

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 307**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 35/13 (2015.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2006 PCT/US2006/033828**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2007 WO07027751**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2006 E 06802605 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 1919954**

54 Título: **Inmunomodulación de agonistas, antagonistas e inmunotoxinas del receptor del factor de necrosis tumoral 25 (TNFR25)**

30 Prioridad:

30.08.2005 US 712084 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
 1951 NW 7th Avenue, Suite 300
 Miami, FL 33136, US**

72 Inventor/es:

**PODACK, ECKHARD;
 DEYEV, VADIM y
 LEVY, ROBERT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 611 307 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

Immunomodulación de agonistas, antagonistas e inmunotoxinas del receptor del factor de necrosis tumoral 25 (TNFR25)

5

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a agonistas de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral 25 (TNFR25) y su uso en el tratamiento del cáncer.

2. Antecedentes

15 Muchos trastornos del sistema inmunológico humano se dividen en dos grandes categorías: los caracterizados por una respuesta inmune atenuada y los caracterizados por respuestas inmunes excesivas. La inmunodeficiencia se caracteriza por una respuesta atenuada. Existen formas congénitas (innatas) y adquiridas de inmunodeficiencia. La enfermedad granulomatosa crónica, en la que los fagocitos tienen problemas para destruir patógenos, es un ejemplo de la primera. SIDA ("Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida"), una enfermedad infecciosa, causada por el virus del VIH que destruye las células T CD4+, es un ejemplo de esta último. Una enfermedad adicional que puede caracterizarse por una respuesta inmune atenuada es el cáncer. En contraste con los individuos sanos, los sistemas inmunes de los pacientes con cáncer ya no son capaces de reconocer y/o destruir células tumorales en forma eficaz.

25 A pesar de las grandes esperanzas, no hay medicamentos hasta la fecha que aumenten directamente la actividad del sistema inmunológico. Sin embargo, las terapias biológicas se han utilizado recientemente para reclutar el sistema inmunológico, directa o indirectamente, para luchar contra enfermedades como el cáncer. Los anticuerpos monoclonales (MAb) se utilizan ahora con frecuencia como una terapia biológica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden reaccionar con tipos específicos de células cancerosas, y tienen efectos antitumorales directos o indirectos.

30 Las vacunas tumorales se pueden emplear terapéuticamente o para profilaxis después de la terapia primaria. Las vacunas antitumorales pueden necesitar inducir inmunidad celular en forma de células T citotóxicas específicas del tumor, del fenotipo CD4 o CD8. Se cree que una inmunidad antitumoral eficaz requiere la generación y el mantenimiento durante largos períodos de tiempo de tales células citotóxicas. Además, la evidencia indica que el brazo innato del sistema inmunológico debe activarse para generar vacunas antitumorales eficaces. Las vacunas que aumentan o generan respuestas humorales producen anticuerpos que pueden detectarse durante un periodo relativamente largo. Para ser eficaces, estos anticuerpos necesitan ser capaces de reconocer antígenos de superficie celular en ensayos con células vivas. El mantenimiento de respuestas inmunes celulares específicas a los epítopos antigénicos (inmunidad adaptativa) puede requerir inmunizaciones más frecuentes, aunque las células de memoria pueden sostener la capacidad de responder y volver a invocar el epítipo inmunizante. Como tal, sería de beneficio sustancial tener acceso a terapias que serían capaces de reforzar las respuestas inmunes celulares específicas del cáncer a las vacunas tumorales.

45 En el otro extremo de la escala, un sistema inmunológico hiperactivo aparece en una serie de otros trastornos, particularmente trastornos autoinmunes tales como lupus eritematoso, diabetes tipo I (a veces llamada "diabetes juvenil"), esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias intestinales tales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (UC). En éstas, el sistema inmunológico no distingue correctamente entre lo propio y lo extraño y ataca una parte del cuerpo del propio paciente. Otros ejemplos de respuestas inmunes excesivas en la enfermedad incluyen hipersensibilidad tales como alergias y asma.

50 La supresión del sistema inmunológico se utiliza a menudo para controlar trastornos autoinmunes o inflamación cuando esto provoca un daño excesivo del tejido. La medicación inmunosupresora induce intencionalmente una inmunodeficiencia para prevenir el rechazo de los órganos trasplantados. Los inmunosupresores comúnmente usados incluyen glucocorticoides, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, ciclofosfamida y mercaptopurina. En los trasplantes de órganos, la inhibición selectiva de las células T evita el rechazo de órganos, y se usan ciclosporina, tacrolimus, micofenolato de mofetilo y varios otros más.

60 Los linfocitos T juegan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes. Las células T auxiliares expresan el marcador de superficie CD4 y proporcionan ayuda a las células B para la producción de anticuerpos y ayudan a las células T CD8 a desarrollar actividad citotóxica. Otras células T CD4 inhiben la producción de anticuerpos y la citotoxicidad. Las células T regulan el equilibrio entre el ataque de las células infectadas o tumorigénicas y la tolerancia a las células del cuerpo. Un ataque inmune desregulado puede conducir a la autoinmunidad, mientras que la respuesta inmune disminuida da lugar a infecciones crónicas y cáncer.

65 El receptor de factor de necrosis tumoral 25 (TNFR25) también denominado aquí de manera intercambiable el receptor de muerte 3 (DR3), como se discute aquí, es un regulador de la función de las células T. El receptor de

muerte 3 (DR3) (Chinnaiyan y colaboradores, Science 274: 990, 1996) es un miembro de la familia de receptores de TNF. También se conoce como TRAMP (Bodmer y colaboradores, Immunity 6:79, 1997), wsl-1 (Kitson y colaboradores, Nature 384: 372, 1996), Apo-3 (Marsters y colaboradores, Curr Biol 6: 1669, 1996) y LARD (Screaton y colaboradores, 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 apoptosis y NF- κ B activado. El ligando cognado para DR3 se ha identificado recientemente como TL1A (Migone y colaboradores, Immunity 16: 479, 2002) y se ha demostrado que tiene actividad coestimuladora para DR3 en células T a través de la inducción de NF- κ B y supresión de apoptosis por expresión de CIAP2 (Wen y colaboradores, J Biol Chem 25:25, 2003). TL1A también se une al receptor señuelo 3 (DcR3/TR-6), lo que indica que el ajuste fino de accesibilidad biológica de TL1A es de importancia crítica. Prehn y colaboradores (Clinical Immunology 2004; 112 (1): 66-77) divulga que tanto TL1A como un anticuerpo anti-DR3 indujeron un aumento en la producción de IFN- γ a partir de células mononucleares de sangre periférica. Se han observado múltiples formas empalmadas de ARNm de DR3 humano, indicando regulación a nivel postranscripcional (Screaton y colaboradores, Proc Natl Acad Sci. USA 94: 4615, 1997).

Muchos miembros de la familia de receptores de TNF tienen la capacidad de inducir la muerte celular por apoptosis o inducir señales coestimuladoras para la función de las células T. La regulación de estas vías opuestas se ha aclarado recientemente para TNF-R1, el receptor prototípico que contiene un dominio de muerte que puede causar apoptosis o proliferación de células T receptoras positivas (Micheau y Tschopp, Cell 114: 181, 2003). La activación de NF- κ B por un complejo de señalización compuesto de TNF-R1 a través de TRADD, TRAF2 y RIP induce asociación de FLIPL con un segundo complejo de señalización compuesto de TNFRI, TRADD y FADD, evitando la activación de caspasa 8 mientras persiste la señalización de NF- κ B. Se ha demostrado que DR3 es capaz de inducir apoptosis en células transfectadas e inducir NF- κ B y todas las tres vías de MAP-quinasa (Chinnaiyan y colaboradores, Science 274: 990, 1996, Bodmer y colaboradores, Immunity 6:79, 1997, Kitson y colaboradores, Nature 384: 372, 1996, Marsters y colaboradores, Curr Biol 6: 1669, 1996, Screaton y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 94: 4615, 1997, Wen y colaboradores, J. Biol Chem 25:25, 2003). El bloqueo de NF- κ B, pero no de la MAP-quinasa y la inhibición de la síntesis de proteínas resultó en la muerte celular mediada por DR3, lo que indica que las señales de NF- κ B median los efectos antiapoptóticos a través de la síntesis de proteínas antiapoptóticas.

La expresión del ARNm de DR3 humano se manifiesta en tejidos linfoides, principalmente en el bazo, los ganglios linfáticos, el timo y el intestino delgado, indicando un papel importante para DR3 en los linfocitos. DR3 murino ha sido eliminado por recombinación homóloga en células madre embrionarias (Wang y colaboradores, Mol Cell Biol 21: 3451, 2001). Los ratones DR3 $-/-$ muestran una selección negativa disminuida por el anti-CD3 en el timo pero una selección negativa normal por superantígenos y una selección positiva sin problemas de timocitos. Las células T periféricas maduras no se vieron afectadas por la deficiencia de DR3. A pesar de una cantidad significativa de investigación preliminar, la función fisiológica de DR3 sigue siendo mal caracterizada.

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno del receptor del factor de necrosis tumoral 25 (TNFR25) y que puede actuar como un agonista de TNFR25, para su uso en el aumento de la expansión de linfocitos T CD8 en un sujeto al que se le administra un antígeno, en el que los linfocitos T CD8 son específicos para el antígeno administrado. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo agonista anti-TNFR25 agonístico en la fabricación de un medicamento para aumentar la expansión de los linfocitos T CD8 en un sujeto que recibe un antígeno, en el que los linfocitos T CD8 son específicos para el antígeno administrado. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En una realización, el antígeno es expresado o presentado por una célula. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral. En una realización, el antígeno es un antígeno tumoral y al sujeto se le administra adicionalmente un adyuvante. En una realización, el anticuerpo es capaz de aumentar la expansión de células CD8 de OT-I cuando es cebado en forma cruzada por gp96-Ig-ovoalbúmina con respecto a un anticuerpo de control. En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal purificado 4C12.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una toxina específica de TNFR25 que comprende un agente tóxico enlazado al polipéptido que se une al receptor TNFR25. En una realización de este aspecto, la porción que comprende la toxina incluye el anticuerpo monoclonal 4C12 o una porción inmunoespecífica de 4C12. En otra realización, el agente tóxico se selecciona de un isótopo radiactivo, ricina, abrina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas o ión metálico. En una realización adicional, el polipéptido que se une al receptor TNFR25 es la proteína TL1A o un fragmento o variante de la misma.

En otro aspecto de la divulgación, la toxina específica de TNFR25 se usa en un método de tratamiento de cáncer en un paciente. Específicamente, el método incluye el agotamiento en un paciente de las células reguladoras T CD4+/CD25+ (Treg) proporcionándole al paciente la toxina específica del TNFR25 y proporcionándole también al paciente un agente quimioterapéutico.

Aún otro aspecto de esta divulgación se refiere a un método para activar el receptor TNFR25 expresado en una célula que comprende poner en contacto la célula con un agonista del TNFR25. El agonista puede seleccionarse entre un anticuerpo monoclonal 4C12; Un anticuerpo que se une a TNFR25 y que puede incrementar la expansión

de las células CD8 de OT-I cuando se realiza un cebado cruzado con gp96-Ig-ovoalbúmina con respecto a un anticuerpo de control; una proteína TL1A soluble; un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar la expresión transgénica de un anticuerpo agonista del TNFR25; un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar la expresión transgénica de un TL1A soluble; o un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar la expresión transgénica de un TNFR25. Este método incluye además observar un aumento en la señalización del receptor TNFR25.

Un aspecto adicional de esta divulgación se refiere a un anticuerpo que es capaz de actuar como un antagonista del TNFR25. En una realización, el anticuerpo se une a un TL1A y es capaz de disminuir la expansión de células CD8 de OT-I cuando se realiza un cebado cruzado por gp96-Ig-ovoalbúmina con respecto a un anticuerpo de control. En una realización adicional, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal purificado L4G6.

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para inhibir la señalización del receptor TNFR25 en una célula. El método incluye poner en contacto la célula con un antagonista de TNFR25. El método incluye además observar una disminución en la señalización del receptor TNFR25.

Otro aspecto de esta invención se refiere a una vacuna tumoral que comprende un antígeno tumoral y un agonista del TNFR25 como modificador de la respuesta biológica. Una realización adicional de esta vacuna también incluye un adyuvante.

En otro aspecto adicional de la presente invención, después de aislar un antígeno específico de tumor, se usa una vacuna que comprende un antígeno específico de tumor y un agonista del TNFR25 para inmunizar a un paciente contra el tumor.

Un aspecto adicional de esta divulgación se refiere a un método para tratar y/o prevenir la inflamación intestinal que comprende proporcionar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición terapéutica que comprende un agonista del TNFR25.

Un aspecto adicional de esta divulgación se refiere a una composición terapéutica para la facilitación de un trasplante de órganos que comprende un antagonista del TNFR25 y un inmunosupresor. En una realización de este aspecto, el inmunosupresor es glucocorticoide, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, ciclofosfamida, mercaptopurina, tacrolimus o micofenolato de mofetilo.

En otro aspecto de la divulgación, se usa una composición antagonista del TNFR25 en un método de trasplante de un tejido de un donante a un huésped. Este método incluye las etapas de obtener tejido de un donante; proporcionarle a un huésped la composición antagonista del TNFR25; y trasplantar el tejido dentro del huésped.

Otro aspecto de esta divulgación se refiere a un método para inhibir la expansión clonal de una población de células T CD8 afines. Este método incluye exponer las células T CD8 a su antígeno afín y exponer las células T CD8 a un antagonista del TNFR25. En una realización adicional, el antígeno afín está asociado con el tejido que va a ser trasplantado de un donante a un huésped.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un antagonista del TNFR25 aislado que comprende un polipéptido codificado por una secuencia que comprende un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 4, 5, 6 y/o 16, y en el que la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína TL1A. En una realización, la secuencia se hibrida bajo condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 4. En otra realización, la secuencia se hibrida bajo condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 5. En una realización adicional, la secuencia se hibrida bajo condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 6. En otra realización, la secuencia se hibrida bajo condiciones rigurosas con la SEQ ID NO: 16. En otra realización más, la TL1A es TL1A humana o de ratón.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para tratar y/o prevenir inflamación pulmonar que comprende proporcionar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una composición terapéutica que comprende el antagonista de TNFR25 que comprende un polipéptido codificado por una secuencia que comprende ácido nucleico que hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 4, 5, 6 y/o 16, y en donde la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína TL1A.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para trasplantar un tejido de un donante a un huésped que comprende obtener el tejido del donante; proporcionarle al huésped el antagonista del TNFR25 que comprende un polipéptido codificado por una secuencia que comprende un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 4, 5, 6 y/o 16, y en la que la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a Proteína TL1A; y trasplantar el tejido en el huésped.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a una composición que comprende un polipéptido codificado por una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 3 y/o 7, y en la que la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína del receptor TNFR25; y un agente tóxico. En una

realización, el agente tóxico se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, ricina, abrina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, y un ión metálico.

5 Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de cáncer en un paciente que comprende el agotamiento en un paciente de las células reguladoras T CD4+/CD25+ (Treg) proporcionando al paciente una composición que comprende la toxina de la reivindicación 39; y proporcionarle a un paciente un agente quimioterapéutico.

10 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para tratar y/o prevenir la inflamación intestinal que comprende proporcionarle a un paciente que lo requiera una cantidad eficaz de una composición que comprende un polipéptido codificado por una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 3 y/o 7, y en la que la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína del receptor TNFR25. En una realización, la inflamación es un resultado del síndrome de intestino irritable. En otra realización, la inflamación intestinal es el resultado de la enfermedad de Crohn.

15 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a una vacuna tumoral que comprende un antígeno tumoral y un polipéptido codificado por una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 3 y/o 7, y en la que la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína del receptor TNFR25, como un modificador de la respuesta biológica.

20 Incluso un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 3 y/o 7, y que codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína del receptor TNFR25.

25 Aún un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con las SEQ ID NOs: 4, 5, 6 y/o 16, y en la que la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a una proteína TL1A.

30 Las ventajas adicionales de la presente invención resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

35 **La Figura 1A** representa la expresión del TNFR25 murino en células de ganglios linfáticos. MFI está indicado mediante números resaltados para el anticuerpo de control del isotipo como anticuerpo primario y sombreado para anti-TNFR25. La detección del TNFR25 requirió de un sándwich triple de anticuerpo monoclonal primario anti-TNFR25 de hámster, seguido por biotina anti-hámster de cabra y estreptavidina marcada con PE. 1B representa la expresión del TNFR25 sobre linfocitos activados. La activación de esplenocitos se realizó con anti-CD3 inmovilizado (5 µg/mL) y anti CD28 (1 µg/mL) o LPS (1 µg/mL) durante 24 horas. Las células fueron conmutadas por células CD4 o CD8 o B220 positivas y 7-AAD negativas (el subíndice a significa células CD4, CD8 o B activadas). En los histogramas, se muestra MFI para la expresión del TNFR25 en esplenocitos en reposo y en esplenocitos activados. 1C representa la expresión del TNFR25 en timocitos. Los timocitos se conmutaron en células CD4/CD8 doblemente negativas, doble positivas o positivas simples y se evaluaron para fluorescencia anti-TNFR25.

45 **La Figura 2A** representa formas de empalme del TNFR25 murino. Las formas de empalme se obtuvieron mediante RT-PCR del ARNm obtenido de esplenocitos de murino en reposo y líneas celulares murinas. CRD: dominio rico en cisteína; TM: dominio transmembrana; DD: dominio de muerte. Asteriscos: en el codón de detención en el marco. En las formas de empalme 1-4 el intrón entre el exón 2 y 3 no se empalma y contiene un codón de detención prematuro. Es probable que las formas de empalme 1-4 sean proteínas no funcionales. Los Δ5 y Δ6 murinos (correspondientes a Δ6 y Δ6,7 humanos) carecen de un dominio transmembrana completo y se predice que son formas secretadas que podrían actuar como receptor de señuelo soluble para TL1A. Las formas de empalme Δ5,6 (potencialmente correspondientes a A3 humano) y FL se estudian como transgenes en este informe. Se predice que Δ5,6,8 y Δ5,6,9 (homólogos no humanos) están anclados en la membrana pero carecen del dominio de muerte y pueden tener propiedades de señalización alteradas o pueden actuar como formas de empalme negativas dominantes. El TNFR25 del DN preferido divulgado en este documento estaba truncado después del dominio TM. La Figura 2B representa el empalme alternativo inducido por activación del TNFR25. Tanto TNFR25 humano como de ratón se empalman después de la activación. El empalme humano se muestra aquí porque las formas de empalme del TNFR25 se separan mejor en tamaño después de la electroforesis en gel que las formas murinas. Las formas de empalme se confirmaron mediante secuenciación. Los PBL se aislaron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. 60 Se usaron cinco millones de células en cada muestra y se extrajeron los ARNm y se convirtieron en ADNc utilizando el kit de síntesis de ADNc de Invitrogen. La activación de PBL por PHA (5 µg/mL), anti-CD3 inmovilizada (5 µg/mL) y anti-CD28 soluble (1 µg/mL), o PMA (10 ng/mL) e ionomicina (400 ng/mL) como se indicó. Las células se cosecharon en los puntos de tiempo indicados y se realizaron RT-PCR; se usó β-actina como control interno. La Figura 2C representa el empalme inducido por activación que depende de PKC y es independiente de la síntesis de proteínas. Las células PBL recién aisladas se estimularon con PMA (10 ng/mL) sola, o ionomicina (400 ng/mL) sola o en combinación. Se trataron previamente los PBL con H7 (50 µM), o cicloheximida (10 µg/mL) durante media hora, 65

después se añadieron PMA y ionomicina al cultivo celular. Las células se recogieron después de 12 horas para el análisis de RT-PCR.

5 **La Figura 3** ilustra la expresión y función de los transgenes del TNFR25 bajo el promotor y reforzador de CD2. La Figura 3A representa la expresión del TNFR25 en ratones transgénicos comparado con ratones de tipo silvestre B6 y control de isotipo. Las células de los ganglios linfáticos inguinales se conmutaron por células CD4, CD8, B220, CD11c positivas o células NK1.1 positivas y CD3 negativas o células NK1.1/CD3 doblemente positivas. Se indica la MFI correspondiente. El perfil de expresión para el FL TNFR25, el TNFR25 de $\Delta 5,6$ y el DN TNFR25 fue idénticos. La Figura 3B representa una transferencia tipo Western de células tumorales transfectadas del TNFR25
10 alternativamente empalmadas. Se cargaron 50 μg de proteína de lisados de P815 transfectados con tres formas de empalme de TNFR25 y se transfirieron con el anticuerpo anti-TNFR25 1OD1. Carril 1: DN TNFR25; Carril 2: $\Delta 5,6$ TNFR25; Carril 3: FL TNFR25. El anticuerpo no detecta $\Delta 5,6$ TNFR25 en transferencias tipo Western. La Figura 3C ilustra la celularidad reducida de las células CD4 y CD8 positivas en células de ganglios linfáticos de FL TNFR25-tg y timocitos comparados con compañeros de camada de tipo silvestre ($n = 5$): *; $p < 0,05$; **; $p < 0,01$; ***; $p < 0,001$. La Figura 3D representa la proliferación inducida por la activación deteriorada de las células transgénicas del FL TNFR25 y $\Delta 5,6$. La proliferación de células CD4 o CD8 purificadas se midió después de 3 días de estimulación por captación de timidina durante las últimas 6 horas. Las células se activaron en placas de microtitulación con anti-CD3 inmovilizadas (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con o sin anti-CD28 soluble (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o PMA (10 ng/mL) y ionomicina (400 ng/mL). Se usó IL-2 recombinante de ratón a razón de 1000 U/mL. La Figura 3E ilustra NF- κB activo del FL TNFR25 y $\Delta 5,6$ TNFR25. La activación de NF- κB se midió en células EL4 transfectadas con FL TNFR25 (panel superior) o con $\Delta 5,6$ TNFR25 (panel inferior) en respuesta a la activación de TNFR25. Las células fueron tratadas con el anticuerpo TNFR25 agonístico, 4C12 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 50 min; se administró TL1A soluble durante 25, 50 o 75 min como se indica en la forma del 25% de los sobrenadantes de células EL4 transfectadas con TL1A; se suministró TL1A unido a la membrana (MTL1A) durante 50 min mediante la adición de células EL4 transfectadas con L1A directamente a EL4
25 que expresa TNFR25. Los controles recibieron sobrenadantes EL4 (no transfectados) durante 50 min. Los extractos nucleares fueron preparados y analizados por EMSA; la flecha indica NF- κB activado. La Figura 3F representa la producción primaria de citoquinas sesgada por Th2 mediante las células T CD4 transgénicas de FL TNFR25 y $\Delta 5,6$ TNFR25. Se purificaron las células T CD4 de bazo mediante selección negativa y se activaron con anti-CD3 inmovilizado (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 soluble (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 días. Se recogieron los sobrenadantes para ensayos de citoquina por ELISA. La Figura es representativa de tres experimentos independientes. n.s.: no significativo; *; $p < 0,05$; **; $p < 0,01$; ***; $p < 0,001$. La Figura 3G ilustra que TNFR25 puede coestimular la producción de citoquinas de Th1 o Th2. La producción de citoquinas de células T CD4 de FL TNFR25-tg se determinó bajo condiciones no polarizantes (Th neutro), Th1 o Th2 polarizantes. Las células CD4 se activaron con anti-CD3 inmovilizadas (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 solubles (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solas (Th neutro), o combinadas con IL-12 (5 ng/mL) y anti-IL-4 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para polarización de Th1 o combinado con IL-4 (10 ng/mL), anti-IFN- γ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-IL-12 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para polarización de Th2 durante 4 días. Las células se recogieron, se lavaron y se sembraron nuevamente en placa en anti CD3 durante 24 horas y los sobrenadantes se recogieron para análisis de citoquinas por ELISA.

40 **La Figura 4** representa la proliferación disminuida de células transgénicas TNFR25 que no es debida a la apoptosis, carencia de IL-2 o de la expresión del receptor de IL-2. La Figura 4A ilustra la sobrerregulación normal de IL-2-R α (CD25) en células CD4 y CD8 transgénicas tras la activación. Después de 72 horas de activación con anti-CD3 inmovilizado y anti-CD28 soluble, se recogieron los esplenocitos, se lavaron y se tiñeron con anti-CD25-FITC, anti-CD8-PE y anti-CD4-CY. Paneles superiores células de tipo silvestre, paneles inferiores células $\Delta 5,6$ TNFR25-tg. La Figura 4B demuestra que las células transgénicas no experimentan aumento de la apoptosis tras la activación. Las células CD4 se activaron con anti-CD3 de ratón inmovilizadas (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con anti-mCD28 solubles (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante tres días y se tiñeron con Anexina-V-PE y 7-AAD. Las células positiva para Anexina-V y negativas para 7-AAD representaban las células apoptóticas. La Fig. 4C ilustra la producción reducida de IL-2 por células T transgénicas de $\Delta 5,6$ TNFR25. Las células T fueron purificadas por selección negativa y activadas con anti-CD3 inmovilizada y anti-CD28 soluble durante 3 días. Los sobrenadantes se analizaron por la producción de IL-2 mediante ensayo de ELISA; **; $p = 0,0078$. La Figura 4D ilustra que las células transgénicas de TNFR25 negativas dominantes no son polarizadas por Th2 en respuesta primaria. Las células T CD4 del bazo se purificaron mediante selección negativa y se activaron con anti-CD3 inmovilizado (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 soluble (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 días. Los sobrenadantes se recogieron para ensayos de citoquinas por ELISA. La figura es representativa de tres experimentos independientes. La Figura 4E representa la misma respuesta de isotipo de anticuerpo de ratones transgénicos DN TNFR25 de tipo silvestre. Los ratones fueron inmunizados de forma intraperitoneal con 100 μg de DNP-KLH en PBS estéril y se evaluaron los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de DNP en suero mediante ELISA tres semanas después de la inmunización. Se recubrieron las placas de 96 pozos de alta unión con DNP-BSA a razón de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para detectar anticuerpos específicos anti-DNP. La figura representa uno de tres experimentos independientes.

