS) disuelto en agua corriente *ad libitum* durante 7 días. En algunos experimentos, los ratones se trataron en el día 0 del experimento con el IgG de control de isotipo o con el anticuerpo agonista de TNFRSF25, el clon 4C12. Se controló el peso diariamente comenzando 4 días antes de la provisión de DSS (día -4 del experimento). En el día -4, un grupo de ratones se trató con el anticuerpo agonista de TNFRSF25, el clon 4C12, mediante inyección intraperitoneal (20 µg/ratón), y los otros se trataron con IgG de control de isotipo de hámster. Se midió la mortalidad cuando los animales perdieron \pm 20 % del peso corporal de partida (Figura 10A). En algunos experimentos, los animales se sacrificaron en el día 5 del experimento y se preparó el ARN total utilizando el kit RNeasy miniprep (Qiagen) procedente de tejido colónico lavado con PBS y congelado de forma ultrarrápida. Se posteriormente transcribió de forma inversa el ARN (Quantitect RT, Qiagen) y se amplificó el ADNc mediante la PCR en tiempo real utilizando las sondas Taqman (Applied Biosystems) para los transcritos indicados (Figura 10B). Se muestran los datos como el cambio de veces en la expresión de ratones TL1A inactivados genéticamente en comparación con ratones C57BL/6 del control. Se controló el porcentaje de pérdida de peso corporal y se representó gráficamente durante el curso del estudio en cada grupo experimental (Figura 10C). En los experimentos donde se sacrificaron animales en el día 5 del experimento para el aislamiento del ARN se aislaron ganglios linfáticos mesentéricos para el análisis, mediante citometría de flujo de la proporción de linfocitos CD4⁺ que expresaban el factor de transcripción FoxP3, indicativo de la reserva de linfocitos T reguladores (Figura 10D). Finalmente, se llevó a cabo la transcripción inversa utilizando ARN aislado procedente de los grupos de tratamiento indicados como se describe para la Figura 10B y se sometió a la RT-PCR de los transcritos indicados. Las barras de errores indican el promedio \pm S.E.M. para \pm 3 ratones por experimento y un mínimo de 2 experimentos por panel.

La Figura 11 demuestra que los agonistas de TNFRSF25 retrasan el rechazo agudo de los corazones alogénicos en un modelo heterotópico de trasplante en ratones. Para estudiar la inducción de la tolerancia por linfocitos Treg naturales expandidos mediante 4C12, se utilizó un modelo de trasplante de corazón que se describe bien para estudios de tolerancia. Se trasplantaron corazones de ratones CBA/J (H2^d) en el abdomen de ratones C57BL/6 (H2^b) en el día 0. En el día -4, un grupo de ratones se trató con el anticuerpo agonístico TNFRSF25, el clon 4C12, mediante inyección intraperitoneal (20 µg/ratón), con los otros tratados con anticuerpo IgG de control de isotipo de hámster. En el momento del trasplante, se confirmó la expansión de los linfocitos Treg en la sangre en el grupo tratado con 4C12. Se controló la supervivencia del aloinjerto palpando el corazón manualmente y se calificó el pulso en una escala de 0 a 4 (0 = sin pulso; 1 = muy leve; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = fuerte). Se define el rechazo como el cese del latido cardíaco palpable. En el momento del rechazo (= cuando el latido cardíaco se detuvo), se retiró el injerto, se fijó la formalina y se sometió a examen patológico. La pérdida de función del injerto a las 48 h del trasplante se considera un fallo técnico (<5 %) y se omitió del análisis adicional.

La Figura 12 demuestra que los agonistas TNFRSF25 expanden selectivamente de forma natural, pero no inducida, los linfocitos T reguladores. Se aislaron linfocitos CD4⁺FoxP3⁻T de ratones que expresaban un gen indicador FoxP3-RFP y se cultivaron *in vitro* durante 5 días en presencia de IL-2, TGF- β , anticuerpo dirigido contra CD3 y ácido retinoico de acuerdo con los protocolos normalizados. A la conclusión del periodo de cultivo, las células viables contenidas en la población de linfocitos CD4⁺ contenían 70-85 % de linfocitos T reguladores inducidos por linfocitos CD4⁺FoxP3⁻RFP⁺ (iTreg). Estas células se purificaron mediante clasificación celular de alta velocidad. De forma simultánea, los linfocitos CD4⁺ totales se purificaron a partir de ratones que expresaban un gen indicador FoxP3-GFP (estas células contienen por tanto una mezcla de iTreg y de linfocitos T reguladores naturales, típicamente derivados, así denominados (nTreg)). iTreg (se mezclaron 6x10⁵ linfocitos iTreg con linfocitos CD4⁺ totales aislados de ratones FoxP3-GFP que contenían 8x10⁵ linfocitos Treg) y se transfirieron adoptivamente (mediante inyección intravenosa) en ratones receptores CD4^{-/-}. Después de 2 días, los ratones CD4^{-/-} receptores que contenían una mezcla de linfocitos iTreg positivos para RFP y linfocitos nTreg positivos para GFP se trataron tanto con anticuerpos 4C12 como con el isotipo de los anticuerpos IgG del control (20 µg/ratón, mediante inyección intraperitoneal). Cinco días después, se determinó la proporción de linfocitos iTreg positivos para RFP y de linfocitos Treg totales positivos para GFP (que contienen la única fuente de nTreg) mediante citometría de flujo de los esplenocitos aislados (Figura 12).

Descripción detallada

Las realizaciones descritas en el presente documento, incluyendo aquella de la presente invención, se describen con referencia a las figuras adjuntas, en las que se utilizan números de referencia similares a lo largo de las figuras para designar elementos similares o equivalentes. Las figuras no están hechas a escala y se proporcionan meramente para ilustrar la presente invención. A continuación, se describen algunos aspectos de la invención con referencia a las aplicaciones a modo de ejemplo para la ilustración. Debe entenderse que se muestran numerosos detalles, relaciones, y métodos específicos para proporcionar una comprensión completa de la invención. Una persona normalmente experta en la técnica relevante, reconocerá, sin embargo, fácilmente que se puede practicar la invención sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. La presente invención no está limitada por la ordenación ilustrada de los hechos o acontecimientos, ya que alguno hechos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros hechos o acontecimientos. Además, no se requieren todos los hechos o acontecimientos ilustrados para implementar una metodología de acuerdo con la presente invención.

Se pretende que todos los genes, nombres de genes, y productos génicos divulgados en el presente documento correspondan a homólogos de cualquier especie para la cual son aplicables las composiciones y métodos divulgados. De esta manera, los términos incluyen, pero no de forma limitativa, los genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Debe entenderse que cuando se divulga un gen o producto génico de una especie concreta, se pretende que esta divulgación sea solo ilustrativa y no se vaya a interpretar como una limitación a no ser que el contexto en el que aparece lo indique claramente. De esta manera, por ejemplo, para las moléculas divulgadas en el presente documento, por ejemplo, 4C2 no está limitada a ratones, pero se prefiere el anticuerpo humano, que en algunas realizaciones se refiera a secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos de mamífero que se pretende que abarquen genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos procedentes de otros animales, incluyendo, pero no de forma limitativa, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles, y pájaros. En las realizaciones preferidas, los genes o secuencias de ácidos nucleico son de seres humanos.

Salvo que se defina otra cosa, todos los términos (incluidos los términos técnicos y científicos) utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios usados comúnmente, deben interpretarse como teniendo un significado que es consistente con su significado en el contexto de la técnica relevante y no se interpretará en un sentido idealizado o excesivamente formal salvo que se defina expresamente de esta forma en el presente documento.

Definiciones

Además, en la extensión que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o sus variantes se usan tanto en la descripción detallada como/o en las reivindicaciones, se pretende que dichos términos sean inclusivos de una manera similar al término "que comprende".

El término "alrededor" o "aproximadamente" significa comprendido en un intervalo de error aceptable para el valor concreto como ha determinado una persona normalmente experta en la materia, que dependerá en parte sobre cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema medido. Por ejemplo; "alrededor" puede significar comprendido en una desviación estándar de 1 o más de 1, para la práctica en la materia. Alternativamente, "alrededor" puede significar un intervalo de hasta 20 %, preferentemente hasta 10 %, más preferentemente hasta 5 % y aún más preferentemente hasta un 1 % de un valor dado. De forma alternativa, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar comprendido en un orden de magnitud, preferentemente, en 5 veces, y más preferentemente en 2 veces, de un valor. Donde los valores concretos se describen en la aplicación y en las reivindicaciones, salvo que se indique de otra forma, el término "alrededor" significa comprendido en un intervalo de error aceptable para que deba asumirse el valor concreto.

Un "linfocito T regulador" o "linfocito Treg" o "linfocito Tr" se refiere a una célula que puede modular la respuesta de un linfocito T. Los linfocitos Treg expresan el factor de transcripción *Foxp3*, que no está regulado en exceso tras la activación de los linfocitos T y discrimina los linfocitos Treg de las células efectoras activadas. Los linfocitos Treg se identifican por los marcadores superficiales celulares CD25, CTLA4, y GITR. Se han identificado algunos subconjuntos de linfocitos Treg que tienen la capacidad de inhibir respuestas inflamatorias autoinmunitarias y crónicas y de mantener la tolerancia inmunitaria en hospedadores que soportan tumores. Estos subconjuntos incluyen linfocitos T reguladores de tipo 1 (Tr1) que secretan interleuquina 10- (IL-10-), linfocitos T auxiliares de tipo 3 (Th3) que secretan factor-p de crecimiento transformante (TGF-β-), y linfocitos Treg CD4⁺/CD25⁺ "naturales" (Trn) (Fehervari y Sakaguchi. J. Clin. Invest. 2004, 114:1209-1217; Chen y col. Science. 1994, 265: 1237-1240; Groux et al. Nature. 1997, 389: 737-742).

"Agonista de TNFR25", "agente TNFR25" "composición de TNFR25" se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a una sustancia que se une al receptor TNFR25 y que estimula una respuesta en la célula sobre la cual se expresa el receptor TNFR25 se expresa de forma similar a una respuesta que se observaría exponiendo a un ligando de TNFR25, por ejemplo, TL1A. Un agonista es lo opuesto a un antagonista en el sentido de que aunque un antagonista puede también unirse al receptor, este fracasa en activar el receptor y bloquea completa o parcialmente de forma real este de la activación por los agonistas endógenos o exógenos. Un agonista parcial activa un receptor, pero no produce tanto cambio fisiológico como un agonista completo. De forma alternativa, otro ejemplo de un agonista de TNFR25 es un anticuerpo que es capaz de unirse y activar TNFR25. Un ejemplo de un anticuerpo dirigido contra TNFR es 4C12 (agonista). (Depositado bajo la normativa del Tratado de Budapest en representación de: la Universidad de Miami; Fecha de recepción de semillas/cepa(s) por la ATCC®: 5 de mayo de 2009; ATCC ®Designación del Depósito de Patente: PTA10000. Referencia de Identificación por el Depositante: Línea de células de hibridoma; 4C12; Se ensayó este depósito el 4 de junio de 2009 y en esta fecha, las semillas/cepa(s) fueron viables. Organismo Depositario Internacional: American Type Culture Collection (ATCC®), Manassas, VA, EE.UU.).

"Antagonista de TNFR25" se denomina en el presente documento una sustancia que inhibe la función fisiológica normal de un receptor TNFR25. Dichos agentes trabajan interfiriendo en la unión del receptor endógeno a los agonistas/ligandos como TL1A, con el receptor TNFR25.

Los antagonistas o agonistas de TNFR25 pueden estar en la forma de aptámeros. Los "aptámeros" son moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado entre combinaciones aleatorias basándose en su capacidad para unirse con otras moléculas. Los aptámeros se unen específicamente a una molécula diana en la que la molécula del ácido nucleico tiene una secuencia que comprende una secuencia reconocida por la molécula diana en su escenario natural. De forma alternativa, un aptámero puede ser una molécula de ácido nucleico que se une a una molécula diana en la que la molécula diana no se une naturalmente a un ácido nucleico. La molécula diana puede ser cualquier molécula de interés. Por ejemplo, el aptámero se puede usar para unirse a un dominio de unión a ligando de una proteína, evitando por lo tanto la interacción del ligando que se produce naturalmente con la proteína. Este es un ejemplo no limitante, y los expertos en la técnica reconocerán que se pueden generar fácilmente otras realizaciones utilizando técnicas generalmente conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Gold et al., Annu. Rev. Biochem. 64:763 1995; Brody y Gold, J. Biotechnol. 74:5, 2000; Sun, Cur. Opin. Mol. Ther. 2:100, 2000; Kusser, J. Biotechnol. 74:27, 2000; Hermann y Patel, Science 287:820, 2000; y Jayasena, Clinical Chem. 45:1628, 1999).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" es inclusivo de todas las especies, incluyendo anticuerpos humanos y humanizados y la diana antigénica, por ejemplo, TNFR25, puede ser de cualquier especie. De esta manera, un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra TNFR25 puede ser un anticuerpo de ratón dirigido contra TNFR25 humano, un anticuerpo de cabra dirigido contra TNFR25 humano; anticuerpo de cabra dirigido contra TNFR25 de ratón; anticuerpo de rata dirigido TNFR25; anticuerpo de ratón dirigido contra TNFR25 de rata y similares. Las combinaciones de anticuerpos generados en una determinada especie contra una diana antigénica, por ejemplo, TNFR25, de otras especies, o en algunos casos, de la misma especie (por ejemplo, en respuestas autoinmunitarias o inflamatorias) no tienen límites y todas las especies están abarcadas en la presente invención. El término anticuerpo se usa, en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos que se pueden unir a un antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), que comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las anteriores siempre que presente la actividad biológica deseada.

"Molécula diana" incluye cualquier macromolécula, incluyendo proteínas, hidratos de carbono, enzimas, polisacáridos, glucoproteínas, receptores, antígenos, anticuerpos, factores de crecimiento; o puede ser cualquier molécula orgánica pequeña incluyendo una hormona, sustrato, metabolito, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, pesticida, péptido; o puede ser una molécula inorgánica incluyendo un metal, ion metálico, óxido metálico, y un complejo metálico; puede ser también un organismo completo incluyendo una bacteria, virus, y un eucariota monocelular tal como un protozoo.

"Tratar" o "tratamiento" de un estado, trastorno o dolencia incluye: (1) Evitar o retrasar la aparición de síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o dolencia que se desarrolla en un mamífero que puede padecer o estar predispuesto al estado, trastorno o dolencia pero que no experimenta todavía o expresa los síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o dolencia; o (2) inhibir el estado, trastorno o dolencia, es deferir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma (en el caso de un tratamiento de mantenimiento) o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos; o (3) Aliviar la enfermedad, es decir, producir la regresión del estado, trastorno o dolencia o al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos. El beneficio a un sujeto que se va a tratar es tanto estadísticamente significativo como al menos perceptible para el paciente o para el médico.

"Paciente" o "sujeto" se refiere a mamíferos e incluye sujetos humanos y veterinarios.

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Normalmente, debido a que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Modulación de la respuesta inmunitaria

Características de los subconjuntos de linfocitos T CD4: Los linfocitos T CD4 tras la activación y expansión se desarrollan en diferentes subconjuntos de linfocitos T auxiliares (T_H) con diferentes perfiles de citoquinas y distintas funciones efectoras. La diferenciación adecuada de linfocitos T_H en subconjuntos efectores más adecuados para la defensa del hospedador frente a un patógeno invasor es de importancia crítica para el sistema inmunitario. Los linfocitos T CD4 se diferencian en al menos cuatro subconjuntos conocidos, tres subconjuntos efectores (T_H1, T_H2 y T_H17) y un subconjunto de linfocitos T reguladores (linfocitos Treg). Basándose en las citoquinas que producen, los linfocitos T se dividieron históricamente en linfocitos T_H1 y T_H2, y esto ha proporcionado un marco para comprender como los medios específicos de citoquinas producidos por las células del sistema inmunitario innato dirigen el desarrollo de la inmunidad adaptativa. Los linfocitos T_H1 que son inducidos de forma potente por las células dendríticas (CD) que secretan IL-12, se caracterizan por la expresión del factor T-bet de transcripción específico del linaje (T box 21) y la producción de IFN- γ . Los linfocitos TH2, dependerán de IL-4 durante la diferenciación y la ausencia de IL-12, produce IL-4, IL-5, IL-9, e IL-13 y se caracterizan por la expresión del factor de transcripción GATA-3. De forma importante, en los cinco últimos años, se ha descubierto y caracterizado un tercer subconjunto de

linfocitos T auxiliares efectoros productores de IL-17, denominados linfocitos T_H17 , y se especifica por la expresión del factor de transcripción ROR γ t.

Los linfocitos T_H17 producen IL-17, IL-17F, e IL-22. Secretando estas citoquinas efectoras, los linfocitos T_H17 inducen una reacción masiva del tejido debido a la amplia distribución de los receptores IL-17 e IL-22. Los linfocitos T_H17 secretan también IL-21 para comunicarse con las células del sistema inmunitario. La sinergia entre la isoforma 1 del factor β de crecimiento transformante de las citoquinas (TGF β) y la interleuquina (IL)-6 induce el desarrollo de linfocitos T_H17 en ratones y seres humanos, mientras que IL-23 soporta la expansión de estas células. Los factores de diferenciación (TGF- β más IL-6 o IL-21), el crecimiento y el factor de estabilización (IL-23), y los factores de transcripción (STAT3, ROR- γ t (ROR-c), y ROR-a) implicados en el desarrollo de los linfocitos T_H17 se han identificado solo recientemente. La participación de TGF- β en la diferenciación de linfocitos T_H17 coloca el linaje T_H17 en estrecha relación con los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (T_{reg}) debido a que TGF- β induce también la diferenciación de linfocitos T no expuestos anteriormente a tratamiento en linfocitos Treg Foxp3⁺ en el compartimento inmunitario periférico. Los linfocitos Treg son una subpoblación especializada de linfocitos T que actúa para suprimir la activación del sistema inmunitario y que mantiene por lo tanto la homeostasis del sistema inmunitario y la tolerancia de los autoantígenos. El desarrollo de los linfocitos Treg, que son capaces de suprimir la enfermedad autoinmunitaria, está recíprocamente relacionado con los linfocitos T_H17 , que pueden impulsar respuestas inmunitarias, incluyendo respuestas autoinmunitarias. Se pueden identificar linfocitos Treg mediante su expresión única del factor de transcripción forkhead box P3 (Foxp3). De forma importante, en la medida que se sabe, existen dos poblaciones fenotípicamente idénticas de linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ - naturales y adaptativos. Los linfocitos Treg CD4⁺CD25⁺ surgen en el timo en condiciones homeostáticas para salvaguardarlo contra la autoinmunidad. Los linfocitos T CD4⁺CD25⁺ surgen durante los procesos inflamatorios tales como infecciones y cánceres y suprimen a inmunidad a través de mecanismos heterogéneos que incluyen el contacto directo o la producción de factores solubles tales como IL-10 y TGF- β .

Receptor 25 del Factor de Necrosis Tumoral (TNFR25): Denominado indistintamente en el presente documento como receptor 3 de muerte (DR3), es un regulador de la función de los linfocitos T. El receptor 3 de muerte (DR3) (Chinnaiyan et al., Science 274:990, 1996) es un miembro de la familia de receptores TNF. Se conoce también como TRAMP (Bodmer et al., Immunity 6:79, 1997), wsl-1 (Kitson et al., Nature 384:372, 1996), Apo-3 (Marsters et al., Curr Biol 6:1669, 1996), y LARD (Screaton et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:4615, 1997) y contiene un dominio de muerte típico. La transfección de células 293 con DR3 humano (hDR3) indujo la apoptosis y activó NF-KB. Se han observado formas cortadas y empalmadas múltiples de ARNm DR3, indicando la regulación en el nivel posterior a la transcripción (Screaton et al., Proc Natl Acad Sci USA 94:4615, 1997).

Los linfocitos T CD4⁺FoxP3⁺ reguladores (Treg) pueden suprimir la actividad de los linfocitos T efectoros autorreactivos que escapan a la selección negativa en el timo. Los linfocitos Treg son suficientes para evitar o retrasar la patología autoinmunitaria en modelos experimentales de IBD, asma y EAE. Los linfocitos Treg bloquean la señalización de TNFR25 de la inhibición de los linfocitos CD4⁺CD25⁺ pero no de los linfocitos CD8⁺ específicos de antígenos *in vitro*. De forma interesante, ratones transgénicos que expresaban TNFR25 de longitud completa bajo el promotor CD2 expresan elevados niveles de citoquinas T_H2 y T_H17 y tienen una celularidad disminuida en tejidos linfoides secundarios. La coincidencia de la actividad reguladora disminuida de los linfocitos T, la celularidad disminuida, y la producción de citoquinas aumentada en ratones TNFR25 transgénicos sugiere que la señalización de TNFR25 puede ser proinflamatoria y antiinflamatoria dependiendo del contexto en el que se reciben las señales de TNFR25.