60 **La Figura 5** ilustra que los ratones transgénicos del TNFR25 desarrollan una respuesta sesgada a Th2 después de estimulación in vivo. La Figura 5A demuestra que un isotipo de anticuerpo está sesgado por Th2 en ratones TNFR25-tg inmunizados. Los ratones fueron inmunizados en forma intraperitoneal con 100 μg de DNP- KLH en PBS estéril sin adyuvante. Los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos de DNP en suero se evaluaron mediante ELISA una semana después de la inmunización. Se recubrieron placas de 96 pozos de alta unión con DNP-BSA a razón de 0,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para detectar anticuerpos específicos de anti-DNP. Los datos representan uno de tres experimentos

independientes. **: $p < 0,01$; n.s.: no significativo. La Figura 5B ilustra señales de TNFR25 que regulan la eosinofilia en el líquido broncoalveolar (BALF). La inmunización y la exposición de las vías respiratorias de ratones TNF25-tg de $\Delta 5,6$ y de tipo silvestre se realizó como se describe en los Ejemplos 10-15. Las vías respiratorias se lavaron y el recuento diferencial de células obtenido a partir de preparaciones de citospinas teñidas con Wright-Giemsa. *: $p < 0,05$; n.s.: no significativo. La Figura 5C representa una mayor inflamación pulmonar en ratones TNFR25-tg. La histología pulmonar de ratones sensibilizados en forma i.p. y las vías respiratorias desafiadas con ovoalbúmina. Después del lavado bronquial, se retiraron los pulmones y se fijaron en formalina regulada neutra al 10%. Los pulmones se embebieron en parafina, se hicieron cortes de 5 μm de espesor y se tiñeron con H & E (paneles de la izquierda) o ácido peryódico-Schiff (PAS, paneles de la derecha) para detectar la producción de moco. Los dos paneles superiores ratones B6 tipo silvestre; paneles inferiores ratones $\Delta 5,6$ TNFR25-tg. La Figura 5D ilustra que las señales de TNFR25 controlan los niveles de IgE en suero. Los ratones se sangraron el día 0 y tres días después de la exposición con aerosol (día 15). Se separó el suero y se analizó por ELISA para detectar IgE específica de ovoalbúmina mediante ELISA tipo sándwich. Dado que no hay una proteína estándar disponible para IgE específica de OVA, los resultados se presentan en unidades O.D. La Figura representa uno de tres experimentos independientes. **: $p < 0,01$. La Figura 5E representa un aumento de la producción de citoquinas de Th2 por células de ganglios linfáticos bronquiales en ratones TNFR25-tg. Los ganglios linfáticos bronquiales se recogieron un día después de la exposición al aerosol (día 13) y las células se estimularon nuevamente in vitro con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ovoalbúmina durante 4 días. A continuación se analizaron los sobrenadantes para la producción de citoquinas mediante ELISA. Esta figura es representativa de dos experimentos independientes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

La Figura 6 ilustra que TNFR25 negativo dominante interfiere con la polarización de Th2 y la inflamación pulmonar. La Figura 6A ilustra que el transgén de DN TNFR25 bloquea la coestimulación de citoquinas mediante TNFR25 endógeno. Las células CD4+ de DN TNFR25-tg y de tipo silvestre fueron estimuladas durante tres días con anti CD3, o con anticuerpo agonista anti TNFR25 4C12 y anti CD3 combinados y se analizaron los sobrenadantes para citoquinas mediante ELISA. La Figura 6B ilustra que DN TNFR25 bloquea la coestimulación de la proliferación mediante TNFR25 endógeno. En ensayos de proliferación se activaron células CD4 de DN TNFR25-tg con anti-CD3, con 4C12 o con la combinación de anti-CD3 y 4C12 durante 3 días y se midió la incorporación de timidina durante las 8 horas finales. La Figura 6C ilustra que las células T CD4 de DN TNFR25-tg producen citoquinas de Th2 disminuidas en la activación secundaria. Las T CD4 transgénicas y de tipo silvestre se purificaron mediante selección negativa y se activaron con anti-CD3 inmovilizado (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-CD28 soluble (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 3 días. Las células se recogieron después, se lavaron, se sembraron nuevamente en placa y se estimularon nuevamente con anti-CD3 inmovilizado (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 2 días. Los sobrenadantes se recogieron para un ensayo de citoquinas por ELISA. n.s.: no significativo; ***: $p < 0,001$. La Figura 6D muestra que las células T CD4 de DN TNFR25-tg resisten la polarización de Th2 in vitro. Las células T CD4 de DN TNFR25-tg fueron purificadas y activadas durante cuatro días con anti CD3 y anti CD28 bajo condiciones de polarización neutras (ThN) o de Th2 (mediante la adición de IL-4 y bloqueo de IFN- γ con anticuerpo). Las células se recolectaron, se lavaron y sembraron de nuevo en placa en anti CD3 durante 24 h, se recolectaron los sobrenadantes y se analizaron las citoquinas por ELISA. La Figura 6E ilustra la exudación celular disminuida en BALF, en ratones DN TNFR25-tg comparado con ratones de tipo silvestre. Los ratones fueron cebados y después retados con ovoalbúmina en aerosol de acuerdo con el protocolo estándar; $n = 5$; *: $p < 0,05$. La Figura 6F representa la supresión de la inflamación pulmonar en ratones DN TNFR25-tg después de la inmunización y exposición de las vías respiratorias. Panel superior: ausencia de infiltrados perivasculares en ratones DN TNFR25-tg después de la exposición al antígeno en aerosol. Panel inferior: ausencia de mucosidad sobre la producción e hiperplasia de células calciformes en ratones DN TNFR25-tg. La inflamación pulmonar fue inducida como en la Figura 5 mediante inmunización con ovoalbúmina y posterior exposición al aerosol. Los ratones de control tipo silvestre tenían una inflamación típica como se muestra en la Fig. 5. La Figura 6G ilustra la supresión de la producción de IgE específica de ovoalbúmina en ratones DN TNFR25-tg. Se determinó la IgE específica de ovoalbúmina en suero mediante ELISA. **: $p < 0,01$. La Figura 6H representa la supresión de la producción de citoquinas de Th2 pero no la de Th1 por DN TNFR25 en ganglios linfáticos bronquiales. Se recolectaron los ganglios linfáticos bronquiales un día después de la exposición al aerosol y se estimularon nuevamente las células 1001.tg/mL de ovoalbúmina durante 4 días. Los sobrenadantes fueron luego analizados por la producción de citoquinas mediante ELISA. Esta figura es la representativa de dos experimentos independientes. n.d.: no detectado; n.s.: no significativo; *: $p < 0,05$.

La Figura 7 ilustra que los anticuerpos que bloquean a TL1A anulan la inflamación pulmonar y disminuyen la producción de citoquinas de Th2 en el pulmón. Las Figuras 7A-D representan que el anticuerpo L4G6 anti TL1A es un antagonista funcional de TL1A. a. transfectantes P815 con FL TNFR25, b. con $\Delta 5,6$ TNFR25 y c. con TL1A teñido mediante citometría de flujo con los anticuerpos apropiados. d. L4G6 bloquea la citotoxicidad mediada por TL1A de las células transfectadas con TNFR25. TL1A soluble diluida en forma serial recolectada de los sobrenadantes de las células transfectadas con P815-TL1A se mezclaron con células objetivo P815-TNFR25 marcadas con ^{51}Cr . Se añadieron diferentes anticuerpos monoclonales anti-TL1A de murina en el ensayo y se analizó el ^{51}Cr liberado cinco horas después. La Figura 7E ilustra que el anticuerpo L4G6 que bloquea TL1A suprime la producción de moco y la inflamación pulmonar in vivo en ratones C57B16 de tipo silvestre. Esquema: cronograma de cebado con ovoalbúmina, exposición al aerosol y administración de anticuerpo de bloqueo (L4G6) o anticuerpo de control. La histología pulmonar después de tinción de PAS con IgG de control (izquierda) y L4G6-IgG (derecha). Obsérvese que la falta de producción de moco en animales tratados con L4G6 (las flechas señalan al moco en ratones tratados con

IgG de control). La Figura 7F demuestra la exudación celular disminuida en BALF en ratones tratados con L4G6 comparado con animales tratados con IgG de control. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n.s. no significativo. La Figura 7G ilustra la producción disminuida de IL-5 e IL-13 por células de ganglios linfáticos bronquiales nuevamente estimuladas con ovoalbúmina después del bloqueo de TL1A con L4G6. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. Los detalles experimentales como en la Fig. 5. La Figura 7H representa la expresión de TL1A después de la exposición al aerosol en una subpoblación de células positivas para CD11c (flecha) en el pulmón. Se recolectaron los ganglios linfáticos bronquiales antes y después de la exposición del aerosol con ovoalbúmina, y se analizaron las células CD11c por la expresión de TL1A. Todas las otras células del ganglio linfático bronquiales fueron negativas para TL1A. La Figura 7I ilustra la falta de expresión de TL1A en linfocitos de células de ganglios linfáticos bronquiales de ratones inmunizados con ovoalbúmina después de la exposición de las vías respiratorias. Se tiñeron las suspensiones de células individuales en un triple sándwich con anti-TL1A como anticuerpo monoclonal primario. Las células fueron conmutadas usando el respectivo anticuerpo marcado como marcador de población y se visualizó el histograma de TL1A. Anti-TL1A; control de isotipo. La Figura 7J ilustra que TL1A se expresa en linfocitos T activados in vitro. Los esplenocitos fueron activados durante 24 h con anti-CD3 unido en placa o con LPS y luego teñidos con el triple sándwich anti-TL1A como en la Figura 1 y con el marcador de población como se indicó. Las células B son negativas para TL1A incluso después de la activación de LPS. Se muestra la conmutación en el marcador poblacional, la expresión de TL1A en células activadas.

La Figura 8 representa que se requieren las señales de TNFR25 en células NKT para la inducción de inflamación pulmonar. Los ratones con desactivación de $\alpha 18$ deficientes en NKT (Cui, J. y colaboradores, *Science* 278, 1623-6 (1997)) fueron cebados con ovoalbúmina y alumbre como en el protocolo estándar en materiales y métodos. El día 11, los ratones recibieron mediante i.v. transferencia adoptiva de 3.1 millones de células NKT de tipo silvestre parcialmente purificada o células NKT de DN TNFR25-tg o PBS como se indicó. Los ratones recibieron aerosol el día 12 con ovoalbúmina y se analizaron el día 14. Los ratones de tipo silvestre sirvieron como controles positivos para la inducción de inflamación pulmonar, los ratones con desactivación de $\alpha 18$ fueron inmunizados y recibieron aerosol con ovoalbúmina sin transferencia de células adoptivas como controles negativos. Los datos son para cuatro ratones en cada grupo en dos experimentos independientes. Ja son ratones deficientes en NKT (Cui, J. y colaboradores, *Science* 278, 1623 - 6 (1997)).

La Figura 9 ilustra un modelo para activación mediada por TL1A/TNFR25 de células NKT y células CD4 polarizadas por Th2 en el pulmón. El modelo describe la interacción potencial entre TL1A y TNFR25 que puede contribuir a la producción de IL-13 y la inducción de AHR. La evidencia de la necesidad de la producción de IL-13 mediante células NKT ha sido proporcionada previamente (Akbari, O. y colaboradores, *Nat Med* 9, 582-8 (2003)). La presente comunicación muestra la necesidad de señales de TNFR25 en células NKT para la inflamación pulmonar, la expresión de TL1A por células CD11c+ y la coestimulación de efectores Th2 de CD4 por TNFR25. Dado que los efectores de CD4 pueden expresar TL1A es posible que la interacción TL1A/TNFR25 entre células CD4 y NKT proporcione el enlace molecular para su sinergia en asma. Además, otras células asociadas al pulmón pueden expresar TL1A y ayudar a desencadenar inflamación pulmonar.

La Figura 10 representa los resultados de un experimento en el que los ratones recibieron 1 millón de OT-I-gfp en forma i.v. Dos días después fueron inmunizados en forma i.p. con la dosis indicada de ovoalbúmina en PBS (curva azul); con EG7-gp96-Ig o 3T3-ova-gp96-Ig - la cantidad de gp96-Ig (en ng) secretada en 24h por el número de células inyectadas se indica en la abscisa; con 3T3-ova- la cantidad de ovoalbúmina secretada en 24h por el número de células inyectadas se indica en la abscisa. Después de 5 días, se determinó la expansión OT-I por citometría de flujo en la cavidad peritoneal (PEC) y en el bazo. La frecuencia de OT-I entre células CD8 fue de hasta el 50% en la PEC y hasta el 8% en el bazo con inmunización con 3T3-ova-gp96-Ig.

La Figura 11A representa los resultados de un experimento en el que el mAb 4C12 anti-TNFR25 actuó agonísticamente y mató células EL4 transfectadas con TNFR25, pero no EL4 de tipo silvestre. En la Figura 11B, se administraron 50 μ g de 4C12 agonista o anti-TL1A L4G6 antagonista o IgG de control en forma i.p. 24 h y 72 h después de inmunización con EG7-gp96-Ig. 4C12 causó un aumento de 8-10 veces de la expansión de OT-I y la duplicación de células peritoneales exudadas ($n = 4$ ratones por grupo). Anti-TL1A inhibe la expansión de CD8.

La Figura 12 representa el cebado cruzado de células CD8 mediante la proteína de choque térmico gp96. Se transfectaron células de vacuna (alógenicas o singénicas) con gp96-Ig y ovoalbúmina, después de lo cual secretaron péptidos de ovoalbúmina que acompañan a gp96-Ig. Se detectó gp96 mediante CD91 y TLR2/4 en DC, dando como resultado su activación y atrapamiento de gp96-Ig con sus péptidos unidos. DC activada sobrerregula B7 (independiente de CD40-L) y los péptidos unidos a gp96 reenviados en forma cruzada a través de Kb (en ratones B6). OT-I son gfp que expresan, células CD8 transgénicas TCR transferidas en forma adoptiva a ratones B6 específicos para Kb-ova. Su expansión puede ser fácilmente medida mediante la proteína fluorescente verde.

La Figura 13 representa Treg CD4+CD25+ positivas para FoxP3 que expresan TNFR25. Las células CD4 fueron purificadas mediante agotamiento de células CD8 de células B y monocitos y luego seleccionadas en forma positiva mediante clasificación magnética para CD25 y luego activadas.

La Figura 14 representa una falta de recuperación de los ratones DN TNFR25-tg a partir de colitis inducida por DSS. 5 ratones de cada grupo recibieron DSS al 2% en agua potable durante 8 días y luego se restauraron a agua normal.

La Figura 15 muestra que las señales de TNFR25 eliminan la inhibición de Treg.

La Figura 16 muestra la ubicación de gfp-OT-I en la mucosa después de la inmunización con gp96-Ig en forma i.p. Los ratones recibieron 1 millón de gfp-OT-I en forma i.v. por transferencia adoptiva. Después de 2 días, los ratones recibieron 4 millones de EG7-gp96-Ig (izquierda) o 4 millones de EG7 (paneles a la derecha) en forma i.p. como estímulo. Cuatro días después se analizó la frecuencia de gfp-OT-I en IEL, los parches de Peyer y LPL además del análisis habitual de células en la PEC, en el bazo y en los ganglios linfáticos.

La Figura 17 muestra las SEQ ID NOs: 1-7 y la SEQ ID NO: 16 y los números de acceso de las bases de datos públicas seleccionadas.

Descripción detallada de la invención

Un objeto de la divulgación es proporcionar nuevas composiciones y métodos que utilizan agentes inmunomoduladores que pueden o bien estimular o aumentar indirectamente el sistema inmunológico o en otros casos, tienen un efecto inmunosupresor. Los agonistas TNFR25 descritos en este documento representan modificadores de la respuesta biológica que alteran la interacción entre las defensas inmunitarias celulares del cuerpo y las células cancerosas para estimular, dirigir o restaurar la capacidad del cuerpo para combatir el cáncer cuando se administra con vacunas tumorales. Los agentes tóxicos específicos de TNFR25 divulgados en este documento son capaces de aumentar la eficacia de un régimen quimioterapéutico agotando en un paciente con cáncer las células inmunosupresoras naturales. Los agonistas de TNFR25 divulgados aquí también pueden tener un efecto curativo. Pueden usarse, entre otras cosas, para tratar enfermedades causadas por inflamación crónica tal como la enfermedad inflamatoria intestinal. Los antagonistas de TNFR25 divulgados en este documento son capaces de inhibir respuestas inmunes celulares mediadas por células T CD8 y pueden, por ejemplo, tratar asma y mitigar el rechazo de órganos o tejidos después de un trasplante de tejido.

1. Definiciones

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos y se pretende que se definan como se indica a continuación.

Un "antígeno" incluye cualquier sustancia que puede estar específicamente unida por una molécula de anticuerpo. Por lo tanto, el término "antígeno" abarca moléculas biológicas que incluyen, pero no se limitan a, metabolitos intermedios simples, azúcares, lípidos, autoácidos y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas.

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. Véase la publicación del documento U.S. No. 2003/0185840.

Un "inmunógeno" es un antígeno macromolecular que es capaz de iniciar la activación de linfocitos dando como resultado una respuesta inmune específica de antígeno. Por lo tanto, un inmunógeno incluye cualquier molécula que contenga uno o más epítomos que estimulen el sistema inmunológico de un huésped para iniciar una respuesta secretora específica de antígeno celular y/o humoral.

El término "anticuerpo" abarca preparaciones de anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos de la invención se pueden preparar en cualquier mamífero, incluyendo ratones, ratas, conejos, cabras y seres humanos. El anticuerpo puede ser un miembro de una de las siguientes clases de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, y sus subclases, y preferiblemente es un anticuerpo IgG1.

El término anticuerpo también se refiere a equivalentes funcionales de los anticuerpos descritos en esta memoria. Los equivalentes funcionales tienen características de unión comparables a las de los anticuerpos e incluyen, por ejemplo, anticuerpos quimerizados, híbridos, humanizados y de cadena única, así como sus fragmentos. Métodos para producir tales equivalentes funcionales se describen en la solicitud PCT WO 93/21319, en la solicitud de Patente Europea No. 239.400; solicitud PCT WO 89/09622; en la solicitud de Patente Europea 338.745; y la solicitud de Patente Europea EP 332.424. Los equivalentes funcionales incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a las secuencias de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos de la invención. Secuencias de aminoácidos "Sustancialmente iguales" se definen aquí como una secuencia con al menos 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80% y más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología con otra secuencia de aminoácidos, como se determina mediante el método de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444 - 2448 (1988).

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos homogénea. El término no está limitado con respecto a la especie o fuente del anticuerpo, ni se pretende que esté limitado por la manera en que se elabora. El término abarca inmunoglobulinas enteras.

5 Los métodos de preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales son conocidos en la técnica. Los anticuerpos policlonales se generan mediante la inmunización de un animal adecuado, tal como un ratón, rata, conejo, oveja o cabra, con un antígeno de interés. Con el fin de potenciar la inmunogenicidad, el antígeno puede unirse a un vehículo antes de la inmunización. Los vehículos adecuados son típicamente grandes macromoléculas
10 metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivas. Tales vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Además, el antígeno puede conjugarse con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de difteria, tétanos, cólera, etc., con el fin de mejorar su inmunogenicidad.

15 Se prefieren conejos, ovejas y cabras para la preparación de sueros policlonales cuando se desean grandes volúmenes de sueros. Estos animales son buenas opciones de diseño también debido a la disponibilidad de anticuerpos marcados anti-conejo, anti-oveja y anti-cabra. La inmunización se realiza generalmente mezclando o emulsionando el antígeno en solución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund ("FCA"), e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o intramuscular). El animal generalmente se refuerza 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones del antígeno en solución salina, preferiblemente usando el adyuvante incompleto de Freund ("FIA"). Los anticuerpos también pueden generarse mediante inmunización in vitro, utilizando métodos conocidos en la técnica. Luego se obtienen antisueros policlonales a partir del animal inmunizado.

25 Los anticuerpos monoclonales se preparan generalmente usando el método de Kohler y Milstein, Nature (1975) 256: 495-497, o una modificación del mismo o Campbell en "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" en Burdon y colaboradores, Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volumen 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); Así como por el método de ADN recombinante descrito por Huse y colaboradores En Science 246, 1275-1281 (1989).

Típicamente, se inmuniza un ratón o rata como se describió anteriormente. Sin embargo, en lugar de sangrar al animal para extraer suero, se remueve el bazo (y opcionalmente varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Si se desea, se pueden seleccionar las células del bazo (después de remover las células adherentes no específicas) aplicando una suspensión de células a una placa o pozo recubierto con el antígeno. Las células B, que expresan una inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno, se unirán a la placa y no se enjuagarán con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, se inducen luego para fusionarse con células del mieloma para formar hibridomas y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, hipoxantina, aminopterina, medio de timidina, "HAT"). Los hibridomas resultantes se sembraron mediante dilución limitante, y se ensayaron para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizante (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales seleccionados se cultivan entonces in vitro (por ejemplo, en botellas de cultivo de tejidos o reactores de fibras huecas), o in vivo (por ejemplo, como ascitis en ratones).

45 El "sitio de unión al antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables del N-terminal ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones hipervariables" que se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones marco" o "FR". Por lo tanto, el término FR se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran naturalmente entre y adyacentes a regiones hipervariables en las inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas en forma relativa entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR".

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "inmuno-específico", "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica puede expresarse en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que un K_d más pequeño representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológicas de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de estos métodos implica la medición de las velocidades de formación y disociación del complejo sitio de unión al antígeno/antígeno, en donde dichas velocidades dependen de las concentraciones de los socios del complejo, la afinidad de la interacción y de los parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante de asociación" ($K_{\text{asociación}}$) como la "constante de disociación" ($K_{\text{disociación}}$)

se pueden determinar mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. La relación de Kdisociación/Kasociación permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y por lo tanto es igual a la constante de disociación K_d . Véase, en general, Davies y colaboradores (1990) Annual Rev. Biochem. 59: 439 - 473.

Se conocen en la técnica varias moléculas terapéuticamente útiles que comprenden sitios de unión al antígeno que son capaces de exhibir propiedades de unión inmunológica de una molécula de anticuerpo. La enzima proteolítica papaina escinde preferencialmente moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos "F(ab)") comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión al antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento "F(ab)₂" que comprende ambos sitios de unión al antígeno. Se puede producir un fragmento "Fv" mediante escisión proteolítica preferencial de una IgM, y en raras ocasiones, una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Sin embargo, los fragmentos Fv se derivan más comúnmente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero VH :: VL no covalente que incluye un sitio de unión al antígeno que retiene gran parte de las capacidades de reconocimiento y unión del antígeno de la molécula de anticuerpo nativo. Inbar y colaboradores (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 2659 - 2662; Hochman y colaboradores (1976) Biochem 15: 2706 - 2710; Y Ehrlich y colaboradores (1980) Biochem 19: 4091 - 4096.

Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("sFv") es un heterodímero VH :: VL enlazado covalentemente que se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL unidos por un enlazador que codifica un péptido. Huston y colaboradores (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85 (16): 5879 - 5883. Se han descrito varios métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas de polipéptido ligero y pesado agregadas naturalmente, pero químicamente separadas, de una región V de anticuerpo en una molécula sFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Números 5.091.513 y 5.132.405 concedida a Huston y colaboradores; y la patente estadounidense Número 4.946.778, concedida a Ladner y colaboradores

"Antígeno cognado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un antígeno para el cual un receptor de células T CD8 (TCR) es inmuno específico. Dicho antígeno, que generalmente se deriva de, por ejemplo, patógenos, tejidos trasplantados (aloantígenos) y células tumorales, son reconocidos por el sistema inmunológico como no propios. La unión del antígeno cognado a su receptor de células T CD8 da como resultado la expansión clonal de esa célula T. Una población creciente de células T CD8 cognadas se encuentra entonces en posición para montar una respuesta inmunológica celular contra la fuente del antígeno cognado agresor.

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para producir "inmunotoxinas". La molécula híbrida combina la especificidad de un anticuerpo o antígeno con la toxicidad de la toxina. Como tal, las moléculas de inmunotoxina tienen una porción de unión al antígeno y una porción de agente tóxico. Las inmunotoxinas son preferiblemente específicas para una molécula de la superficie de la célula, por ejemplo, TNFR25, y facilita el suministro de un agente tóxico a una célula que expresa la molécula de la superficie de la célula antes mencionada.

Preferiblemente, los "agentes tóxicos" tienen un efecto citostático y/o citotóxico sobre la célula a la que se administra. Los agentes tóxicos preferidos son, por ejemplo, isótopos radiactivos, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, colorantes y iones metálicos. Los agentes tóxicos incluyen, pero no se limitan a, Yodo-131, Indio-111, y Tecnecio-99m, Tecnecio-99m, Indio-111, Itrio-90, doxorubicina (Yang y colaboradores (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 1189-1193), daunorubicina (Diener y colaboradores, (1985) Science 231: 148-150, Dillman y colaboradores, (1988) Cancer Res. 48: 6097-6102), metotrexato (Uadia y colaboradores J. Natl Cancer Inst. 74: 29-35, Deguchi y colaboradores (1986) Cancer Res. 46: 3751-3155) y clorambucilo (Symth y colaboradores, J Immunol., 137: 3361-3366). Otros agentes tóxicos incluyen ricina, abrina, toxina diftérica y exotoxina de Pseudomonas, o una porción enzimáticamente activa (cadenas A) de los mismos. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 4.753.894 concedida a Frankel y colaboradores; Nevelle, y colaboradores (1982) Immunol Rev 62: 75 - 91; Ross y colaboradores (1980) European J Biochem 104; Vitteta y colaboradores (1982) Immunol Rev 62: 158-183; Raso y colaboradores (1982) Cancer Res 42: 457-464, y Trowbridge y colaboradores (1981) Nature 294: 171-173. También se incluyen toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas tales como modeccina, alfa sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Saponaria officinalis, Gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina.

Los "agentes tóxicos" también pueden ser agentes quimioterapéuticos. El término "agente quimioterapéutico", tal como se usa en la presente memoria, se refiere generalmente a compuestos administrados para detener, hacer más lenta o revertir la proliferación no deseada de células. Preferiblemente, dichos agentes tienen un efecto antiproliferativo.

Los agentes quimioterapéuticos pueden ser antimetabolitos tales como 5-FU, por ejemplo. La quimioterapia basada en 5-FU comprende la administración de 5-FU, sus derivados, solos o con otros agentes quimioterapéuticos, tales como leucovorina o con un inhibidor de DPD tal como uracilo, 5-etiniluracilo, bromoviniluracilo, timina,

benciloxibenciluracilo (BBU) o 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina. Además, se ha encontrado que la coadministración de un derivado de 5'-desoxicitidina de fórmula (I) con 5-FU o un derivado del mismo mejora significativamente el suministro de un agente quimioterapéutico selectivamente en tejidos tumorales en comparación con la combinación de 5-FU o un derivado del mismo con un inhibidor 5-etiniluracilo de DPD.

5 Alternativamente, los agentes genotóxicos son aquellos que forman lesiones genómicas persistentes y se prefieren para su uso como agentes quimioterapéuticos en el manejo clínico de la proliferación celular no deseada. La velocidad de reparación celular del daño del ADN inducido por genotoxina, así como la velocidad de crecimiento celular a través del ciclo de división celular, afecta el resultado de la terapia con genotoxina. Una clase general de
10 compuestos genotóxicos que se usan para tratar muchos cánceres son agentes alquilantes de ADN y agentes de intercalación de ADN. Los psoralenos son compuestos genotóxicos conocidos por ser útiles en el tratamiento fotoquimioterapéutico de enfermedades cutáneas tales como psoriasis, vitiligo, infecciones fúngicas y linfoma de células T cutáneas. Harrison's Principles of Internal Medicine, parte 2 Cardinal Manifestations of Disease, cap. 60 (Decimosegunda edición, 1991). Otra clase general de compuestos genotóxicos, cuyos miembros pueden alquilar o
15 intercalarse en el ADN, incluyen antibióticos de fuente sintética y natural. De particular interés en la presente invención son antibióticos antineoplásicos, que incluyen pero no se limitan a las siguientes clases de compuestos representados por: amsacrina; actinomicina A, C, D (alternativamente conocida como dactinomicina) o F (alternativamente KS4); azaserina; bleomicina; carminomicina (carubicina), daunomicina (daunorubicina) o 14-hidroxi-daunomicina (adriamicina o doxorubicina); mitomicina A, B o C; mitoxantrona; Plicamicina (mitramicina); y similares. Aún otra clase general de agentes genotóxicos que son comúnmente utilizados y que alquilan al ADN, son aquellos que incluyen a las haloetilnitrosoureas, especialmente las cloroetilnitrosoureas. Los miembros representativos de esta clase amplia incluyen carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina y estreptozotocina. Los primeros agentes de haloetilnitrosourea pueden ser análogos o derivados de cualquiera de los compuestos representativos anteriores.

25 Los tumores actualmente manejables por compuestos de coordinación de platino tales como cisplatino o oxaliplatino incluyen carcinomas de testículo, endometrio, cervicales, gástricos, de células escamosas, adrenocorticales y de pulmón de células pequeñas, junto con meduloblastomas y neuroblastomas. Otros agentes terapéuticos anticancerígenos citotóxicos incluyen, por ejemplo, BEP (bleomicina, etopósido, cisplatino) para cáncer testicular, MVAC (metotrexato, vinblastina, doxorubicina, cisplatino) para cáncer de vejiga, MVP (mitomicina C, vinblastina, cisplatino) para tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Otra clase general de agentes genotóxicos, cuyos miembros alquilan al ADN, incluye las mostazas de azufre y nitrógeno. Estos compuestos dañan el ADN principalmente formando aductos covalentes en el átomo N7 de la
35 guanina. Los miembros representativos de esta clase amplia incluyen clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, mecloretamina, novembicina, trofosfamida y similares. También pueden utilizarse como agentes genotóxicos oligonucleótidos o análogos de los mismos que interactúan de forma covalente o no covalente con secuencias específicas en el genoma de células seleccionadas, si se desea seleccionar uno o más objetivos genómicos predefinidos como locus de una lesión genómica.

40 Otra clase de agentes, cuyos miembros alquilan al ADN, incluyen las etileniminas y metilmelaminas. Estas clases incluyen altretamina (hexametilmelamina), trietilenfosforamida (TEPA), trietilfosforamida (TioTEPA) y trietilenmelamina, por ejemplo.

45 Clases adicionales de agentes alquilantes de ADN incluyen los sulfonatos de alquilo, representados por busulfán; Las azinidinas, representadas por benzodepa; y colaboradores., representados por, por ejemplo, mitoguazona, mitoxantrona y procarbazona. Cada una de estas clases incluye análogos y derivados de los respectivos compuestos representativos.

50 En una realización, los agentes quimioterapéuticos son inhibidores de tirosina quinasas receptoras tales como EGFR y HER2-neu y se emplean como inhibidores selectivos del crecimiento de células proliferativas. Por ejemplo, la erbastatina, un inhibidor de la tirosina quinasa receptor de EGF, reduce el crecimiento de células de carcinoma humano que expresan EGFR. También se afirma que varios derivados de estireno poseen propiedades inhibitoras de la tirosina quinasa y que son útiles como agentes antitumorales. Dos de tales derivados de estireno son
55 inhibidores de RTK clase I cuya eficacia se ha demostrado atenuando el crecimiento del carcinoma de células escamosas humanas inyectado en ratones desnudos. Ciertos derivados de 4-anilinoquinazolina son útiles como inhibidores de tirosina quinasas receptoras. Las muy estrechas relaciones estructura-actividad mostradas por estos compuestos indican un modo de unión claramente definido, en el que el anillo de quinazolina se une en el bolsillo de adenina y el anillo anilino se une en un bolsillo lipofílico único, adyacente. Se han evaluado clínicamente tres análogos de 4-anilinoquinazolina (dos inhibidores reversibles y uno irreversible) como fármacos contra el cáncer. Adicionalmente, el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptina^{MR}) para el tratamiento de cánceres de mama metastásico que sobreexpresan HER2-neu. Scheurle, y colaboradores, Anticancer Res. 20: 2091 - 2096, 2000.

65 Un "vector de expresión" es cualquier elemento genético, por ejemplo, un plásmido, cromosoma, virus, que se comporta ya sea como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula. (es decir, capaz de replicación bajo su propio control) o que es capaz de replicarse mediante la inserción en un cromosoma de célula

huésped, que tiene unido otro segmento de polinucleótido, con el fin de provocar la replicación y/o expresión del segmento unido. Los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a virus, plásmidos y cósmidos.

5 Los vectores de expresión contienen un "casete de expresión" que incluye una secuencia de polinucleótido que se transcribe operativamente enlazada a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la ligación o inserción del vector en una célula huésped deseada y para efectuar la transcripción del polinucleótido que va a ser expresado. Tales secuencias incluyen secuencias promotoras para efectuar la transcripción, secuencias reforzadoras para aumentar la transcripción, secuencias de sitios de unión ribosómica y secuencias de terminación de la transcripción y la traducción. Alternativamente, los vectores de expresión pueden ser capaces de expresar directamente productos de la secuencia de ácido nucleico codificados allí sin ligación o integración del vector en las secuencias de ADN de la célula huésped.

15 El término "operativamente enlazado" se refiere al enlace de un segmento de ADN a otro segmento de ADN de tal forma que permite que los segmentos funcionen en sus formas deseadas. Una secuencia de ADN que codifica un producto génico está operativamente enlazada a una secuencia reguladora cuando está ligada a la secuencia reguladora, tal como, por ejemplo, promotores, reforzadores y/o silenciadores, en una manera que permite la modulación de la transcripción de la secuencia de ADN, directa o indirectamente. Por ejemplo, una secuencia de ADN está operativamente enlazada a un promotor cuando está ligada al promotor secuencia abajo con respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor, en el marco de lectura correcto con respecto al sitio de inicio de la transcripción y permite que el alargamiento de la transcripción continúe a través de la secuencia del ADN. Un reforzador o silenciador está operativamente enlazado a una secuencia de ADN que codifica un producto génico cuando está ligado a la secuencia de ADN de tal forma que aumenta o disminuye, respectivamente, la transcripción de la secuencia de ADN. Los reforzadores y silenciadores pueden estar situados secuencia arriba, secuencia abajo o embebidos dentro de las regiones codificadoras de la secuencia de ADN. Un ADN para una secuencia señal está operativamente enlazado al ADN que codifica para un polipéptido si la secuencia señal se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido. El enlace de las secuencias de ADN a las secuencias reguladoras se lleva a cabo típicamente mediante la ligación en los sitios de restricción adecuados o a través de adaptadores o enlazadores insertados en la secuencia usando endonucleasas de restricción conocidas por el experto en la técnica.

25 Una "molécula pequeña" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos sintéticos de peso molecular diseñados para interactuar con una proteína específica que se sabe que está implicada en una condición de enfermedad dada. Las bibliotecas de tales compuestos se pueden sintetizar fácilmente mediante química combinatoria, por ejemplo, y se seleccionan para la actividad agonista/antagonista de TNFR25 usando técnicas convencionales.

30 Los términos "TNFR-SF25", "TNFR25" o "DR3" se usan aquí indistintamente para un miembro de la familia de receptores de TNF, cuya función biológica completa no se conocía previamente. Véase la Patente estadounidense número 6.713.061, y Borysenko, y colaboradores, *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Mar 18; 328 (3): 794 - 9, Sheikh, y colaboradores, *Curr. Cancer Drug Targets.* 2004 Feb; 4 (1): 97-104. Sin embargo, los inventores, han hecho una cantidad de descubrimientos importantes. La secuencia de ADNc que codifica TNFR25 de ratón se muestra como la SEQ ID NO: 1. El ADNc que codifica TNFR25 humano se muestra como la SEQ ID NO: 2.

45 A diferencia de cualquier otro miembro de la familia TNF-R, se encontró que la expresión de DR3 se controlaba mediante un empalme alternativo de ARNm. Las células T en reposo expresan poca o ninguna proteína DR3, pero contenían altos niveles de ARNm de DR3 empalmado aleatoriamente. Tras la activación de células T a través del receptor de células T, se activa la proteína quinasa C (PKC). La activación de PKC a su vez media el empalme correcto de DR3 de longitud completa y la expresión superficial de la proteína. Esta regulación única de la expresión de DR3 permite una expresión rápida de la proteína DR3 en las células T y permite la regulación ambiental de la expresión de DR3 influyendo en los niveles de PKC responsables del empalme y expresión de DR3.

50 El DR3 también está implicado en la coestimulación de la polarización de las células T y en la estimulación de la producción de IL-13 e IL-10 en células polarizadas Th2. Esta es una observación importante porque entre otras cosas, la producción de IL-10 juega un papel crítico en la supresión de la enfermedad inflamatoria intestinal.

55 La expresión transgénica de TNFR25 en células T media la polarización de TH2 de la producción de citoquinas y anticuerpos sobre la activación de células T y la exposición al antígeno. Además, el TNFR25 transgénico inhibe parcialmente la proliferación dirigida por TCR de las células CD4 y CD8 y reduce el número total de células T en los órganos linfoides sin inducir apoptosis. Las células CD8 fueron más afectadas por TNFR25 que las células CD4. Por lo tanto, las señales de TNFR25 son importantes en las respuestas efectoras a patógenos formando la polarización resultante hacia TH2 o hacia una respuesta mixta TH1/TH2.

60 Los ratones transgénicos TNFR25 son altamente susceptibles a la inflamación de las vías respiratorias inducida por antígeno en un modelo de asma en ratones y producen cantidades incrementadas de IL-13 y eosinófilos en el pulmón tras la exposición al antígeno mediante inhalación. Los ratones transgénicos que expresan una forma

negativa dominante de TNFR25 mostraron una resistencia mayor a la hiperreactividad de las vías respiratorias cuando se compararon con ratones de tipo silvestre.

"TL1A" se refiere aquí como un factor similar al TNF que actúa como coestimulador de la secreción de IFN-gamma a través de la unión al receptor que contiene el dominio de muerte, DR3. Se presume que TL1A, al igual que el TNF, circula como una forma soluble homotrimérica. Por lo tanto, "TL1A soluble" como se usa en la presente memoria, se refiere a TL1A homotrimérico. El término no se limita a ninguna forma específica de la especie. Sin embargo, la secuencia de ADNc para el monómero TL1A humano se proporciona como la SEQ ID NO: 7 y aquella del ratón como la SEQ ID NO: 3.

Se ha sugerido que TL1A desempeña un papel en la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) funcionando como citoquina de polarización de Th1. Se ha demostrado que la cantidad de proteína TL1A y el número de células positivas para TL1A se correlacionan con la gravedad de la inflamación, más significativamente en la enfermedad de Crohn (CD). También se ha demostrado que la adición de TL1A humana recombinante a cultivos de lámina propia mononuclear estimulada por PHA de pacientes con CD aumentó significativamente la producción de IFN-gamma en 4 veces, mientras que se observó un efecto mínimo en pacientes de control. Adicionalmente, un anticuerpo anti TL1A de bloqueo fue capaz de mejorar el asma en ratones de tipo silvestre lo que indica que TNFR25 y TL1A están implicados en la patogénesis del asma.

Los receptores del cuerpo humano actúan estimulados o inhibidos por agonistas naturales (tales como hormonas, citoquinas y neurotransmisores) o sintéticos (tales como fármacos, por ejemplo, anticuerpos o moléculas pequeñas).

El agonista de TNFR25 se denomina en la presente memoria como una sustancia que se une al receptor TNFR25 y desencadena una respuesta en la célula en la que el receptor TNFR25 se expresa en forma similar a una respuesta que se observaría exponiendo la célula a un ligando TNFR25 natural, por ejemplo, TL1A. Un agonista es el opuesto de un antagonista en el sentido de que mientras un antagonista puede unirse también al receptor, falla en activar el receptor y en realidad lo bloquea total o parcialmente de la activación por agonistas endógenos o exógenos. Un agonista parcial activa un receptor pero no causa tanto cambio fisiológico como un agonista completo.

La TL1A soluble se puede administrar en forma terapéutica a un paciente para aumentar la activación del receptor TNFR25 en una población celular dada como un agonista de TNFR25. Alternativamente, otro ejemplo de un agonista de TNFR25 es un anticuerpo que es capaz de unirse y activar TNFR25. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 4C12 se une y activa la señalización de TNFR25. En otra realización y en el contexto de esta invención, un agonista de TNFR25 puede derivarse de un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar ectópicamente la expresión transgénica de un anticuerpo agonista de TNFR25 y/o una proteína TL1A en un lugar elegido o en un momento escogido. En aún otra realización, un agonista de TNFR25 que conduce a un aumento en la señalización de TNFR25 en un tejido se proporciona mediante un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar la expresión transgénica del propio TNFR25. Esto sería útil en una situación en la que se desea un aumento de la señalización de TNFR25 en un tejido en el que exista un exceso de agonista(s) de TNFR25 exógeno o endógeno en relación con el receptor.

Un "antagonista de TNFR25" se refiere aquí a una sustancia que inhibe la función fisiológica normal de un receptor TNFR25. Tales agentes actúan interfiriendo en la unión de agonistas/ligandos del receptor endógeno tales como TL1A, con el receptor TNFR25. Un ejemplo de un antagonista de TNFR25 es un receptor TNFR25 negativo dominante. Preferiblemente, el antagonista de TNFR25 usado aquí es un anticuerpo específico para TL1A que interfiere con la capacidad de TL1A para activar el receptor TNFR25. Lo más preferiblemente, ese anticuerpo es el anticuerpo monoclonal L4G6. En otra realización, el antagonista de TNFR25 es una proteína de fusión de la porción extracelular de TNFR25 o una forma alternativa de empalme de TNFR25 con la porción Fc de inmunoglobulina o cualquier otro socio de fusión adecuado. En otra realización, el antagonista de TNFR25 es una forma soluble de TNFR25 elaborada mediante el truncamiento anterior del dominio de unión transmembrana, ya sea como forma alternativa de empalme o como un constructo artificial. En otra realización, el antagonista de TNFR25 es un anticuerpo que se une específicamente a TNFR25 e interfiere con su unión a su(s) ligando(s) natural(es). En otra realización, el antagonista de TNFR25 puede ser un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar la expresión transgénica de un ARNm, antisentido ARNi o ribozima que es capaz de desactivar la transcripción y/o traducción del ARNm de TNFR25 y/o TL1A endógenos en un sitio escogido o en un momento elegido. En otra realización más, se puede disminuir la señalización de TNFR25 en un tejido proporcionando un vector de expresión con un casete de expresión capaz de impulsar la expresión transgénica de un TNFR25 dominante negativo.

Los antagonistas o agonistas de TNFR25 pueden estar en forma de aptámeros. Los "aptámeros" son moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado de combinaciones aleatorias basadas en su capacidad para unirse a otras moléculas. En una realización, los aptámeros se unen específicamente a TNFR25 para bloquear la unión de su ligando natural, por ejemplo, TL1A, o que se unen al mismo TL1A, e impiden que se una a TNFR25. En otra realización, los aptámeros se unen específicamente al receptor TNFR25 y lo activan.

"Negativo dominante" o "DN" como se usa en la presente memoria se refiere a una variante estructural proporcionada exógenamente de TNFR25 que actúa para bloquear TNFR25 endógeno. Por ejemplo, un exceso molar de un DN competirá con TNFR25 endógeno para la unión del ligando TNFR25, por ejemplo, TL1A. Preferiblemente, el DN es el mismo que el TNFR25 de tipo silvestre excepto porque carece del dominio intracelular. Alternativamente, el DN es el mismo que el TNFR25 de tipo silvestre excepto por que carece del dominio transmembrana y el dominio intracelular. La secuencia de codificación para el DN de ratón TNFR25 se proporciona en la SEQ ID NO: 4. La secuencia de codificación para el DN TNFR25 humano se proporciona en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de codificación para el DN TNFR25 humano que contiene solo el dominio extracelular se proporciona en la SEQ ID NO: 6.

La presente divulgación también involucra las secuencias de codificación que son sustancialmente idénticas a las SEQ ID NOs: 3-7. El experto en la técnica también apreciará que las secuencias de oligonucleótidos sustancialmente idénticas a las SEQ ID NOs: 3-7 pueden diferir de las SEQ ID NOs: 3-7, respectivamente, con respecto a la identidad de al menos una base de nucleótidos. Sin embargo, todas las secuencias de oligonucleótidos sustancialmente idénticas a las SEQ ID NOs: 3-7 se hibridarán bajo condiciones rigurosas (como se definió aquí) con todos o a una porción de los complementos de las SEQ ID NOs: 3-6 (es decir, secuencias objetivo), respectivamente. Los términos "hibrida específicamente" o "específicamente hibrida" se refieren a hibridación complementaria entre un oligonucleótido (por ejemplo, un cebador o sonda marcada) y una secuencia objetivo. El término abarca específicamente desajustes menores que se pueden acomodar reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación para lograr el cebado deseado para las polimerasas de PCR o la detección de la señal de hibridación.

Bajo condiciones de hibridación rigurosas, sólo hibridan secuencias de ácido nucleico altamente complementarias, es decir, sustancialmente idénticas. Preferiblemente, tales condiciones previenen la hibridación de ácidos nucleicos que tienen 3 o más desajustes de 20 nucleótidos contiguos, más preferiblemente 2 o más desajustes de 20 nucleótidos contiguos, lo más preferiblemente uno o más desajustes de 20 nucleótidos contiguos. La porción que hibrida del ácido nucleico que hibrida es al menos aproximadamente 90%, preferiblemente al menos aproximadamente 95%, o lo más preferiblemente aproximadamente al menos aproximadamente 98%, idéntica a la secuencia de una secuencia objetivo, o su complemento.

La hibridación de un ácido nucleico a una muestra de ácido nucleico bajo condiciones rigurosas se define a continuación. La estabilidad del dúplex de ácido nucleico o híbrido se expresa como una temperatura de fusión (T_m), que es la temperatura a la cual la sonda se disocia del ADN objetivo. Esta temperatura de fusión se utiliza para definir las condiciones de rigurosidad requeridas. Si se deben identificar secuencias que son sustancialmente idénticas a la sonda, en lugar de idénticas, entonces es útil establecer primero la temperatura más baja a la que sólo se produce hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, SSC o SSPE). Después, se asume que un desajuste del 1% da lugar a una disminución de 1°C en la T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si se buscan secuencias que tienen una identidad > al 95% con la sonda, la temperatura final de lavado disminuye en 5°C). En la práctica, el cambio en la T_m puede estar entre 0,5°C y 1,5°C por cada 1% de desajuste.

Las condiciones rigurosas implican la hibridación a 68°C. en 5xSSC/5x solución Denhart/SDS al 1,0%, y lavado en 0,2xSSC/ SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Condiciones moderadamente rigurosas incluyen lavado en 3xSSC a 42°C. Los parámetros de concentración de sal y temperatura se pueden variar para conseguir un nivel óptimo de identidad entre el cebador y el ácido nucleico objetivo. En la técnica se puede obtener una orientación adicional con respecto a tales condiciones, por ejemplo, Sambrook, Fischer y Maniatis, Molecular Cloning, manual de laboratorio (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1989) y FM Ausubel y colaboradores, editores, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons (1994).

Los "inmunosupresores", como se usa aquí el término, son fármacos importantes necesarios para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y la facilitación de trasplantes de órganos. Por ejemplo, la Ciclosporina A (CsA) tiene una actividad inmunosupresora considerable. Ha revolucionado el trasplante de órganos y se utiliza comúnmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Para una revisión reciente del uso de CsA y sus mecanismos de acción, véase Wenger y colaboradores; Cyclosporine Chemistry, Structure-activity relationships and Mode of Action, Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Vol. 2, 176 (1986). Sin embargo, CsA es una medicación potente que puede tener efectos secundarios severos tales como insuficiencia renal, supresión de la médula ósea e infertilidad.

Los corticosteroides también se usan en condiciones inflamatorias por sus efectos antiinflamatorios. Tienen un rápido inicio de acción, y afectan profundamente muchas partes del sistema inmunológico así como la mayoría de los otros sistemas del cuerpo. Los corticosteroides son una piedra angular del tratamiento de la mayoría de los tipos de vasculitis, y se usan a menudo en combinación con otros medicamentos inmunosupresores. Sin embargo, el uso a largo plazo de corticosteroides también puede tener efectos secundarios graves incluyendo hipertensión, aumento de peso, acné y una cara hinchada. Otros inmunosupresores incluyen azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, mercaptopurina, tacrolimus y micofenolato de mofetilo.

En general, se pueden proporcionar agonistas y antagonistas a un paciente en cualquiera tipo de composiciones que sean ingeridas, inyectadas, inhaladas o proporcionadas por medio de supositorios. Alternativamente, las composiciones pueden formularse en gotas para los oídos o los ojos.

5 El término asma, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier condición asmática marcada por ataques recurrentes de disnea paroxística (es decir, "enfermedad obstructiva reversible del pasaje de las vías respiratorias") con sibilancias debido a la contracción espasmódica de los bronquios (denominado "broncoespasmo"). Las afecciones asmáticas que pueden ser tratadas o incluso prevenidas incluyen asma alérgico y
10 alergia bronquial caracterizados por manifestaciones en personas sensibilizadas provocados por una variedad de factores incluyendo ejercicio, especialmente ejercicio vigoroso ("broncoespasmo inducido por ejercicio"), partículas irritantes (polen, polvo, algodón, caspa de gato) así como asma leve a moderada, asma crónica, asma crónica severa, asma grave e inestable, asma nocturna y estrés psicológico. Los métodos pueden ser particularmente útiles para prevenir la aparición de asma en mamíferos, por ejemplo, seres humanos afectados con enfermedad obstructiva reversible de los pasajes de las vías respiratorias inferiores y pulmones, así como broncoespasmo
15 inducido por ejercicio. En los métodos para tratar el asma descritos en la presente memoria, el método preferido de administrar los antagonistas es mediante inhalación

Existen varios tipos diferentes de dispositivos que usan mecanismos y metodologías generalmente diferentes para producir aerosoles para inhalación. El dispositivo más comúnmente utilizado es un inhalador de dosis medidas (MDI) que comprende un envase de formulación del fármaco con la formulación que incluye un propelente de bajo punto de ebullición. La formulación se mantiene en el recipiente a presión y se libera una dosis medida de formulación como un aerosol cuando se abre la válvula del recipiente. El propelente de bajo punto de ebullición se evapora rápidamente o "destella" cuando se expone la formulación a presión atmosférica fuera del recipiente. Las partículas de formulación que contienen el fármaco sin el propelente son inhaladas en los pulmones del paciente y después migran al sistema circulatorio del paciente. Hay una serie de tipos diferentes de dispositivos MDI. Dispositivos de este tipo se divulgan en la patente estadounidense No. 5.404.871 concedida el 11 de abril de 1995 y la patente estadounidense No. 5.364.838 concedida el 15 de noviembre de 1994.
20
25

Otro tipo de dispositivo es el dispositivo de inhalador de polvo seco (DPI). Como se indica por el nombre, tales dispositivos usan formulaciones de polvo seco, polvo que se sopla en una nube en aerosol mediante una ráfaga de gas. Los dispositivos DPI típicos se muestran en la patente estadounidense No. 5.775.320 concedida el 7 de julio de 1998 y la patente estadounidense No. 5.740.794 concedida el 21 de abril de 1998.
30

Incluso otro tipo de dispositivo de liberación de aerosol fuerza una formulación a través de una membrana porosa. La formulación que se mueve a través de los poros se rompe para formar pequeñas partículas que son inhaladas por el paciente. Los dispositivos de este tipo se muestran en patente estadounidense No. 5.554.646 concedida el 13 de agosto de 1996 y la patente estadounidense No. 5.522.385 concedida el 4 de junio de 1996.
35

Con respecto a las composiciones inhalables, los materiales portadores adecuados pueden estar en forma de un polvo amorfo, un polvo cristalino o una combinación de polvos amorfos y cristalinos. Los materiales adecuados incluyen (a) hidratos de carbono, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa, celobiosa, y similares; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos y similares; (b) aminoácidos, tales como glicina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, cisteína, lisina, y similares; (c) sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicos, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, gluconato de magnesio, gluconato de sodio, clorhidrato de trometamina y similares; (d) péptidos y proteínas, tales como aspartame, albúmina de suero humano, gelatina y similares; (e) alditoles, tales como manitol, xilitol y similares. Un grupo preferido de portadores incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas, glicina, citrato de sodio, clorhidrato de trometamina, albúmina de suero humano y manitol.
40
45
50

Dichos materiales portadores se pueden combinar con los agonistas o antagonistas antes del secado por aspersión, es decir, añadiendo el material portador a la solución reguladora que se prepara para el secado por aspersión. De este modo, el material portador se formará simultáneamente con y como parte de las partículas agonistas o antagonistas. Típicamente, cuando el portador se forma por secado por aspersión junto con los agonistas o antagonistas, los agonistas o antagonistas estarán presentes en cada partícula individual en un porcentaje en peso en el intervalo de 5% a 95%, preferiblemente de 20% a 80%. El resto de la partícula será principalmente material portador (típicamente de 5% a 95%, normalmente de 20% a 80% en peso), pero también incluirá regulador(es) y puede incluir otros componentes como se describió anteriormente. Se ha encontrado que la presencia de material portador en las partículas que se suministran a la región alveolar del pulmón (es decir, aquellas en el intervalo de tamaño requerido por debajo de 10 μm) no interfiere significativamente en la absorción sistémica de agonistas o antagonistas.
55
60

Alternativamente, los portadores pueden prepararse por separado en una forma de polvo seco y combinarse con los agonistas o antagonistas en polvo secos mediante mezcla. Los portadores en polvo preparados en forma separada serán normalmente cristalinos (para evitar la absorción de agua), pero en algunos casos pueden ser amorfos o mezclas cristalinas y amorfas. El tamaño de las partículas portadoras puede seleccionarse para mejorar la fluidez de
65

los agonistas o antagonistas en polvo, estando típicamente en el intervalo de 25 μm a 100 μm . Las partículas portadoras en este intervalo de tamaños generalmente no penetrarán en la región alveolar del pulmón y a menudo se separarán de los agonistas o antagonistas en el dispositivo de suministro antes de la inhalación. De este modo, las partículas que penetran en la región alveolar del pulmón constarán esencialmente de agonistas o antagonistas y regulador. Un material portador preferido es manitol cristalino que tiene un tamaño en el intervalo indicado anteriormente.