En resumen, los experimentos llevados a cabo en el presente documento, mostraron el hallazgo inesperado de que la estimulación de TNFR25 *in vivo* conduce a la expansión rápida y sistémica de la reserva de linfocitos T reguladores CD4⁺FoxP3⁺. El anticuerpo (4C12) indujo que la expansión de Treg se produjera de forma independiente al antígeno exógeno y dio como resultado un aumento de 3-4 veces en el porcentaje de linfocitos Treg de los linfocitos CD4⁺ comprendido en el lapso de 4 días de la administración. Esta expansión de linfocitos Treg que resultó predominantemente de la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25^{int}, es duradera, y no disminuye hasta los niveles sin estimular durante dos semanas. 4C12 expandió los linfocitos Treg que retienen las funciones supresoras de los linfocitos T efectoros mediados por TGF β *ex vivo*; sin embargo, la señalización continuada de TNFR25 aboga la actividad supresora de los linfocitos Treg expandidos mediante 4C12. Sin pretender quedar vinculados por teoría alguna, estos hallazgos indican la señalización de los linfocitos TNFR25 en los linfocitos Treg tiene la doble función de aumentar la proliferación de los linfocitos Treg y la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos Treg. La inhibición de la supresión de linfocitos Treg por la señalización de TNFR25 es muy plástica y se puede restaurar o mantener tras la eliminación o continuación de la señalización de TNFR25 en los linfocitos Treg, respectivamente. La adición de esta información al papel de TNFR25 como un costimulador de respuestas T_H2 y T_H17 indica que el papel de TNFR25 en la señalización inmunitaria es para potenciar simultáneamente la función celular efectora durante la inducción de una respuesta inflamatoria y acelera la resolución de la inflamación mediante una reserva expandida regionalmente de los linfocitos Treg que recuperan la actividad supresora tras la eliminación del estímulo inflamatorio. Tomados en su conjunto, estos hallazgos evidencian que los tratamientos dirigidos contra TNFR25 pueden ser valioso tanto para potenciar como para inhibir la activación inmunitaria,

dependiendo del contexto inflamatorio en el que se administran; con amplias implicaciones en los campos de la enfermedad autoinmunitaria, la infección crónica, el trasplante y el cáncer.

5 En una realización preferida, un método para regular una respuesta inmunitaria *in vivo* comprende administrar a un paciente que lo necesita, al menos un agente que modula la función del receptor 25 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRSF25; TNFR25; DR3). La función preferida es la señalización mediada por TNFRSF25 que da como resultado la inducción de los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg). La estimulación de la molécula de TNFRSF25 induce los linfocitos Treg que suprimen una respuesta inmunitaria. Sin embargo, la estimulación
10 continuada de la molécula de TNFRSF25 aboga la actividad supresora de los linfocitos Treg, regulando de esta manera una respuesta inmunitaria.

15 La señalización a través del miembro 25 de la superfamilia del receptor TNF (TNFRSF25, DR3) en linfocitos T CD4⁺ cuando se expresa constitutivamente, potencia la producción de las citoquinas T_H2 y T_H17 y contribuye a la inflamación patológica en modelos de enfermedad del asma, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple (MS), y artritis reumatoide.

20 En realizaciones preferidas que regulan la respuesta inmunitaria *in vivo* tratan las enfermedades o trastornos asociados con una respuesta inmunitaria. Dichas enfermedades o trastornos comprenden, por ejemplo: reacciones de rechazo mediante el trasplante de órganos o tejidos tales como corazón, riñón, hígado, médula ósea, piel, córnea, pulmón, páncreas, intestino delgado, miembro, músculo, nervio, disco intervertebral, tráquea, mioblasto, cartílago, etc.; reacciones de injerto frente a hospedador tras el trasplante de médula ósea; enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, diabetes de tipo I, etc.; infecciones producidas por microorganismos patógenos (por ejemplo, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton asteroides*, etc.); enfermedades de la piel
25 inflamatorias o hiperproliferativas o manifestaciones cutáneas o enfermedades inmunológicamente mediadas (por ejemplo, psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto, dermatitis eczematoide, dermatitis seborreica, líquen plano, pénfigo, pénfigoide buloso, epidermolisis bulosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritema, eosinofilia dérmica, lupus eritematoso, acné, y alopecia areata); enfermedades autoinmunitarias del ojo (por ejemplo, queratoconjuntivitis, conjuntivitis vernal, uveítis asociada con enfermedad de Behcet, queratitis, queratitis herpética, queratitis cónica, distrofia epitelial de la córnea, queratoleucoma, pénfigo ocular, úlcera de Mooren, escleritis, oftalmopatía de Grave, síndrome de Vogt-Koyanagi-Narada, queratoconjuntivitis sicca (ojo seco), flictenula, iridociclitis, sarcoidosis, oftalmopatía endocrina, etc.); enfermedades de las vías aéreas obstructivas reversibles (por ejemplo, asma bronquial, asma alérgica, asma intrínseca, asma extrínseca, y asma debida a polvo, asma particularmente crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hipersensibilidad de las vías aéreas), bronquitis, etc.; inflamaciones mucosales o vasculares (por ejemplo, úlcera gástrica, lesión vascular isquémica o trombótica, enfermedades isquémicas del intestino, enteritis, enterocolitis necrotizante, daños intestinales asociados con quemaduras térmicas, enfermedades mediadas por leucotrieno B4); inflamaciones/alergias intestinales (por ejemplo, enfermedades celíacas, proctitis, gastroenteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa);
35 enfermedades alérgicas relacionadas con los alimentos con manifestación sintomática remota procedente del tracto gastrointestinal (por ejemplo, migraña, rinitis y eczema); enfermedades renales (por ejemplo, nefritis intersticial, síndrome de Goodpasture, síndrome urémico hemolítico, y nefropatía diabética); enfermedades nerviosas (por ejemplo, miositis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Meniere, neuritis solitaria, infarto cerebral, enfermedades de Alzheimer, enfermedades de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y radiculopatía); enfermedades isquémicas cerebral (por ejemplo, lesión de cabeza, hemorragia cerebral (por ejemplo, hemorragia subaracnoide, hemorragia intracerebral), trombosis cerebral, embolismo cerebral, ataque al corazón, ictus, ataque isquémico transitorio (TIA), encefalopatía hipertensiva, infarto cerebral); enfermedades endocrinas (por ejemplo, hipertiroidismo, y enfermedad de Basedow); enfermedades hemáticas (por ejemplo, aplasia de glóbulos rojos, anemia aplásica, anemia hipoplásica, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, agranulocitosis, anemia perniciosa, anemia megaloblástica y aneritroplasia); enfermedades óseas (por ejemplo, osteoporosis); enfermedades respiratorias (por ejemplo, sarcoidosis, fibrosis pulmonar, y neumonía intersticial idiopática); enfermedades de la piel (por ejemplo, dermatomiositis, leucoderma vulgar, ictiosis vulgar, fotosensibilidad, y linfoma cutáneo de linfocitos T); enfermedades circulatorias (por ejemplo, arterioesclerosis, aterosclerosis, síndrome de aortitis, poliarteritis nodosa, y miocardosis); enfermedades relacionadas con el colágeno (por ejemplo, escleroderma, granuloma de Wegener, y síndrome de Sjogren); adiposis; fascitis eosinofílica;
45 enfermedades periodontales (por ejemplo, daño a la encía, periodoncio, hueso alveolar o sustancia ósea del diente); síndrome nefrótico (por ejemplo, glomerulonefritis); alopecia de patrón masculino, alopecia senil; distrofia muscular; pioderma y síndrome de Sezary; enfermedades asociadas a anomalías cromosómicas (por ejemplo, síndrome de Down); enfermedad de Addison; enfermedades mediadas por oxígeno activo [por ejemplo, lesión orgánica (por ejemplo, trastornos en la circulación isquémica de órganos (por ejemplo, corazón, hígado, riñón, tracto digestivo, etc.) asociadas con preservación, trasplante, o enfermedades isquémicas (por ejemplo, trombosis, infarto de miocardio, etc.); enfermedades intestinales (por ejemplo, choque de endotoxinas, colitis pseudomembranosa, y colitis inducida por fármacos o radiación); enfermedades renales (por ejemplo, insuficiencia renal aguda isquémica, insuficiencia renal crónica); enfermedades pulmonares (por ejemplo, toxicosis producida por oxígeno pulmonar o fármacos (por ejemplo, paracort, bleomicina, etc.), cáncer de pulmón y enfisema pulmonar); enfermedades oculares
50 (por ejemplo, cataratas, enfermedad por almacenamiento de hierro (siderosis bulbi), retinitis pigmentosa, placas seniles, cicatrización vítrea, quemadura alcalina de la córnea); dermatitis (por ejemplo, eritema multiforme, dermatitis

5 bullosa debida a inmunoglobulina A lineal, dermatitis por contacto con cemento); y otras enfermedades (por ejemplo, gingivitis, periodontitis, septicemia, pancreatitis, y enfermedades producidas por contaminación ambiental (por ejemplo, contaminación del aire), envejecimiento, carcinógenos, metástasis de carcinoma, e hipobaropatía)]; las enfermedades producidas por histaminas liberan o liberan leucotrieno C4; restenosis de la arteria coronaria tras
 10 angioplastia y prevención de adhesiones posteriores a cirugía; enfermedades autoinmunitarias y dolencias inflamatorias (por ejemplo, edema mucosal primario, gastritis atrófica autoinmunitaria, menopausia prematura, esterilización masculina, diabetes mellitus juvenil, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmitis simpática, uveítis inducida por lente, leucopenia idiopática, hepatitis crónica activa, cirrosis idiopática, lupus discoide eritematoso, orquitis autoinmunitaria, artritis (por ejemplo, artritis deformante), o policondritis); infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), SIDA; conjuntivitis alérgica; cicatriz hipertrófica y queloide debido a trauma, quemadura, o cirugía.

15 En una realización preferida, el agente se administra en una monodosis o se extiende durante un periodo de tiempo a fin de mantener los efectos supresores de los linfocitos Treg. Por ejemplo, tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

En otra realización preferida, el agente se administra en dosis múltiples o en una pluralidad de dosis de tal manera que se abrogan los efectos supresores de los linfocitos Treg. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, enfermedades víricas u otras enfermedades que requieren una compensación inmunomediada de células anómalas.

20 En otra realización preferida, el agente se administra en una formulación de liberación extendida con el fin de proporcionar una estimulación constante de TNFRSF25 a fin de abrogar la supresión del sistema inmunitario por los linfocitos Treg.

25 En otra realización preferida, al menos un agente estimula la señalización de TNFRSF25 e induce la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25^{int} en un paciente. Se pueden controlar los efectos supresores de los linfocitos Treg y se pueden ajustar las dosis del agente para mantener los efectos supresores en enfermedades o dolencias en las que se desea una respuesta inmunitaria disminuida, por ejemplo, autoinmunidad, rechazo al trasplante y similares.

30 En otra realización preferida, al menos un agente estimula la señalización de TNFRSF25 e induce la proliferación de linfocitos Treg inducidos tímicamente, pero no inducidos periféricamente. Se pueden controlar los efectos supresores de los linfocitos Treg y se pueden ajustar las dosis del agente para mantener los efectos supresores en enfermedades o dolencias en las que se desea una respuesta inmunitaria disminuida, por ejemplo, autoinmunidad, rechazo al trasplante y similares.

35 En otra realización preferida, al menos un agente estimula la señalización de TNFRSF25 e induce la proliferación de linfocitos Treg inducidos tímica y periféricamente, donde se sabe que está presente el antígeno homólogo reconocido por los linfocitos Treg inducidos periféricamente. Se pueden controlar los efectos supresores de los linfocitos Treg y se pueden ajustar las dosis del agente para mantener los efectos supresores en enfermedades o dolencias en las que se desea una respuesta inmunitaria disminuida, por ejemplo, autoinmunidad, rechazo al trasplante y similares.
 40

45 En otra realización preferida, se puede administrar uno o una combinación de agentes a un paciente para modular su respuesta inmunitaria. Por ejemplo, un paciente puede recibir uno o más agentes en una dosis terapéuticamente eficaz como se ha determinado por la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ en un paciente, o cualquier otro ensayo que mida la respuesta deseada. Por ejemplo, inmunoensayos, detección de biomarcadores, FACS, inmunotransferencias, hibridación, PCR etc. Los linfocitos Treg se pueden identificar como, por ejemplo, linfocitos CD4⁺FoxP3⁺. En algunos aspectos, existe la expresión simultánea de CD103. La expresión de CD103 por los linfocitos Treg contribuye a la retención de tejidos comprendidos en tejidos. Los agentes conocidos no interfieren con la proliferación de linfocitos Treg mediada por TNFRSF25 que incluye rapamicina.
 50

En otra realización preferida, el agente que modula la señalización de TNFRSF25 comprende al menos uno de: un anticuerpo, un aptámero, un ligando, molécula pequeña, péptido, proteína, oligonucleótido, polinucleótido, molécula orgánica o inorgánica.

55 En una realización preferida, el agente es un agonista de TNFRSF25.

60 En otra realización preferida, un método para suprimir una respuesta inmunitaria *in vivo* comprende administrar a un paciente que lo necesita, al menos un agente que modula la función de señalización mediada por el receptor 25 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRSF25; TNFR25; DR3); e, induciendo la expansión de los linfocitos T reguladores supresores (Treg).

En otra realización preferida, el agente modula la señalización del receptor 25 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral e inhibe la actividad supresora de los linfocitos T reguladores CD4⁺FoxP3⁺.

65 En otra realización preferida, una composición para modular una respuesta inmunitaria que comprende un agente que modula la señalización de TNFRSF25. En una realización, el agente se administra a un paciente de tal manera

que los linfocitos Treg supresores suprimen una respuesta inmunitaria. En otra realización preferida, el agente se administra a un paciente en una dosis o en condiciones que abrogan la señal que conduce a una inhibición de los linfocitos Treg supresores, de tal manera que se monta una respuesta inmunitaria.

5 En otra realización preferida, un método para tratar el cáncer *in vivo* que comprende administrar a un paciente que lo necesita, al menos un agente que modula la función de señalización del receptor 25 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRSF25; TNFR25; DR3) a dosis y condiciones que proporcionan una estimulación continua del TNFRSF25 que abroga los efectos supresores de la respuesta inmunitaria que pueden inducir los linfocitos Treg a un cáncer.

10 En otra realización preferida, la modulación de las células inmunitarias y las respuestas posteriores comprende un método para tratar a un paciente con una enfermedad tal como por ejemplo, cáncer, enfermedad vírica, o enfermedad producida por cualquier organismo infeccioso en la que una composición anti-TNFR25, se administra a un paciente, y modula las funciones de las células inmunitarias, por ejemplo, la proliferación de un linfocito en la que el linfocito se ha suprimido o atenuado previamente, o en casos donde la respuesta inmunitaria es normal pero el aumento de la potencia de la respuesta inmunitaria da como resultado un tratamiento más eficaz y rápido de un paciente. Una ruta reguladora negativa, y no la carencia de una inmunogenicidad tumoral inherente (es decir, la capacidad de los tumores no manipulados de estimular la inmunidad protectora), juegan un importante papel en la prevención del control inmunomediado de la progresión tumoral. La implicación terapéutica es que el recuento de los circuitos reguladores inmunoatenuantes/inmunosupresores contribuye a un control inmunitario satisfactorio del cáncer y es tan, si no más, importante que desarrollar potentes protocolos de vacunación.

25 *Vacunas tumorales:* Como tales, los agonistas de TNFR25 son eficaces modificadores de la respuesta biológica, en, por ejemplo, vacunas para tumores debido a que refuerzan la activación de los linfocitos T y la respuesta inmunitaria celular a un antígeno específico de tumor, mientras que los antagonistas de TNFR25 bloquean o inhiben la activación de los linfocitos T. Por tanto, se describen también métodos y agentes terapéuticos que aumentan la eficacia de una vacuna tumoral.

30 Las vacunas tumorales intentan usar los elementos del sistema inmunitario natural del cuerpo para combatir el cáncer. Las vacunas tumorales contienen uno o más antígenos específicos de tumor y pueden contener un adyuvante y modificadores de la respuesta biológica. Un antígeno específico de tumor es un polipéptido que está limitado sustancialmente a la expresión en o sobre células tumorales y que puede utilizarse para estimular una respuesta inmunitaria prevista para hacer diana en aquellas células tumorales. Se usan diferentes tipos de vacunas para tratar diferentes tipos de cáncer. Para que una composición antigénica sea útil como una vacuna, una composición antigénica debe inducir una respuesta inmunitaria al antígeno en una célula o tejido. Como se usa en el presente documento, una "composición antigénica" puede comprender un antígeno (por ejemplo, un péptido o polipéptido), un ácido nucleico que codifica un antígeno (por ejemplo, un vector de expresión de antígeno), o una célula que expresa o presenta un antígeno.

40 El aumento de la respuesta inmunitaria a una vacuna u otro estimulante antigénico puede medirse mediante cualquier método convencional, tal como por ejemplo, ensayos de proliferación, secreción de citoquinas, tipos de citoquinas secretadas, ensayos de linfocitos T citotóxicos, ensayos ELISA, RIA y similares. El aumento de la respuesta inmunitaria puede detectarse también vigilando el tratamiento. Por ejemplo, en el caso de tratar el cáncer, se vigilaría también una respuesta inmunitaria aumentada observado uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en alguna extensión, del crecimiento tumoral, incluyendo (i) ralentizar (ii) inhibir la angiogénesis y (ii) completar la detención del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) mantener el tamaño del tumor; (4) reducción en el tamaño del tumor; (5) inhibición, incluyendo (i) reducción (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de la infiltración celular en los órganos periféricos; (6) inhibición, incluyendo (i) reducción (ii) ralentización o (iii) prevención completa, de la metástasis; (7) aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral, que puede dar como resultado (i) el mantenimiento del tamaño del tumor, (ii) reducir el tamaño del tumor, (iii) ralentizar el crecimiento de un tumor, (8) reducir, retrasar o evitar a invasión y/u (alivio, en alguna extensión, de la gravedad o del número de uno o más síntomas asociados con el trastorno).

55 En otra realización preferida, el anticuerpo dirigido contra TNFR25 se puede administrar como una construcción vectorial que expresa anticuerpos dirigidos contra TNFR25. Además, la construcción vectorial puede contener secuencias de nucleótidos que codifican citoquinas, tales como el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interleuquina-12 (IL-12) y moléculas coestimuladoras tales como 87-1, 87-2, CD40. Se pueden usar las citoquinas en diversas combinaciones para afinar la respuesta del sistema inmunitario del sujeto, incluyendo respuesta de anticuerpos y linfocitos T citotóxicos para llevar a cabo el nivel específico de respuesta necesario para controlar o eliminar la infección o el estado de enfermedad. El polinucleótido puede codificar también un producto de fusión que contiene un polipéptido antigénico, por ejemplo, un antígeno antitumoral, antígeno antivírico y similar, y una molécula coestimuladora, tal como CTLA-4. Los ejemplos de vectores adecuados comprenden vectores víricos que incluyen el virus de la polio, los virus de la viruela, tales como vaccinia, el virus de la viruela del canario, y la viruela aviar, los virus del herpes, incluyendo el virus del herpes bagre, vectores asociados a adenovirus, y retrovirus. Los vectores bacterianos ilustrativos incluyen las formas atenuadas de *Salmonella*, *Shigella*, *Edwardsiella ictaluri*, *Yersinia ruckerii*, y *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* puede ser también

valiosa como una herramienta de investigación utilizada para estimular la expansión de linfocitos Treg en animales de tal manera que pueden recogerse en un punto temporal posterior con un rendimiento aumentado de linfocitos Treg por animal.

5 *Terapias combinadas*

En una realización preferida, el aumento o regulación en exceso de una respuesta inmunitaria se puede combinar con una o más terapias. El anticuerpo dirigido contra TNFR25, por ejemplo, se puede administrar antes de, simultáneamente con, o después de un curso de tratamiento con uno o más agentes o métodos de tratamiento.

10 En otra realización, las composiciones de TNFR25 se pueden administrar a células autólogas, lo que permite a las células expandirse y a continuación reinfundir las células en el paciente.

15 Los agentes estimuladores de TNFR25 pueden administrarse en una composición farmacéutica, como un polinucleótido en un vector, liposomas, péptidos de ácidos nucleicos, y similares.

En otra realización preferida, se pueden administrar los agentes estimuladores de TNFR25 con uno o más agentes farmacológicamente activos adicionales. Como se usa en el presente documento, el término " agente farmacológicamente activo" se refiere a cualquier agente, tal como un fármaco, capaz de tener un efecto fisiológico (por ejemplo, un efecto terapéutico o profiláctico) sobre células procariotas o eucariotas, *in vivo* o *in vitro*, incluyendo, pero sin limitación, agentes quimioterapéuticos, toxinas, agentes radioterapéuticos, agentes radiosensibilizantes, vectores de terapia génica, construcciones de ácidos nucleicos de sentido contrario o ARN interferente pequeño, agentes de formación de imágenes, agentes diagnósticos, agentes conocidos por actuar con una proteína intracelular, polipéptidos, y polinucleótidos.