Las composiciones en polvo seco preferiblemente forman aerosol por dispersión en un flujo de aire u otra corriente de gas fisiológicamente aceptable de una manera convencional. Un sistema adecuado para tal dispersión se describe en la solicitud de patente en trámite junto con la presente, serial No. 07/910.048, que ha sido publicada como WO 93/00951.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las composiciones y formulaciones en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, tal como solución salina regulada con fosfato de sodio, seguido por esterilización mediante filtración. Tal como se utiliza en la presente memoria, "un portador fisiológicamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, agentes antibacterianos y antifúngicos que no son tóxicos para los seres humanos, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. El medio o el agente deben ser compatibles con el mantenimiento de la conformación apropiada de las cadenas de proteínas y su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. Se puede encontrar una descripción de ejemplos de portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como formulaciones farmacéuticas, en Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto estándar en este campo, y en USP/NF.

La dosificación y el modo de administración de las composiciones reivindicadas deben ajustarse de acuerdo con la identidad, formulación, vía de administración y otras características relevantes pertinentes, como se sabe, o puede discernirse fácilmente en la técnica.

2. Agonistas de TNFR25 como potenciadores directos de la polarización de las células T y la inflamación pulmonar

Se descubrió que el TNFR25 y su ligando TL1A son potenciadores directos de la polarización de las células T y la inflamación pulmonar. El papel importante de TL1A y TNFR25 en la enfermedad pulmonar se apoya en la inflamación exagerada de los pulmones observada en ratones TNFR25-transgénicos agonistas. La sobreexpresión de TNFR25 da como resultado un sesgo fuerte de Th2 de células CD4 tras la activación. Este sesgo a su vez es probable que sea responsable del aumento de la inflamación pulmonar en el modelo de ovoalbúmina.

Los inventores observaron que en un modelo murino de asma, el bloqueo de la señalización de TNFR25 da como resultado una producción reducida de citoquinas de Th2 que inhibe la inflamación pulmonar. El TNFR25 en las células CD4 desencadena la secreción de IL-13 en ambas células Th1 y Th2 polarizadas y se necesitan señales de TNFR25 en células NKT que inician y promueven la inflamación pulmonar. La producción crónica de IL-13, desencadenada por TNFR25, también es responsable de las secuelas de la inflamación crónica de los pulmones, incluyendo pero no restringida al asma crónica, para la remodelación de las vías respiratorias y la fibrosis. El bloqueo de la señalización de TNFR25 sobre células NKT por un mutante de TNFR25 negativo dominante en experimentos de transferencia adoptiva anula la inflamación pulmonar. El bloqueo de señales de TNFR25 como estas sería útil en el tratamiento del asma agudo y crónico y otros trastornos pulmonares.

En la cadena de eventos que conduce a la inflamación pulmonar, la producción de IL-13 por las células NKT es una etapa temprana (Akbari, O. y colaboradores, Nat Med 9, 582-8 (2003)). El papel crítico de las células NKT en el asma se apoya en este estudio, ya que los experimentos de transferencia adoptiva indicaron que uno de los principales conmutadores moleculares utilizados por las células NKT para inducir la inflamación pulmonar es TNFR25. TNFR25 tiene la capacidad adicional de modular las respuestas efectoras incipientes por células de memoria CD4 específicas de antígeno mediante el empalme de TNFR25 mediado por PKC en células activadas por TCR. TNFR25 actúa por lo tanto en la fase muy temprana del inicio de la respuesta de memoria en el pulmón. Por lo tanto, el bloqueo de la señalización de TNFR25 por anti-TL1A o por otros procedimientos interrumpe la cascada de eventos que conducen a la inflamación pulmonar aguda que se cree que es responsable de los ataques de asma.

El bloqueo de TNFR25 se consiguió en ratones de tipo silvestre genéticamente así como por bloqueo de anticuerpos con los dos métodos independientes produciendo resultados similares. Interferir con las señales de TNFR25 in vivo dio como resultado una disminución de la producción de IL-13, IL-5 e IL-4 por drenaje estimulado nuevamente con antígeno de los ganglios linfáticos bronquiales y en la supresión de la inflamación pulmonar. Es importante destacar que el bloqueo de anticuerpos anti TL1A durante la fase de exposición al antígeno de las vías respiratorias de ratones polarizados con cebador y Th2 fue eficaz en la inhibición de la inflamación pulmonar indicando un papel directo de TNFR25 en la fase efectora en el pulmón.

3. La expresión constitutiva de TNFR25 en células NKT y expresión inducible en células T activadas.

Para estudiar las funciones biológicas de TNFR25 y su ligando cognado TL1A, se generaron anticuerpos monoclonales antirrátón de hámster mediante protocolos estándar. Para detectar en forma confiable el bajo nivel de expresión de TNFR25 por citometría de flujo en células primarias fue necesario desarrollar un ensayo tipo sándwich de triple capa. Sin activación, se detectó TNFR25 en niveles bajos en las células T CD4 y en niveles aún más bajos también en las células T CD8, pero no en las células B (Figura 1a). Además, una subpoblación de células CD11c+ expresó TNFR25. Las células NKT expresaron constitutivamente niveles relativamente altos de TNFR25, mientras que sólo una pequeña fracción de células NK11+ negativas para CD3 mostró expresión de TNFR25 (Fig. 1a). En el timo, las células CD4 y CD8 positivas individuales expresaron TNFR25 de forma similar a las células T periféricas. Los timocitos doblemente positivos y doblemente negativos para CD4, CD8 no expresaron TNFR25 (Fig. 1c).

Tras la activación de células T periféricas con anti-CD3 y anti-CD28, se sobreexpresó la expresión de TNFR25 tanto en células CD4+ como CD8+ (Figura 1b). Por otro lado, la activación de LPS de células B no produjo la expresión de TNFR25. El ARNm de TNFR25 murino se expresa constitutivamente en células T pero se empalma aleatoriamente en forma similar al TNFR25 humano (Screaton, G.R. y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 94, 4615-9 (1997)) (Figura 2). El aumento de la expresión de la proteína TNFR25 en células T activadas se asoció con el empalme inducido por la activación de TNFR25 de longitud completa del ARNm de TNFR25 empalmado aleatoriamente. El empalme inducido por activación de TNFR25 en células T fue bloqueado por el inhibidor químico H7 indicando un papel para la PKC en el empalme (Figura 2).

La expresión preferencial de TNFR25 en células NKT y células T activadas y su activación inducida por el empalme a TNFR25 de longitud completa y el rápido aumento en la expresión superficial plantearon la cuestión de la función biológica de TNFR25 en el sistema inmunológico. La ablación del gen TNFR25 en ratones no reveló un fenotipo definitivo para la deficiencia de TNFR25, excepto por un defecto leve en la selección negativa en el timo. Por lo tanto, se analizaron los efectos biológicos de los transgenes TNFR25 expresados en células T impulsados por el promotor CD2 y el potenciador.

Se utilizaron TNFR25 de longitud completa (FL TNFR25, en la Fig. 2) y un producto de empalme alternativo de TNFR25 que carecía del exón 5 y 6 (Δ 5,6 TNFR25, Figura 2) para la expresión transgénica. Δ 5,6 TNFR25 carece de exón 5 y 6 que codifican parte del cuarto dominio extracelular rico en cisteína. Sin embargo, está anclado en la membrana y tiene un dominio de señalización intracelular completo tal como FL TNFR25, y se une a TL1A y un anticuerpo agonista anti TNFR25 (4C12). Además, un mutante dominante negativo, DN TNFR25, truncado inmediatamente después del dominio transmembrana, se expresó como transgén y se describirá a continuación.

4. La sobreexpresión transgénica de TNFR25 promueve la polarización Th2 de las células CD4 y media el aumento de la inflamación pulmonar en el modelo de ovoalbúmina de AHR.

Se obtuvieron y analizaron cuatro fundadores independientes para cada transgén de TNFR25. El promotor CD2 y la posición reforzadora soportada independiente de la expresión del transgén en los cuatro fundadores Δ 5,6 TNFR25, FL TNFR25 y DN TNFR25 revelaron un alto nivel de expresión en células T en reposo, células NKT, células NK y en una subpoblación de células CD11c+. Las células B no expresaron el transgén (Fig. 3a). La autenticidad de la detección de anticuerpos por citometría de flujo se verificó mediante transferencias tipo Western de células tumorales transfectadas (Figura 3b) y se detectaron bandas de transferencia tipo Western idénticas en esplenocitos transgénicos mientras que la molécula endógena estaba por debajo del nivel de detección por transferencia tipo Western. La forma de empalme de Δ 5,6 no fue detectada por el anticuerpo 10D1 en transferencias tipo Western (Figura 3b) lo que indica que se une al exón 5 o 6. La sobreexpresión transgénica de FL TNFR25 se asoció con un número disminuido de células T en órganos linfoides primarios y secundarios en comparación con los compañeros de camada no transgénicos (Fig. 3c); el efecto del transgén Δ 5,6 sobre la celularidad fue modesto en el timo y no significativo en órganos linfoides secundarios. El número reducido de células T en ratones transgénicos estaba acompañado de una proliferación disminuida en respuesta a la estimulación con anti CD3 y CD28 cuando se comparan números iguales de células transgénicas purificadas con células CD4 y CD8 compañeras de camada no transgénicas (Fig. 3d). Se observó una proliferación disminuida en todos los puntos de tiempo de 24 a 72 horas. Sin embargo, la estimulación de las células CD4 o CD8 de TNFR25-tg con ésteres de forbol PMA y la ionomicina ionóforo de Ca restauró la proliferación normal indicando que las células transgénicas no tenían un defecto intrínseco en su capacidad para proliferar. Las células T de TNFR25-tg activadas con CD3/CD28 sobreexpresaron CD25 normalmente, pero produjeron sólo aproximadamente la mitad de la cantidad de IL-2 (Figura 4) en comparación con los controles de compañeros de camada. La adición exógena de un exceso de IL-2 no restableció la proliferación (Fig. 3d). Las células T de TNFR25-tg no sufrieron un aumento de la apoptosis según se midió mediante tinción con Anexina V (Figura 4), lo que indica que el déficit proliferativo no se debe a las señales de TNFR25 para la muerte celular.

Se usaron células EL4 transfectadas con FL y Δ 5,6 TNFR25 para comparar las propiedades de señalización de las variantes de empalme activadas con TL1A soluble, TL1A unida a la membrana (EL4-TL1A) o un anticuerpo agonista anti TNFR25 (4C12). Los tres ligandos indujeron rápidamente la activación de NF- κ B en un lapso de 25 minutos como se detectó mediante EMSA (Fig. 3e).

Después de la activación primaria con anticuerpos anti-CD3 unidos a la placa y anti-CD28 solubles, las células transgénicas FL y Δ5,6 TNFR25 produjeron cantidades significativamente mayores de citoquinas de Th2 incluyendo IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 cuando se compararon con compañeros de camada no transgénicas (Fig. 3f). El IFN-γ disminuyó cuando se activaron las células CD4 de FL TNFR25-tg, pero no con transgenes de Δ5,6 TNFR25, lo que indica una sutil diferencia en la función de las variantes de empalme. Aunque la proliferación de células transgénicas de TNFR25 se disminuyó, puso detectarse un aumento en la producción de citoquinas de Th2 ya en un lapso de 24 horas desde la activación y continuó aumentando en los días siguientes, indicando un sesgo de Th2 existente antes de la activación.

A continuación se determinó si el sesgo de Th2 de las células CD4 transgénicas de FL TNFR25 podría ser anulado bajo condiciones de polarización de Th1. En condiciones neutras de Th, las células CD4 de TNFR25-tg produjeron tanto IL-4 como las células CD4 de tipo silvestre en condiciones de polarización de Th2 (Figura 3g). La incubación de células de FL TNFR25-tg en condiciones de polarización de Th2 no tuvo ningún efecto adicional sobre la producción de IL-4 o IL-13, indicando que las células estaban ya polarizadas al máximo en Th2 durante la activación primaria en condiciones neutras de Th. Sin embargo, las células CD4 de FL TNFR25-tg podrían polarizarse con Th1 incluyendo en el cultivo anticuerpos para IL-4 y añadiendo IL-12 exógena. Bajo estas condiciones las células de FL TNFR25-tg produjeron IFN-γ a niveles más altos que las células de tipo silvestre polarizadas con Th1 (Figura 3g), lo que indica que el transgén de TNFR25 también puede coestimular citoquinas de Th1. Las células CD4 de FL TNFR25-tg polarizadas con Th1, a diferencia de las células Th1 de tipo silvestre, también produjeron IL-13 pero sólo cantidades mínimas de IL-4. La sobreexpresión transgénica de TNFR25 mientras se sesgaba espontáneamente hacia Th2, puede sin embargo coestimular la producción de citoquinas de tipo Th1 o Th2 en condiciones de polarización apropiadas. Además, las señales de TNFR25 coestimulan la producción de IL-13 ya sea bajo condiciones de polarización Th1 o Th2.

Se evaluó el sesgo espontáneo de Th2 de ratones TNFR25-tg in vivo mediante inmunización y análisis de la producción de isotipos de anticuerpos. Se llevaron a cabo estudios in vivo con ratones transgénicos Δ5,6 TNFR25. Δ5,6-TNFR25 muestra las mismas propiedades de señalización que FL TNFR25 con respecto a la inducción de NF-κB (Figura 3e) y la inducción de apoptosis y genera un perfil de citoquinas similar sesgado de Th2. Sin embargo, a diferencia de los ratones transgénicos FL, los ratones transgénicos Δ5,6 tienen una celularidad de células T CD4 normal en los ganglios linfáticos (Figura 3c) y los bazo y por lo tanto pueden representar con mayor precisión la función de TNFR25 para experimentos in vivo.

Los ratones TNFR25-tg inmunizados con DNP-KLH generaron proporciones más altas de anticuerpo IgG1/IgG2a específico de antígeno en comparación con compañeros de camada no transgénicos, indicativo de una mayor relación de anticuerpos de tipo Th2 in vivo (Figura 5a). Sin inmunización, los niveles de IgG1 e IgG2a de ratones de tipo silvestre y transgénicos eran idénticos, lo que demuestra que es necesaria la activación para revelar el sesgo de Th2.

El sesgo de Th2 de las células CD4 de TNFR25-tg y su mayor producción de IL-13 sugiere que la sobreexpresión de TNFR25 puede predisponer al aumento de inflamación alérgica de los pulmones característica del asma, ya que IL-13 es la citoquina de firma de dicha afección (Eliás, JA y colaboradores. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 401-4 (2003)). Se analizó esta hipótesis utilizando el modelo clásico de ovoalbúmina para la inflamación pulmonar experimental en ratones. Se cebaron ratones TNFR25-tg B6 y controles de tipo silvestre en forma i.p. con ovoalbúmina y alumbre el día 0 y 5. El día 12 se expusieron sus vías respiratorias a ovoalbúmina en aerosol y se analizaron uno a tres días después. Los ratones TNFR25-tg contenían un número dramáticamente mayor de eosinófilos en el fluido broncoalveolar (BALF, Fig. 5b), asociado con mayores niveles de IgE específicos de la ovoalbúmina en suero (Fig. 5d) y la producción elevada de citoquinas de Th2 mediante nueva estimulación con ovoalbúmina de las células de los ganglios linfáticos bronquiales (Figura 5e). La producción de IFN-γ se redujo en las células de los ganglios linfáticos bronquiales transgénicos en comparación con células de tipo silvestre. El análisis histopatológico de los pulmones de ratones TNFR25-tg mostró un aumento masivo de la infiltración pulmonar perivascular de los eosinófilos, un aumento de la producción de moco bronquial y una hiperplasia de células calciformes teñidas con PAS (Figura 5c) en forma consistente con la exacerbación de la inflamación pulmonar por sobreexpresión de TNFR25 en células T.

5. El bloqueo genético o de anticuerpos de TNFR25 durante la exposición de las vías respiratorias de ratones cebados bloquea la inflamación pulmonar.

Se elaboró un mutante negativo dominante de TNFR25, DN TNFR25 para bloquear la señalización de TNFR25 durante la exposición de las vías respiratorias y expresó el constructo como transgén bajo el promotor y reforzador de CD2. El transgén DN TNFR25 carece del dominio de señalización intracelular completo, pero es idéntico al TNFR25 de longitud completa en su dominio transmembrana y extracelular.

DN TNFR25 transgénico se expresó en niveles idénticos a los transgenes agonistas TNFR25 (Figura 3a) como se determinó mediante citometría de flujo. Utilizando la intensidad de fluorescencia superficial como la medida para el número de moléculas expresadas, se determinó un exceso molar de tres a cuatro veces de la expresión de TNFR25 transgénico sobre TNFR25 endógeno. Este nivel de sobreexpresión de DN TNFR25 silenció la actividad de TNFR25

endógeno. La activación primaria anti CD3 tanto de células CD4 transgénicas DN como de tipo silvestre estimulan tanto la secreción de citoquinas de Th1 como de Th2 (Figura 4, panel d). La activación de TNFR25 con un anticuerpo agonista (4C12) durante la activación primaria anti CD3 de células de tipo silvestre coestimula tanto la producción de citoquinas de Th1 como de Th2 pero este efecto coestimulador de TNFR25 se bloquea por el transgén DN TNFR25 (Figura 6a), lo que indica que el transgén bloquea la función del gen endógeno. De forma similar, el efecto agonista de 4C12 coestimula la proliferación de células CD4 de tipo silvestre que fue bloqueada en células CD4 de DN TNFR25-tg (Figura 6b) que indica que se silencia TNFR25 endógena. Es importante destacar que la expresión de DN TNFR25 en células CD4 disminuyó en gran medida la producción sobrerregulada de citoquinas de Th2, normalmente observada, tras la activación secundaria de células que habían sido cebadas bajo condiciones neutrales de Th (Figura 6c), indicando que las señales de TNFR25 promueven fuertemente o son necesarias para la polarización de Th2 y que estas señales están bloqueadas por el transgén DN. Más importante aún, las células de DN TNFR25-tg no podían estar polarizadas por Th2 incluso bajo condiciones de polarización de Th2 que se proporcionaron mediante la adición de IL-4 y anticuerpos de bloqueo para IFN- γ e IL-12 (Figura 6d). Por otro lado, la polarización de Th1 de las células CD4 de DN TNFR25-tg no se vio afectada incluso en condiciones no polarizantes (Th neutral, ThN). Por lo tanto, aunque TNFR25 coestimula la producción de ambas citoquinas de Th1 y Th2 en la activación primaria de células CD4, las señales de TNFR25 parecen ser necesarias para promover la polarización de Th2 in vitro. La polarización de Th1 es independiente de TNFR25, pero las señales de TNFR25 en células Th1 promueven la producción de IL-13 (Figura 3g). La ausencia de señales de TNFR25 en ratones DN TNFR25-tg in vivo no afecta a la relación normal de anticuerpos IgG1 con respecto a IgG2a encontrada en ratones de tipo silvestre después de la inmunización de los ratones DN TNFR25-tg con DNP-KLH (Figura 4).

A continuación, se determinó si los ratones DN TNFR25-tg tenían una respuesta alterada en el modelo de inflamación pulmonar. En comparación con ratones de tipo silvestre, los ratones DN TNFR25-tg tras la exposición de las vías aéreas presentaron una infiltración eosinofílica significativamente disminuida en el BALF, ausencia de inflamación pulmonar y disminución de la producción de IgE en suero cuando se examinaron por histopatología y tinción con PAS (Fig. 6e-g). La nueva estimulación de los ganglios linfáticos de drenaje bronquial de ratones DN TNFR25-tg por exposición de las vías aéreas con ovoalbúmina mostró disminución de la producción de citoquinas de Th2 pero producción normal de IFN- γ (Figura 6h). Los datos sugieren que TNFR25 desempeña un papel crítico en las respuestas inmunes pulmonares.

Para validar los datos genéticos del bloqueo de TNFR25 en ratones de tipo silvestre, se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra la TL1A murina. Utilizando células transfectadas con TNFR25 y TL1A (Fig. 7 a, b), se identificaron anticuerpos bloqueadores de TL1A que anulaban la señalización de TNFR25. Las células transfectadas con TL1A expresan TL1A en su superficie (Figura 7c) y secretan TL1A en el sobrenadante en forma similar a otros miembros de la superfamilia TNF. Los sobrenadantes que contenían TL1A causaron la rápida liberación de ⁵¹Cr de células tumorales transfectadas con FL TNFR25 o Δ 5,6 TNFR25 a través de apoptosis como se informó anteriormente (Chinnaiyan, AM y colaboradores, Science 274, 990-2 (1996); Kitson, J. y colaboradores, Nature 384, 372 - 5 (1996); Screatton, GR y colaboradores, Proc Natl Acad Sci USA 94, 4615 - 9 (1997); Bodmer, JL y colaboradores, Immunity 6, 79 - 88 (1997); Marsters, SA y colaboradores, Curr Biol 6, 1669 - 76 (1996); Tan, KB y colaboradores, Gene 204, 35 - 46 (1997)). (Figura 7d). Uno de los anticuerpos anti-TL1A, L4G6, bloqueó completamente la lisis mediada por TL1A de células transfectadas con TNFR25, mientras que otros anticuerpos anti-TL1A no tuvieron efecto o mediaron sólo la inhibición incompleta de la lisis (Figura 7d). Por lo tanto, el anticuerpo L4G6 se seleccionó para el uso del bloqueo in vivo de TL1A para bloquear la señalización de TNFR25 en ratones de tipo silvestre genéticamente no modificados. Los ratones se inmunizaron dos veces con ovoalbúmina en alumbre de la forma usual. Un día antes de la exposición de las vías respiratorias y durante los siguientes tres días después de eso, se inyectaron 50 μ g de L4G6 en forma i.p. y luego se analizaron los ratones (Fig.7e). Los controles recibieron la misma cantidad y el mismo cronograma de IgG de hámster. L4G6 administrado de esta manera durante y después del período de la fase de exposición a los aerosoles, inhibió la exudación de eosinófilos en BALF, bloqueó la producción excesiva de moco y disminuyó la producción de citoquinas de Th2 de células de ganglios linfáticos bronquiales tras la nueva exposición con ovoalbúmina in vitro (Fig. 7e-g).

El bloqueo de la inflamación pulmonar por anti-TL1A durante la exposición al aerosol es evidencia de la expresión de TL1A en las vías respiratorias. Se encontró que se expresan niveles modestos de TL1A en una subpoblación de células CD11c⁺ en los ganglios linfáticos de drenaje bronquial después de la exposición de las vías respiratorias, pero no antes de la exposición de las vías respiratorias (Figura 7h). Todas las demás poblaciones de células en los ganglios linfáticos bronquiales fueron negativas para TL1A antes y después de la exposición al aerosol (Fig. 7i). Los ganglios linfáticos inguinales no expresaron TL1A en células CD11c⁺ ni en ningún otro tipo de células en ningún momento antes o después del cebado con ovoalbúmina o exposición de las vías respiratorias. Sin embargo, la expresión de TL1A puede inducirse in vitro en el lapso de 24 h en células de ganglio linfático o de bazo CD4⁺ y CD8⁺ purificadas por activación con anti-CD3 y anti-CD28 (Figura 7j). Las células B que proliferan, activadas por LPS, no expresan TL1A (Figura 7j).

6. Las células NKT de DN TNFR25 transgénico no pueden soportar la inflamación pulmonar en ratones deficientes en NKT cebados con antígeno y expuestos al aerosol.

Se ha demostrado que la transferencia adoptiva de células NKT de tipo silvestre NKT a ratones deficientes en NKT restaura la inflamación pulmonar y la hiperreactividad de las vías respiratorias en el modelo de ovoalbúmina y que se requiere la producción de IL-13 por células NKT (Akbari, O. y colaboradores, *Nat Med* 9, 582-8 (2003); Lisbonne, M J. *Immunol* 171, 1637 - 41 (2003); Meyer, EH y colaboradores, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2772 - 7 (2006)). Las células NKT también han sido implicadas en la fisiopatología de pacientes asmáticos (Sen, Y. Y colaboradores, *J. Immunol* 175, 4914 - 26 (2005); Akbari, O. y colaboradores. *N Engl J Med* 354, 1117 - 29 (2006)). Para determinar si TNFR25, que está constitutivamente expresado en las células NKT (Figura 1a), está implicado en el desencadenamiento de la inflamación pulmonar, se transfirieron en forma adoptiva células NKT de DN TNFR25-tg a ratones deficientes en NKT cebados con ovoalbúmina (Cui, J y colaboradores, *Science* 278, 1623 - 6 (1997)) (desactivación de $\text{J}\alpha\text{18}$) (Figura 8). Aunque las células NKT de tipo silvestre transferidas en forma adoptiva restablecieron la inflamación tras la exposición con antígeno de las vías respiratorias, el mismo número de células NKT de DN TNFR25-tg fue incapaz de hacerlo. Los datos demuestran que las señales de TNFR25 en células NKT son críticas para desencadenar inflamación pulmonar durante la exposición a antígenos de las vías respiratorias de ratones sensibilizados.

7. Agonistas de TNFR25 como potenciadores directos de respuestas inmunitarias antitumorales

Las células dendríticas maduras llevan a cabo un proceso importante denominado "presentación cruzada" que les permite activar eficazmente células T citotóxicas que son específicas para péptidos específicos de tumores. Los antígenos tumorales se degradan y se presentan en proteínas MHC clase I a células T CD8 circulantes.