25 El agente adicional farmacológicamente activo se puede seleccionar entre una variedad de tipos conocidos de fármacos, incluyendo, por ejemplo, analgésicos, anestésicos, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, agentes antiarrítmicos, agentes antiasma, antibióticos (incluyendo penicilinas), agentes anticancerosos (incluyendo Taxol), anticoagulantes, antidepresivos, agentes antidiabéticos, antiepilépticos, antihistaminas, antitusivos, agentes antihipertensivos, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antineoplásicos, agentes antioxidantes, antipiréticos, inmunosupresores, inmunoestimulantes, agentes antitiroideos, agentes antivíricos, sedantes anxiolíticos (hipnóticos y neurolépticos), astringentes, agentes bacteriostáticos, agentes bloqueantes beta-adrenoreceptores, productos sanguíneos y sustitutos, broncodilatadores, agentes tamponantes, agentes ionotrópicos cardíacos, agentes quimioterapéuticos, medios de contraste, corticoesteroides, supresores de la tos (expectorantes y mucolíticos), agentes diagnósticos, agentes de diagnóstico por imágenes, diuréticos, dopaminérgicos (agentes antiparkinsonianos), agentes secuestrantes de radicales libres, factores de crecimiento, hemostáticos, agentes inmunológicos, agentes reguladores de lípidos, relajantes musculares, proteínas, péptidos y polipéptidos, parasimpaticomiméticos, calcitonina paratiroidea y bifosfonatos, prostaglandinas, radiofarmacéutico, hormonas, hormonas sexuales (incluyendo esteroides), aglutinantes de liberación temporal, agentes antialérgicos, estimulantes y anoréticos, esteroides, simpaticomiméticos, agentes tiroideos, vasodilatadores, y xantinas.

40 El agente adicional farmacológicamente activo no necesita ser un agente terapéutico. Por ejemplo, el agente puede ser citotóxico para las células locales a las cuales se administra, pero tiene un efecto beneficioso global sobre el sujeto. Además, el agente puede ser un agente diagnóstico sin actividad terapéutica directa per se, tal como un agente de contraste para la formación de imágenes biológicas.

45 *Quimioterapia:* Las composiciones TNFR25 se pueden administrar con quimioterapia. La administración de, por ejemplo, anticuerpo dirigido contra TNFR25 daría como resultado probablemente la necesidad disminuida de quimioterapia, o si se requiere o recomienda todavía quimioterapia, las dosis serían menores, aliviando por tanto algo de los efectos secundarios adversos de estos agentes quimioterapéuticos. Los tratamientos contra el cáncer incluyen una variedad de terapias de combinación con tratamiento basados tanto en sustancias químicas como en radiación. Las quimioterapias combinadas incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, busulfan, nitrosourea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbinainhibidores de la farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivada del anterior.

60 *Radioterapia:* Las composiciones se pueden combinar con radioterapia. Otros factores que producen el daño del ADN y que se han usado extensamente incluyen los que se conocen comúnmente como rayos gamma, rayos X, y/o, la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que ocasionan daños en el ADN, tales como la radiación de microondas y la irradiación de haces de protones (Patente de Estados Unidos. N.º 5.760.395 y patente de los Estados Unidos N.º 4.870.287) e irradiación de UV. Es más probable que todos estos factores realicen una amplia gama de daños en el ADN, sobre los precursores del ADN, sobre la replicación y reparación del ADN, y sobre el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosis para los rayos X están comprendidos en dosis diarias de 50 a 200 roentgen para periodos de

tiempo prolongados (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación de los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y tipo de la radiación emitida, y de su captación por las células neoplásicas.

5 **Inmunoterapia:** Los agentes anti-TNFR25 se pueden combinar con otras formas de inmunoterapia. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento del cáncer, los compuestos inmunoterapéuticos, de una forma general, se basan en el uso de células y moléculas efectoras (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) para dirigirse y destruir las células cancerosas. Trastuzumab (HERCEPTIN™) o bevacizumab (AVASTIN™) son un ejemplo de este tipo. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico de algún marcador situado en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo en solitario puede servir como efector de tratamiento o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción de la célula. El anticuerpo también puede estar conjugado a un fármaco o toxina (compuesto quimioterapéutico, radionucleido, cadena de ricina A, toxina colérica, toxina de la tosferina, etc.) y servir simplemente como agente de direccionamiento. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que tiene en su superficie moléculas que interactúan, tanto directa como indirectamente, con una célula tumoral diana. Varias células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y células destructoras naturales (NK). La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, actividad citotóxica directa y potenciación de dicha respuesta efectora inmune mediante, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra TNFR25, proporcionaría un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer.

20 La respuesta inmune específica de antígeno se dirigiría a uno o más antígenos tumorales y la administración de las composiciones de TNFR25 potenciaría la respuesta inmunitaria dirigida hacia estos antígenos tumorales. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales habituales incluyen el antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de sialil-Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, erb B y p 155. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia es combinar efectos contra el cáncer con efectos estimulantes del sistema inmunitario. También existen moléculas estimulantes del sistema inmunitario, entre las que se incluyen: citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN, quimioquinas tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores del crecimiento tales como el ligando FLT3. La combinación de moléculas estimulantes del sistema inmunitario, tanto como proteínas o usando un suministro de genes junto con un supresor tumoral tal como MDA-7 potencia los efectos antitumorales.

35 Existen numerosos enfoques diferentes para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Se pueden clasificar ampliamente en lo siguiente: inyección de anticuerpos solos; inyección de anticuerpos acoplados a toxinas o agentes quimioterapéuticos; inyección de anticuerpos acoplados a isótopos radioactivos; inyección de anticuerpos anti-idiotipo; y, finalmente, eliminación de las células tumorales de la médula ósea. Preferentemente, los anticuerpos monoclonales humanos se utilizan en la inmunoterapia pasiva, ya que producen pocos o ningún efecto secundario en el paciente.

40 En la inmunoterapia activa, se administra un péptido antigénico, polipéptido o proteína, o una composición de célula tumoral autóloga o alogénica o "vacuna", de forma general, con un auxiliar bacteriano diferenciado. En la inmunoterapia del melanoma, aquellos pacientes que suscitan una respuesta de IgM elevada frecuentemente sobreviven mejor que aquellos que no suscitan anticuerpos IgM, o lo hacen en cantidad baja. Los anticuerpos IgM son frecuentemente anticuerpos transitorios y, como excepción a la regla, parecen ser anticuerpos contra gangliósidos o contra hidratos de carbono.

50 En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos en circulación del paciente, o linfocitos infiltrados en tumores, se aíslan *in vitro*, se activan mediante linfoquinas tales como IL-2 o se transducen con genes de necrosis tumoral. Las composiciones de TNFR25, por ejemplo, el anticuerpo contra TNFR25, se administran o se cultivan con las células que posteriormente se van a reinfundir. Para conseguirlo, se administraría a un animal, o paciente humano, una cantidad inmunítariamente eficaz de linfocitos activados junto con anticuerpos contra TNFR25 y, opcionalmente, con una composición de péptido antigénico incorporada a un coadyuvante. Los linfocitos activados serán, lo más preferiblemente, las propias células del paciente aisladas previamente de la sangre o una muestra de tumor y activados (o "expandidos") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y de carcinoma renal, pero el porcentaje de pacientes que responden fue bajo en comparación con los que no lo hicieron. El anticuerpo contra TNFR25 se puede administrar a un paciente, tras reinfusión a las células con un régimen que se puede determinar por el médico a cargo del paciente o enfermera especialista.

60 **Inmunosupresores:** La administración de uno o más agentes TNFRSF25 se puede realizar con uno o más inmunosupresores cuando se desea mantener una respuesta inmunitaria suprimida (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias). Los ejemplos de inmunosupresores incluyen, sin limitación, ácido micofenólico, azatlioprina, ciclosporina A, FK506, FK520, Elidel; tacrolimus y sirolimus; minociclina; leflunomida; o metotrexato.

65 **Cirugía:** Aproximadamente el 60 % de personas con cáncer se someten a algún tipo de cirugía, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que se puede usar junto con otros tratamientos, tales como los descritos en el presente documento, quimioterapia,

radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia, y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye la resección, en la que todo o parte del tejido canceroso se retira físicamente, extirpa y/o destruye. La resección tumoral se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección de tumores, el tratamiento mediante cirugía incluye la cirugía con láser, criocirugía, y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla adicionalmente que las realizaciones descritas en el presente documento se puedan utilizar junto con la retirada de cánceres superficiales, precánceres, o cantidades incidentales de tejido normal.

Tras la extirpación de todo o parte de las células, tejido o tumor canceroso, se puede formar una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede realizar mediante perfusión, inyección directa o aplicación local a la zona de un tratamiento contra el cáncer adicional. Dicho tratamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos también pueden ser de dosis variables.

Otros agentes: Se contempla que se puedan utilizar otros agentes combinados con las realizaciones descritas en el presente documento para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores que afectan a la regulación en exceso de los receptores de la superficie celular y uniones de GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, la inhibición de la adhesión celular, y el aumento en la sensibilidad de las células hiperproliferativas respecto a los inductores apoptóticos u otros agentes. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón alfa, β , y gamma; IL-2 y otras citoquinas; F42K y otros análogos de citoquina; o MIP-1, MIP-1 β , MCP-1, RANTES, y otras quimioquinas. Se contempla además que la regulación en exceso de los ligandos de la superficie celular o sus ligandos tales como ligando Fas/Fas, DR4 o DR5/TRAIL (ligando Apo-2) potencie las capacidades de estimulación de la presente invención. El aumento de la señalización intercelular mediante el aumento del número de uniones de GAP aumentaría los efectos proliferativos de las poblaciones celulares deseadas.

El ligando Apo2 (Apo2L, también denominado TRAIL) es un miembro de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral (TNF). TRAIL activa la apoptosis rápida en muchos tipos de células cancerosas, aunque no es tóxico para las células normales. El ARNm de TRAIL se encuentra en una amplia variedad de tejidos. La mayoría de células normales parecen ser resistentes a la acción citotóxica de TRAIL, lo que sugiere la existencia de mecanismos que las protegen de la inducción de apoptosis mediante TRAIL. El primer receptor descrito para TRAIL, denominado receptor de muerte 4 (DR4), incluye un "dominio de muerte" citoplásmico; DR4 transmite la señal de apoptosis transportada por TRAIL. Se han identificado receptores adicionales que se unen a TRAIL. Un receptor, denominado DR5, incluye un dominio de muerte citoplásmicos, y señala la apoptosis de forma muy similar a DR4. Los ARNm de DR4 y DR5 se expresan en muchos tejidos normales y líneas celulares tumorales. Se han identificado receptores señuelo tales como DcR1 y DcR2 que evitan que TRAIL induzca la apoptosis mediante DR4 y DR5. Estos receptores señuelo representan, por tanto, un mecanismo novedoso para regular la sensibilidad a una citoquina proapoptótica directamente en la superficie celular. La expresión preferida de estos receptores inhibidores en tejidos normales sugiere que TRAIL podría ser útil como agente anticanceroso que induce la apoptosis en células cancerosas, preservando las células sanas al mismo tiempo.

Se han realizado muchos avances en la terapia contra el cáncer desde la introducción de los fármacos citotóxicos quimioterapéuticos. Sin embargo, una de las consecuencias de la quimioterapia es el desarrollo/adquisición de fenotipos resistentes a fármacos y el desarrollo de resistencia multifármaco. El desarrollo de resistencia multifármaco sigue siendo un obstáculo importante para el tratamiento de dichos tumores y, por tanto, una mejora de la respuesta inmunitaria proporciona un enfoque alternativo.

Otra forma de terapia incluye la hipertermia, que es un procedimiento en el que un tejido del paciente se expone a alta temperatura (hasta 106 °F, 41 °C). En la aplicación de la hipertermia local, regional o de cuerpo completo pueden estar implicados dispositivos de calentamiento externos o internos. La hipertermia local implica la aplicación de calor a una zona pequeña, como un tumor. El calor se suele aplicar externamente con ondas de alta frecuencia dirigidas al tumor desde un dispositivo externo al cuerpo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, incluyendo alambres finos calentados o tubos huecos llenos de agua caliente, una antena de microondas implantada, o electrodos de radiofrecuencia.

El órgano o extremidad del paciente se calienta en la terapia regional, que se realiza mediante dispositivos que producen alta energía, como imanes: Alternativamente, parte de la sangre del paciente se puede extraer y calentar antes de perfundirse en la zona que se ha calentado internamente. También se puede implementar el calentamiento del cuerpo completo en los casos en que el cáncer se ha diseminado por todo el cuerpo. Con este fin, se pueden emplear sábanas de agua caliente, cera caliente, bobinas inductoras y cámaras térmicas.

La terapia hormonal también se puede utilizar junto con las realizaciones descritas en el presente documento o junto con cualquier otra terapia contra el cáncer anteriormente descrita. El uso de hormonas se puede utilizar en el tratamiento de determinados cánceres como el cáncer de mama, próstata, ovario o cuello de útero, para disminuir el nivel o bloquear los efectos de determinadas hormonas tales como testosterona o estrógeno. Este tratamiento se

utiliza frecuentemente junto con al menos otra terapia contra el cáncer como opción de tratamiento o para reducir el riesgo de metástasis.

Administración de composiciones

Las formulaciones farmacéuticas y vacunas pueden ser para administración por vía oral (sólido o líquido), parenteral (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (IV) o subcutánea), transdérmica (tanto pasiva o usando ionoforesis o electroporación), transmucosal (nasal, vaginal, rectal, o sublingual), o de inhalación, o usando inserciones bioerosionables, y se puede formular en formas farmacéuticas adecuadas para cada ruta de administración.

Para dirigirse a una célula tumoral *in situ*, las composiciones descritas anteriormente se pueden administrar a animales incluyendo seres humanos en cualquier formulación adecuada. Por ejemplo, se pueden formular las composiciones dirigidas a una célula tumoral en transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como suero salino fisiológico o una solución salina tamponada. Los transportadores y diluyentes adecuados se pueden seleccionar según el modo y ruta de administración y la práctica farmacéutica convencional. Una descripción de transportadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables ilustrativos, así como de formulaciones farmacéuticas, se puede encontrar en el Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto estándar en este campo, y en USP/NF. Se pueden añadir otras sustancias a las composiciones para estabilizar y/o conservar las composiciones.

Las composiciones se pueden administrar a los animales mediante cualquier técnica convencional. Las composiciones pueden administrarse directamente a un sitio diana mediante, por ejemplo, administración quirúrgica a un sitio diana interno o externo, o mediante un catéter dirigido a un sitio accesible mediante un vaso sanguíneo. Se conocen en la técnica otros métodos de administración, por ejemplo, la administración mediante liposomas o la difusión desde un dispositivo médico impregnado con la composición. Las composiciones pueden administrarse en un único bolo, múltiples inyecciones, o mediante infusión continua (por ejemplo, por vía intravenosa). Para administración parenteral, las composiciones se formulan preferentemente en una forma esterilizada exenta de pirógenos.

En algunas realizaciones, las composiciones o vacunas se administran mediante administración pulmonar. La composición o vacuna se administra a los pulmones de un mamífero durante la inhalación y atraviesa el revestimiento epitelial pulmonar hasta el torrente sanguíneo [véase, por ejemplo, Adjei, et al. *Pharmaceutical Research* 1990; 7:565 569; Adjei, et al. *Int. J. Pharmaceutics* 1990; 63:135 144 (acetato de leuprólido); Braquet, et al. *J Cardiovascular Pharmacology* 1989; 13(sup5):143 146 (endotelina1); Hubbard, et al. (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, pp. 206 212 (α 1-antitripsina); Smith, et al. *J. Clin. Invest.* 1989;84:1145-1146 (α 1-proteinasa); Oswein, et al. "Aerosolization of Proteins", 1990; *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II Keystone, Colorado* (hormona del crecimiento humana recombinante); Debs, et al. *J. Immunol.* 1988; 140:3482 3488 (interferón γ y factor de necrosis tumoral α); y la patente de Estados Unidos n.º 5.284.656 de Platz, et al. (factor estimulador de las colonias de granulocitos). Se describe un método y una composición para la administración pulmonar de fármacos para efectos sistémicos en la patente de Estados Unidos n.º 5.451.569 de Wong, et al. Véase también la patente de Estados Unidos 6.651.655 de Licalsi et al.

Se contemplan para su uso en la práctica de las realizaciones descritas en el presente documento una amplia variedad de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, nebulizadores, inhaladores de dosis medida, e inhaladores de polvo, todos ellos conocidos de la persona experta en la materia. Algunos ejemplos específicos de dispositivos comercialmente disponibles adecuados para la práctica de la presente invención son el nebulizador Ultravent (Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); el nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, CO); el inhalador de dosis medida Ventolin (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); y el inhalador para polvo Spinhaler (Fisons Corp., Bedford, MA). Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del agente terapéutico. Normalmente, cada formulación es específica del tipo de dispositivo utilizado, y puede implicar el uso de un material propulsor adecuado, además de los diluyentes, adyuvantes, tensioactivos y/o transportadores normalmente usados en terapia. Análogamente, también se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de transportadores.

Las formulaciones a utilizar en un dispositivo inhalador de dosis medida comprenderán general mente un polvo finamente dividido que incluye el agente terapéutico suspendido en un propulsor con ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualmente material normalmente empleado a tal fin, tal como un clorofluorocarbono, un hidrocfluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol, y 1,1,1,2 tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también se puede utilizar como tensioactivo.

Las formulaciones a dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene el agente terapéutico, y también puede incluir un agente de carga tal como lactosa, sorbitol,

sacarosa o manitol en cantidades que faciliten la dispersión de polvo desde el dispositivo, por ejemplo, 50 a 90 % en peso de la formulación. El agente terapéutico debería prepararse de forma más ventajosa en forma particulada con un tamaño promedio de partícula inferior a 10 mm (o micrómetros), lo más preferiblemente de 0,5 a 5 mm, para la administración más eficaz al pulmón distal.

También se contempla la administración nasal o a otra mucosa del agente terapéutico. La administración nasal permite el paso al torrente sanguíneo directamente después de la administración de la composición a la nariz, sin necesidad de depositar el producto en el pulmón. Las formulaciones para la administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano y saponina como un adyuvante.

La composición o vacuna se puede administrar junto con uno o más principios activos, composiciones farmacéuticas o vacunas adicionales. Los agentes terapéuticos se pueden administrar a un animal, preferentemente un mamífero, lo más preferiblemente a un ser humano.

Sistemas de liberación prolongada: Un primer sistema de liberación prolongada incluye sistemas de matriz, en el que el agente se incluye o dispersa en una matriz u otro material que sirve para retrasar la liberación del agente a un entorno acuoso (es decir, el fluido luminal del tracto GI). Cuando el agente se dispersa en una matriz de este tipo, la liberación del fármaco se produce principalmente desde la superficie de la matriz. Así, el fármaco se libera desde la superficie de un dispositivo, que incorpora la matriz una vez que se difunde por la matriz o cuando la superficie del dispositivo se erosiona, exponiendo el fármaco. En algunas realizaciones, ambos mecanismos pueden actuar simultáneamente. Los sistemas de matriz pueden ser grandes, por ejemplo, del tamaño de un comprimido (aproximadamente 1 cm) o más pequeños (< 0,3 cm). El sistema puede ser unitario (por ejemplo, un bolo), puede estar dividido para componerse de varias subunidades (por ejemplo, varias cápsulas constituyen una dosis unitaria) que se administran prácticamente simultáneamente, o pueden comprender una pluralidad de partículas, también denominado material multiparticulado. Un material multiparticulado puede tener numerosas aplicaciones en formulación. Por ejemplo, se puede utilizar un material multiparticulado como un polvo para rellenar la envoltura de una cápsula, o usarse tal cual para mezclar con alimento para facilitar la ingesta.

En una realización específica, una matriz multiparticulada comprende una pluralidad de partículas que contienen el principio, comprendiendo cada partícula el principio y/o un análogo del mismo, por ejemplo, en forma de una solución/dispersión sólida con uno o más excipientes seleccionados para formar una matriz capaz de controlar la velocidad de disolución del principio en un medio acuoso. Los materiales de matriz útiles en esta realización son generalmente hidrófobos tales como ceras, algunos derivados de celulosa, u otros polímeros hidrófobos. Si es necesario, los materiales de matriz se pueden formular opcionalmente con materiales hidrófobos, que se pueden utilizar como aglutinantes o potenciadores. Los materiales de matriz útiles para la fabricación de estas formas farmacéuticas son: etilcelulosa, ceras tales como parafina, aceites vegetales modificados, cera de carnauba, aceite de ricino hidrogenado, cera de abeja, y similares, así como poliestireno sintéticos tales como poli(cloruro de vinilo), poli(acetato de vinilo) copolímeros de acetato de vinilo y etileno, poliestireno, y similares. Los aglutinantes o agentes modificadores de la liberación solubles en agua o hidrófilos que opcionalmente se pueden formular en la matriz incluyen polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropil metil celulosa (HPMC), metilcelulosa, poli(N-vinil-2-pirrolidina) (PVP), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(alcohol vinílico) (PVA), goma xantana, carragenato, y otros materiales naturales y sintéticos de este tipo. Además, los materiales que actúan como agentes modificadores de la liberación incluyen materiales solubles en agua tales como azúcares o sales. Los materiales solubles en agua preferidos incluyen lactosa, sacarosa, glucosa y manitol, así como polímeros hidrófilos tales como, por ejemplo, HPC, HPMC, y PVP.

En una realización específica, un producto multiparticulado se define como aquel que se procesa mediante aglomeración controlada. En este caso, el agente se disuelve o se disuelve parcialmente en un transportador fusible adecuado, y se pulveriza sobre las partículas transportadoras que comprenden la sustancia de matriz.

Dosis: Una dosis eficaz de una composición de la materia sujeto divulgada en el presente documento se administra a un sujeto que lo necesita. Una "cantidad eficaz para tratamiento" o una "cantidad terapéutica" es una cantidad de una composición terapéutica suficiente para producir una respuesta mensurable (por ejemplo, una respuesta biológicamente o clínicamente relevante en un sujeto que se está tratando). Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones de la materia sujeto divulgada en el presente documento se pueden variar con el fin de administrar una cantidad del(de los) compuesto(s) activo(s) que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada en un sujeto concreto. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad de la composición terapéutica, la vía de administración, la combinación con otros fármacos o tratamientos, la gravedad de la dolencia que se va a tratar, y del estado y antecedentes médicos del sujeto que se está tratando. Sin embargo, está comprendido en los conocimientos del experto en la materia comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado, e incrementar la dosificación gradualmente hasta que se consiga el efecto deseado. La potencia de la composición puede variar y, por tanto, una "cantidad eficaz para tratamiento" puede variar. Sin embargo, utilizando los métodos de ensayo descritos en el presente documento, el experto en la materia puede evaluar rápidamente la potencia y eficacia de un compuesto candidato de la materia sujeto divulgada en el presente documento y ajustar el régimen terapéutico de acuerdo con ello.

Tras revisar la divulgación de la materia sujeto divulgada en el presente documento, una persona normalmente experta en la materia puede adaptar las dosificaciones a un sujeto individual, teniendo en cuenta la formulación concreta, el método de administración a utilizar con la composición, y la enfermedad concreta tratada. Otros cálculos de la dosis pueden tener en cuenta la altura y el peso del sujeto, la gravedad y estadio de los síntomas, y la presencia de condiciones físicas perjudiciales adicionales. Dichos ajustes o variaciones, así como la evaluación de cuándo y cómo realizar dichos ajustes o variaciones, son bien conocidos por los expertos en la técnica médica.

Por la cita de las diferentes referencias del presente documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia concreta sea "técnica anterior" respecto a su invención. Las realizaciones de las composiciones y métodos de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionadas descritas en el presente documento, incluyendo las de la invención. Se apreciará que serán evidentes para el experto en la materia las variaciones en las proporciones y alternativas en los elementos de los componentes mostrados.

Ejemplo 1: La expansión terapéutica de Treg in vivo mediante TNFRSF25 evita la inflamación pulmonar por alergia

La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF) consiste en al menos 19 ligandos y 30 receptores (TNFRSF) que se expresan diferencialmente en células linfoides y no linfoides. En los linfocitos TCD3⁺, la señalización de TNFSF funciona normalmente de forma específica de TCR para soportar varias fases de la respuesta inmunitaria, incluyendo la polarización, la expansión, la función efectora, la contracción, la memoria y la muerte. TNFRSF25 (DR3, denominado a partir de ahora en el presente documento como TNFR25) es uno de los miembros de TNFSF descubiertos más recientemente y se expresa principalmente en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y en linfocitos T citolíticos naturales (NKT) (Fang, L., Adkins, B., Deyev, V., y Podack, E.R. 2008. *J Exp Med* 205:1037-1048). TNFSF15 (TL1A), el ligando de TNFR25, se expresa en algunas células endoteliales y se induce rápidamente en células dendríticas y en macrófagos/monocitos tras la señalización de TLR4 o FcγR (Meylan, F., et al. 2008. *Immunity* 29:79-89; Prehn, J.L., et al. 2007. *J Immunol* 178:4033-4038). Los estudios *in vitro* demuestran que la señalización de TNFR25 en linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ o citolíticos naturales aumenta la producción de IL-2, IL-4 e IFNγ posterior a la activación de TCR o a la estimulación simultánea mediante IL-12 e IL-18 (Papadakis, K.A., et al. 2005. *J Immunol* 174:4985-4990). La señalización de TNFR25 también disminuye el umbral de los linfocitos T CD4⁺ T a la proliferación inducida por TCR en ausencia de coestimulación de CD28 mediante un mecanismo dependiente de IL-2 (Meylan *et al.* 2008; Migone, T.S., et al. 2002. *Immunity* 16:479-492).

La activación de TNFR25 mediante TL1A agrava la patología de la enfermedad en asma experimental, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), artritis reumatoide (AR) y encefalomiélitis autoinmunitaria experimental (EAE) (Pappu, B.P., et al. 2008. *J Exp Med* 205:1049-1062). En cada uno de estos estudios, la estimulación dependiente de TNFR25 de Th1, Th2 o Th17 polariza y los linfocitos T efectoras activados por TCR potencian la producción de las citoquinas efectoras relevantes de cada subconjunto T auxiliar. Las señales de TNFR25 no son necesarias para la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ T no expuestos anteriormente frente a los linajes Th1, Th2 o Th17. En algunos de estos informes, se han estudiado los modelos de ratón con ablación genética de TNFR25 o TL1A (Pappu, B.P. et al., 2008; Takedatsu, H., et al. *Gastroenterology* 135:552-567. *Bull*, M.J., et al. 2008. *J Exp Med* 205:2457-2464), modelos de ratón transgénico que expresan un TNFR25 dominante negativo o bloqueo sistémico de A. No se observaron anomalías inmunitarias o susceptibilidades a enfermedades en los modelos de ratón deficiente en TL1A o TNFR25 o en modelos de enfermedad autoagresiva donde se ha inhibido la señalización normal de TL1A a TNFR25. Además, en cada uno de estos informes, la expresión de TNFR25 o TL1A produce un fenotipo proinflamatorio que parece más peligroso para el animal que en ausencia de TNFR25 o TL1A. Hasta el momento no existen informes que analicen el papel de TNFR25 sobre los linfocitos T CD4⁺FoxP3⁺ reguladores (Treg), aunque Treg puede expresar TNFR25 (Pappu, B.P., et al. 2008. *J Exp Med* 205:1049-1062). Dada la importancia de Treg en la prevención de la autoinmunidad letal, la expresión de TNFR25 mediante Treg y la función de TNFR25 en la patogénesis de múltiples modelos de enfermedad autoagresiva, los autores decidieron estudiar el papel de TNFR25 sobre la función de Treg. Esta investigación reveló que los Treg expresan intensamente TNFR25, pero no lo hacen los linfocitos T FoxP3CD4⁺ convencionales (Tconv). La estimulación *in vivo* de TNFR25 en ausencia de antígeno exógeno usando un anticuerpo agonista, el clon 4C12, conduce a la proliferación rápida y selectiva de los Treg naturales, pero no de los Tconv, hasta un 30-35 % de todos los linfocitos T CD4⁺ en un plazo de cuatro días desde el tratamiento con 4C12 y es independiente de la implicación de TCR en la señalización de MHC II e IL-2. La expansión de Treg mediante TNFR25 protege contra la inflamación pulmonar tras estímulo con antígeno de las vías respiratorias superiores de ratones sensibilizados. Estos datos demuestran un nuevo papel para TNFR25 como regulador de Treg. Este papel puede proteger de la patogénesis de la enfermedad en el asma alérgica. Además, la expansión *in vivo* de Treg natural con agonistas de TNFR25 proporcionaría un método traducible, como alternativa a enfoques basados en IL-2 o *ex vivo*, para facilitar el uso clínico de la terapia con Treg en seres humanos.

Materiales y métodos:

Ratones: Los ratones C57BL/6 de tipo natural se adquirieron de Charles River Laboratories (Wilmington, MA).

Ratones indicadores Foxp3-RFP en un fondo B6 (Wan, Y.Y., y Flavell, R.A. 2005. Proc Natl Acad Sci U S A 102:5126-5131), FoxP3-GFP (Fontenot, J.D., et al. 2005. Immunity 22:329-341; Fontenot, J.D., Gavin, M.A., y Rudensky, A.Y. 2003. Nat Immunol 4:330-336) y CD45.1 SJ-L, MHC II^{-/-}, IL-2 receptor β mutante, los ratones CD80/86^{-/-} y CD4^{-/-} se reprodujeron en el animalario de los inventores. Los ratones TL1A^{-/-} se adquirieron de Lexicon Genetics Inc. (The Woodlands, TX) y se retrocruzaron en un fondo C57BL/6 por Speed Congenics. Los ratones se utilizaron a las 6-12 semanas de edad, y se mantuvieron en condiciones exentas de patógenos en el animalario de la UM. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el comité institucional para el cuidado y el uso animal de Miami.

Anticuerpos y reactivos. Los anticuerpos comerciales a utilizar en la campana de flujo se adquirieron de BD Pharmingen o eBioscience. El Armenian Hamster IgG control de isotipo se compró a eBioscience. DTA-1 (α -GITR) se obtuvo de BioXCell, LG.3A10 (α -IL-27) de BioLegend y 158321 (α -4-1BB) de R&D Systems. El ratón recombinante IL2 y el anticuerpo monoclonal anti-IL-2, clon JES6-1A12, se adquirieron de eBioscience. Los ratones recombinantes para el complejo IL2/anti-IL-2 (IAC) se generaron mediante incubación de 10.000 unidades de IL-2rm con 5 μ g de JES6-1A12 durante 15 minutos a 25°C. Los hibridomas de hámster armenio productores de anticuerpos contra el TNFR25 de ratón (4C12, agonista) se generaron como se ha descrito anteriormente (Fang, L., Adkins, B., Deyev, V., y Podack, E.R. 2008. J Exp Med 205:1037-1048). 4C12 (α -TNFR25) y OX-86 (α -OX40) se produjeron en biorreactores de fibra hueca (Fibercell Systems, Frederick, MD) y se purificaron de los sobrenadantes exentos de suero en una columna de proteína G (GE Healthcare, UK). Se usó rapamicina (Rapamune, Wyeth) a 75 μ g/kg/día como se ha descrito anteriormente (Araki, K., et al. 2009. Nature 460:108-112.). La ciclosporina-A (25 mg/kg/día) FK506 (3 mg/kg/día) e inhibidor Akt V (Tricirbina, 1,5 mg/kg/día, o dos veces al día, según se indica) se adquirieron de Calbiochem/EMD y se administraron mediante inyección intraperitoneal.

Citometría de flujo y clasificación celular: Se prepararon suspensiones de una sola célula a partir de bazo y ganglios linfáticos. 10⁶ células se prebloquearon con anticuerpo con anti-CD16/CD32 de ratón y se tiñeron con diferentes combinaciones de anticuerpos. La tinción intracelular se realizó de acuerdo con los procedimientos normalizados. El análisis mediante citometría de flujo se realizó en un instrumento Becton Dickinson FACS LSR II y el programa informático DIVA o FlowJo. La clasificación celular se realizó con un clasificador celular FACSaria (BD) tras enriquecimiento de los esplenocitos en linfocitos T CD4⁺ usando el kit EasySep Mouse CD4⁺ T cell Pre-Enrichment de Stem Cell Technologies.

RT-PCR en tiempo real: El ARN total se extrajo de cortes de tejido colónico o pulmonar congelado instantáneamente, y se transcribió de forma inversa con el kit RNeasy Mini Kit y el kit QuantiTect Reverse Transcription Kit de QIAGEN, respectivamente. La PCR en tiempo real se realizó por duplicado en un equipo ABI 7300 Light Cycler con sondas TaqMan de Applied Biosystems. Las muestras se normalizaron para la acción β .

Transferencia adoptiva: Para los estudios de las Figuras 2A y 2B, los linfocitos CD4⁺ totales se clasificaron mediante FACS de ratones FIR y se determinó el porcentaje de linfocitos FoxP3⁺RFP⁺ tras la clasificación. Los linfocitos CD4⁺ totales que contenían 10⁶ linfocitos FoxP3⁺ se transfirieron de forma adoptiva (i.v.) en ratones MHC II^{-/-} o CD4^{-/-} el día -2. El día 0, los ratones se trataron con anticuerpo 4C12 o el control de isotipo. Para los estudios de las Figuras 11A-11E, 2 x 10⁶ linfocitos CD4⁺FoxP3⁻ o CD4⁺FoxP3⁺ de ratones CD45.2⁺ FIR clasificados mediante FACS se transfirieron de forma adoptiva mediante inyección intravenosa en ratones CD45.1 SJL congénicos. Un día después, se administraron 10 μ g de 4C12 mediante inyección intraperitoneal. La expansión de las células transferidas se siguió diariamente mediante FACS (a partir de 3 días) en células de sangre periférica.

Ensayos de supresión in vitro: 1 x 10⁵ linfocitos CD4⁺CD25 se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos y se activaron con 2 μ g de anticuerpo anti-CD3 (2C11) soluble en presencia o ausencia de los APC (relación 1:1) y linfocitos CD4⁺FIR⁺ reguladores en diferentes proporciones. El IgG control, los anticuerpos 4C12, DTA1, se añadieron donde se indica a una concentración de 10 μ g/ml. Los cultivos se incubaron durante 72 horas y pulsaron con ³H-timidina (1 μ Ci/pocillo; Perkin Elmer, Waltham, MA) durante las últimas 6 h. Los isótopos incorporados se midieron mediante recuento por centelleo en medio líquido (contador Micro Beta TriLux, Perkin Elmer).

Inducción de asma alérgica: Los ratones se sensibilizaron mediante inyección i.p. de 66 μ g ovoalbúmina (albúmina de huevo de gallina cristalizado, calidad V; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) adsorbida con 6,6 mg de alum (sulfato de potasio y aluminio; Sigma-Aldrich) en 200 μ l de PBS el día 0, con un refuerzo i.p. el día 5. El día 12, los ratones recibieron i.p. bien 20 μ g de anticuerpo agonista contra TNFRSF25 (4C12) o 20 μ g de anticuerpo de cabra dirigido contra la IgH control de isotipo de hámster (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., Westgrove, PA) en 200 μ l de PBS. El día 16, los ratones recibieron un estímulo mediante aerosol con ovoalbúmina al 0,5 % (Sigma-Aldrich) en PBS durante 1 hora utilizando un nebulizador BANG (CH Technologies, Westwood, NJ) en un sistema de exposición por inhalación de flujo dirigido solamente a la nariz Jaeger-NYU (CH Technologies). El día 19, los ratones se sacrificaron, los pulmones se perfundieron con PBS, y se obtuvo el lavado broncoalveolar. Los lóbulos pulmonares se procesaron para determinar el ARN o para obtener suspensiones de célula única preparadas a partir del pulmón homogeneizado para análisis mediante citometría de flujo, o para histología pulmonar. El drenado de los ganglios linfáticos bronquiales también proporcionó el ARN para análisis posterior, así como análisis mediante citometría de flujo. La cuantificación de cortes pulmonares teñidos con ácido-Schiff (PAS) se realizó mediante el programa informático MacBiophotonics Image J por desconvolución del color (con el vector H PAS) seguido por asignación de

umbral a las imágenes (color [2], configurado a 100) y se contaron con el contador de núcleos (límites configurados entre 100-1000).

5 *Análisis estadístico:* Todos los análisis gráficos y estadísticos se realizaron con el programa ABI Prism. Se llevaron a cabo análisis emparejados utilizando el test de la T de Student. El análisis multivariante se realizó usando el ANOVA monolateral y la prueba posterior de Tukey. La significancia se indica como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$).

Resultados

10 *TNFR25 se expresa intensamente por los linfocitos T reguladores:* Antes de este estudio, no había informes que demostraran una función de TNFR25 sobre los linfocitos T CD4⁺FoxP3⁺ reguladores (Treg). para confirmar si existía expresión de TNFR25 por Treg, FoxP3 CD4⁺ (Tconv) y Treg se clasificaron por célula única desde ratones indicadores FoxP3 hasta más de un 99 % de pureza y posteriormente se analizó mediante citometría de flujo para determinar la expresión de TNFR25 así como de GITR (TNFRSF18), Ox40 (TNFRSF4, CD134) y 4-1BB (TNFRSF9, CD137). La clasificación de Treg vivos fue posible mediante el uso de ratones indicadores FoxP3 (ratones FIR) que expresan una proteína fluorescente roja de un transgén desactivado procedente de una construcción bicistrónica según el promotor FoxP3. Este análisis reveló que, aunque TNFR25, Ox40, GITR y 4-1BB se expresan tanto por Treg como por Tconv, la mayor diferencia relativa en los niveles de expresión se observó mediante una expresión muy elevada de TNFR25 en Treg en comparación con la expresión baja mediante Tconv (Figure 1A). Sin desear quedar vinculado por teoría alguna, la expresión diferencial de TNFR25 entre Treg y Tconv indica que TNFR25 puede tener un papel importante en el funcionamiento de Treg.

25 *La estimulación de TNFR25 expande rápidamente los linfocitos Treg in vivo:* La generación de un anticuerpo agonista de TNFR25, el clon 4C12, se ha descrito anteriormente (Fang, L., Adkins, B., Deyev, V., and Podack, E.R. 2008. J Exp Med 205:1037-1048). Mediante el uso de ratones FIR, se realizó un seguimiento continuo de la frecuencia y fenotipo de la población de linfocitos Treg en sangre periférica después del tratamiento con el anticuerpo agonista de TNFR25, 4C12. La inyección intraperitoneal (i.p) de 4C12 indujo una expansión rápida y muy reproducible de los linfocitos Treg CD4⁺FoxP3⁺ *in vivo* (Figura 1B). Esta expansión fue máxima en los días 4 y 5 después de la inyección de 4C12, con Treg FoxP3⁺ que comprendían un 30-35 % de los linfocitos T CD4⁺ totales en la sangre periférica durante el máximo de la respuesta. Los linfocitos Treg expandidos mediante 4C12 persistieron en la sangre periférica y en todos los sitios tisulares examinados durante dos semanas, y disminuyendo lentamente hasta los niveles sin estimular. El sitio de inyección no tiene ningún papel en esta expansión, como demuestra una expansión de linfocitos Treg equivalente tras la inyección de 4C12, por vía tanto intraperitoneal, subcutánea o intravenosa. La expansión de linfocitos Treg tras la inyección de 4C12 fue dependiente de la dosis, con una respuesta máxima observada a una dosis de solamente 10 µg, correspondiente a aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal (Figura 1B). Se descubrió que el tratamiento de los ratones FIR con la proteína de fusión TL1Alg purificada de ratón (100 µg) induce la expansión de linfocitos Treg con una magnitud y cinética análoga al tratamiento con el anticuerpo 4C12. La detección de la expresión de RFP en ratones FIR notificó fehacientemente la presencia de los transcritos de FoxP3; sin embargo, su posible existencia puede que no garantice la expresión de la proteína FoxP3 porque FoxP3 y RFP se traducen independientemente desde el transcrito de FoxP3-RFP. Por tanto, la expansión de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ tras la administración de 4C12 se confirmó en ratones no genomanipulados mediante la tinción con anticuerpos FoxP3 y en ratones indicadores genéticamente inactivados para FoxP3-GFP que expresan una proteína de fusión FoxP3-GFP.

45 *Entre los miembros de TNFR que expresan linfocitos Treg, TNFR25 es el único que produce la expansión de linfocitos Treg:* Los miembros de TNFRSF GITR y Ox40 se expresan mediante linfocitos Treg (Figura 1A) y realizan la actividad y proliferación de los linfocitos Treg. Se cree que la estimulación de los linfocitos Treg mediante 4-1BB puede modular tanto la actividad como la proliferación de estas células. Además, se cree que la estimulación de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ mediante el miembro de TNFRSF CD27 induce la expresión de FoxP3. Dado el solapamiento entre bien la supresión funcional o la inducción de los linfocitos Treg entre TNFR25 y estos otros miembros de TNFRSF, la expansión de los linfocitos Treg se comparó *in vivo* tras la estimulación de TNFR25, Ox40, 4-1BB, GITR o CD27. En todos los casos, se utilizaron anticuerpos monoclonales agonistas bien caracterizados del correspondiente receptor para disparar la señalización específica. Estos estudios demostraron que TNFR25 es único entre los miembros de TNFRSF analizados por su capacidad de inducir selectivamente la expansión de los linfocitos Treg (Figura 1C). Se ha informado recientemente que la expansión de los linfocitos Treg inducida por Ox40 requiere el agotamiento de IL-4, IL-6 e IFNγ (Ruby, C.E., et al. 2009. J Immunol 183:4853-4857). Por el contrario, TNFR25 induce la expansión de los linfocitos Treg *in vivo* sin necesitar manipulaciones adicionales.

60 *Las señales de TMHC II e IL-2 son necesarias para la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25:* *In vitro*, la proliferación de los linfocitos Treg se puede inducir mediante varias combinaciones de anticuerpos estimuladores de TCR, células presentadoras de antígenos y señales de IL-2. La inducción de la proliferación de linfocitos Treg *in vitro* se intentó en estos estudios usando muchas combinaciones diferentes de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, IL-2 recombinante, TGF-β y ácido retinoico con o sin anticuerpo agonista de TNFR25, y en todos los casos, la estimulación con TNFR25 no consiguió potenciar la proliferación de linfocitos Treg *in vitro*, indicando que se necesitaban señales adicionales (Tabla 1).

65

Tabla 1: Condiciones estudiadas *in vitro* usando varias poblaciones de linfocitos (indicadas) para analizar los requisitos de la proliferación de linfocitos Treg inducidos con TNFR25.