Para demostrar que los agonistas de TNFR25 son BRM de vacunas tumorales eficaces, se inyectaron ratones con células tumorales EG7 y células OT-I. Se observaron luego las células OT-I para la expansión clonal. EG7 son células linfoblásticas de linfoma de ascitis de ratón EL4 que han sido alteradas genéticamente para expresar ovoalbúmina, el principal constituyente proteico de la clara de huevo de pollo. Los ratones fueron inoculados con células EG7 y recibieron una transferencia adoptiva de células transgénicas (OT-I) receptoras de células T específicas de ovoalbúmina. Las células OT-I actúan como células indicadoras in vivo que responden al antígeno de ovoalbúmina específico de tumor. Teóricamente, las células dendríticas de ratón presentan la ovoalbúmina específica del tumor y activan las células T específicas de la ovoalbúmina (OT-I). Sin embargo, bajo estas circunstancias y como se observa a menudo en ensayos de vacunas tumorales humanas, las células OT-I reaccionan con anergia a las células tumorales EG7.

Por el contrario, la cotransfección de células EG7 con un constructo que codifica una versión secretada de la proteína de choque térmico gp96 (gp-96-Ig) proporcionada por un tumor que secreta gp96Ig y que contenía ovoalbúmina como antígeno sustituto. La exposición de las células CD8 OT-I a la proteína chaperona de choque térmico secretada en combinación con la ovoalbúmina específica del tumor dio como resultado una expansión de OT-I desde una frecuencia inicial de 0,5% hasta más del 50% de todas las células CD8 después de la inyección primaria y un refuerzo con secreción de gp96Ig. Por lo tanto, el cebado cruzado de células CD8 por gp96-Ig-ovoalbúmina en comparación con el cebado cruzado por proteína de ovoalbúmina intacta aumenta de 10.000 a 1.000.000 de veces. Véase el Ejemplo 19 y las Figuras 10 y 12. Véase también *Am J Reprod Immunol.* 2002 Oct; 48 (4): 220 - 5.

Cuando las células OT-I CD8 fueron cebadas en forma cruzada por gp96-Ig-ovalbúmina, en presencia del anticuerpo agonista 4C12 de TNFR25, la expansión de OT-I CD8 aumentó 10 veces más que un anticuerpo de control. Sin embargo, cuando las células OT-I CD8 fueron cebadas de forma cruzada por gp96-Ig-ovalbúmina, en presencia del anticuerpo de bloqueo de TL1A, L4G6, la expansión de OT-I CD8 disminuyó 10 veces sobre un anticuerpo de control. Véase la Figura 11.

Como tales, los agonistas de TNFR25 son modificadores de respuesta biológica eficaces para vacunas tumorales porque refuerzan la activación de células T y la respuesta inmune celular a un antígeno específico del tumor, mientras que los antagonistas de TNFR25 bloquean o inhiben la activación de células T. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a métodos y agentes terapéuticos que aumentan la eficacia de una vacuna tumoral.

Las vacunas tumorales intentan el uso de elementos del sistema inmunológico 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 respuesta biológica. Un antígeno específico del tumor es un polipéptido que está sustancialmente limitado a la expresión en o sobre las células tumorales y que puede usarse para estimular una respuesta inmune dirigida a estas células tumorales. Se utilizan diferentes tipos de vacunas para tratar diferentes tipos de cáncer. Para que una composición antigénica sea útil como vacuna, una composición antigénica debe inducir una respuesta inmune 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. Véase el documento U.S. No. 2003/0185840.

Modificadores de la respuesta biológica (BRM), que se ha demostrado que sobrerregulan la inmunidad de las células T o subregulan la actividad de las células supresoras. Tales BRM incluyen, pero no se limitan a, Cimetidina (CIM);

1200 mg/d) (Smith-Kline, PA); Ciclofosfamida de baja dosis (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ), citoquinas tales como interferón g, IL-2 o IL-12 o genes que codifican proteínas implicadas en funciones auxiliares inmunológicas, tales como B-7.

5 En una realización de este aspecto de la invención, la composición de vacuna tumoral incluye una composición antigénica tumoral y un agonista de TNFR25. En otra realización, el agonista de TNFR25 es el anticuerpo 4C12. En la realización preferida, se añade un agonista de TNFR25 a una vacuna tumoral como un modificador de la respuesta biológica. Aún más preferiblemente, el agonista de TNFR25 es el anticuerpo 4C12. En otra realización, la
10 vacuna tumoral incluye un adyuvante.

Los coadyuvantes de vacuna tumoral pueden incluir IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferón gamma, GMCSF, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos MDP, tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A y lípido A monofosforilado (MPL). También se contempla RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween 80.
15 Incluso se pueden utilizar los antígenos del MHC. Ejemplos de adyuvantes a menudo preferidos incluyen adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene Mycobacterium tuberculosis muerta), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

La preparación de vacunas que contienen secuencias de péptidos como ingredientes activos es en general bien entendida en la técnica, como se ejemplifica en las patentes estadounidenses Nos. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792; y 4.578.770. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables. Pueden prepararse también ya sea como soluciones o suspensiones líquidas: formas sólidas adecuadas para disolución en, o
20 suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El ingrediente inmunógeno activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH o adyuvantes que aumentan la eficacia de las vacunas.

30 **8. Las inmunotoxinas TNFR25 como potenciadores indirectos de las respuestas inmunitarias antitumorales innatas**

Muchos científicos y corporaciones trabajan en células reguladoras T CD4+/CD25+ (Treg) debido a su inmenso impacto potencial en el tratamiento de muchas enfermedades. Aunque muchas personas están expuestas a los mismos alérgenos ambientales y la sensibilización a los alérgenos es común, sólo una fracción de las personas desarrolla enfermedades alérgicas tales como asma. La razón de esto no está clara en la actualidad, pero podría estar relacionada con la presencia de Treg reguladores eficientes que suprimen inflamación de las vías respiratorias en personas sanas expuestas al alérgeno. Como tales, se sabe que las Treg contribuyen al mantenimiento de la tolerancia periférica contra lo propio y lo extraño. Sin embargo, también se ha documentado que las Treg impiden la capacidad del cuerpo para combatir el cáncer. En esos casos, las Treg interfieren con las células inmunes que matan el tumor del cuerpo. Como tal, la función de las Treg como células supresoras dedicadas y pueden desempeñar un papel en la prevención de tumores, por ejemplo, en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, de ser reconocidas por el sistema inmunológico. Véase Br J Cancer, 2005, 14 de marzo; 92 (5): 913-20.

Los inventores han observado que las Treg tienen propiedades que sugieren que están activadas. Se ha reportado que otros receptores de TNF se expresan en Treg. GITR se expresa por Treg activadas. Se ha encontrado que su ligación abolía la actividad inhibitoria de las Treg (Nocentini y colaboradores, Eur. J. Immunol., 2005, 35, 4: 1016 - 22). TNFR25 tiene muchas propiedades que podrían convertirlo en un versátil regulador de células Treg. a) La expresión de la proteína TNFR25 es rápidamente sobreexpresada por el empalme de ARNm inducido por PKC; b) Varias versiones de empalme funcional incluyendo un receptor señuelo y una forma negativa dominante permiten un ajuste fino de la regulación; c) La expresión de TL1A parece estar altamente regulada en la enfermedad de Crohn; además, la expresión de TL1A en linfocitos activados permite detectar la densidad de linfocitos. Por último, ejercen su función reguladora al menos en parte segregando IL-10 e IL-13, una citoquina activada por señales de TNFR25. Los inventores son los primeros en señalar que expresando FoxP3, las Treg cultivadas con CD4+/CD25+ expresan niveles excesivamente altos de TNFR25. Por lo tanto, los inventores concluyen que TNFR25 modula la función de Treg y que TNFR25 puede usarse como una etiqueta molecular para agotar las Treg in vivo. Véase el Ejemplo 20. Además, los antagonistas de TNFR25 eliminan la inhibición de Treg. Véase la Fig. 15.

Por lo tanto, otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos y agentes terapéuticos que son útiles para aumentar la potencia de las terapias anticancerígenas agotando en un paciente las células reguladoras T CD4+/CD25+ (Treg). En una realización de este aspecto, se usa una inmunotoxina para agotar las Treg. En esta realización, la inmunotoxina tiene una porción de unión al antígeno que es específica para TNFR25; y se conjuga con un agente tóxico. En una realización alternativa, se proporciona al paciente TL1A soluble conjugado a un agente tóxico. Aún otra realización se refiere a una composición quimioterapéutica que tiene un agente quimioterapéutico y una inmunotoxina específica de TNFR25. Incluso otra realización se refiere a una composición quimioterapéutica que tiene un agente quimioterapéutico y un TL1A conjugado con un agente tóxico.

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos y agentes terapéuticos que son útiles para aumentar la potencia de las terapias contra el cáncer proporcionando a un paciente agonistas de TNFR25, que reducen la inhibición mediada por las células reguladoras T CD4+/CD25+.

5 9. Agonistas de TNFR25 como agentes antiinflamatorios

Usando una forma negativa dominante de TNFR25 (DN-TNFR25) que carece del dominio de muerte intracelular y una forma empalmada en forma alternativa de TNFR25 ($\Delta 5,6$ -TNFR25) que carece del exón 5 y 6 que codifica el cuarto dominio extracelular rico en cisteína, los inventores encontraron que se requiera de la función de TNFR25 para restaurar el equilibrio homeostático después de un ataque de la mucosa. Específicamente, los inventores expresaron en forma transgénica una forma negativa dominante de TNFR25 (DN-TNFR25) bajo el promotor CD2 en ratones. A los ratones se les administró sulfato de dextrano sódico (DSS) para inducir colitis como modelo para la enfermedad de Crohn humana. Los ratones C57B1/6 de tipo silvestre desarrollaron colitis y diarrea y perdieron peso después de 5 días de beber agua potable con DSS al 2%. Sin embargo, si se restaura a agua normal, los ratones de tipo silvestre se recuperaron en una semana y recuperaron el peso, mientras que los ratones que expresan DN TNFR25-tg adquirieron la enfermedad de una manera similar a los ratones de tipo silvestre, pero la diarrea apareció en forma más severa. Además, la restauración del agua normal no produjo su recuperación. En vez de eso, todos los ratones que expresan DN-TNFR-tg siguieron perdiendo peso y murieron en la segunda semana. Los ratones que expresan transgenes funcionales de TNFR25 (TNFR25 de longitud completa o una versión de empalme $\Delta 5,6$ -TNFR25) se recuperaron de una manera similar a los ratones de tipo silvestre. Véanse los Ejemplos 21 y 22 y la Fig. 14.

El tratamiento actual de la enfermedad de Crohn utiliza agentes antiinflamatorios, inmunosupresores e inhibidores de TNF. Todos estos son sintomáticos. La estimulación de la señalización de TNFR25 se mueve un paso más en la cadena patogenética de eventos. El TNFR25 activado estimula la producción de IL-10 e IL-13, que, a su vez, estimula la producción de TGF-beta dando como resultado la restauración de la homeostasis. Tal tratamiento es curativo o se acerca a la curación.

Por lo tanto, otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en un paciente mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéutica de un agonista de TNFR25. Otra realización se refiere a un método para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en un paciente elevando los niveles de IL-10 en las áreas de la mucosa en el intestino. En otra realización, el agonista de TNFR25 es el anticuerpo 4C12. En una realización adicional, el agonista de TNFR25 es la forma soluble de TL1A. En la realización preferida, la enfermedad inflamatoria del intestino es la enfermedad de Crohn.

Dada esta actividad antiinflamatoria de agonistas de TNFR25, otro aspecto de la divulgación es proporcionar métodos y agentes terapéuticos a un paciente que requiere reducción de la inflamación. En una realización, se proporciona a un paciente una composición que contiene un agonista de TNFR25 para disminuir la inflamación y promover la curación. En una realización, se proporciona a un paciente una composición que contiene el agonista 4C12 de TNFR25. Tales realizaciones son útiles para aliviar los síntomas de trastornos mediados por respuestas inflamatorias crónicas a nivel celular, incluyendo enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis), enfermedades autoinmunes incluyendo lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis múltiple (EM), diabetes (especialmente diabetes tipo I), espondilitis anquilosante, artritis (particularmente artritis reumatoide), asma y alergia, trastornos de resorción ósea, trastornos oftalmológicos incluyendo retinopatías y enfermedades fibróticas.

45 10. Antagonistas de TNFR25 como inmunosupresores

Muchos órganos y tejidos se trasplantan rutinariamente hoy en día de un ser humano a otro. Excepto en los raros casos en que el donante y el receptor son gemelos monocigóticos "idénticos", tales injertos se denominan aloinjertos. La compatibilidad de tejidos para el trasplante de tejidos de un individuo a otro es crítica porque un receptor de tejido montará una fuerte reacción inmune humoral y celular contra todas las proteínas no propias. La tipificación de tejidos implica la identificación de antígenos de MHC tanto en células donantes como receptoras y usando células donantes con tantos alelos de MHC idénticos a los del receptor como sea posible. La compatibilidad los alelos HLA-DR de clase I de MHC (especialmente HLA-B) y clase II es más importante para un trasplante exitoso que la compatibilidad con otros antígenos de MHC; y la compatibilidad con el MHC es más importante que la compatibilidad de antígenos de histocompatibilidad menores.

La compatibilidad de HLA mejora la supervivencia del injerto pero no previene el rechazo, incluso en hermanos con MHC idéntico (excepto para gemelos idénticos). El MHC alogénico es reconocido por células T CD8 (clase I) o células T CD4 (clase II); hasta el 10% de las células T pueden reconocer un MHC alogénico dado porque se asemeja al propio péptido foráneo MHC+.

El éxito mejorado en el trasplante se debe a la creciente experiencia técnica, al aumento de la disponibilidad de centros de trasplante para hacer la compatibilidad de HLA y minimizar el tiempo de suministro de los órganos, y al aumento de la disponibilidad de fármacos inmunosupresores (ciclosporina y tacrolimus) que bloquean la activación de células T a los aloantígenos. Todavía son problemáticos la escasez de órganos, la capacidad de la enfermedad

existente para destruir el órgano trasplantado (la diabetes y la infección por VHB son dos ejemplos), los efectos secundarios de los fármacos inmunosupresores y el alto costo.

5 Dado los efectos secundarios principales asociados con los inmunosupresores actuales que bloquean la activación de las células T y la observación de que los antagonistas de TNFR25 tales como el anticuerpo L4G6 que bloquea TL1A, producen inhibidores efectivos de la expansión clonal de células T CD8 afines (véase la Figura 11, Ejemplo 19), otro aspecto de la divulgación implica el uso de antagonistas de TNFR25 para facilitar el trasplante de tejido para prevenir el rechazo del mismo. En una realización, se proporcionan antagonistas de TNFR25 a un receptor del trasplante para suprimir la expansión clonal de células T CD8 que portan receptores de células T específicos del aloantígeno (TCR) y para aliviar la supresión de Treg mediante TNFR25. En otra realización, se proporcionan antagonistas de TNFR25 a un receptor de un trasplante en combinación con un agente inmunosupresor.

Ejemplos

15 **Ejemplo 1: Medios y reactivos**

Las células se cultivaron en medio esencial de mínimo de Dulbecco modificado de Iscove (Invitrogen) suplementado con FBS inactivado por calor al 10% (Invitrogen), 10 µg/mL de gentamicina (Invitrogen) y β-mercaptoetanol 50 µM (Bio-Rad). Se purificaron anti-CD3 de ratón y anti-CD3 humanas monoclonales a partir de sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares 2C11 y OKT3, respectivamente (ATCC, Manassas, VA). Se adquirieron las anti-CD28 de ratón y anti-CD28 humanas monoclonales a través de eBioscience (San Diego, CA). Se adquirieron ConA, PHA y LPS a través de Sigma (St. Louis, MO). La IL-2 murina recombinante era de BioSource International (Camarillo, CA). PMA, ionomicina, H7 y cicloheximida se adquirieron a través de Calbiochem (San Diego, CA).

25 Los anticuerpos monoclonales conjugados directamente, incluyendo FITC-CD4, Cicromo-CD4, PE-CD8a, Cicromo-CD8α, FITC-B220, PE-B220, FITC-CD25, PE-CD11c, PEDX5, FITC-CD3, PE-NK1.1, PE-Anexina V y 7-AAD se adquirieron a través de BD/PharMingen (San Diego, CA). El control de IgG de hámster se adquirió a través de eBioscience.

30 **Ejemplo 2: Generación de anticuerpos monoclonales contra mTNFR25 y mTL1A**

Se inmunizaron intraperitonealmente los hámsteres armenios tres veces cada dos semanas con 50 µg de mTNFR25-Ig o mTL1A-MBP (proteína de unión a la maltosa) en adyuvante de Freund. Tres días antes de la fusión, los hámsteres fueron reforzados con 50 µg de las respectivas proteínas por vía intravenosa. Los esplenocitos de hámster se fusionaron con el mieloma de murino SP20 con PEG y después se sembraron en placa en medio a base de metilcelulosa durante dos semanas utilizando el kit ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc., BC, Canadá). Se recogieron mil colonias y se analizaron mediante ELISA en placas recubiertas con la proteína de fusión inmunizante o proteína de fusión de la proteína control-Ig. Los sobrenadantes de los clones positivos se ensayaron en cuanto a la capacidad para detectar isoformas de mTNFR25 en células transfectadas mediante citometría de flujo y transferencias tipo Western. Los anticuerpos se purificaron a partir de un sobrenadante Nutridoma-SP (Roche, Indianápolis, IN) en una columna de proteína G, se dializaron en PBS y se esterilizaron por filtración.

Ejemplo 3: Análisis por citometría de flujo para la expresión de mTNFR25 y mTL1A

45 Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de órganos linfoides indicados en el experimento individual. Antes de la tinción, se trataron las células con anti-CD16/CD32 de ratón purificado (receptor Fc-γIII/II; BD) e IgG humana purificada (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) para bloquear la unión no específica a FcR. Las células se tiñeron con anti-TNFR25 de ratón de hámster armenio o anti-TL1A de ratón durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron las células en regulador FACS (PBS que contenía BSA al 0,5% y EDTA 2 mM) y luego se tiñeron con anti-IgG de hámster armenio de cabra marcado con biotina (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y luego se tiñeron con Estreptavidina-PE o Estreptavidina-Citocromo (BD) durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron y luego se tiñeron con marcadores de superficie celular directamente conjugados para distintas poblaciones de células. Las muestras se analizaron utilizando un instrumento Becton Dickinson FACS LSR y software CellQuest^{MR}.

55 **Ejemplo 4: RT-PCR**

Identificación de formas de empalme de mTNFR25: se extrajo el ARN mensajero de líneas celulares o tejidos de murino con el kit Micro Fast-Track (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transcribió el forma inversa el ADNc utilizando el kit Superscript II (Invitrogen). Los productos de RT-PCR se subclonaron en el vector PCR II usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen) y se confirmaron como formas de empalme de mTNFR25 mediante secuenciación del ADN. Para el análisis de empalme de TNFR25 murino se utilizaron los siguientes cebadores. Cebador secuencia arriba, exón 2: CAG TGA GTC CCA GAA GAG GT (SEQ ID NO: 8); cebador secuencia abajo, exón 7: GGA TAG CCC CAA AAA GGA AC (SEQ ID NO: 9); cebador secuencia arriba, exón 7: TCC TTT TTG GGG CTA TCC TG (SEQ ID NO: 10); cebador secuencia abajo, exón 10: GGT ATT TCT CCA TGA CGC TT (SEQ ID NO: 11).

Se analizó el empalme alternativo inducido por activación de TNFR25 humano porque en el ratón los productos de PCR de diferentes formas de empalme eran más difíciles de distinguir en geles de agarosa pero parecían similares a las formas de empalme humanas. Se usaron los siguientes cebadores de PCR. Secuencia arriba, exón 4: TTC ACC CTT CTA CTG CCA AC (SEQ ID NO: 12); secuencia abajo, exón 7: TAA CCA GGG GCT TGT GAG GC (SEQ ID NO: 13). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana de donantes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll Hypaque. Se activaron 5 millones de células por muestra con PHA (5 µg/mL), o anti-CD3 inmovilizada (OKT3, 5 µg/mL) y anti-CD28 (1 µg/mL) o PMA (10 ng/mL) y ionomicina (400 ng/mL). Se recolectaron las células en los puntos de tiempo indicados y se extrajo el ARNm y se convirtió a ADNc utilizando el kit de Invitrogen. Se usó β-actina humana como control interno. La cuantificación de los productos de PCR se realizó con la ayuda del software Molecular Analyst (BioRad).

Ejemplo 5: Generación de ratones transgénicos

Se clonaron los constructos de TNFR25 murinos bajo el promotor de CD2 humano y la región de control local (obsequio del Dr. A. Singer, NIH) usando los sitios de endonucleasa de restricción EcoRI y Sall. Se generaron tres constructos de mTNFR25 mediante PCR usando una enzima de corrección de pruebas. Los constructos fueron la molécula de longitud completa de TNFR25 murino (FL TNFR25), la variante de empalme de TNFR25 que carecía del exón 5 y 6 (Δ5,6 TNFR25) y la versión negativa dominante de TNFR25 (DN TNFR25, como 1-234) que terminaba en el extremo del dominio transmembrana y que carece del dominio intracelular completo. La secuencia de los productos de PCR se confirmó por secuenciación. Las microinyecciones de ADN en los óvulos fertilizados fueron realizadas por el área de transgénicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Miami. Los fundadores potenciales fueron examinados por PCR del ADN de biopsias de la cola. El par de cebador se localizó secuencia arriba y secuencia abajo de los sitios de clonación, por lo tanto se usó el mismo par de cebadores para todos los transgenes mTNFR25. El cebador secuencia arriba es 5 'CGC TCT TGC TCT CTG TGT ATG 3' (SEQ ID NO: 14) y el cebador secuencia abajo es 5 'CTG CCA GCC CTC TTC CAT C 3' (SEQ ID NO: 15). Los ratones transgénicos fueron criados en el ambiente de C57BL/6J por apareamiento en serie de animales transgénicos hemisigotos con C57BL/6J de tipo silvestre (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Todos los ratones se utilizaron a las 6-12 semanas de edad y se mantuvieron en instalaciones libres de patógenos. El Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Miami aprobó todos los procedimientos de uso de los animales.

Ejemplo 6: Preparación del extracto nuclear y ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética para la activación de NFI-κB

Se trataron ciento siete células TNFR25 de EL4-A5,6 TNFR25 o EL4-FL con TL1A soluble o unida a la membrana o con el anticuerpo agonístico 4C12 de TNFR25 como se indica en las leyendas de las Figuras y luego se recolectaron por centrifugación a 800 g durante 5 minutos. Los extractos nucleares se aislaron usando un protocolo de minipreparación y se sometieron a EMSA como se ha descrito (Harhaj, EW y colaboradores, Virology 333, 145-58, 2005). Se incubaron extractos nucleares (6 µg) a temperatura ambiente durante 20 min con una sonda κB de alta afinidad marcada con ³²P, seguido de la resolución de los complejos ADN-proteína en geles nativos de poliacrilamida al 5%.

Ejemplo 7: Ensayo de proliferación de células T

Los esplenocitos se sembraron en placa por triplicado a razón de 1×10^5 células/pozo en placas de 96 pozos de fondo plano. Las células se activaron con anti-CD3 inmovilizado (2 µg/mL) con o sin anti-CD28 soluble (1 µg/mL), o con ConA (5 µg/mL) o con PMA (1 µg/mL) y ionomicina (400 µg/mL). Para la proliferación de células T, se estimularon células T CD4 purificadas a razón de 1×10^5 células/pozo o células T CD8 a razón de 5×10^4 células/pozo con anti-CD3 (2 µg/mL) y anti CD28 soluble (1 µg/mL) recubierto. Se añadió mL-2 recombinante al cultivo a razón de 1000 U/mL en los experimentos indicados. Las células se cultivaron durante 72 horas y se pulsaron durante las últimas 6 horas de incubación con 1 µCi/pozo de 3H-timidina (Perkin Elmer, Boston, MA), y se cuantificó la incorporación de timidina usando un contador de centelleo.

Se purificaron células T CD4 o CD8 murinas de esplenocitos y/o ganglios linfáticos mediante selección negativa utilizando el kit SpinSep (StemCell Technology Inc.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La pureza fue rutinariamente alrededor del 90-96% examinada por análisis FACS.

Ejemplo 8: Inmunización de ratones con DNP-KLH, determinación del isotipo del anticuerpo y ELISA de citoquinas

Se inmunizaron ratones transgénicos y de tipo silvestre adultos (6-10 semanas de edad) intraperitonealmente con 100 µg de hemocianina de lapa de ojo de cerradura conjugada con DNP (DNP-KLH) (CalBiochem). Una semana y tres semanas después de la inmunización, se sangraron los ratones y se separó el suero para el análisis de anticuerpos IgG1, IgE e IgG2a anti-DNP específicos por ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD). Se absorbieron los sueros de animales individuales en placas de 96 pozos recubiertas con 0,8 µg/mL de DNP-albúmina (DNP-BSA) (CalBiochem) y se determinó el isotipo de anticuerpo unido por ELISA.

Para examinar la producción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares, se realizaron ELISA tipo sándwich según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron pares de anticuerpos de BD para el análisis de IL-2, IFN- γ e IL-4. Los reactivos para el ELISA de IL-13 se adquirieron a través de R&D Systems (Minneapolis, MN) y los reactivos para el ELISA de IL-5 e IL-10 se adquirieron a través de eBioscience.

5

Ejemplo 9: Polarización in vitro de células T CD4 en células Th1 o Th2

Las células T CD4 se purificaron por selección negativa como se mencionó anteriormente. Se activaron las células T CD4 con anti-mCD3 inmovilizado (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-mCD28 soluble (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) solos, o en presencia de IL-12 (0 ng/mL) y anti-mIL-4 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para la diferenciación de Th1, o con IL-4 (10 ng/mL), anti-mIFN- γ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anti-mIL-12 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 7 días. Se recolectaron las células, se lavaron y se sembraron nuevamente en placa a razón de 1×10^5 células por pozo y se estimularon nuevamente con anti-CD3 inmovilizado. Después de 24 horas se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la producción de citoquinas mediante ELISA.