Condición	Esplenocitos	CD4+	LN
1. Sin estimular	X	X	X
2. Sin estimular+4C12	X	X	X
3. Sin estimular + 4C12 ret.	X		
4. α -CD3	X	X	X
5. α -CD3 + 4C12	X	X	X
6. α -CD3 + 4C12 ret.	X		
7. α -CD3 + TGF- β	X	X	X
8. α -CD3 + TGF- β + 4C12	X	X	X
9. α -CD3+RA	X		
10. α -CD3 + RA + 4C12	X		
11. α -CD3 + RA + 4C12 ret.	X		
12. α -CD3 + α -CD28	X	X	X
13. α -CD3 + α -CD28 + 4C12	X	X	X
14. α -CD3 + IL-2	X	X	X
15. α -CD3 + IL-2 + 4C12	X	X	X
16. α -CD3 + α -CD28 + IL-2	X		
17. α -CD3 + α -CD28 + IL-2 + 4C12	X		
18. α -CD3 + α -CD28 + TGF- β	X		
19. α -CD3 + α -CD28 + TGF- β + 4C12	X		
20. α -CD3 + IL-2 + TGF- β	X		
21. α -CD3 + IL-2 + TGF- β + 4C12	X		
22. α -CD3 + α -CD28 + IL-2 + TGF- β	X		
23. α -CD3 + α -CD28 + IL-2 + TGF- β + 4C12	X		
24. Un día <i>in vivo</i> + 4 días <i>in vitro</i> : IL-2 + escalado de 4C12	X		

5 Como TNFR25 puede afectar la sensibilidad de los linfocitos T CD4⁺ T a las señales de TCR, los siguientes experimentos se realizaron para determinar si la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25 era dependiente de la señalización de TCR *in vivo*. Ratones MHC II^{-/-} o CD4^{-/-} se transfirieron de forma adoptiva linfocitos CD4⁺ totales que contenían 10⁶ linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ purificados de ratones FIR. Como los ratones MHC II^{-/-} son deficientes en linfocitos T CD4⁺, se decidió utilizar ratones CD4^{-/-} como población de control para cualquier expansión homeostática que pudiera aparecer tras la transferencia adoptiva en un entorno con los linfocitos T CD4⁺ agotados. Los ratones se trataron con 4C12 o con el anticuerpo control de isotipo 2 días después de la transferencia adoptiva, y el porcentaje y la cantidad absoluta de linfocitos Treg se determinaron en los días 4 y 6 después de la inyección de anticuerpo (Figuras 2A, 28). Estos datos demuestran que, aunque los linfocitos Treg se expanden en grado similar en los ratones CD4^{-/-} y silvestres, las moléculas de MHC II son necesarias para la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25 *in vivo*. Se observó que el porcentaje de linfocitos Treg transferidos de forma adoptiva en ratones MHC II^{-/-} era inferior que en ratones CD4^{-/-} porque los ratones MHC II^{-/-} tienen más linfocitos CD4⁺ al principio que los ratones CD4^{-/-} (Figura 2A). Una comparación entre las cifras absolutas de linfocitos Treg transferidos de forma adoptiva (Figura 28) indica que se recuperaron cifras absolutas equivalentes de linfocitos Treg en ambos grupos. Estos estudios demuestran una necesidad de señales MHC II en la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25, que implica indirectamente la necesidad de la señalización de TCR para que los linfocitos Treg se vuelvan sensibles a la señalización de TNFR25, análogamente a la señalización de TNFR25 en linfocitos Tconv. Para proporcionar evidencia adicional de que las señales de TCR son necesarias para la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25, los ratones se pretrataron con ciclosporina A o FK506 y se analizaron las cifras de linfocitos Treg después del tratamiento con 4C12 o los anticuerpos control de isotipo (Figuras 2C, 2D). Estos estudios demuestran que, análogamente a lo observado en ausencia de señales MHC II, el estímulo de TNFR25 en presencia de ciclosporina A o FK506 no induce la proliferación de linfocitos Treg. El requisito de autoantígenos homólogos en el MHC II está aún en investigación, pero un régimen de ese tipo proporcionaría una explicación adicional para la selectividad de los linfocitos Treg para TNFR25 (además de la expresión selectiva de TNFR25 sobre los linfocitos Treg, Figuras 8A-8C) en ausencia de antígeno exógeno.

Se cree que la señalización de TNFR25 aumenta la sensibilidad de los linfocitos Tconv a las señales de IL-2 posteriores a las señales de TCR en ausencia de coestimulación con CD28. Dado el requisito de la activación tanto de MHCII como de NFAT para la activación de la expansión de los linfocitos Treg inducida por TNFR25 (Figuras 2A-2D) se determinó si las señales de IL-2 o CD80/186 eran necesarias adicionalmente. La expansión de linfocitos Treg en ratones que expresan una cadena β no funcional del receptor de IL-2 (Figura 2E) y en ratones CD80/186-/- (Figura 2F) se determinó 4 días después de la inyección de 4C12. Estos datos demuestran que la señalización del receptor de TCR e IL-2, pero no la coestimulación con CD80 o CD86, es necesaria para la expansión de linfocitos Treg inducida por TNFR25 *in vivo*. Sin desear quedar vinculado por teoría alguna, la señalización de CD28 y CTLA-4 en los linfocitos Treg puede que no sea un requisito para la proliferación inducida por TNFR25. Además, puesto que la combinación entre TNFR25, estimulación con TCR y señalización de IL-2 no consigue inducir la proliferación de linfocitos Treg *in vitro*, se requieren señales necesarias que también están en investigación.

Los linfocitos Treg estimulados con TNFR25 son hipersensibles a la proliferación inducida por IL-2 ex vivo: Aunque los requisitos de la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25 *in vitro* necesita más estudio, se observó que los linfocitos Treg purificados de ratones tratados con anticuerpos agonistas de TNFR25 eran hipersensibles a la proliferación inducida por IL-2 *ex vivo* (Figura 3A). Estos datos corroboran la importancia de las señales de IL-2 en la expansión de linfocitos Treg inducida por TNFR25 (Figura 2E), e indican que la estimulación de TNFR25 induce la expansión de los linfocitos Treg afectando la sensibilidad de los linfocitos Treg a las señales de IL-2. Se prevén varios mecanismos posibles, que podrían explicar esta observación: 1) TNFR25 podría aumentar la expresión de las subunidades del receptor de IL-2 sobre los linfocitos Treg, 2) TNFR25 podría potenciar la activación de STAT5 en linfocitos Treg, 3) TNFR25 podría potenciar la activación de mTOR en linfocitos Treg y 4) TNFR25 podría potenciar la activación de PI3-quinasa/Akt en linfocitos Treg. Para determinar la expresión de las cadenas alfa, beta y gamma del receptor de IL-2 se realizó una citometría de flujo con linfocitos Treg que experimentaron expansión *in vivo* posterior al tratamiento con el anticuerpo 4C12 comparado con los linfocitos Treg aislados de ratones tratados con los anticuerpos de IgG de control (Figura 3B). Estos datos demuestran que, aunque la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25) disminuye realmente tras la exposición a 4C12 (Figura 7A), la expresión de las cadenas beta y gamma (CD 122 y CD 132, respectivamente) permanece inalterada en los linfocitos Treg aislados de ratones tratados con 4C12 y los anticuerpos control de isotipo (Figura 3B), eliminando eficazmente la opción (1) como posibilidad. Para determinar si la fosforilación de STAT5 quedaba potenciada en los ratones tratados con 4C12, se asilaron linfocitos Treg de ratones tratados 4 días antes con 4C12 o anticuerpo control de isotipo y se expusieron a IL-2 *ex vivo* (10 ng/ml, 15 min). La tinción posterior de estos linfocitos Treg con anticuerpos fosfoespecíficos demostró que ni STAT5 ni la fosforilación de S6 se potenció en los linfocitos Treg aislados de ratones tratados con 4C12 en comparación con los ratones de control, eliminando eficazmente la segunda posibilidad (Figura 3C). Posteriormente, la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25 *in vivo* se encontró inalterada en presencia del inhibidor de mTOR, rapamicina, eliminando la tercera posibilidad (Figura 3D). Finalmente, para determinar si la señalización de Akt era necesaria para la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25, los ratones se trataron con anticuerpos agonistas de TNFR25 o con anticuerpo de control en presencia o ausencia del inhibidor selectivo de Akt1/2/3, tricibina (inhibidor de Akt V, AktiV). Estos estudios demuestran que la inhibición selectiva de la activación de Akt fue suficiente para inhibir la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25 de $33,69 \pm 1,253$ % en controles tratados con vehículo a $22,43 \pm 1,352$ % (N=6) cuando se trataron una vez al día con AktiV (no se muestran los datos, $p < 0,001$) y a $18,20 \pm 2,117$ % (N=3) cuando se trataron dos veces al día con AktiV (Figura 3E, $p = 0,0003$).

Comparación de la expansión de linfocitos Treg inducida por TNFR25 o el complejo del anticuerpo IL-2 en ratones no expuestos a antígeno: El único otro agente que expande selectivamente los linfocitos Treg *in vivo* se notificó por Boyman et al (Science 311:1924-1927, 2006) mediante el uso de un complejo de IL-2 recombinante y anticuerpo específico de IL-2 (IAC), el clon JES6-1A12. Así, la expansión de los linfocitos Treg *in vivo* se comparó directamente después del tratamiento con cualquiera de 4C12 o IAC (Figura 7A). Este análisis demuestra que la magnitud y la cinética de la expansión de los linfocitos Treg fueron similares después del tratamiento con 4C12 o IAC *in vivo*. Sin embargo, se observó que la contracción de los linfocitos Treg expandidos era prolongada después del tratamiento con 4C12 en comparación con el tratamiento con IAC. A diferencia de los linfocitos Treg expandidos con TNFR25, que expresan niveles intermedios de CD25, los linfocitos Treg expandidos con IAC expresaban elevados niveles de CD25 (Figura 7B). No se encontraron otras diferencias en la expresión de CD11a, CD28, CD45RA, CD62L, CD127, CTLA-4 intra o extracelular, OX40, PD-1, IL-17A o IFN γ por comparación de los linfocitos Treg expandidos mediante 4C12 con los linfocitos Treg expandidos mediante IAC.

La expansión de linfocitos Treg in vivo mediante TNFR25 reduce la inflamación pulmonar alérgica: Para determinar si los linfocitos Treg expandidos mediante 4C12 evitan la inflamación en un modelo de enfermedad, se sometió a ensayo si este tratamiento podría reducir la inflamación en un modelo bien caracterizado de inflamación pulmonar alérgica inducida en ratones estimulados con ovoalbúmina/alum en un estímulo de las vías respiratorias con ovoalbúmina. Los ratones se estimularon con ovoalbúmina/alum el día 0 y 5 y posteriormente se trataron con 4C12 IgG de hámster el día 12. Cuatro días después, en el momento de máxima expansión de linfocitos Treg, las vías respiratorias se sensibilizaron con ovoalbúmina aerosolizada en PBS o un control salino en PBS. La expansión máxima de los linfocitos Treg se confirmó por seguimiento de los linfocitos Treg en sangre periférica durante este periodo (Figura 4A). La expansión de linfocitos Treg inducida por 4C12 tras la sensibilización con ovoalbúmina/alum se retrasó ligeramente los dos primeros días, en comparación con la expansión en ratones no sensibilizados, pero

después los linfocitos Treg rápidamente se expandieron en una proporción mayor (50-55 %) de linfocitos T CD4⁺ totales en el día 4 (Figuras 4B, 4C). Los ratones se sacrificaron tres días después de la aerosolización, y se analizaron el fluido de lavado bronquioalveolar (BALF), ganglios linfáticos bronquiales (bLN) y tejido pulmonar.

5 El número total de células aisladas de los pulmones quedó inalterado entre los animales de control y los tratados con 4C12. Coherente con esta observación, el número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ T dentro de los pulmones fue similar entre los animales de control y los tratados con 4C12; sin embargo, en los ratones tratados con 4C12, el número de linfocitos Treg fue significativamente mayor (Figura 4B). El análisis de la composición de los linfocitos Treg del tejido pulmonar reveló que siete días después de la administración de 4C12 (y 3 días después de la aerosolización), la frecuencia de linfocitos Treg en los pulmones permaneció al 55 % de todos los linfocitos T CD4⁺ en comparación con un 22 % en los ratones tratados con IgG de hámster (Figura 4C). Se ha notificado que el equilibrio entre linfocitos Tconv y Treg es un mejor predictor de la patogénesis de la enfermedad que simplemente el número total de linfocitos Treg (Tang, Q., et al. 2008. Immunity 28:687-697; Monteiro, J.P., et al. 2008. J Immunol 181:5895-5903); la relación de CD4⁺FoxP3⁻ (linfocitos Tconv) y linfocitos Treg se determinó en tejido pulmonar (Tabla 2). Para confirmar que el fenotipo de linfocitos Treg infiltrantes en el pulmón era consistente con el fenotipo de linfocitos T expandidos con TNFR25 en ratones sin enfermedad, se analizaron los linfocitos Treg infiltrantes en el pulmón y se descubrió que no se podían distinguir de los linfocitos Treg infiltrantes en el pulmón aislados de ratones tratados con IgG por su expresión de GITR, OX40, PD-1, CD44, CD62L y CD69. Tabla 2: Se muestra el número total de linfocitos CD4⁺FoxP3⁻ (Tconv), CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) y la relación de linfocitos Tconv a Treg del total de células pulmonares recogidas, tal como se describe para las Figuras 10A-10E. El número de linfocitos se calculó multiplicando el número de células obtenidas en una suspensión de célula única del pulmón izquierdo por el porcentaje de células linfocitos controladas analizadas mediante citometría de flujo x el porcentaje de linfocitos Tconv o Treg dentro de la población linfocito controlada.

4C12 disminuye el número absoluto de linfocitos T _{conv} y la relación de linfocitos T _{conv} :T _{reg}		
	IgG	4C12
n.º de linfocitos T _{conv} /pulmón	78.200	23.340
n.º de linfocitos T _{reg} /pulmón	10.700	44.400
Relación T _{conv} :T _{reg}	7:1	1:2

25 Coherente con el análisis de las células del tejido pulmonar, el número de células aisladas del BALF aumentó significativamente después del estímulo con aerosol que contenía ovoalbúmina, pero no el control salino aerosolizado, en todas las condiciones, pero se redujo intensamente mediante el tratamiento con 4C12. El número total de eosinófilos en el BALF se asemeja al número total de células en el BALF, y se observó que el pretratamiento con 4C12 reduce significativamente la gravedad de la eosinofilia de las vías respiratorias (Figura 4D).

30 Las citoquinas proinflamatorias IL-4, IL-5 y IL-13 se han implicado intensamente en la patogénesis de la inflamación pulmonar alérgica. Para determinar si la expresión de estas citoquinas se redujo mediante el pretratamiento con 4C12, el ARN total se extrajo de pulmones congelados rápidamente tres días después de la aerosolización y se analizaron mediante RT-PCR. Este análisis demostró que la expresión de IL-4, IL-5 e IL-13 entre los linfocitos CD4⁺ infiltrantes en el pulmón se redujo significativamente después del tratamiento con 4C12, pero sigue elevada después del tratamiento con el anticuerpo control de isotipo, en comparación con los controles con solución salina aerosolizada (Figura 4E). Como control adicional, el nivel de expresión del ARN de FoxP3 se analizó y replicó las mismas proporciones relativas de los linfocitos CD4⁺ que expresaban FoxP3 observada en la citometría de flujo (comparar la Figura 4C a 4E). La histología del tejido pulmonar confirmó estos hallazgos, demostrando una infiltración de linfocitos y producción de moco en las vías respiratorias reducidos después del tratamiento con 4C12 en comparación con los controles de solución salina aerosolizada (Figura 4F y cuantificado en la Figura 4G).

45 *TNFR25 expande los linfocitos Treg sin activar o expandir los linfocitos Tconv:* Para determinar el fenotipo de los linfocitos Treg expandidos por 4C12, los autores analizaron los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ aislados de ganglios linfáticos periféricos, ganglios linfáticos mesentéricos, y bazos de ratones que habían recibido 4C12 o IgG de control de isotipo. Los linfocitos Treg expandidos con 4C12 eran predominantemente linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25 intermedios (int) y se descubrió que se habían expandido en todos los órganos linfocitos secundarios analizados (Figuras 5A, 5B y Figuras 8A, 8D). El tratamiento con 4C12 no alteró la expresión de CD11a, CD28, CD45RA, CD62L, CD127, CTLA-4 intra o extracelular, OX40, PD-1, IL-17A o IFN γ mediante linfocitos Treg. Aunque todos los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ siguen siendo positivos para GITR después del tratamiento con 4C12, la proporción de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ que expresan GITR se desplazó en favor del subconjunto CD25 int después del tratamiento con 4C12 (Figura 8B). La integrina α E β 7 se expresa por un subconjunto muy supresor de CD4⁺FoxP3⁺ que puede ser tanto positivo como negativo para CD25. El análisis de la expresión de CD103 reveló un aumento en la expresión de CD103 mediante los linfocitos Treg expandidos por 4C12, pero no los linfocitos Treg control (Figura. 8C). De forma importante, el análisis de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁻ y de los linfocitos CD8⁺ después del tratamiento con 4C12 reveló que la señalización de TNFR25 no aumenta la cifra absoluta o la proporción de estas poblaciones celulares. Para determinar si el tratamiento con 4C12 estimula la proliferación de linfocitos no Treg, los linfocitos T CD4⁺ Tconv los linfocitos T CD8⁺ se tiñeron con el marcador de proliferación, Ki67. Este análisis ilustró que el tratamiento con 4C12 en ausencia de antígeno exógeno no aumentó la proliferación de linfocitos Tconv o linfocitos T CD8⁺. Además, la

tinción de linfocitos CD8⁺ y linfocitos FoxP3⁻ CD4⁺ para CD44, CD62L y CD69 no reveló diferencias entre ratones tratados con 4C12 e IgG. Así, la señalización de TNFR25 expande selectivamente los linfocitos Treg sin inducir la expansión o la activación de los linfocitos efectores CD4⁺ o CD8⁺ en ausencia de antígeno exógeno.

5 *La estimulación de TNFR25 induce la proliferación de linfocitos Treg naturales in vivo:* El aumento de linfocitos Treg después del tratamiento con 4C12 podría resultar bien de una expresión de FoxP3 *de novo* o de la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺. Para diferenciar entre estas dos posibilidades, se determinó la expresión del marcador de proliferación, Ki67, sobre linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ (Figuras 5C, 5D). Como los datos muestran que el aumento en la relación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25^{int} con respecto a los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25^{hi}, la mayoría de linfocitos
10 Ki67⁺ era CD4⁺FoxP3⁺CD25^{int} en los ratones tratados con 4C12. Una proporción menor (~27 %) de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ no se tiñó con Ki67 (Figuras 5C, 5D), y la mayoría de estos linfocitos eran CD25^{hi}. No quedó claro si la proliferación observada de linfocitos CD25^{int} después del tratamiento con 4C12 era resultado de la estimulación selectiva de linfocitos CD25^{int} o si los linfocitos Treg se estimulaban para proliferar independientemente de la expresión de CD25, que se redujo durante la proliferación.

15 La mayor proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25^{int} no descarta conclusivamente la posibilidad de que la señalización de TNFR25 pueda estimular la expresión de FoxP3 *de novo* por los linfocitos CD4⁺FoxP3⁻. Para analizar esta posibilidad, se llevaron a cabo experimentos de transferencia adoptiva infundiendo linfocitos CD4⁺FoxP3⁻ o CD4⁺FoxP3⁺ muy purificados (>99 % pureza) de ratones CD45.2⁺ FIR en ratones B6/SJL congénicos para CD45.1. Estos estudios permitieron rastrear los linfocitos CD45.2⁺ de transferencia adoptiva después del tratamiento con 4C12 en hospedadores CD45.1⁺ y realizar un seguimiento de la persistencia, inducción del silenciamiento de FoxP3-RFP mediante linfocitos CD45.2⁺CD4⁺ de transferencia adoptiva (Figuras 5E-5H). Se eligió deliberadamente realizar estos experimentos en ratones completamente inmunocompetentes para evitar cualquier complicación que pudiera surgir de la expansión homeostática de linfocitos Treg tras la transferencia adoptiva en cepas inmunodeficientes genética o experimentalmente. La transferencia de 2X10⁶ células clasificadas (Figura 9A) a receptores CD45.1⁺ inmunocompetentes fue suficiente para detectar una población rara, pero fácilmente distinguible, de linfocitos CD45.2⁺CD4⁺ en la sangre periférica durante al menos dos semanas después de la transferencia adoptiva (Figuras 5G, 5H). La estimulación con TNFR25 de ratones receptores mediante 4C12 después de la transferencia adoptiva no estimuló *de novo* la expresión de FoxP3 mediante linfocitos CD4⁺FoxP3⁻ (Figura 5E) que permaneció con una frecuencia del 0,5 % y de FoxP3-RFP independientemente de del tratamiento con 4C12 o anticuerpo de control. La frecuencia de los linfocitos FoxP3⁺RFP⁺ después de la transferencia adoptiva de 2 X 10⁶ linfocitos fue del 0,04 % para linfocitos CD4 en la sangre periférica de ratones tratados con anticuerpo de control y aumentó a un 0,11 % en ratones tratados con 4C12 (Figura 5F), un aumento de tres veces la frecuencia de linfocitos FoxP3⁺RFP⁺CD45.2⁺. Este resultado es coherente con la medida de expansión de los linfocitos Treg FoxP3⁺ mediante el anticuerpo agonista TNFR25 en ratones no transferido (Figura 1B). Los datos indican que el tratamiento con 4C12 estimula selectivamente la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ que mantienen la expresión de FoxP3 tras la expansión (Figura 5F). Los datos muestran que la señalización de TNFR25 estimula principalmente la proliferación aumentada de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺CD25^{int} dando como resultado un aumento sistémico de los linfocitos Treg. Estos estudios también demuestran que, aunque los linfocitos CD4⁺FoxP3⁻ de transferencia adoptiva no se expanden en ningún momento después del tratamiento con 4C12 (Figura 5G), la expansión de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de transferencia adoptiva sigue una cinética similar a la expansión y contracción de los linfocitos Treg endógenos en ratones FIR (comparar la Figura 5H con la Figura 1B). De manera importante, los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de transferencia adoptiva mantienen la expresión de FoxP3 tanto durante como después de la expansión, lo que sugiere que la contracción observada de la combinación de linfocitos Treg expandidos es resultado de la muerte celular en lugar de la pérdida de expansión de FoxP3 (Figuras 5F, 5H). Si la combinación expandida de linfocitos CD45.2⁺CD4⁺FoxP3⁺ de transferencia adoptiva perdieran la expresión de FoxP3 en cualquier momento durante el experimento, la fracción de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de los linfocitos CD45.2⁺CD4⁺ aumentaría; sin embargo, esto no sucede. Se observó que una pequeña proporción de los linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ de transferencia adoptiva (<5 %) mostraban la expresión de FoxP3 (Figura 5E) y una pequeña proporción de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ transferidos (<5 %) perdió la expresión de FoxP3 (Figura 5F) durante el experimento. Dichas inestabilidades poco importantes en la expresión de FoxP3 probablemente explican estas observaciones.

20 *Los linfocitos Treg expandidos mediante TNFR25 son muy supresores ex vivo:* Para determinar si los linfocitos Treg expandidos mediante 4C12 retienen la actividad supresora, se purificaron linfocitos Treg a partir de ratones FIR durante 4 días tras el tratamiento tanto con 4C12 como con anticuerpo IgG de control de isotipo (Figura 6A). Estos subconjuntos de linfocitos Treg se usaron a continuación en un ensayo de proliferación tradicional. Los linfocitos Treg purificados a partir de ratones tratados con 4C12 suprimieron la proliferación de linfocitos CD4⁺CD25⁺ en un grado mayor que los ratones tratados con el anticuerpo control de isotipo (Figuras 6A-6D). Se observó la supresión de la proliferación de linfocitos Tconv mediante los linfocitos Treg expandidos con 4C12 en presencia y ausencia de células presentadoras de antígenos (APC) en el ensayo de supresión *in vitro* (Figura 6A vs. 6B). Para determinar si la adición de 4C12 durante el ensayo de supresión modulaba la actividad supresora de Treg, se llevaron a cabo ensayos idénticos de los linfocitos como se describe (Figuras 6A, 6B) en presencia de 4C12 o un anticuerpo agonista de G1TR conocido por liberar la supresión mediada por Treg a partir de Tconv (clon DTA-1) o el isotipo del anticuerpo de control (Figuras 6C, 6D). La presencia de anticuerpos agonistas de TNFR25 o G1TR restauró parcialmente la proliferación de linfocitos Tconv, produciendo ambos anticuerpos un efecto similar en ausencia de APC independientemente de si los linfocitos Treg se obtuvieron de 4C12 o de los ratones tratados con el isotipo de

IgG del control (Figura 6c). De forma interesante, en presencia de APC, DTA-1 indujo la proliferación de Tconv en presencia de linfocitos Treg procedentes de ratones tratados con el isotipo de IgG del control en una mayor extensión que con los linfocitos Treg procedentes de ratones tratados con 4C12 (Figura 6D). La presencia de APC no altera significativamente la restauración parcial de la proliferación de linfocitos Tconv en presencia de 4C12. Los controles demostraron también que el efecto estimulador de 4C12 solo sobre los linfocitos Tconv fue mínimo, y significativamente menor que el efecto estimulador de GITR sobre los linfocitos Tconv (Figuras 6c, 6D). Para demostrar adicionalmente que la inhibición de la actividad supresora de linfocitos Treg mediante 4C12 era específica para el efecto de TNFR25 expresado por los linfocitos Treg y no por los linfocitos Tconv, se llevaron a cabo ensayos de supresión utilizando linfocitos Tconv transgénicos que expresaban TNFR25 negativo dominante (Figura 6E). Estos datos demuestran que la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos Treg por la señalización de TNFR25 se produce en condiciones donde solo Treg expresa un TNFR25 funcional indicando que este efecto es debido a la señalización por TNFR25 sobre los linfocitos Treg y no sobre los linfocitos Tconv. De forma notable, los linfocitos Treg se expandieron *in vivo* con 4C12 y a continuación se sometieron a los ensayos de supresión *in vitro* (Figuras 6A-6B) que son muy supresores en condiciones donde el anticuerpo 4C12 ya no está presente. Es solo cuando el anticuerpo 4C12 se mantiene en el curso del ensayo de supresión que se observa la inhibición parcial de la actividad supresora de los linfocitos Treg. Como 4C12 indujo la proliferación de los linfocitos Treg CD25^{int}, y en algunos estudios, el nivel de expresión de CD25 es predictivo de la actividad supresora de los linfocitos Treg, la actividad supresora de los linfocitos Treg CD25^{hi} y CD25^{int} clasificados a partir de ratones tras el tratamiento con 4C12 o con el anticuerpo control de isotipo cuando se compararon (Figura 9B y Figura 6F). La actividad supresora no depende del nivel de expresión de CD25 debido a que los linfocitos Treg CD25^{hi} y CD25^{int} fueron ambos muy supresores en el ensayo de proliferación (Figura 6F). De forma interesante, los linfocitos Treg CD25^{int} expandidos con 4C12 tuvieron ligeramente más actividad supresora que los linfocitos Treg CD25^{int} procedentes de los ratones tratados con IgG (Figuras 6F, bares 3-4). Este hallazgo indica que la actividad supresora aumentada de los linfocitos Treg expandidos con 4C12 en comparación con los linfocitos Treg tratados con IgG (Figuras 6A-6D) es al menos parcialmente atribuible a la actividad de los linfocitos CD25^{int}.

Discusión:

Se han reconocido miembros de la familia del receptor TNF como importantes coestimuladores de respuestas celulares inmunoefectoras y como inductores de la apoptosis. Aquí, se identificó TNFR25 como una novedosa función no redundante como regulador de los linfocitos T reguladores. TNFR25 media la sólida expansión de los linfocitos Treg *in vivo* en ratones inmunocompetentes mientras que al mismo tiempo restringe parcialmente su actividad supresora. No se han notificado otras señales fisiológicas, incluyendo las de otros miembros de la familia TNFR para ejercer actividad similar sobre los linfocitos Treg. Además, la observación de que la señalización de TNFR25 induce la expansión de los linfocitos Treg con similar magnitud y cinética al único reactivo notificado diferente para expandir selectivamente los linfocitos Treg (complejo IL2/anticuerpo dirigido contra IL-2 (Boyman, O., et al. 2006. Science 311:1924-1927), indica que los agonistas de TNFR25 pueden proporcionar una alternativa traducible a IL-2 basándose en los tratamientos para uso terapéutico en seres humanos.

Sin pretender quedar ligado por teoría alguna, la pareja del ligando: receptor de TNFR25 y de TL1A está implicada en la generación de la inflamación patógena en diversos modelos de enfermedad. Hasta el momento, no existe un informe individual que identifique un papel para TNFR25 o TL1A en el mantenimiento de la salud o la prevención de la enfermedad que indique que dicho papel no se pueda descubrir. La disponibilidad del anticuerpo agonista de TNFR25, 4C12 permitió en el primer momento el estudio de TNFR25 en diversos subconjuntos de linfocitos T en un escenario donde la disponibilidad temporal de la señalización de TNFR25, las señales inflamatorias y el antígeno exógeno se controlarían independientemente. La identificación de un papel protector para los linfocitos Treg expandidos con TNFR25 en la inflamación pulmonar alérgica no contradice los estudios previos implicando TL1A en la exacerbación de la inflamación pulmonar alérgica debido a que en los actuales estudios, la señalización de TNFR25 precede a la exposición del antígeno mientras que en estudios anteriores, la señalización de TNFR25 sigue al estímulo del antígeno. Más bien, la expresión diferencial de TNFR25 por los linfocitos Treg (expresión elevada) en comparación con los linfocitos Tconv (expresión baja) indica que la secuencia de exposición de los linfocitos T al antígeno, las señales coestimuladoras o TL1A pueden gobernar si una respuesta inflamatoria concreta es suprimida por los linfocitos Treg o inducirse por los linfocitos Tconv. En los estudios actuales, el tratamiento con los agonistas de TNFR25 antes del estímulo antigénico de las vías aéreas indujo la acumulación preferente de linfocitos Treg, pero no de Tconv, en las vías aéreas y se asoció con una reducción en la producción de IL-4, IL-5, e IL-13, así como una eosinofilia y producción de moco reducidas en el espacio bronquialveolar.

Fueron necesarias las señalizaciones de MHC II e IL-2 pero no la coestimulación de CD80/86 para la proliferación de los linfocitos Treg inducidos por TNFR25. Aunque se requieren las señalizaciones de MHCII e IL-2 para la proliferación de Treg inducida por TNFR25, la provisión de señalizaciones de TCR e IL-2 no son suficientes para inducir la proliferación de Treg *in vitro*, indicando que puede requerirse una señalización adicional que está en investigación adicional. Aunque el requerimiento de MHCII implica fuertemente la proliferación de linfocitos Treg inducidos por TNFR25 en TCR expresados mediante linfocitos Treg, estos datos son indirectos. Como evidencia adicional de un papel de TCR en este proceso, se ha observado que la estimulación de TNFR25 no induciría la proliferación de linfocitos Treg en presencia de los inhibidores de NFAT, ciclosporina A o FK506; proporcionando evidencias de que los acontecimientos de señalización son posteriores a la proliferación de linfocitos Treg debido a

la influencia de TCR. Estos datos indican que Treg y Tconv pueden llegar a ser permisivos para la señalización de TNFR25 posterior a la ligadura de TCR, y que la selectividad de los linfocitos Treg de los anticuerpos agonistas de TNFR25 puede ser al menos parcialmente debida a la disponibilidad del autoantígeno en condiciones no inflamatorias. Si la estimulación de TCR es persistente o no con el autoantígeno contribuye también a la expresión aumentada de TNFR25 en los linfocitos Treg en comparación con Tconv, o no se sabe también si la diferencia se mantiene mediante las rutas de señalización no relacionadas.

Dado que se requieren al menos dos rutas receptoras adicionales (receptor IL-2 y TCR) para la proliferación de linfocitos Treg estimulados por TNFR25, la confluencia de las rutas de señalización posteriormente a estos receptores conduce a que la proliferación de los linfocitos Treg pueda ser compleja. Se proporcionó una pista de cómo pueden interactuar estas rutas mediante la observación de que *ex vivo*, los linfocitos estimulados con TNFR25 eran hipersensibles a la señalización de IL-2. Se determinó posteriormente que la inhibición de la ruta de P13-quinasa/Akt proporcionó un enlace posteriormente del receptor de IL-2 es importante para la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25. Estos datos indican que la inhibición mediada por PTEN de la ruta P13-quinasa/Akt restringe la proliferación de linfocitos Treg posteriormente a la señalización de IL-2. La identificación de MHCII, IL-2R, NFAT y Akt proporciona un punto de partida tangible para elucidar los acontecimientos de señalización posteriormente a la estimulación de TNFR25 que culmina en la proliferación de linfocitos Treg, pero se van a llevar a cabo estudios adicionales para elucidar los mecanismos moleculares de las interferencias entre estas diversas rutas.

La expansión de los linfocitos Treg inducida por TNFR25 se produce con una cinética y magnitud similares a la expansión de linfocitos Treg inducida por IAC, pero da como resultado un aumento en la proporción de linfocitos CD25^{int} más bien que linfocitos CD25^{hi}. La importancia de esta observación es desconocida; sin embargo, el aumento de la expresión de CD25 por los linfocitos Treg tras la exposición a IAC sugiere un bucle de retroalimentación positiva impulsado por la disponibilidad aumentada de IL-2. En el caso de que TNFR25 induzca la expansión de los linfocitos Treg, la concentración de IL-2 no está manipulada, de tal manera que la disminución resultante en la expresión de CD25 mediante la proliferación de los linfocitos Treg puede dar como resultado una competición aumentada para la IL-2 endógena procedente de una población de linfocitos Treg en expansión. La interrogación de los diferentes marcadores superficiales expresados por los linfocitos Treg reveló pocas diferencias entre los linfocitos Treg expandidos con TNFR25 e IAC, aunque algunos, incluyendo GITR, fluctuaron entre las poblaciones de CD25^{int} y CD25^{hi}. El único marcador analizado que aumentó consistentemente tras el tratamiento con 4C12 era CD103, que contribuye a la retención de los linfocitos Treg en los tejidos.

Los datos complementan datos recientes que notifican papeles para la estimulación de TNFR25 en la inducción de respuestas inflamatorias con la inhibición de la actividad supresora de los linfocitos Treg en una teoría unificada del papel de las interacciones de TL1A:TNFR25 en la inducción y la resolución de la inflamación del tejido. El mecanismo preciso por el cual la estimulación de TNFR25 induce la proliferación de los linfocitos Treg e inhibe su actividad supresora sigue estando poco claro, debido en parte a que no se entienden bien las rutas de señalización activadas por las señales de TNFR25, y son objeto de investigación adicional. Además, se desconoce si la expansión inducida por TNFR25 de los linfocitos Treg *in vivo* es dependiente del reconocimiento del autoantígeno y, de forma similar a IAC, las condiciones necesarias para la expansión de los linfocitos Treg inducida por TNFR25 *in vitro* permanece poco clara y está en investigación adicional. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se ha teorizado que la identificación de un requerimiento *in vivo* para MHC II permite que la proliferación de linfocitos Treg inducida por TNFR25 indique la implicación de TCR es un requisito general para que la costimulación de linfocitos T inducida por TNFR25 en ausencia de antígeno exógeno se mantenga mediante la expresión preferente de TNFR25 por los linfocitos Treg y la disponibilidad del autoantígeno presentada por MHC II. La sensibilidad aumentada de los linfocitos Treg a la estimulación de TNFR25 a partir de ratones inmunizados frente a no inmunizados es también intrigante, y puede indicar funciones distintas para TNFR25 en respuestas inmunitarias primarias frente a secundarias.

Independientemente del mecanismo, debido a la importancia de la señalización de TNFR25 en la patogénesis de numerosos crecimientos de enfermedades inflamatorias (asma, IBD, EAE, AR) es importante comprender el papel espacio-temporal que la señalización de TNFR25 ejerce sobre diversos subconjuntos de linfocitos CD4⁺ T. Es muy probable que, de forma similar a OX40, el contexto temporal de la señalización de TNFR25 dirija diferencialmente la inmunidad inflamatoria y reguladora. La capacidad única de señalización de TNFR25 se expande rápida y que inhibe transitoriamente los linfocitos T reguladores naturales CD4⁺FoxP3⁺ puede tener importantes consecuencias para el tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria, la infección crónica, el trasplante y el cáncer.

Ejemplo 2: La expansión terapéutica de linfocitos Treg in vivo mediante TNFRSF25 retrasa el rechazo agudo de los corazones alogénicos en un modelo de trasplante de corazón heterotópico.

Para estudiar la inducción de la tolerancia por linfocitos Treg naturales expandidos mediante 4C12, se seleccionó un modelo de trasplante de corazón que se describe bien para estudios de tolerancia. Se trasplantaron corazones de ratones CBA/J (H2^d) en el abdomen de ratones C57BL/6 (H2^b) en el día 0. En el día -4, un grupo de ratones se trató con el anticuerpo agonista de TNFRSF25, el clon 4C12, mediante inyección intraperitoneal (20 µg/ratón), y los otros se trataron con IgG de control de isotipo de hámster. En el momento del trasplante, se confirmó la expansión de los

linfocitos Treg en la sangre en el grupo tratado con 4C12. Se controló la supervivencia del aloinjerto palpando el corazón manualmente y se calificó el pulso en una escala de 0 a 4 (0 = sin pulso; 1 = muy leve; 2 = leve; 3 = moderado; 4 = fuerte). Se define el rechazo como el cese del latido cardíaco palpable. En el momento del rechazo (= cuando el latido cardíaco se detuvo), se retiró el injerto, se fijó la formalina y se sometió a examen patológico. La pérdida de función del injerto a las 48 h del trasplante se considera un fallo técnico (<5 %) y se omitió del análisis adicional.

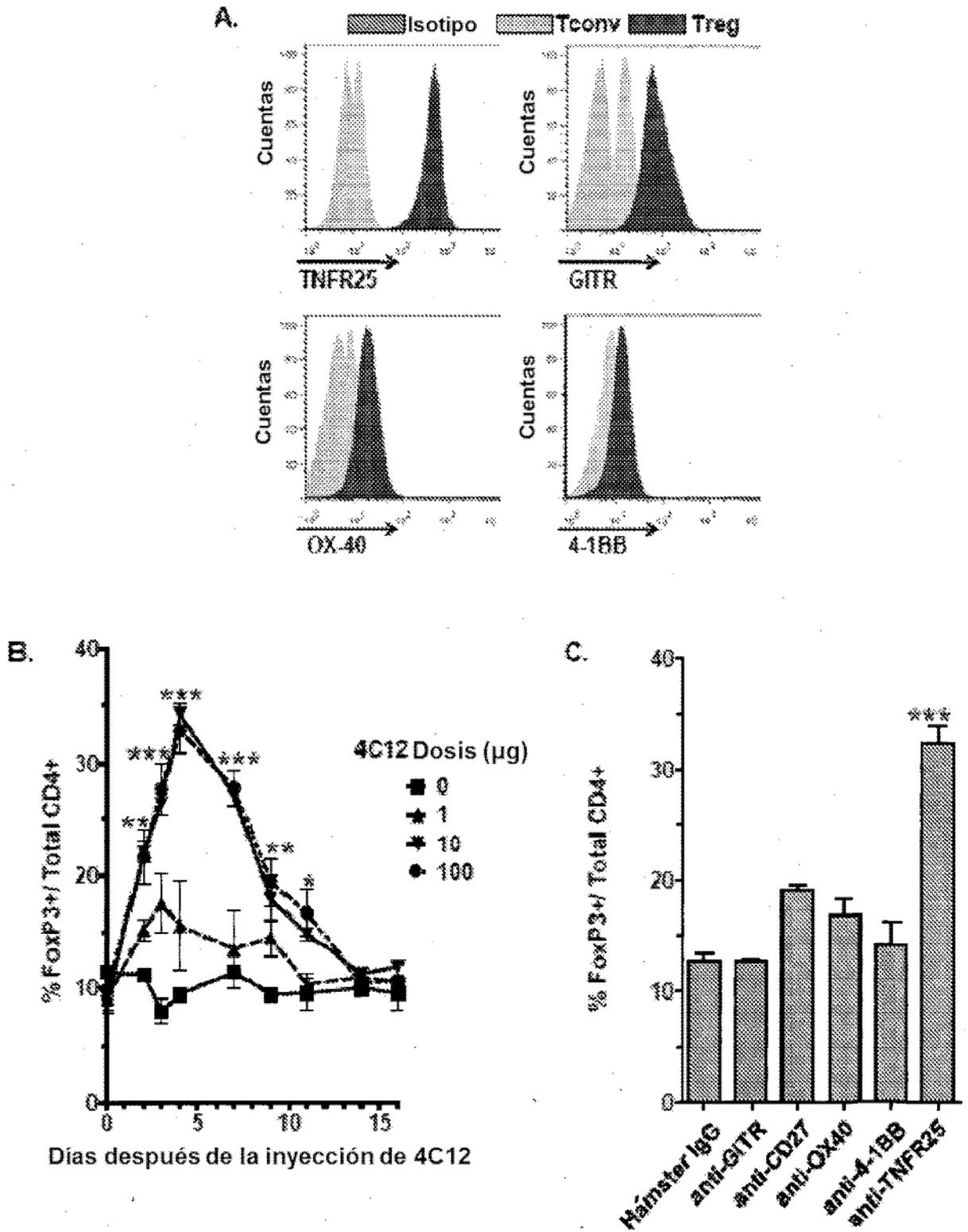
Ejemplo 3: La expansión terapéutica de linfocitos Treg in vivo mediante agonistas de TNFRSF25 protege de colitis inducida por dextrano-sulfato de sodio, un modelo de ratón de la enfermedad de Crohn.