10

Ejemplo 10: Protocolos de inmunización para el modelo murino de asma alérgica

Se compararon los ratones DN TNFR25-tg (codificados por la SEQ ID NO: 16), $\Delta 5,6$ TNFR25-tg y FL TNFR25-tg generados como se describió anteriormente y retrocruzados al menos siete generaciones en el ambiente de C57BL/6J con ratones C57BL/6J de tipo silvestre adquiridos a través del National Cancer Institution (Frederick, MD). Se sensibilizaron los ratones por inyección intraperitoneal de 66 μg de ovoalbúmina (albúmina de huevo de pollo cristalizada, grado V, Sigma) absorbida en 6,6 mg de sulfato de potasio y aluminio (alumbre; Sigma) en 200 μl de PBS el día 0. El día 5, se reforzaron intraperitonealmente los ratones con la misma dosis de ovoalbúmina en alumbre. El día 12, se expusieron los ratones al aerosol con ovoalbúmina al 0,5% en PBS durante una hora usando un Nebulizador Ultrasónico (MABIS Healthcare Inc., Lake Forest, IL). Los ratones fueron evaluados por la inflamación alérgica de los pulmones tres días después de la exposición única al aerosol. Se sacrificaron los ratones por inhalación de CO_2 . Después de la canulación de la tráquea, se lavó el pulmón 4 veces con 1 mL de PBS. Se contaron las células recuperadas del fluido BAL y se usaron para preparaciones de citospinas (50.000 células o menos/lamina). Se contaron >200 células por cada lamina de citospina teñida con colorante Wright-Giemsa (Sigma) para determinar los recuentos diferenciales de células para macrófagos, eosinófilos, linfocitos y neutrófilos.

20

25

30

Ejemplo 11: Histología pulmonar

Se removieron los pulmones de los ratones después del procedimiento de lavado bronquial y se fijaron en formalina regulada neutra al 10%. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Histopatología del Centro de Cáncer Sylvester en la Escuela de Medicina de la Universidad de Miami, donde se embebieron los especímenes, se seccionaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las secciones también se tiñeron con ácido periódico-Schiff (PAS) para determinar la producción de moco.

35

Ejemplo 12: ELISA para IgE total en suero e Ig específica de ovoalbúmina

Se sangraron los ratones antes de la sensibilización (día 0), 3 días después de la exposición al aerosol (día 15) y en algunos experimentos un día antes de la exposición al aerosol (día 11). El nivel de IgE total se cuantificó mediante ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD). Se determinó la IgE específica de ovoalbúmina en ELISA tipo sándwich recubriendo primero la placa con OVA al 0,01% en PBS, seguido por la carga de las muestras de suero diluidas y después el anticuerpo anti-IgE secundario marcado con biotina (BD).

40

45

Ejemplo 13: Nueva estimulación in vitro de células de ganglios linfáticos bronquiales y producción de citoquinas.

Un día o tres días después de la exposición al aerosol, se recolectaron ganglios linfáticos bronquiales y se prepararon suspensiones de células individuales. Las células se sembraron en placas de 96 pozos de fondo redondo a razón de 1×10^6 células/pozo y se cultivaron con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ovoalbúmina durante 4 días. Después se recogieron los sobrenadantes para ensayos de ELISA de citoquina como se describe.

50

Ejemplo 14: Ensayo de citotoxicidad

Se añadieron sobrenadantes de mTL1A solubles diluidos en serie recolectados de células transfectadas con P815-TL1A a células objetivo transfectadas con P815-TNFR25 marcadas con ^{51}Cr . Para analizar la actividad de bloqueo de TL1A se añadieron diferentes anticuerpos monoclonales anti-TL1A en el cultivo y se determinó la liberación de Cr después de 4 horas en muestras por triplicado. Se calculó la liberación espontánea a partir de los pozos que contenían sólo células objetivo marcadas con ^{51}Cr . Se calculó la liberación del 100% (control positivo) a partir de los pozos que contenían células objetivo marcadas con ^{51}Cr y SDS al 1%. Se calculó el porcentaje de actividad de citotoxicidad como sigue: (lectura media de la muestra - lectura media de la liberación espontánea) / lectura media del control positivo. También se obtuvieron datos similares con transfectantes de EL4.

60

65

Ejemplo 15: Bloqueo de la inflamación pulmonar por anticuerpos antagónicos anti-mTL1A

Los ratones se sensibilizaron por vía intraperitoneal con ovoalbúmina en alumbre el día 0 y el día 5 seguido de la exposición al aerosol con ovoalbúmina al 0,5% en PBS durante una hora el día 12. A los ratones se les suministró L4G6 o una cantidad equivalente de IgG de hámster de control (Jackson Immuno Research) por inyección intraperitoneal de 50 µg/ratón cada día desde el día 11 al 14. Se evaluó la inflamación alérgica de los pulmones el día 15.

Ejemplo 16: Transferencia adoptiva de células NKT

Los ratones con desactivación de J α 18 (Cui, J. y colaboradores, Science 278, 1623-6 (1997)) fueron un obsequio de Michael Lotze (U. Pittsburgh) con el amable permiso de M. Taniguchi (Universidad de Ciba, Japón). Las células NKT de ratones DN TNFR25-tg y de tipo silvestre se aislaron de células combinadas de bazo de 10 ratones mediante selección positiva usando el kit de selección positiva EasySep mouse Pan NK (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 17: Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos usando una prueba t de Student de dos colas se realizaron con el Software GraphPad Prism (San Diego, CA); $p < 0,05$ se considera significativo. Los datos en el texto se presentan como la media \pm SEM.

Ejemplo 18: Generación de anticuerpos DR3 y TL1A

Se generó una proteína de fusión DR3-Ig, se purificó y se usó para inmunizar hámsteres. Se obtuvieron los sobrenadantes de hibridoma y se cribaron mediante ELISA usando la proteína de fusión DR3-Ig como agente de cribado. La naturaleza de los hibridomas se verificó mediante citometría de flujo de células tumorales transfectadas con DR3, mediante transferencias tipo Western, y mediante estudios funcionales. Todos los anticuerpos detectaron DR3 empalmados alternativamente y de longitud completa en células transfectadas por FACS, uno de los anticuerpos detectó DR3 en transferencias tipo Western, y el anticuerpo (4C12) mostró actividad agonística, mediando la señalización de DR3 en ausencia de TL1A.

Los anticuerpos monoclonales TL1A se obtuvieron inmunizando hámsteres con una fusión de proteína de unión a TL1A-maltosa. Los anticuerpos TL1A detectaron TL1A transfectada por citometría de flujo. El anticuerpo (L4G6) mostró actividad antagonista, bloqueando la unión de TL1A a DR3.

Ejemplo 19: La señalización a través de TNFR25 mejora el cebado cruzado de CD8

Se describió recientemente un nuevo sistema basado en proteína de choque térmico gp96 que media la expansión in vivo fuerte de CD8-CTL, específica de antígeno, en Strbo y colaboradores, Am J Reprod Immunol. 2002 Oct; 48 (4): 220 - 5. En este sistema modelo gp96-Ig liberado (modificado genéticamente para ser secretado) activa las células dendríticas y proporciona péptidos chaperones para presentación cruzada y cebado cruzado de células CD8 (Fig. 12). El sistema es muy útil porque es independiente de la ayuda de CD4. La gp96 segregada proporciona la señal de activación para DC a través de CD91 y TLR2/4 que de otra manera es proporcionada por CD40-L en células CD4. Por consiguiente, la expansión de CD8 (OT-I) en este sistema funciona bien en ratones deficientes en CD40-L. Esto ha sido empleado para estudiar la inmunidad de la mucosa y para determinar el papel de TNFR25 en la expansión de CD8.

EG7-gp96 es una línea celular derivada del linfoma EL4 por transfección con ovoalbúmina y gp96-Ig. Las células segregan gp96-Ig asociado con péptidos de ovoalbúmina. Los péptidos de ovoalbúmina acompañados por gp96-Ig mejoran el cebado cruzado de células CD8 (Figura 10) en aproximadamente 10.000 veces en comparación con la ovoalbúmina sola. 100 ng de ova-gp96-Ig expandieron OT-I en ratones B6 a partir de una frecuencia de 0,5% entre células CD8 después de la transferencia hasta 20% en el bazo después de la inmunización con EG7-gp96-Ig.

Con el fin de determinar el efecto de las señales de TNFR25 en la expansión de CD8, se utilizó el modelo OT-I transgénico TCR como se describió anteriormente, junto con la estimulación mediada por EG7-gp96-Ig. Para determinar el efecto de las señales de TNFR25, los ratones recibieron un anticuerpo agonista anti TNFR25 (4C12), un anticuerpo de unión a TNFR25 pero no un anticuerpo agonístico (L4G6) o una IgG de control 24 horas y 72 horas después de la inmunización con EG7-gp96-Ig. Se controló la expansión de OT-I en la cavidad peritoneal el día 5 después de la inmunización. 4C12 provocó un aumento en el reclutamiento de células en la cavidad peritoneal por EG7-gp96-Ig dando como resultado una duplicación del número de células. Además 4C12 causó específicamente un aumento de más de 8 veces en la expansión de OT-I. El anticuerpo anti-TNFR25 L4G6 no indujo un mayor reclutamiento de células a la cavidad peritoneal e inhibió la expansión de OT-I.

Estos datos muestran que los anticuerpos agonistas anti TNFR25 coestimulan células CD8 y/o inhiben los efectos supresores de Treg a través de TNFR25. La coestimulación de células T no modificadas por TNFR25 produce una mayor proliferación y una polarización de Th2 tras la activación secundaria. Además, la señalización de TNFR25

sobre células T reguladoras da como resultado su inhibición temporal de la supresión. El efecto combinado es entonces el responsable del aumento de la expansión de CD8 y el reclutamiento celular observado en la Fig. 11.

Ejemplo 20: Las células reguladoras T CD4+ CD25+ expresan altos niveles en TNFR25

Con el fin de determinar la expresión de TNFR25 CD4+ CD25, se purificaron Treg se purificaron de los bazos por selección negativa de células CD4 seguido de clasificación magnética con anti CD25. Se cultivaron las células con perlas anti-CD3, anti-CD28 en una relación de perlas a células de 3:1 y se añadieron 2000 u/mL de IL-2 humana. Bajo estas condiciones, las células comenzarán a proliferar después de 3-4 días y seguirán expandiéndose durante aproximadamente 3 semanas. Se analizaron las células cultivadas mediante análisis FACS para CD4 y CD25, mediante citofluorometría intracelular para la expresión de FoxP3 y para el análisis superficial de TNFR25. La Fig. 13 muestra que las Treg obtenidas de esta manera son esencialmente puras y expresan tanto FoxP3 como TNFR25.

Ejemplo 21: El bloqueo de TNFR25 causa la letalidad de colitis de sulfato de dextrano sódico

El modelo de sulfato de dextrano sódico (DSS) ha sido ampliamente utilizado como un modelo de colitis que se asemeja en algunos aspectos a la enfermedad de Crohn. El ataque inicial es el efecto perjudicial de DSS en la barrera de permeabilidad normalmente proporcionada por el epitelio intestinal. Este efecto de DSS permite el acceso de la flora intestinal normal a sitios en el sistema inmunológico de la mucosa que desencadenan una reacción inmunológica inflamatoria semejante a la colitis de Crohn. Los ratones B6 de tipo silvestre (t. s.) durante el transcurso de exposición de 8 días a agua potable que contiene DSS al 2% desarrollan diarrea y pérdida de peso. Tras la restauración del agua normal, los ratones B6 recuperan y ganan nuevamente su peso normal. TNFR25 también influye en el curso de la enfermedad en la colitis. En el presente experimento, se expusieron ratones de tipo silvestre y transgénicos a agua con DSS al 2% durante siete días. Como se muestra en la Fig. 14, los ratones DN TNFR25-tg desarrollaron una enfermedad similar a los ratones de tipo silvestre, sin embargo cuando se restauró el agua normal, los ratones DN TNFR25-tg no se recuperaron como lo hicieron los ratones de tipo silvestre. En vez de eso, los ratones DN TNFR25-tg continuaron perdiendo peso y murieron entre el día 12 y 16. Los ratones Δ5,6-TNFR25-tg se parecen a los ratones de tipo silvestre aunque la muerte de un ratón también podría sugerir una respuesta inmune perturbada. Se obtuvieron dos conclusiones: En ratones DNTNFR25-tg, la respuesta inmune resultante es mucho más fuerte que en ratones de tipo silvestre que conducen a la letalidad y la restauración de la salud normal y la homeostasis en ratones de tipo silvestre depende del funcionamiento normal de las células T reguladoras (Treg). La función de Treg se altera en los ratones DNTNFR25-tg. Este último es probable, ya que se sabe que la función de Treg es extraordinariamente importante para mantener la homeostasis en el sistema inmunológico de la mucosa, manteniendo el equilibrio correcto entre la tolerancia a los nutrientes y la flora intestinal normal y la respuesta inmune a los patógenos intestinales.

Ejemplo 22: La inmunización con EG7-gp96-Ig induce a las células OT-I a migrar a los sitios de la mucosa, los parches de Peyer, los linfocitos de la lámina propia (LPL) y los linfocitos intraepiteliales (IEL)

Como se muestra en la Fig. 16 (columna derecha), las células EG7 son incapaces de provocar la expansión clonal de OT-I o la migración a sitios de la mucosa. Las células EG7 que secretan gp96-Ig, por otro lado, causan la expansión clonal de OT-I en el bazo, los ganglios linfáticos y la cavidad peritoneal (no mostrada) y su migración a sitios de la mucosa (Fig. 16). En los parches de Peyer, el 8% de las células son CD8+ y el 6,7% de las células CD8 son OT-I; en IEL, 61% de las células son CD8+ y 9% de CD8 son OT-I. En LPL, el 29% de las células CD8 son OT-I. Las células OT-I que migran a IEL después de la inmunización son αEb7+ y α4β7+, pero siguen siendo CD8αβ y TCRαβ, a diferencia del CD8 IEL residente, la mayoría de los cuales son CD8αα y 50% Tryδ.

Listado de secuencias

<110> University of Miami

<120> INMUNOMODULACIÓN DE AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INMUNOTOXINAS DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL 25 (TNFR25)

<130> UNMA001PEP

<140> EP 06 802 605.3

<141> 2006-08-30

<150> PCT/US2006/033828

<151> 2006-08-30

<150> 60/712.084

<151> 2005-08-30

<160> 16

ES 2 611 307 T3

<170> PatentIn versión 3.3

5	<210>		1
	<211>		1665
	<212>		ADN
	<213> Ratón		
10	<400> 1		
	gggagttggt ctggatggcg cgggggpcggg cgggcagcag ctactctagt ctaggaacat	60	
	aggggctgag ctgggtgggg aagccccggg ttacgcgacc gaccagagcc gcactcacia	120	
	gggcccaggc ggtacacacc gcaatggagg cacggctgct gcggggctgc gtggtggagc	180	
	ctctgttccct accactgctg ctgctgctgc tgctgctgct gctgcttggg ggccagggcc	240	
	agggcggcat gtctggcagg tgtgactgtg ccagtgagtc ccagaagagg tatggcccgt	300	
	tttgttgcag gggctgcca aaggacact acatgaaggc cccctgcgca gaaccctgtg	360	
	gcaactccac ctgccttccc tgtccctcgg acaccttctt gaccagagac aaccacttta	420	
	agactgactg taccgcctgc caagtctgtg atgaagaggc cttcaagtg acccttgaga	480	
	actgctcggc aaagtccgac acccactgtg gctgccagtc aggctgggtg gttgactgct	540	
	ccaccgtgcc atgtgggaaa agctcacctt tctcttgtgt cccatgcggg gctacgacac	600	
	cagtccatga ggctccaacc ccccggcctt gcctgcctgg cttctatata cgtggcaatg	660	
	actgcacgtc ctgccccacg ggcttcagca gcgtttgccc taaggcttgc actgctgtct	720	
	gtggctggaa gcagatgttt tgggtccagg tgcttctagg agtcgcggtt ctttttgggg	780	
	ctatcctgat ctgtgcatat tgtcgatggc agccttgtaa ggccgtggtc actgcagaca	840	
	cagctgggac ggagcccctg gcctcaccac agactgcca tctctcagcc tcagacagcg	900	
	cccacacctt cttggcacct ccaagcagta ctgggaaaat ctgtaccact gtccagttgg	960	
	taggcaacia ctggaccctt ggcttatccc agactcagga ggtggctctgc ggacaggcct	1020	
	cacaaccctg ggatcagctg ccaaacagaa ctcttggaa cctctctggca tctccgctct	1080	

ES 2 611 307 T3

cgccagcgcc ccctgcgggc tctccggctg ctgtgctcca gcctggcccg cagctctacg 1140
atgtgatgga tgcggtccca gcacgaaggt ggaaggagtt cgtgcgcacg ctggggctgc 1200
gggaagcgga aattgaagcc gtggaggtgg aaatctgccg cttccgagac cagcagtatg 1260
agatgctcaa gcgctggcgt cagcagcagc ctgcaggcct cggtgccatc tatgcggctc 1320
tggagcgcaa gggctctggaa ggctgtgccg aggacctgcg cagccgcctg cagcgtggcc 1380
cgtgatggaa ggtccatcat ccactttgac accctagtga cccttgaagg agccttaagt 1440
attgttactt atgcgtgtag acattttatg tcaattacta accccctgcc gtggctcctgc 1500
gtagcagggc tggctgcctc acttttgctt atctgcagca cggagctcct gctaagggaa 1560
gcgtcatgga gaaataccag aaggggcaa gtgattggtt gctcagctgt taattagccc 1620
gagtttgac ttggtattaa atttcataag aaaagcagct gcttg 1665

<210> 2
<211> 1665
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 611 307 T3

cgggccctgc gggcgcgggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg 60
 gaagcccctg ggcgcccgtc ggagggctat ggagcagcgg ccgcggggct gcgcgggcgg 120
 ggcggcgggc ctccctctgg tgctgctggg ggcccgggccc cagggcggca ctcgtagccc 180
 caggtgtgac tgtgccgggt acttccacaa gaagattggt ctgttttggt gcagaggctg 240
 cccagcgggg cactacctga agggcccttg cacggagccc tgcggcaact ccacctgcct 300
 tgttgttccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg 360
 ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgctg gagaactggt cagcagtggc 420
 cgacaccgcg tgtggctgta agccaggctg gtttgtggag tgccagggtca gccaatgtgt 480
 cagcagttca cccttctact gccaacctat cctagactgc ggggccctgc accgccacac 540
 acggctactc tgttcccgca gagatactga ctgtgggacc tgccctgcctg gcttctatga 600
 acatggcgat ggctgcgtgt cctgccccac gccacccccg tcccttgagc gagcaccctg 660
 gggagctgtc cagagcgctg tgccgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg 720
 ggtccagggt ctccctggctg gccttgtggt cccctcctg cttggggcca ccctgacct 780
 cacataccgc cactgctggc ctcaaacgcc cctgggtact gcagatgaag ctgggatgga 840
 ggctctgacc ccaccaccgg ccaccatct gtcacccttg gacagcggcc acacccttct 900
 agcacctcct gacagcagtg agaagatctg caccgtccag ttggtgggta acagctggac 960
 ccctggctac cccgagacct aggagcgct ctgcccgcag gtgacatggt cctgggacca 1020
 gttgcccagc agagctcttg gccccgctgc tgcgccaca ctctgccag agtcccagc 1080
 cggctcgcca gccatgatgc tgcagccggg cccgcagctc tacgacgtga tggacgcgg 1140
 cccagcgcgg cgctggaagg agttcgctgc cacgctgggg ctgcgcgagg cagagatcga 1200
 agccgtggag gtggagatcg gccgcttccg agaccagcag tacgagatgc tcaagcgtg 1260
 gcgccagcag cagcccgcgg gcctcggagc cgtttacgcg gccctggagc gcatggggct 1320
 ggacggctgc gtggaagact tgcgcagccg cctgcagcgc ggcccgtgac acggcgccca 1380
 cttgccacct aggcgctctg gtggcccttg cagaagccct aagtacggtt acttatgcgt 1440
 gtagacattt tatgtcactt attaagccgc tggcacggcc ctgcgtagca gcaccagccg 1500
 gccccacccc tgctcgcccc tctcgtcca gccaaaggca agaagcacga acgaatgtcg 1560
 agagggggtg aagacatttc tcaacttctc ggccggagtt tggctgagat cgcggtatta 1620
 aatctgtgaa agaaaacaaa acaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1665

ES 2 611 307 T3

	<210>		3
	<211>		759
	<212>		ADN
	<213> Ratón		
5	<400> 3		
	atggcagagg agctgggggtt gggcttcgga gaaggagtcc cagtggaagt gctgccggaa	60	
	ggctgtagac acaggccaga ggccagggcc gggctagctg ccaggagcaa agcctgcctg	120	
	gctctcacct gctgcctggt gtcatttccc atcctcgcag gacttagcac cctcctaata	180	
	gctggccagc tccgggtccc cggaaaagac tgtatgcttc gggccataac agaagagaga	240	
	tctgagcctt caccacagca agtttactca cctcccagag gcaagccgag agcacacctg	300	
	acaattaaga aacaaacccc agcaccacat ctgaaaaatc agctctctgc tctacactgg	360	
	gaacatgacc tagggatggc cttcaccaag aacgggatga agtacatcaa caaatccctg	420	
	gtgatcccag agtcaggaga ctatttcatc tactcccaga tcacattccg agggaccaca	480	
	tctgtgtgtg gtgacatcag tcggggggaga cgaccaaaca agccagactc catcactgtg	540	
	gtcatcacca aggtagcaga cagctaccct gagcctgccc gcctactaac aggggtccaag	600	
	tctgtgtgtg aaataagcaa caactggttc cagtccctct accttggggc catgtttctcc	660	
	ttggaagaag gggacagact aatggtaaac gtcagtgaca tctccttggt ggattacaca	720	
	aaagaagata aaactttctt tggagctttc ttgctataa	759	
10	<210>		4
	<211>		657
	<212>		ADN
	<213> Ratón		
15	<400> 4		
	atggaggcac ggctgctgcg gggctgcgtg gtggagcctc tgttctacc actgctgctg	60	

ES 2 611 307 T3

ctgctgctgc tgctgctgct gcttgggtggc cagggccagg gcggcatgtc tggcaggtgt 120
gactgtgcca gtgagtccca gaagaggtat ggcccgtttt gttgcagggg ctgcccaaag 180
ggacactaca tgaaggcccc ctgocgacaaa ccctgtggca actccacctg cttccctgt 240
ccctcggaca cttctttgac cagagacaac cactttaaga ctgactgtac ccgctgccaa 300
gtctgtgatg aagaggccct tcaagtgacc cttgagaact gctcggcaaa gtcggacacc 360
cactgtggct gccagtcagg ctggtgtggt gactgctcca ccgtgccatg tgggaaaagc 420
tcacctttct cttgtgtccc atgcggggct acgacaccag tccatgaggc tccaaccccc 480
cggccctgcc tgccctggctt ctatatacgt ggcaatgact gcacgtcctg ccccacgggc 540
ttcagcagcg tttgccctaa ggcttgact gctgtctgtg gctggaagca gatgttttg 600
gtccaggtgc ttctaggagt cgcgttcctt tttggggcta tcctgatctg tgcatat 657

5 <210> 5
<211> 696
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 5
atggagcagc ggccgcgggg ctgcgcggcg gtggcggcgg cgctcctcct ggtgctgctg 60
ggggcccggg cccagggcgg cactcgtagc cccaggtgtg actgtgccgg tgacttccac 120
aagaagattg gtctgttttg ttgcagaggc tgcccagcgg ggcaactacct gaaggcccct 180
tgcacggagc cctgcggcaa ctccacctgc cttgtgtgtc cccaagacac cttcttggcc 240
tgggagaacc accataattc tgaatgtgcc cgctgccagg cctgtgatga gcaggcctcc 300
caggtggcgc tggagaactg ttcagcagtg gccgacacc gctgtggctg taagccaggc 360
tggtttgtgg agtgccaggt cagccaatgt gtcagcagtt cacccttcta ctgccaacca 420
tgcttagact gggggccct gcaccgccac acacggctac tctgttcccg cagagatact 480
gactgtggga cctgcctgcc tggtttctat gaacatggcg atggctgcgt gtcctgcccc 540
acgccacccc cgtcccttgc aggagcacc tggggagctg tccagagcgc tgtgccgctg 600
tctgtggctg gaggcagagt aggtgtgttc tgggtccagg tgctcctggc tggccttgtg 660
gtccccctcc tgcttggggc caccctgacc tacaca 696

15 <210> 6
<211> 633
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 611 307 T3

atggagcagc ggcgcgggg ctgcgcggcg gtggcggcgg cgctcctcct ggtgctgctg 60
 ggggcccggg ccagggcggg cactcgtagc ccaggtgtg actgtgccgg tgacttccac 120
 aagaagattg gtctgttttg ttgcagaggc tgcccagcgg ggactacct gaaggcccct 180
 tgcacggagc cctgcggcaa ctccacctgc cttgtgtgtc cccaagacac cttcttggcc 240
 tgggagaacc accataattc tgaatgtgcc cgctgccagg cctgtgatga gcaggcctcc 300
 caggtggcgc tggagaactg ttcagcagtg gccgacaccc gctgtggctg taagccaggc 360
 tggtttgtgg agtgccaggt cagccaatgt gtcagcagtt cacccttcta ctgccaacca 420
 tgcctagact gcggggccct gcaccgccac acacggctac tctgttcccc cagagatact 480
 gactgtggga cctgcctgcc tggcttctat gaacatggcg atggctgcgt gtcctgcccc 540
 acgccacccc cgtcccttgc aggagcaccc tggggagctg tccagagcgc tgtgccgctg 600
 tctgtggctg gaggcagagt aggtgtgttc tgg 633