Se proporcionaron ratones C57BL/6 o TL1A inactivados genéticamente con sulfato de sodio dextrano al 3 % (DSS) disuelto en agua corriente *ad libitum* durante 7 días. Se controló el peso diariamente comenzando 4 días antes de la provisión de DSS (día -4 del experimento). En el día -4, un grupo de ratones se trató con el anticuerpo agonista de TNFRSF25, el clon 4C12, mediante inyección intraperitoneal (20 µg/ratón), y los otros se trataron con IgG de control de isotipo de hámster. Se midió la mortalidad cuando los animales perdieron \pm 20 % del peso corporal de partida (Figura 10A). En algunos experimentos, los animales se sacrificaron en el día 5 del experimento y se preparó el ARN total utilizando el kit RNeasy miniprep (Qiagen) procedente de tejido colónico, lavado con PBS congelado de forma ultrarrápida. Se transcribió de forma inversa el ARN posteriormente (Quantitect RT, Qiagen) y se amplificó el ADNC mediante la PCR en tiempo real utilizando las sondas Taqman (Applied Biosystems) para los transcritos indicados (Figura 10B). Se muestran los datos como el cambio de veces en la expresión de ratones TL1A inactivados genéticamente en comparación con ratones C57BL/6 del control. Se controló el porcentaje de pérdida de peso corporal y se representó gráficamente durante el curso del estudio en cada grupo experimental (Figura 10C). En los experimentos donde se sacrificaron animales en el día 5 del experimento para el aislamiento del ARN se aislaron ganglios linfáticos mesentéricos para el análisis, mediante citometría de flujo de la proporción de linfocitos CD4⁺ que expresaban el factor de transcripción FoxP3, indicativo de la reserva de linfocitos T reguladores (Figura 10D). Finalmente, se llevó a cabo la transcripción inversa utilizando ARN aislado procedente de los grupos de tratamiento indicados como se describe para la Figura 10B y se sometió a la RT-PCR de los transcritos indicados. Las barras de errores indican el promedio \pm S.E.M. para \pm 3 ratones por experimento y un mínimo de 2 experimentos por panel.

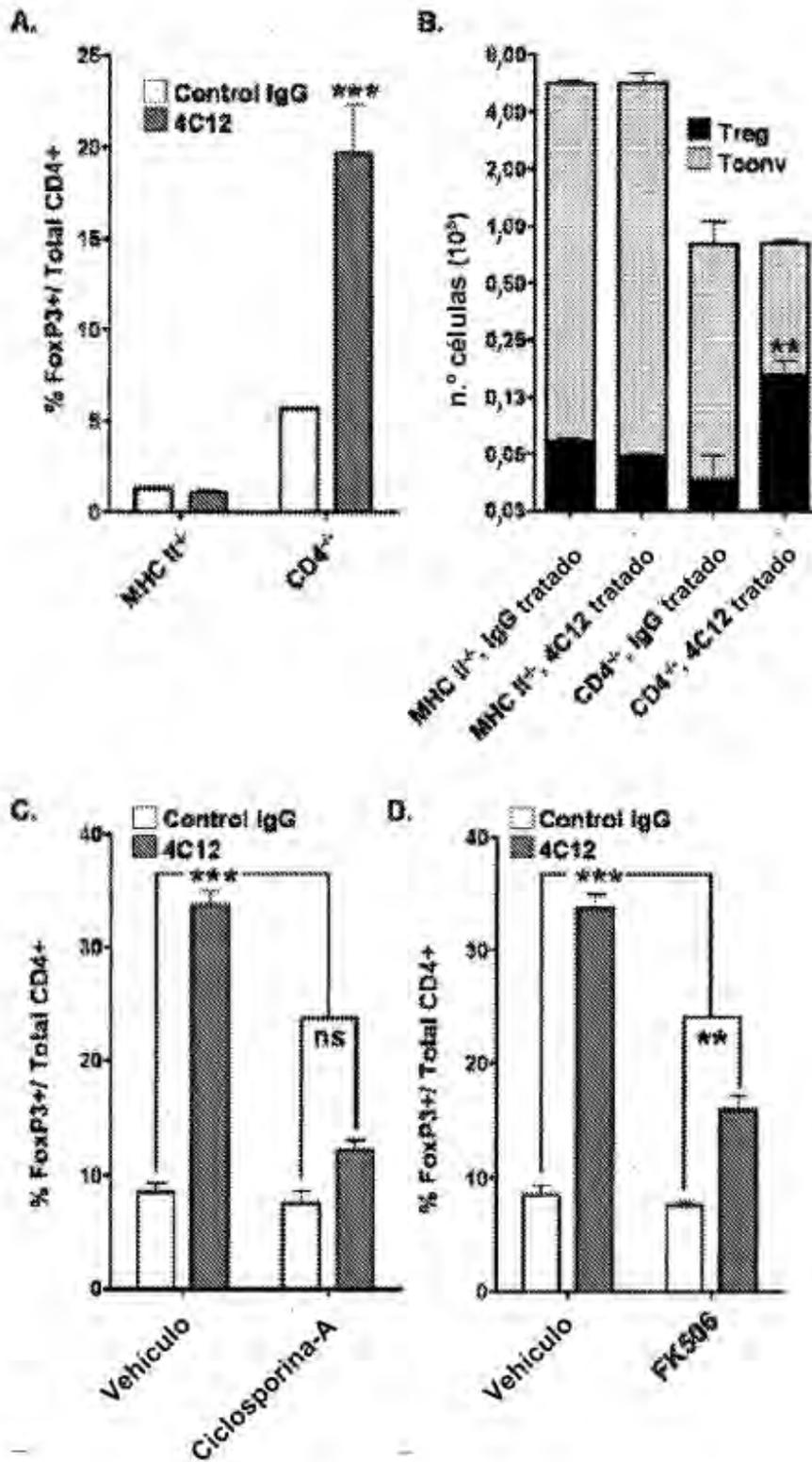
Estos datos demuestran que el pretratamiento con un anticuerpo agonista de TNFRSF25 conduce a la expansión de linfocitos reguladores FoxP3⁺ dentro del intestino, evita la pérdida de peso y la inflamación letal del colon, y evita la expresión de citoquinas inflamatorias entre las que se incluyen IL-1 β e IL-6 del tejido colónico. En su conjunto, estos datos proporcionan evidencia de que la estimulación de TNFRSF25 puede evitar la inflamación letal del intestino en un modelo de ratón habitualmente utilizado para imitar las características inflamatorias de la enfermedad de Crohn en seres humanos.

REIVINDICACIONES

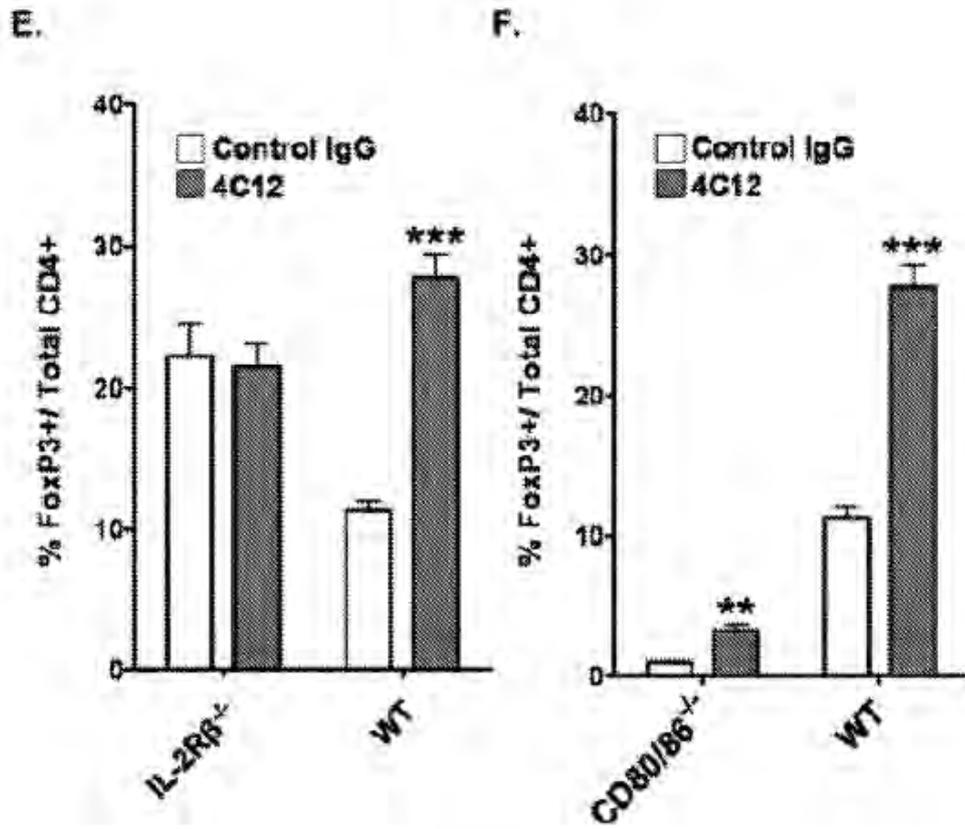
- 5 1. Un agonista de TNFR25 para su uso en un método para retrasar el rechazo agudo de un órgano o tejido trasplantado en un sujeto, en el que el agonista de TNFR25 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TNFR25, o en el que el agonista de TNFR25 es una fusión del ligando 1A análogo al factor de necrosis tisular -Ig (fusión TL1A-Ig).
- 10 2. El agonista de TNFR25 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es del isotipo IgG.
3. El agonista de TNFR25 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agonista de TNFR25 induce la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ en el sujeto.
- 15 4. Uso de un agonista de TNFR25 en la fabricación de un medicamento para retrasar el rechazo agudo de un órgano o tejido trasplantado en un sujeto, en el que el agonista de TNFR25 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TNFR25, o en el que el agonista de TNFR25 es una fusión TL1A-Ig.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo monoclonal es del isotipo IgG.
- 20 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el agonista de TNFR25 induce la proliferación de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ en el sujeto.