5 <210> 7
 <211> 2016
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 7

ES 2 611 307 T3

gagagggaaa agggaaggag gagactgagt gattaagtca cccactgtga agagctggtc 60
 ttctatattaa tgggggctct ctctgccag gagtcagagg tgcctccagg agcagcagga 120
 gcatggccga ggatctggga ctgagctttg gggaaacagc cagtgtggaa atgctgccag 180
 agcacggcag ctgcaggccc aaggccagga gcagcagcgc acgctgggct ctcacctgct 240
 gcctggtggt gctccccttc cttgcaggac tcaccacata cctgcttgct agccagctcc 300
 gggcccaggg agaggcctgt gtgcagttcc aggctctaaa aggacaggag tttgcacctt 360
 cacatcagca agtttatgca cctcttagag cagacggaga taagccaagg gcacacctga 420
 cagttgtgag acaaactccc acacagcact ttaaaaatca gttcccagct ctgcactggg 480
 aacatgaact aggcctggcc ttcaccaaga accgaatgaa ctataccaac aaattcctgc 540
 tgatcccaga gtcgggagac tacttcattt actcccaggt cacattccgt gggatgacct 600
 ctgagtgcag tgaaatcaga caagcaggcc gaccaaacaa gccagactcc atcactgtgg 660
 tcatcaccaa ggtaacagac agctaccctg agccaacca gctcctcatg gggaccaagt 720
 ctgtatgcga agtaggtagc aactggttcc agcccatcta cctcggagcc atgttctcct 780
 tgcaagaagg ggacaagcta atggtgaacg tcagtgacat ctctttggtg gattacacaa 840
 aagaagataa aaccttcttt ggagccttct tactatagga ggagagcaaa tatkattata 900
 tgaaagtctt ctgccaccga gttcctaatt ttctttgttc aaatgtaatt ataaccaggg 960
 gttttcttgg ggccgggagt agggggcatt ccacagggac aacggtttag ctatgaaatt 1020
 tggggcccaa aatttcacac ttcattgtgc ttactgatga gactactaac tggaaaaggc 1080
 tgaagagagc aaatatatta ttaagatggg ttggaggatt ggcgagtttc taaatattaa 1140
 gacactgac actaaatgaa tggatgatct actcgggtca ggattgaaag agaaatattt 1200

ES 2 611 307 T3

	caacacctcc ctgctataca atggtcacca gtgggccagt tattgttcaa tttgatcata	1260
	aatttgcttc aattcaggag ctttgaagga agtccaagga aagctctaga aaacagtata	1320
	aactttcaga ggcaaaatcc ttcaccaatt tttccacata ctttcatgcc ttgcctaaaa	1380
	aaaatgaaaa gagagttggg atgtctcatg aatgttcaca cagaaggagt tggttttcat	1440
	gtcatctaca gcatatgaga aaagctacct ttcttttgat tatgtacaca gatatctaaa	1500
	taaggaagta tgagtttcac atgtatatca aaaatacaac agttgcttgt attcagtaga	1560
	gttttcttgc ccacctatth tgtgctgggt tctaccttaa cccagaagac actatgaaaa	1620
	acaagacaga ctccactcaa aatttatatg aacaccacta gatacttctt gatcaaacad	1680
	cagtcaacad actctaaaga ataactccaa gtctttggcca ggcgcagtggt ctcacacctg	1740
	taatcccaac actttggggag gccaaaggtgg gtggatcatc taaggccggg agttcaagac	1800
	cagcctgacc aacgtggaga aacccccatct ctactaaaaa tacaaaatta gccgggctgtg	1860
	gtagcgcagtg gctgtaatcc tggctactca ggaggccgag gcagaagaat tgcttgaact	1920
	ggggaggcag aggttgccgt gagcccagat cgcgccattg cactccagcc tgggtaacaa	1980
	gagcaaaact ctgtccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	2016
5	<210> <211> <212> <213> Secuencia artificial	8 20 ADN
10	<220> <223> Sintetizada químicamente <400> 8 cagtgagtcc cagaagaggt 20	
15	<210> <211> <212> <213> Secuencia artificial	9 20 ADN
20	<220> <223> Sintetizada químicamente <400> 9 ggatagcccc aaaaggaac 20	
25	<210> <211> <212> <213> Secuencia artificial	10 20 ADN
30	<220> <223> Sintetizada químicamente <400> 10 tccttttgg gcctatcctg 20	

ES 2 611 307 T3

	<210>			11
	<211>			20
	<212>			ADN
5	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Sintetizada químicamente		
10	<400>	11 ggtatttctc catgacgctt	20	
	<210>			12
	<211>			20
	<212>			ADN
15	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Sintetizada químicamente		
20	<400>	12 ttcacccttc tactgccaac	20	
	<210>			13
	<211>			20
25	<212>			ADN
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Sintetizada químicamente		
30	<400>	13 taaccagggg cttgtgaggc	20	
	<210>			14
35	<211>			21
	<212>			ADN
	<213>	Secuencia		artificial
	<220>			
	<223>	Sintetizada químicamente		
40	<400>	14 cgctcttgct ctctgtgat g	21	
	<210>			15
45	<211>			19
	<212>			ADN
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
50	<223>	Sintetizada químicamente		
	<400>	15 ctgccagccc tctccatc	19	
55	<210>			16
	<211>			702
	<212>			ADN
	<213>	Ratón		
60	<400>	16		

ES 2 611 307 T3

atggaggcac	ggctgctgcg	gggctgctg	gtggagcctc	tgttcctacc	actgctgctg	60
ctgctgctgc	tgctgcttgg	tggccagggc	cagggcggca	tgtctggcag	gtgtgactgt	120
gccagtgagt	cccagaagag	gtatggcccg	ttttgttgca	ggggctgccc	aaagggacac	180
tacatgaagg	ccccctgcgc	agaaccctgt	ggcaactcca	cctgccttcc	ctgtccctcg	240
gacaccttct	tgaccagaga	caaccacttt	aagactgact	gtacccgctg	ccaagtctgt	300
gatgaagagg	cccttcaagt	gacccttgag	aactgctcgg	caaagtcgga	cacccactgt	360
ggctgccagt	caggctggtg	tgttgactgc	tccaccgagc	catgtgggaa	aagctcacct	420
ttctcttgtg	tcccatgcgg	ggctacaaca	ccagtccatg	aggctccaac	ccccggccc	480
tgctgctctg	gcttctatat	acgtggcaat	gactgcacgt	cctgccccac	gggcttcagc	540
agcgtttgcc	ctaaggcttg	cactgctgtc	tgtggctgga	agcagatggt	ttgggtccag	600
gtgcttctag	gagtcgcggt	cctttttggg	gctatcctga	tctgtgcata	tggctctgga	660
agcgggagcg	tgcacgatct	ttacgacgat	gataaatagt	aa		702

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que se une al receptor de factor de necrosis tumoral 25 (TNFR25) para su uso en el aumento de la expansión de linfocitos T CD8 en un sujeto al que se le administra un antígeno, en el que dicho anticuerpo es capaz de actuar como un agonista de TNFR25 y los linfocitos T CD8 son específicos para el antígeno administrado.
2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.
- 10 3. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que es un anticuerpo IgG.
4. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno es expresado o presentado por una célula.
- 15 5. El anticuerpo para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno es un antígeno tumoral.
6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 5, en el que se administra al sujeto un adyuvante.
- 20 7. Uso de un anticuerpo agonista anti-TNFR25 en la fabricación de un medicamento para aumentar la expansión de los linfocitos T CD8 en un sujeto al que se le administra un antígeno, en el que los linfocitos T CD8 son específicos para el antígeno administrado.
- 25 8. El uso de la reivindicación 7, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8, en las que el anticuerpo es un anticuerpo IgG.
- 30 10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que el antígeno es expresado o presentado por una célula.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en la que el antígeno es un antígeno tumoral.
12. El uso de la reivindicación 11, en la que se administra al sujeto un adyuvante.

35

Figura 1:

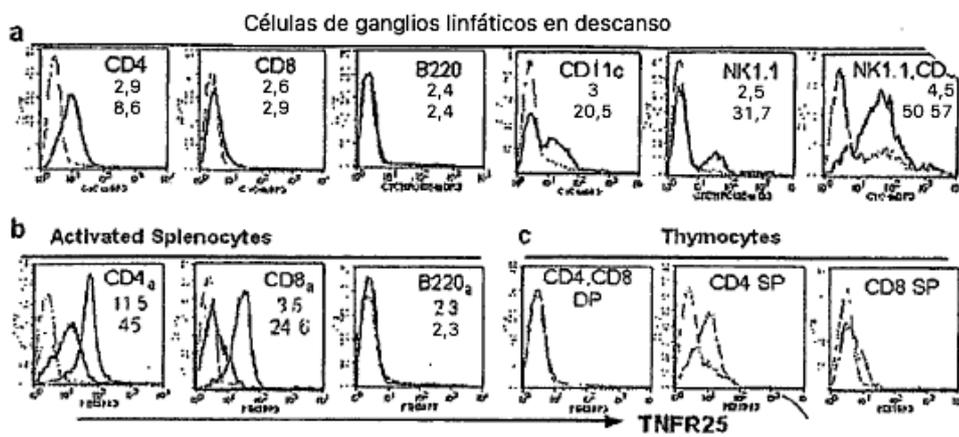


Figura 2:

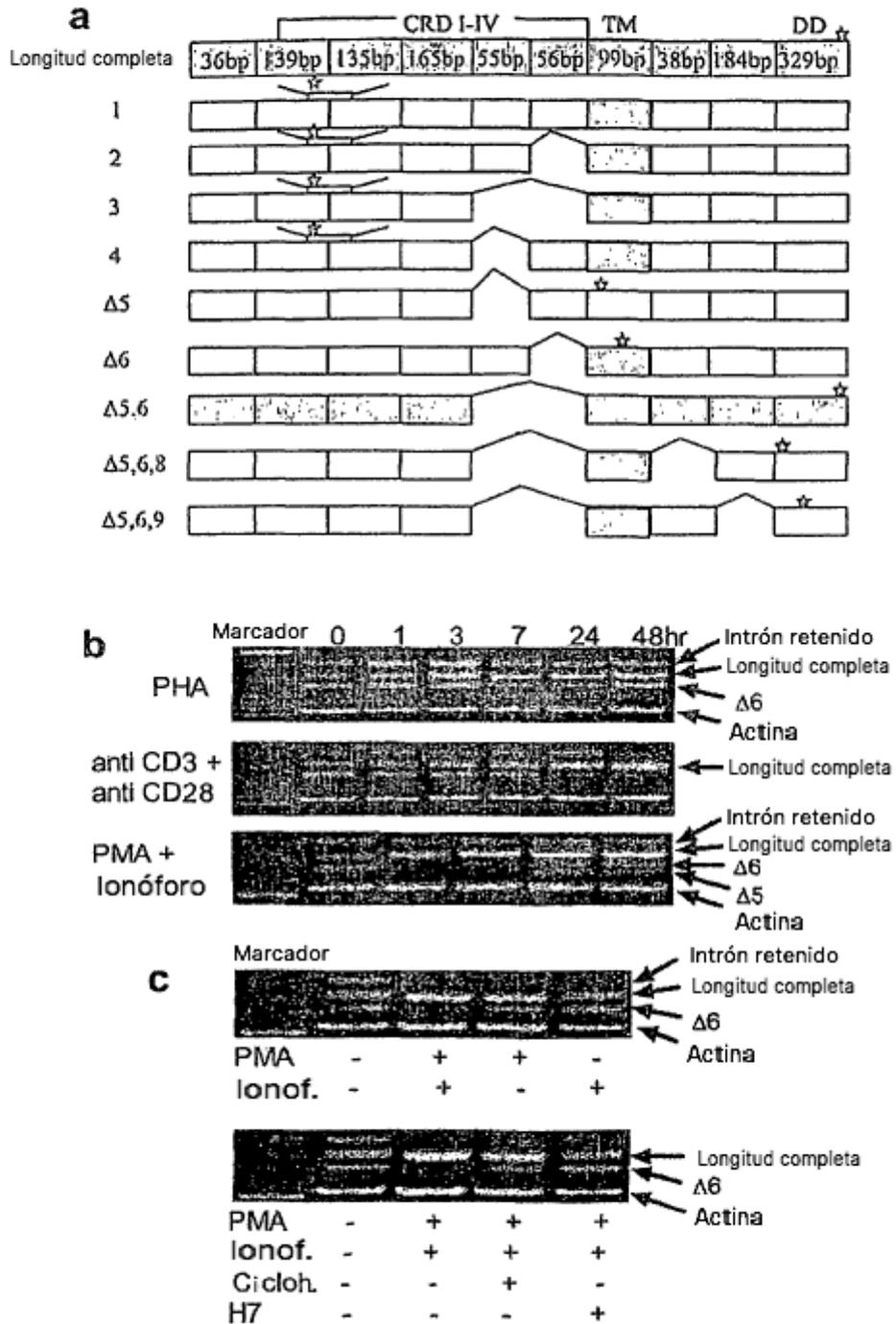


Figura 3:

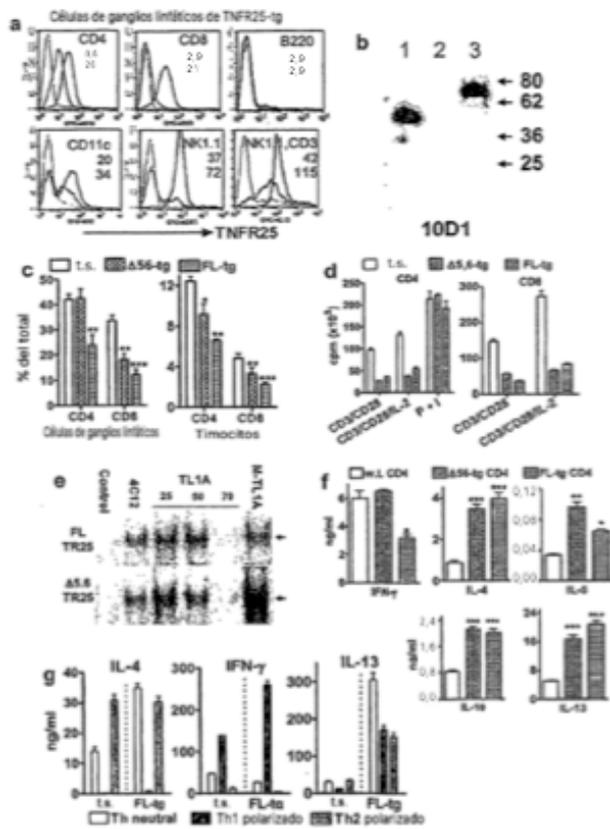


Figura 4:

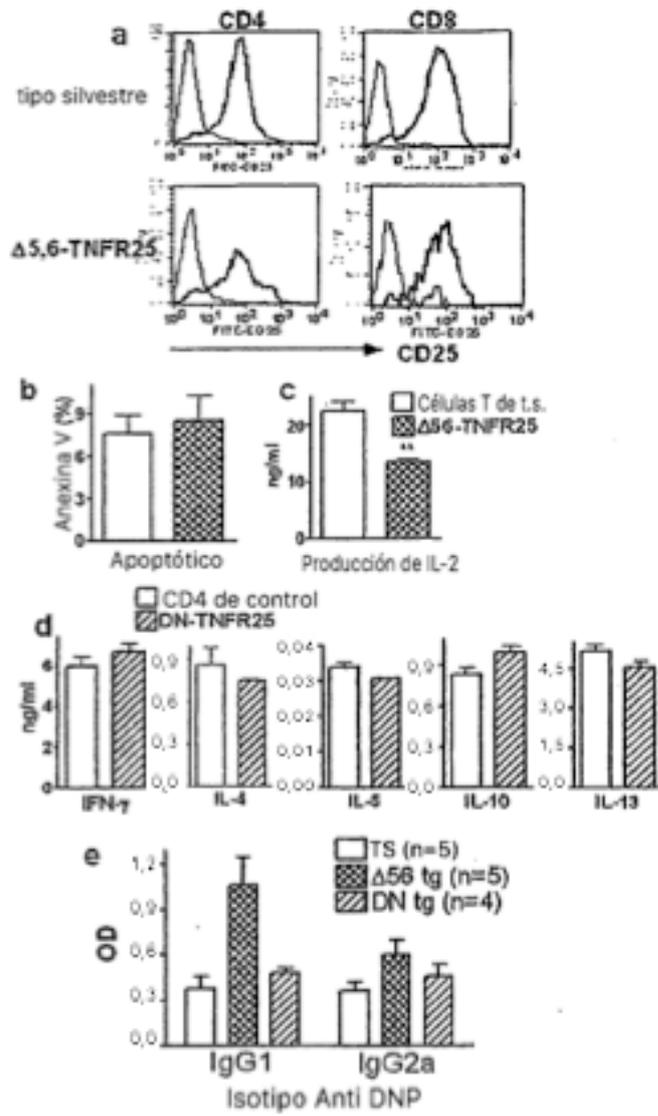


Figura 5:

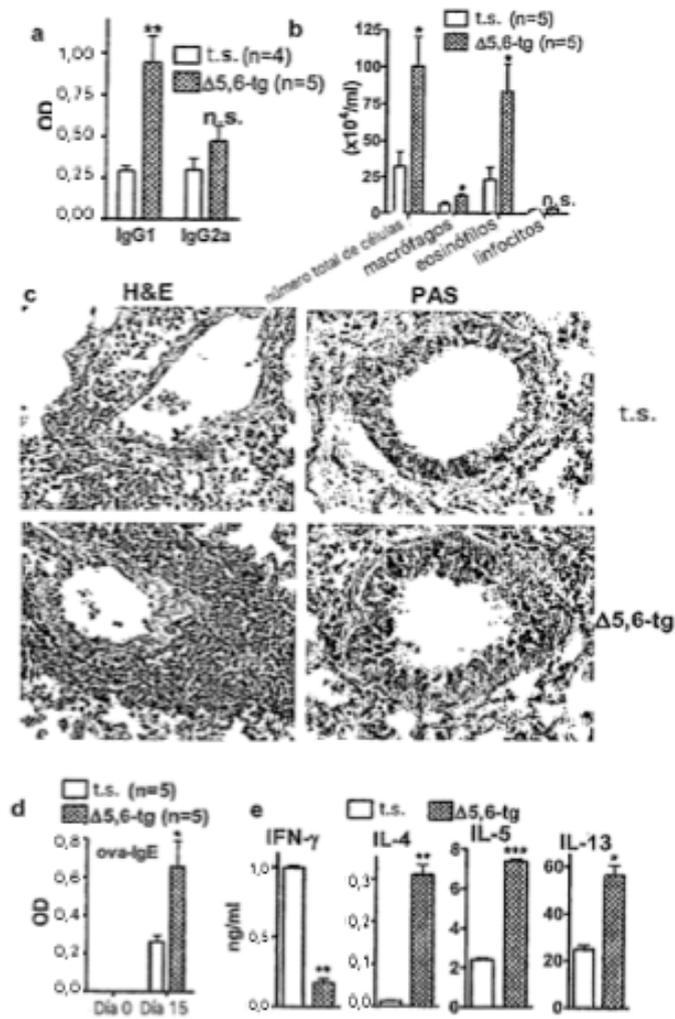


Figura 6:

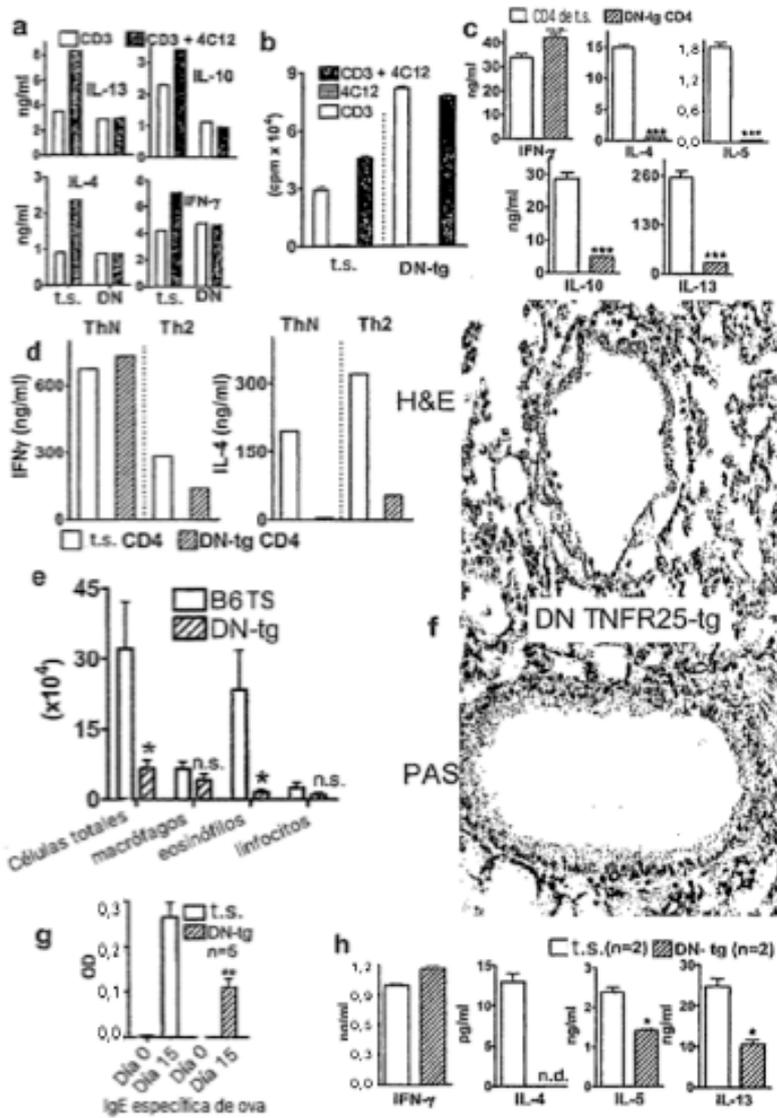


Figura 7:

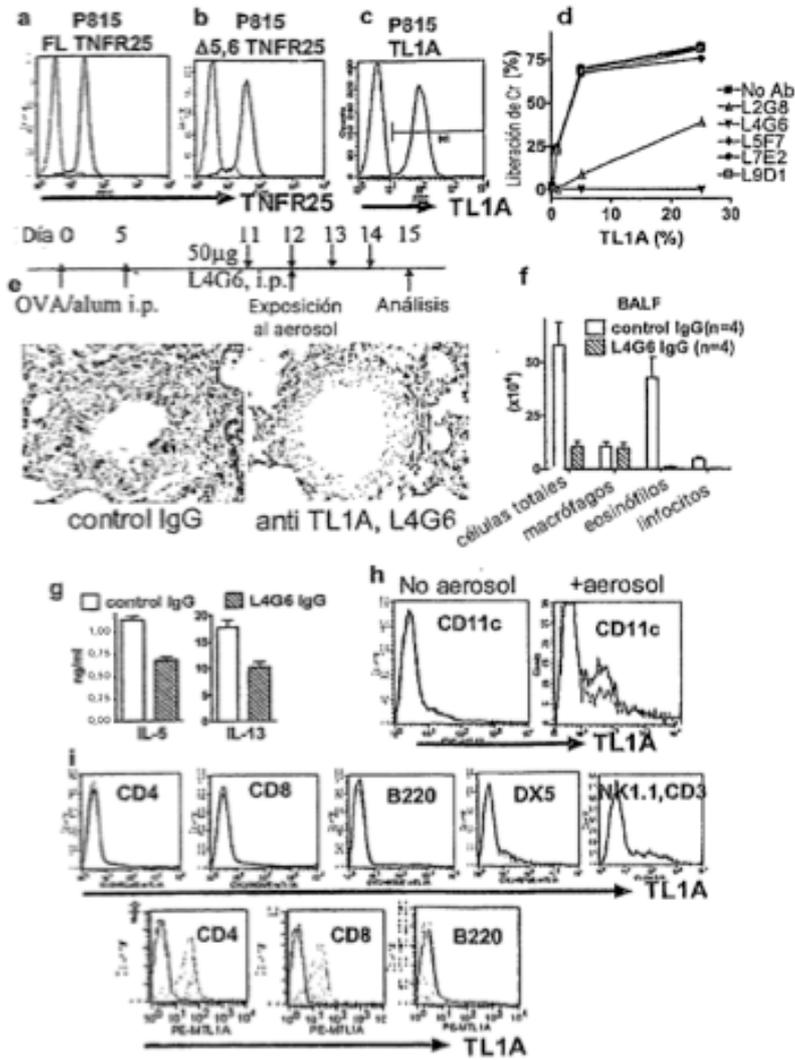


Figura 8:

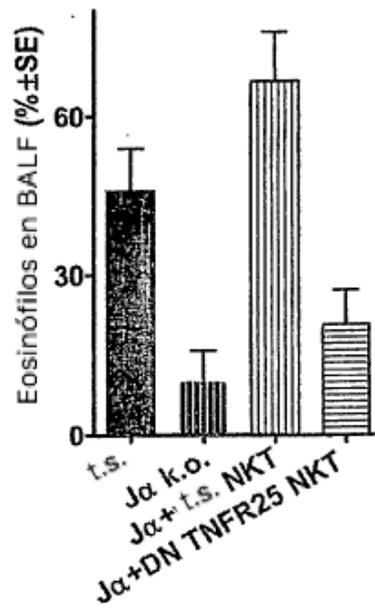


Figura 9:

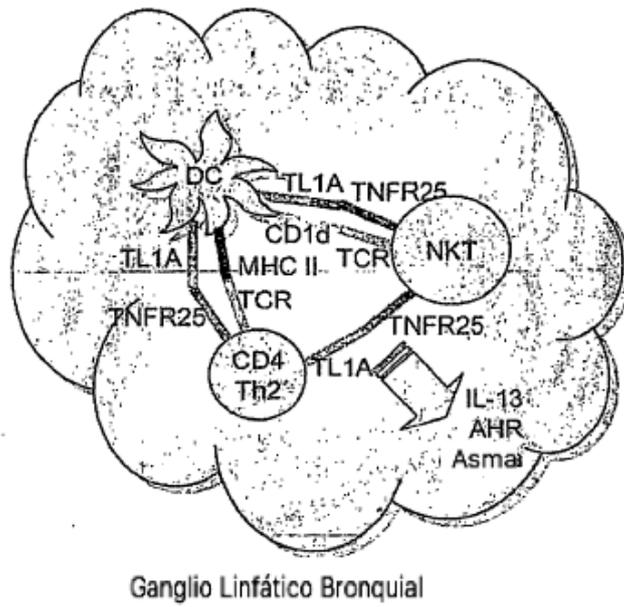


Figura 10:

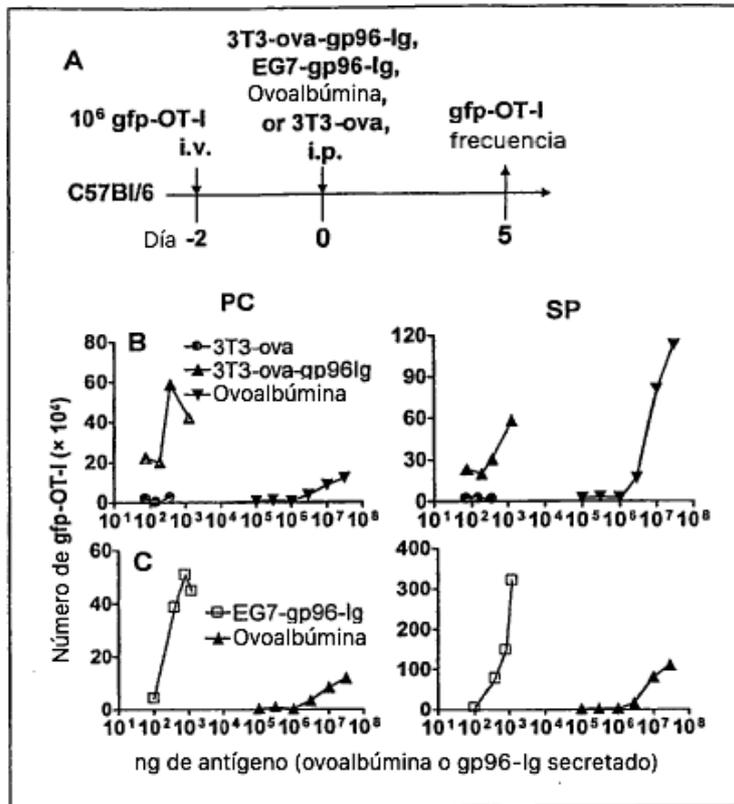


Figura 11

Expansión Mejorada de OT-I por TNFR25 Coestimulación

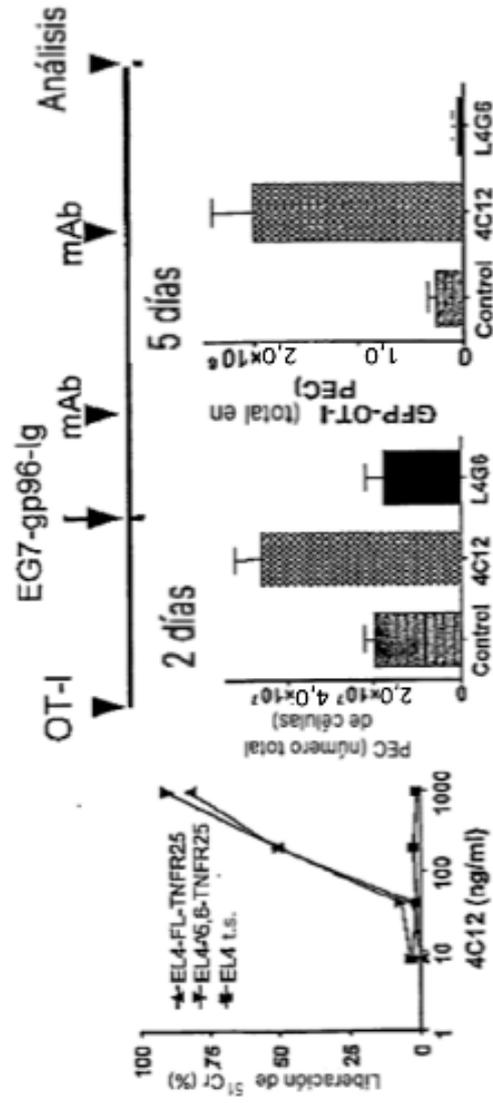


Figura 12:

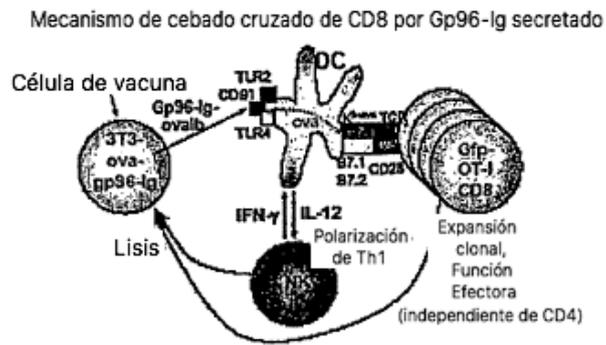


Figura 13:

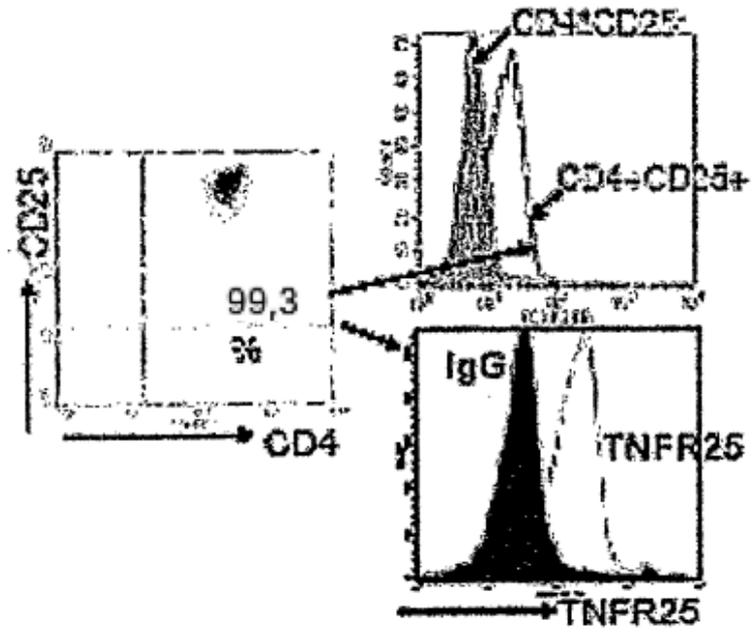


FIGURA 14

Requerimiento de TNFR25 para recuperación de Colitis

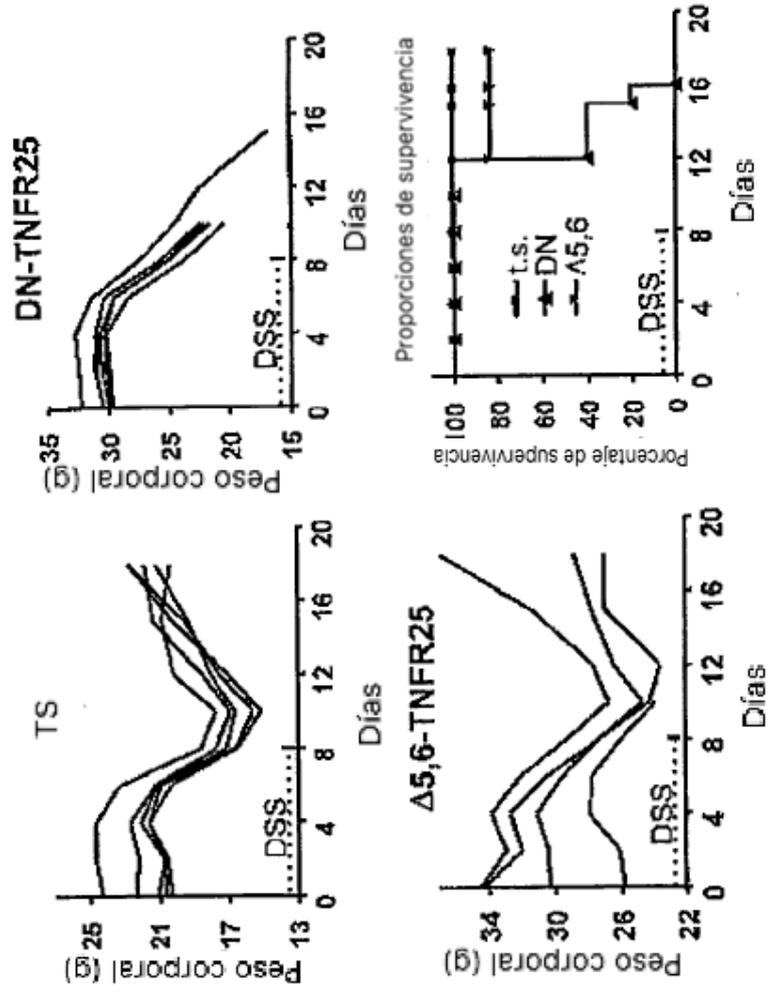


Figura 15:

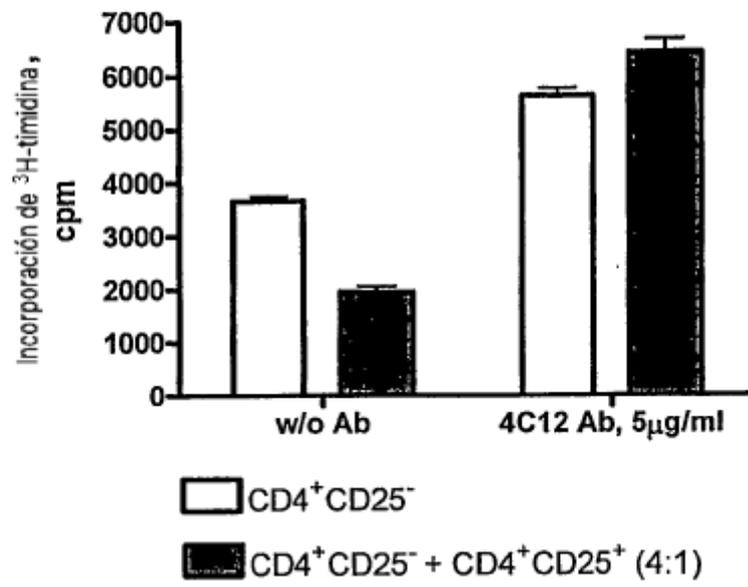


Figura 16:

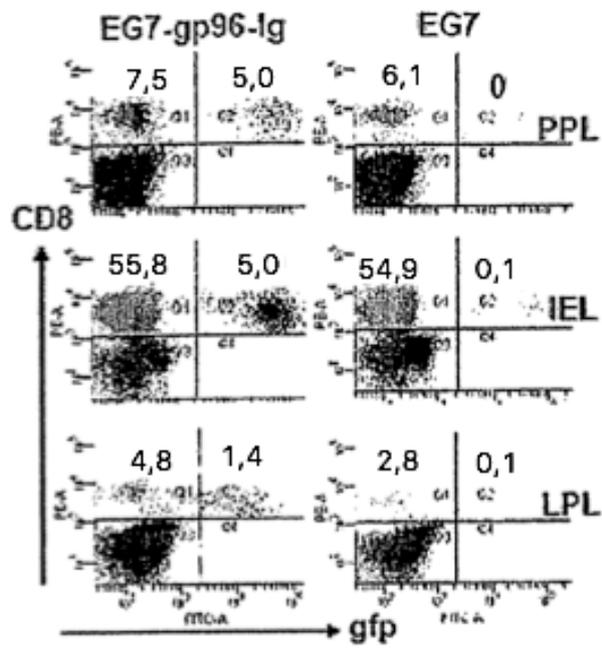


Figura 17

SEQ ID NO: 1 – ADNc de TNFR25 de ratón; NM 033042

```

1 gggagttggt ctggatggcg cgggggcggg cgggcagcag ctactctagt ctaggaacat
61 aggggctgag ctggttgggg aagccccggg ttaocgcacc gaccagagcc gcaactcacia
121 gggcccaggc ggtacacacc gcaatggagg cacggtgctc ggggggctgc gtggtggagc
181 ctctgttctc accactgctg ctgctgctgc tgctgctgct gctgcttggg ggccagggcc
241 agggcgcatc gctggcaggc tgtgactgtg ccagtgagtc ccagaagagg tatggcccgt
301 ttgtttgagc gggctgcca aaggacactc acatgaagcc cccctgcgca gaaccctgtg
361 gcaactccac ctgecttccc tgtccctcgg acaacttctt gaccagagac aaccacttta
421 actgctcggc taaccgctgc caagtctgtg atgaagaggc ccttcaagtg acccttgaga
481 actgctcggc aaagtccgac acccaactgtg gctgccagtc aggtctggtg gttgactgct
541 caaccgtgcc atgtgggaaa agctcacctt tctcttgggt cccatgcggg gctacgacac
601 cagtccatga ggctccaacc cccggccctt gcctgcctgg cttctatata cgtggcaatg
661 actgacactc ctggccaccg ggcttcagca gcgtttgccc taaggcttgc actgctgtct
721 gtggctggaa gcagatgttt tgggtccagg tgcttctagg agtcgcgttc ctttttgggg
781 ctatcctgat ctgtgcatac tgtcgtatgc agccttgtaa ggccctgggc actgcagaca
841 cagctgggac ggagccccct gctcaccac agactgocca tctctcagcc tcagacagcg
901 cccacaccct ctggccaccg ccaagcagta ctgggaaaat ctgtaccact gtcagttggt
961 taggcaacaa ctggaccctt ggcttatccc agactcagga ggtggtctgc ggacaggcct
1021 cacaaccctg ggtacagctg ccaaacagaa ctcttgggac tctctgggca tctccgctct
1081 cggcagcgcc cctgcggggc tctccggctg ctgtgctcca gcctggcccg cagctctacg
1141 atgtgatgga tgcggtccca gcaogaaggt ggaaggagtt cgtgcgcacg ctggggctgc
1201 ggggaagcga aattgaagcc gtggaggtgg aaatctgcc cttccgagac cagcagtatg
1261 agatgctcaa gcgctggcgt cagcagcagc ctgcaggcct cgggtgccatc tatgcggctc
1321 tggagcgcaa ggtcttgaaa ggctgtgccc aggacctgag cagccgctg cagcgtggcc
1381 cgtgatgaaa ggtccatcat ccactttgac accctagtga cccttgaagg agcctaaagt
1441 attgttactt atgcgtgtag acattttatg tcaattacta acccctgcc gtggctctgc
1501 gtagcagggc tggctgcctc acttttgcct atctgcagca cggagctcct gctaagggaa
1561 gcgtcatgga gaataaccag aaggggccaa gtgattggtt gctcagctgt taattagccc
1621 gagtttggac ttggtattaa atttcataag aaaagcagct gcttg

```

SEQ ID NO: 2 - ADNc de TNFR25 humana; NM_148965

```

1 cggggccctgc gggcgcgggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg
61 gaagcccctg ggcgcccctc ggagggctat ggagcagcgg ccgccccgct gcgcccgggt
121 ggcggcgggc ctctccctg tgcctgctgg ggcggggccc caggggcgga ctctgagccc
181 cagggtgtgac tgtgcccgtg acttccacaa gaagattggt ctgttttgtt gcagaggctg
241 cccagcgggg cactacctga agggcccctg cacggagccc tgcggcaact ccacctgctt
301 tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg
361 ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgtg gagaactggt cagcagtgcc
421 cgacacccgc tgtggctgta agccaggctg gtttgggag tggcaggcca gccaatgtgt
481 cagcagttca cccttctact gccaacctat cctagactgc ggggccctgc accgccaac
541 acggctactc tgttcccgca gagatactga ctgtgggacc tgcctgctg gcttctatga
601 acatggcgat ggtgcgtgtt cctgccccac gccacccccg tccttgcag gacaccctg
661 gggagctgtc cagagcgtg tgcgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgtctg
721 ggtccagggt ctctggtgct gccttgtggt cccctcctg cttggggcca cctgaccta
781 cacataccgc cactgctggc ctcaaacgcc cctggttact gcagatgaag ctgggatgga
841 ggctctgacc ccaccaccgg ccaccatct gtacccttg gacagcgccc acaccctctt
901 agcacctcct gacagcagtg agaagatctg caccgtccag ttggtgggta acagctggac
961 cctggcttac ccagagacc aggagcgct ctgcccag gtgacatggt cctgggacca
1021 gttgcccagc agagctctg gcccgctgc tgcgcccaca ctctgcccag agtcccagc
1081 cggctcgcca gccatgatgc tgcagccggg ccgcagctc tacgacgta tggacgggt
1141 cccagcggc cgtggaagg agttctgctg cacgctggg ctgcgcgag cagagatcga
1201 agcgtggag gtggagatg gccgctccg agaccagcag tacgagatgc tcaagcgtg
1261 gcgcccagc cagcccggg gcctcgagc cgtttacgag gccctggagc gcatggggct

```

ES 2 611 307 T3

1321 ggacggctgc gtggaagact tgcgcagccg cctgcagcgc ggcccgtagc acggcgccca
1381 cttgccacct aggcgctctg gtggcccttg cagaagccct aagtacgggt acctatgctg
1441 gtagacattt tatgtcactt attaaagccg tggcaacggcc ctgcgtagca gcaccagccg
1501 gccccacccc tgcctgcccc tatcgtctca gccaaaggcga agaagcacga acgaatgctg
1561 agaggggggtg aagacatttc tcaacttctc ggccggagtt tggctgagat cgcggtatta
1621 aatctgtgaa agaaaacaaa acaaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaa

SEQ ID NO: 3 - ADNc de TL1A de ratón

1 atggcagagg agctgggggtt gggcttcgga gaaggagtcc cagtgggaagt gctgcccga
61 ggctgtagac acaggccaga ggcagggcc gggctagctg ccaggagcaa agcctgctg
121 gctctcacct gctgcctggt gtcatttccc atcctcgcag gacttagcac cctctaagt
181 gctggccagc tccgggtccc cggaaaagac tgtatgcttc gggccataac agaagagaga
241 tctgagcctt caccacagca agtttactca cctccagag gcaagccgag agcacacctg
301 acaattaaga acaaaacccc agcaccacat ctgaaaaatc agctctctgc tctacactgg
361 gaacatgacc tagggatggc cttcaccaaag aacgggatga agtacatcaa caaatcctg
421 gtgatccag agtcaggaga ctatttcata tactcccaga tcacattccg agggaccaca
481 tctgtgtgtg gtgacatcag tcgggggaga cgaccaaaca agccagactc catcactgtg
541 gtcatacaca aggtagcaga cagctaccct gagcctgccc gcctactaac agggccaag
601 tctgtgtgtg aaataagcaa caactgggtc cagtccctct accttggggc catgttctcc
661 ttggaagaag gggacagact aatggtaaac gtcagtgaca tctccttggg ggattacaca
721 aaagaagata aaactttctt tggagcttcc ttgctataa

SEQ ID NO: 4 - ADNc de TNFR25 DN de ratón

atggagg cacggctgct gcggggctgc gtggtggagc
ctctgttctt accactgctg ctgctgctgc tgctgctgct gctgcttggg ggccagggcc
agggggcctat gtctggcagg tgtgactgtg ccagtgagtc ccagaagagg tatggcccgt
tttgttgacg gggctgcccc aagggacact acatgaaggc cccctgcccga gaaccctgtg
gcaactccac ctgcctccc tgctcctogg acaacttctt gaccagagac aaccacttta
agactgactg taccogctgc caagtctgtg atgaagaggc ccttcaagtg acccttgaga
actgctcggc aaagtccgac accactgtg gctgccagtc aggtggtgtg gttgactgct
ccaccgtgcc atgtgggaaa agctcacctt tctcttgtgt cccatgcccg gctacgacac
cagtcacatga ggtccaacc ccccgccctt gctgctgctg cttctatata cgtggcaatg
actgcacgtc ctgccccacg ggcttcagca gcgtttgccc taaggcttgc actgctgtct
gtggctggaa gcagatgttt tgggtccagg tgcttctagg agtcgcgctc ctttttgggg
ctatcctgat ctgtgcatat

SEQ ID NO: 5 - ADNc de TNFR25 DN humano (extracelular + transmembrana únicamente)

atggagcagcgg ccgcccggct gcgcccggct
ggcggcggcg ctctcctcgg tgctgctggg ggcccgggccc cagggcggca ctctagccc
caggtgtgac tgtgcccgtg acttccacaa gaagattggt ctgttttgtt gcagaggctg
cccagcgggg cactacctga aggcoccttg cacggagccc tgccgcaact ccacctgctt
tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg
ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgtg gagaactggt cagcagtggc
cgacacccgc tgtggtgta agccaggctg gtttgtggag tgccaggta gccaatgtg
cagcagttca ccttctact gccaacatg cctagactgc ggggocctgc accgcccac
acggctactc tgtcccgcga gagatactga ctgtgggacc tgccctgctg gcttctatga
acatggcgat ggctgcgtgt cctgccccac gccaccccgc tcccttgacg gagcaccctg
gggagctgtc cagagcgtg tgccgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg
ggtccaggtg ctctggtgct gcttgtggt cccctcctg cttggggcca cctgaccta
caca

SEQ ID NO: 6 - ADNc de DN TNFR25 Humano (únicamente extracelular)

```

at ggagcagcgg ccgcggggct gcgcgggcgt
ggcgggggcg ctctctctgg tgctgtctgg ggccccggcc cagggcgggca ctcgtagccc
caggtgtgac tgtgcccgtg acttccacaa gaagattggt ctgttttgtt gcagaggctg
cccagcgggg cactacctga aggcccctg caeggagccc tgcggcaact ccacctgctt
tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg
ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgctg gagaactgtt cagcagtggc
cgacaccgc tgtggctgta agccaggctg gtttgggag tgcaggtoa gccaatgtgt
cagcagttca ccctctact gccaacctg cctagactgc ggggccctgc accgccacac
acggctactc tgttccgcga gagatactga ctgtgggacc tgctgctctg gcttctatga
acatggcgat ggctgcgtgt cctgccccac gccacccccg tcccttgca ggcaccctg
gggagctgtc cagagcgtg tgccgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg
g
    
```

SEQ ID NO: 7 - ADNc de TL1A Humano; AF520785

```

1 gagagggaaa agggaaggag gagactgagt gattaagtca cccactgtga agagctggtc
61 ttctatttaa tgggggctct ctctgccag ggtcagagg tgctccagg agcagcagga
121 gcatggccga ggatctggga ctgagctttg gggaaacagc cagtgtgaa atgctgccag
181 agcacggcag ctgcaggccc aaggccagga gcagcagcgc acgctgggct ctcaactgct
241 gcctggtggt gctccccttc cttgcaggac tcaccacata cctgcttgc agccagctcc
301 gggcccaggg agaggcctgt gtgcagttcc aggtctctaa aggacaggag tttgcacctt
361 cacatcagca agtttatgca cctcttagag cagacggaga taagccaagg gcacacctga
421 cagttgtgag acaactccc acacagcact ttaaaaatca gttcccagct ctgcaactggg
481 aacatgaact aggcctggcc ttcaccaaga accgaatgaa ctataccaac aaattcctgc
541 tgatcccaga gtccgggagc tacttcattt actcccaggc cacattccgt gggatgacct
601 ctgagtgcag tgaatcaga caagcaggcc gaccaaacia gccagactcc atcactgtgg
661 tcatcaccaa ggtaacagac agctaccctg agccaaccca gctcctcatg gggaccaagt
721 ctgtatgcga agtaggtagc aactggttcc agcccacta cctcggagcc atgttctcct
781 tgcaagaagg ggacaagcta atggtgaacg tcagtgcact ctctttggg gattacaaa
841 aagaagataa aaccttcttt ggagccttct tactatagga ggagagcaaa taccattata
901 tgaagtctct ctgccaccga gttcctaatt ttctttgttc aaatgtaatt ataaccaggg
961 gttttcttgg ggcgggagc agggggcatt ccacagggac aacggtttag ctatgaaatt
1021 tggggcccaa aatttcacac ttcatgtgcc ttactgatga gactactaac tggaaaaggc
1081 tgaagagagc aatattatta ttaagatggg ttggaggatt ggcgagtctc taaatattaa
1141 gacactgatc actaaatgaa tggatgatct actcgggtca ggattgaaag agaaatattt
1201 caacacctcc ctgctataca atggtcacca gtggtccagt tattgttcaa ttgatcata
1261 aatttgcttc aattcaggag ctttgaagga agtccaagga aagctctaga aaacagtata
1321 aactttcaga ggcaaaatcc ttcaccaatt ttccacata ctttcatgct tgcctaaaa
1381 aaaatgaaaa gagagttggt atgtctcatg aatgttcaca cagaaggagt tggtttcat
1441 gtcacttaca gcatatgaga aaagctacct ttctttgat tatgtacaca gatattcaaa
1501 taaggaagta tgagtttcac atgtatatca aaaatacaac agttgcttgt attcagtaga
1561 gttttcttgc ccacctata ttgtctgggt tctaccttaa ccagaagac actatgaaa
1621 caagacaga ctccactcaa aatttatatg aacaccacta gatacttctt gatcaaacat
1681 cagtcaacat actctaaaga ataactcaa gtcttgccca ggcgcagtgg ctcacacctg
1741 taatcccaac actttgggag gccaagggtg gtggatcctc taaggccggg agttcaagac
1801 cagcctgacc aacgtggaga aacccatct ctaactaaaa taaaaatta gccggcgctg
1861 gtgagcgtc gctgtaatcc tggctactca ggaggccgag gcagaagaat tgcttgaact
1921 ggggagcag aggttgcggt gagcccagat cgcgccattg cactccagcc tgggtaacaa
1981 gagcaaaact ctgtccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
    
```

SEQ ID NO: 16 - ADNc de DN TNFR25m

```

ATGGAGGCAC GGCTGCTGG GGGCTGCGTG GTGGAGCCTC TGTTCCTACC ACTGCTGCTG
CTGCTGCTGC TGCTGCTTGG TGGCCAGGGC CAGGGCGGCA TGTCTGGCAG GTGTGACTGT
GCCAGTGAAT CCCAGAAGAG GTATGGCCCG TTTTGTGCA GGGGCTGCC AAAGGGACAC

TACATGAAG CCCCTGCGC AGAACCCTGT GGCAACTCCA CCTGCCTTCC CTGTCCCTCG
GACACCTTCT TGACCAGAGA CAACCACTTT AAGACTGACT GTACCCGCTG CCAAGTCTGT
GATGAAGAGG CCTTCAAGT GACCCCTGAG AACTGCTCGG CAAAGTCGGA CACCCACTGT
GGCTGCCAGT CAGGCTGGTG TGTTGACTGC TCCACCGAGC CATGTGGGAA AAGCTCACCT
TTCTTTGTG TCCCATGCGG GGCTACAACA CCAGTCCATG AGGCTCCAAC CCCCAGGCC
TGCTGCTGCTG GCTTCTATAT ACGTGGCAAT GACTGCACGT CCGCCCCAC GGGCTTCAGC
AGCGTTTGC CTAAGCTTTC CACTGCTGTC TGTGGCTGGA AGCAGATGTT TTGGTCCAG
GTGCTTCTAG GAGTCGCGTT CCTTTTTGGG GCTATCCTGA TCTGTGCATA TGGCTCTGGA
AGCGGGAGCG TCGACGATCT TTACGACGAT GATAAATAGT AA
    
```