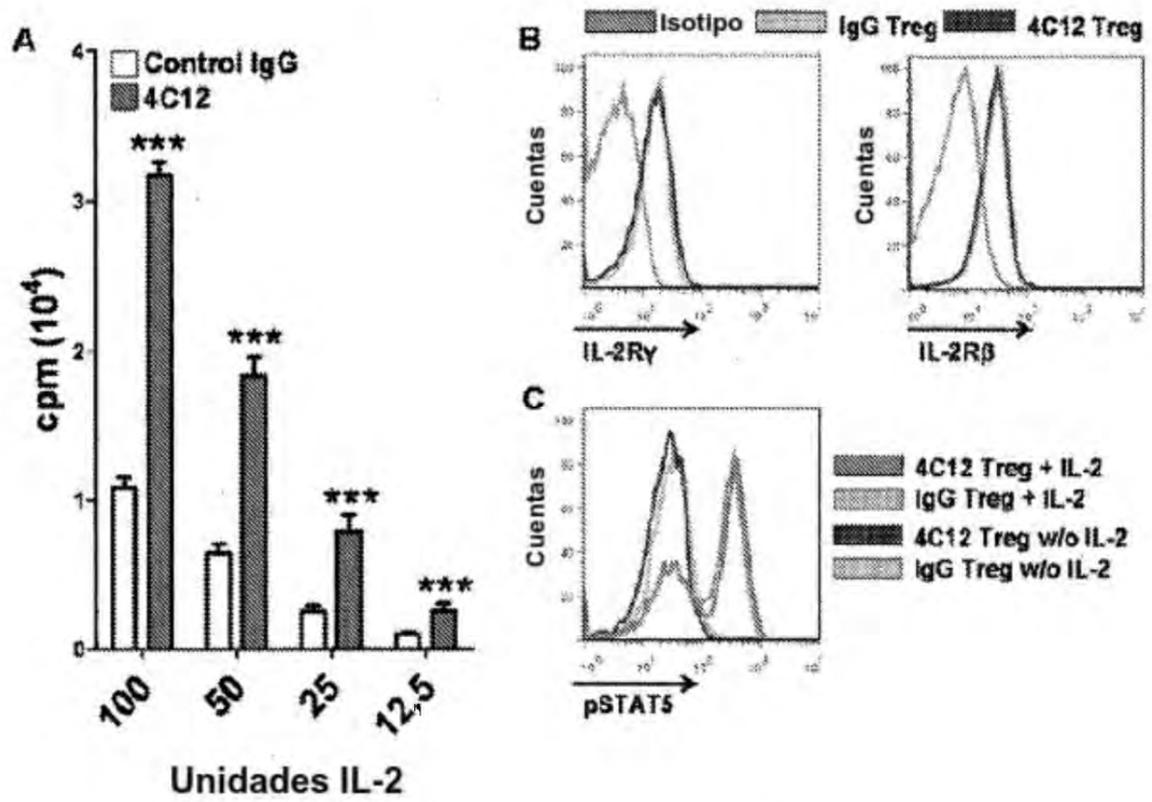
FIGURAS 1A-1C



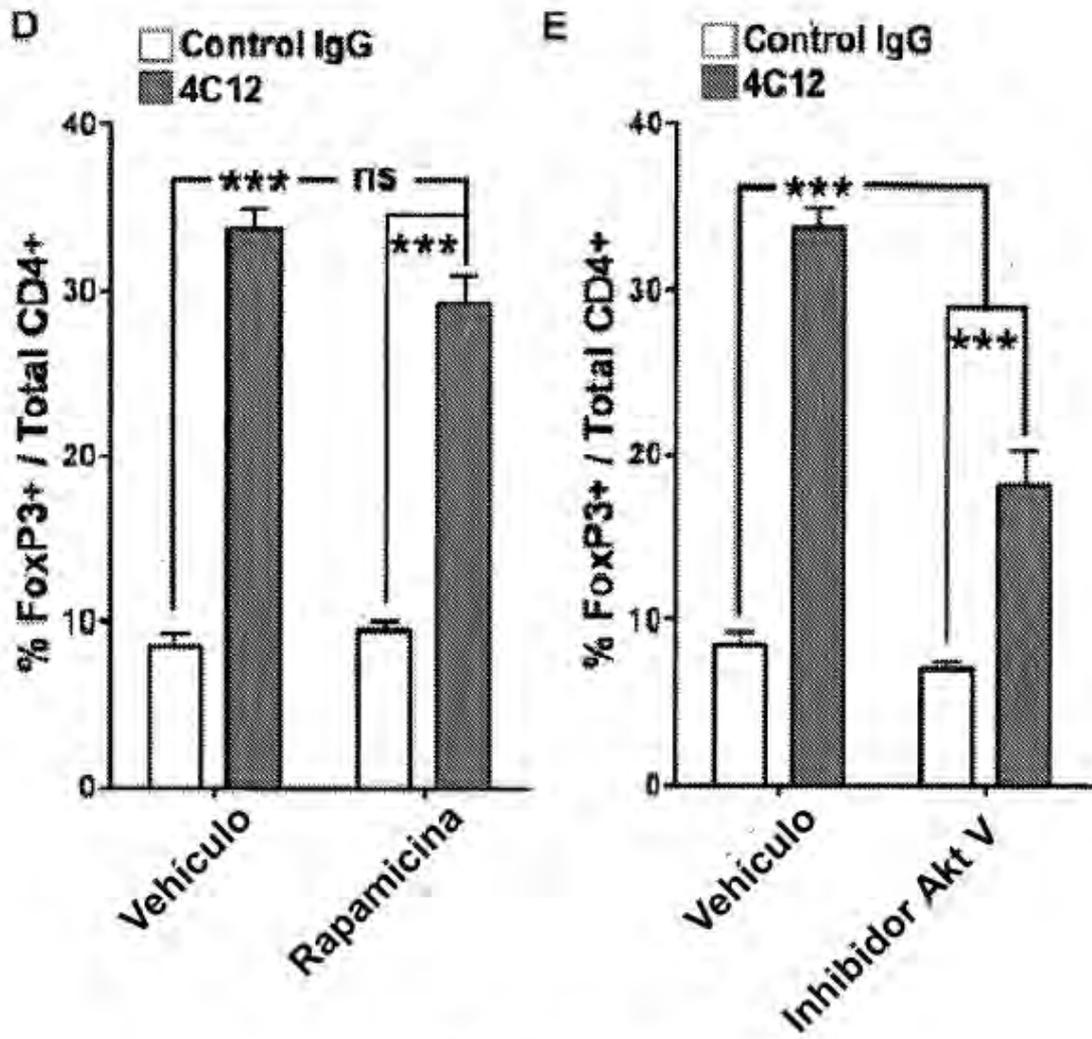
FIGURAS 2A-2D



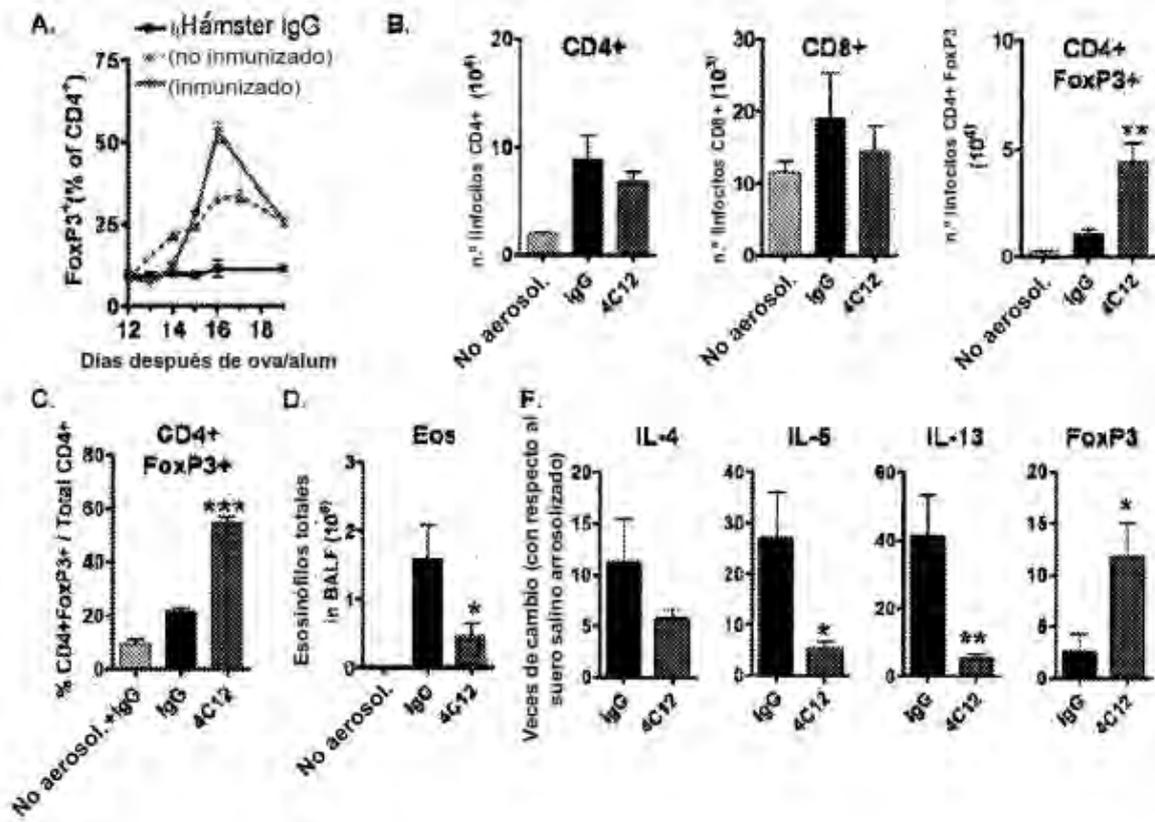
FIGURAS 2E-2F



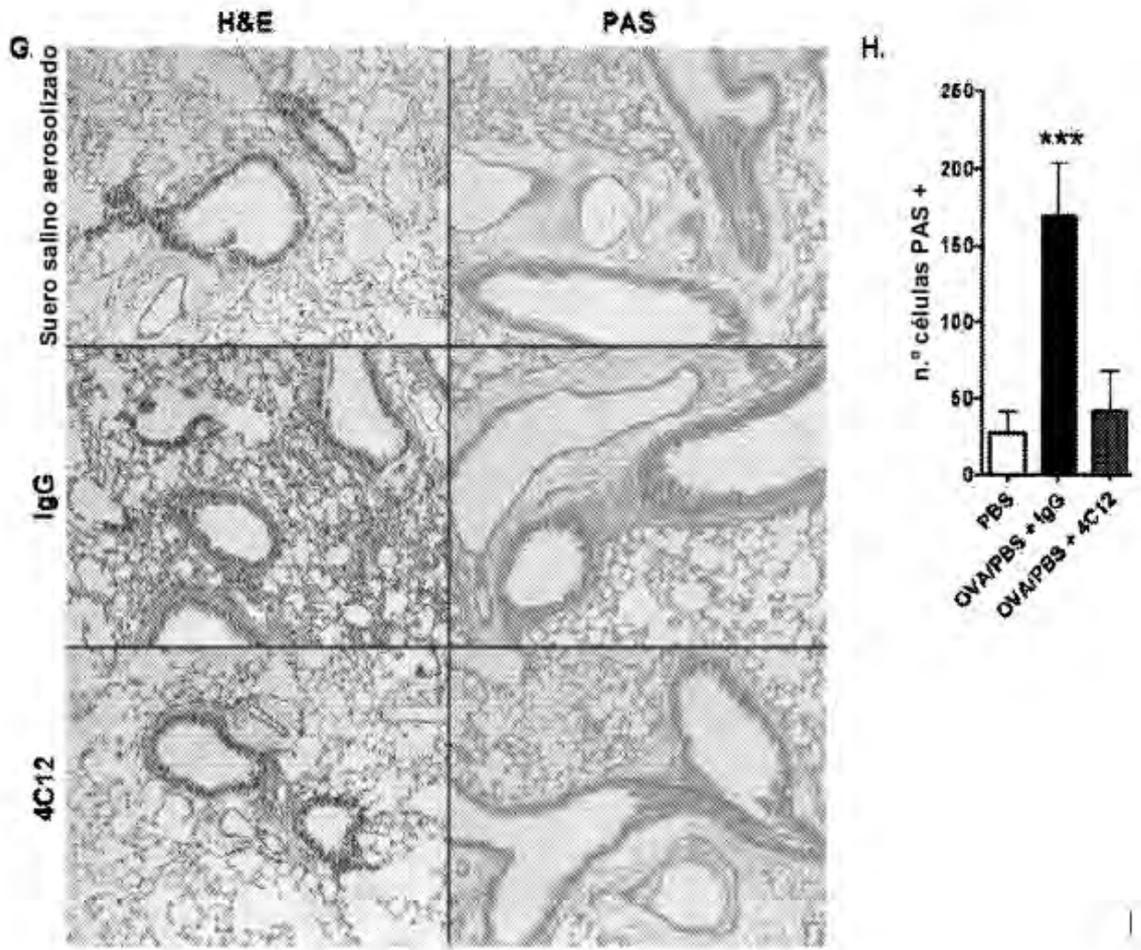
FIGURAS 3A-3C



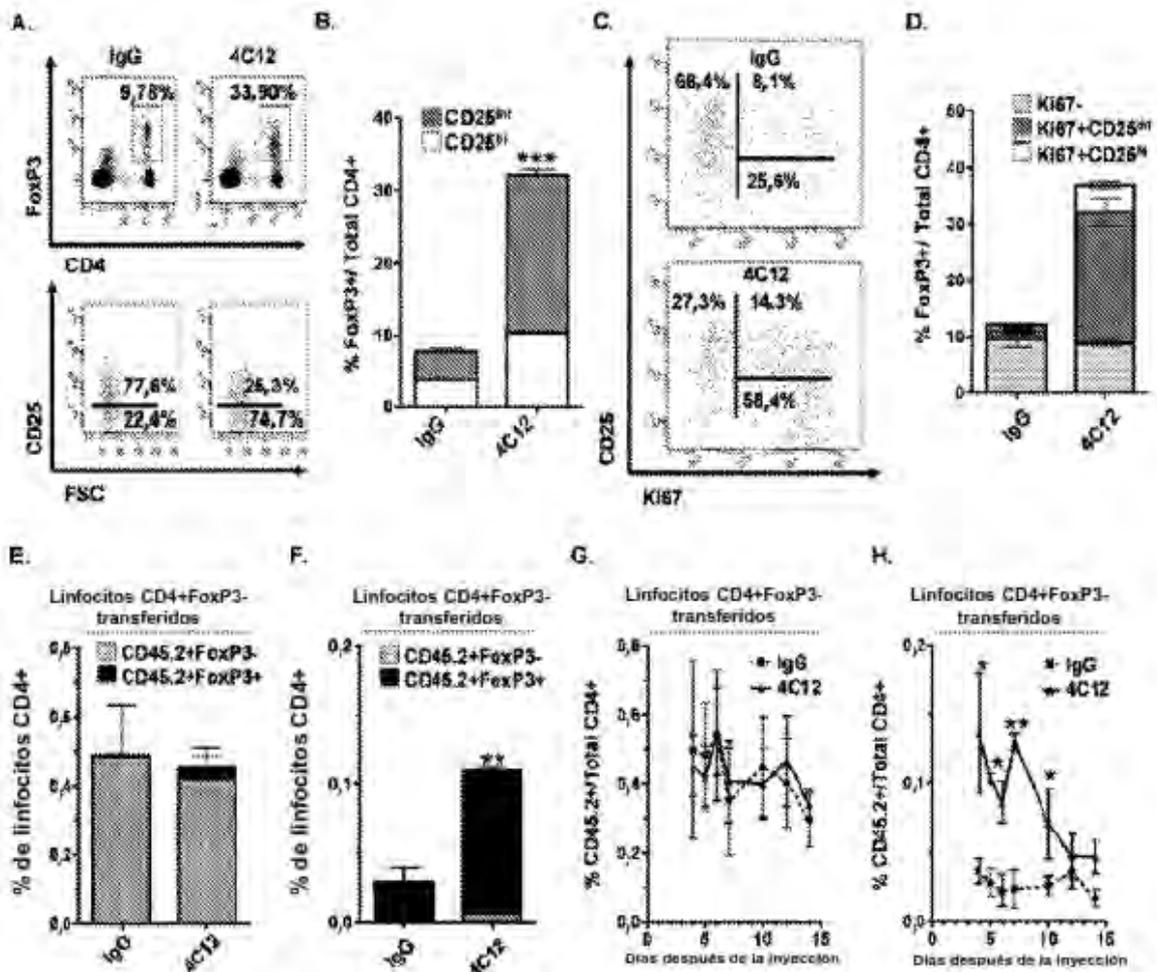
FIGURAS 3D-3E



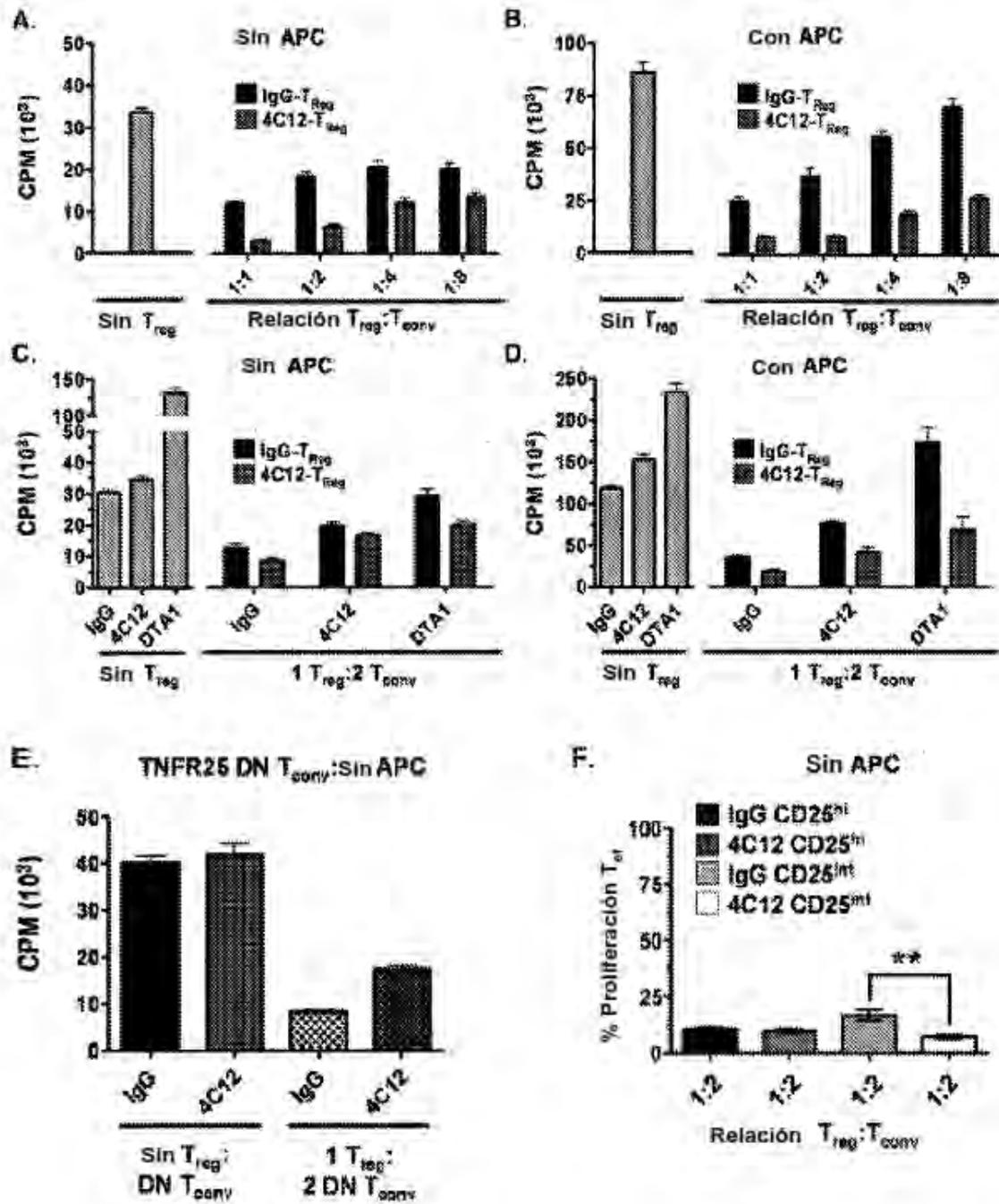
FIGURAS 4A-4F



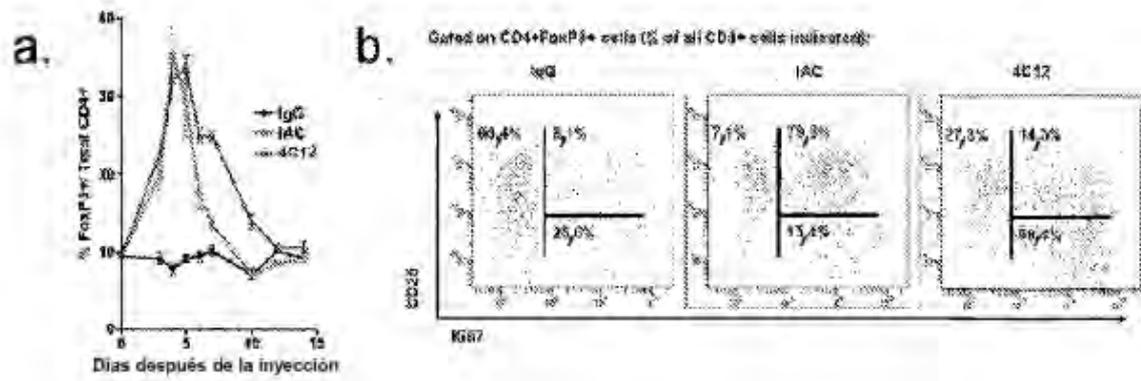
FIGURAS 4G-4H



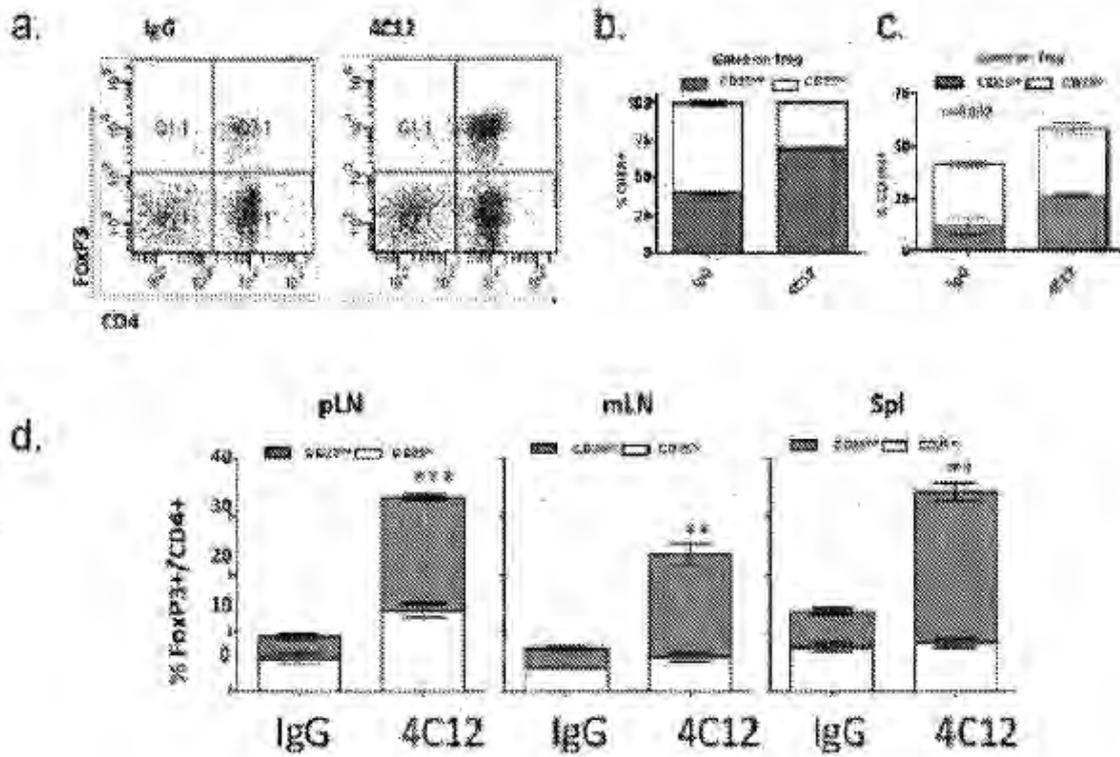
FIGURAS 5A-5H



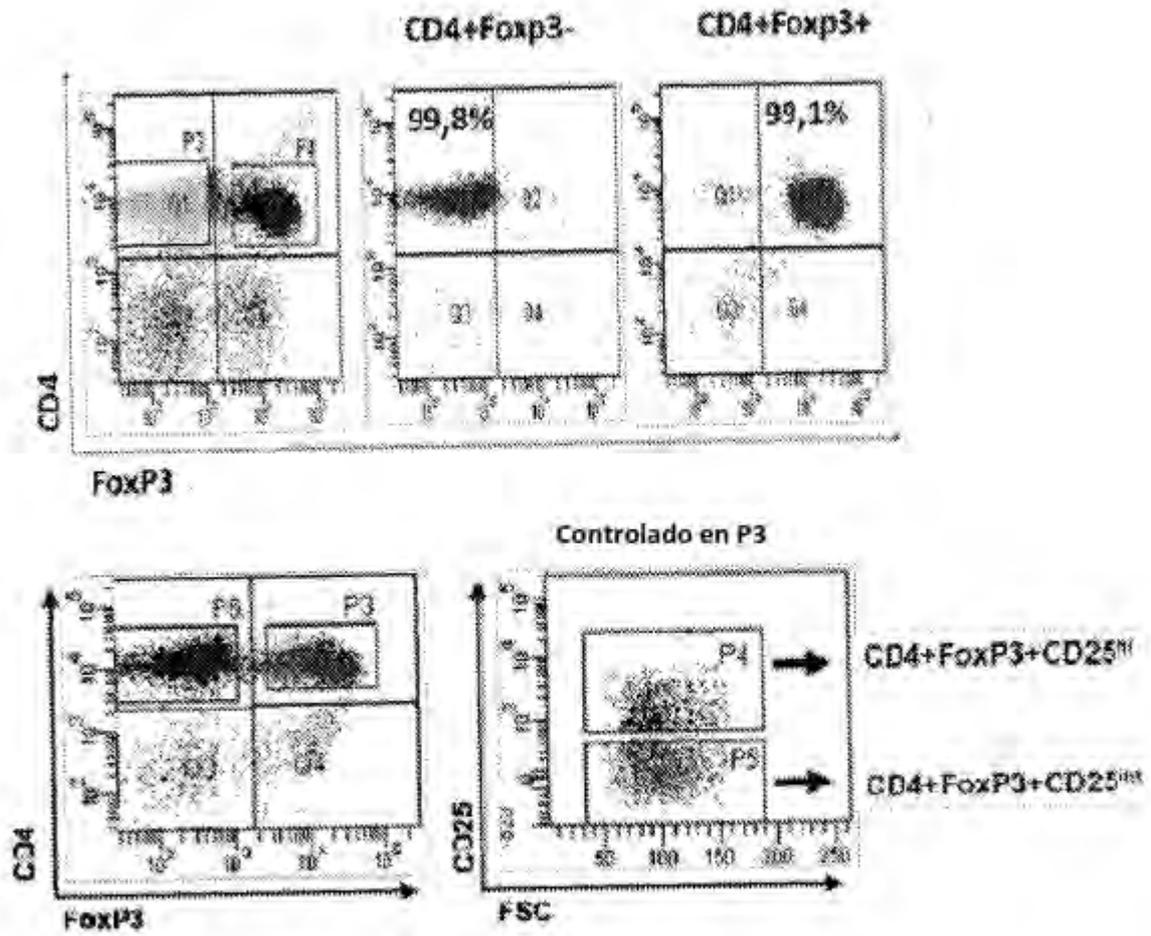
FIGURAS 6A-6F



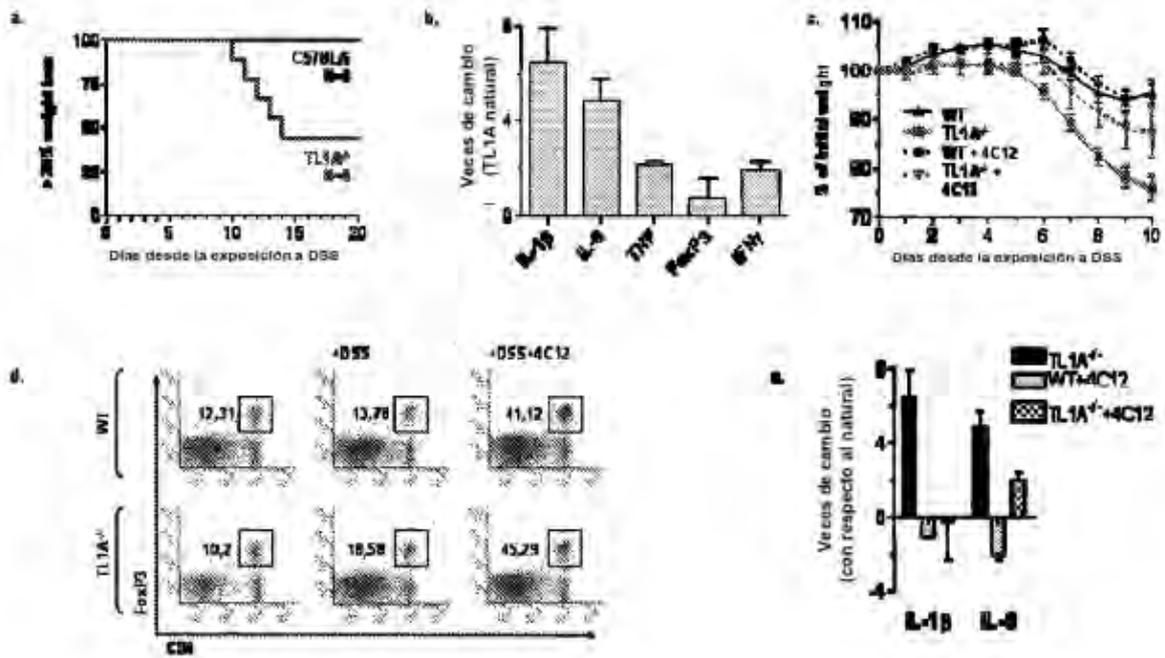
FIGURES 7A-7B



FIGURAS 8A-8D



FIGURAS 9A-9B



FIGURAS 10A-10E

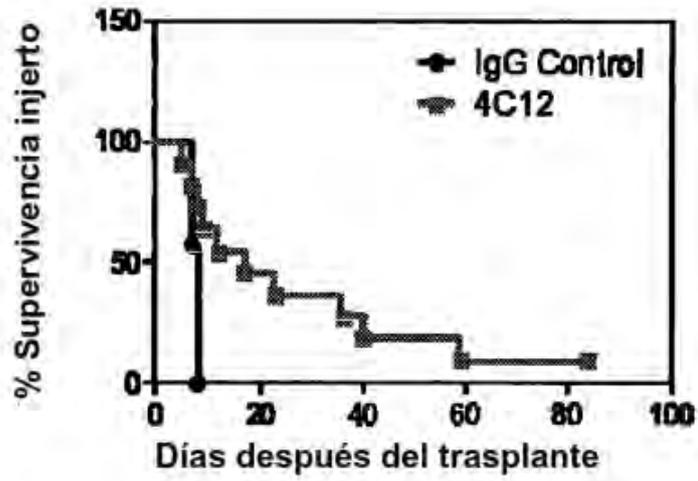


FIGURA 11

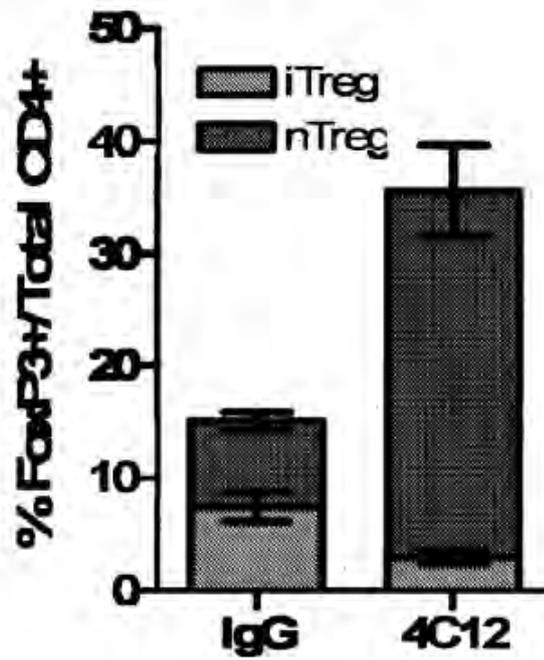


FIGURA 12