



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0617057-9 A2**

(22) Data de Depósito: 30/08/2006
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)



(51) *Int.Cl.:*

C07K 16/28 2006.01
A61K 39/395 2006.01
A61P 37/06 2006.01
A61P 35/00 2006.01
A61P 29/00 2006.01
C07K 16/46 2006.01

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO, TOXINA ESPECÍFICA PARA RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA ATIVAR O RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25) NUMA CÉLULA, VACINA ANTITUMORAL, MÉTODO PARA IMUNIZAR UM PACIENTE CONTRA TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER NUM PACIENTE, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO INTESTINAL, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA A FACILITAÇÃO DE UM TRANSPLANTE DE ÓRGÃO, MÉTODO PARA TRANSPLANTAR UM TECIDO DE UM DOADOR PARA UM HOSPEDEIRO, MÉTODO PARA INIBIR A EXPRESSÃO CLONAL DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 COGNATAS, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO PULMONAR, ANTAGONISTA DE TNFR25 ISOLADO, COMPOSIÇÃO E VETOR DE EXPRESSÃO

(30) Prioridade Unionista: 30/08/2005 US 60/712,084

(73) Titular(es): University Of Miami

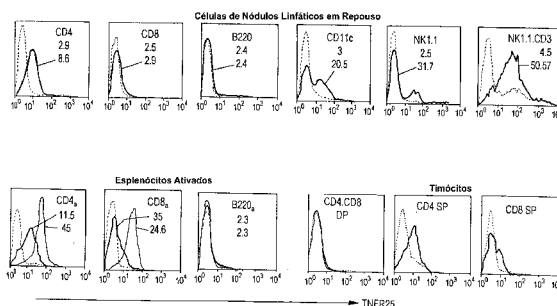
(72) Inventor(es): Eckhard Podack, Robert Levy, Vadim Deyev

(74) Procurador(es): Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) Pedido Internacional: PCT US2006033828 de 30/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/027751 de 08/03/2007

(57) Resumo: ANTICORPO ISOLADO, TOXINA ESPECÍFICA PARA RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA ATIVAR O RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25) NUMA CÉLULA, VACINA ANTITUMORAL, MÉTODO PARA IMUNIZAR UM PACIENTE CONTRA TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER NUM PACIENTE, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO INTESTINAL, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA A FACILITAÇÃO DE UM TRANSPLANTE DE ÓRGÃO, MÉTODO PARA TRANSPLANTAR UM TECIDO DE UM DOADOR PARA UM HOSPEDEIRO, MÉTODO PARA INIBIR A EXPRESSÃO CLONAL DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 COGNATAS, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO PULMONAR, ANTAGONISTA DE TNFR25 ISOLADO, COMPOSIÇÃO E VETOR DE EXPRESSÃO. O objeto da presente invenção consiste em prover composições e métodos novos utilizando agentes imunomoduladores que podem estimular ou indiretamente aumentar o sistema imune ou, em outros casos, ter um efeito imunossupressor. Os agonistas de TNFR25 aqui descritos possuem um efeito antiinflamatório e curativo. Podem ser usados, entre outras coisas, para tratar doença causada por asma e inflamação crônica, tais como, por exemplo, doenças intestinais inflamatórias, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn. Os antagonistas de TNFR25 aqui descritos são capazes de inibir as respostas imunes celulares mediadas por célula T CD8 e podem, por exemplo, mitigar a rejeição de órgão ou tecido, após um transplante de tecido. Os agonistas de TNFR25 aqui descritos representam modificadores de resposta biológica que alteram a interação entre as defesas imunes celulares do organismo e as células cancerosas para reforçar, direcionar ou restaurar a capacidade do organismo no combate ao câncer quando administrados com vacinas anti-tumorais. As imunotoxinas TNFR25 específicas aqui descritas são também capazes de aumentar a eficácia de um esquema quimioterápico através da depleção de células imuno-supressoras de ocorrência natural num paciente com câncer.



"ANTICORPO ISOLADO, TOXINA ESPECÍFICA PARA RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA ATIVAR O RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25) NUMA CÉLULA, VACINA ANTITUMORAL, MÉTODO PARA IMUNIZAR UM PACIENTE CONTRA TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER NUM PACIENTE, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO INTESTINAL, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA A FACILITAÇÃO DE UM TRANSPLANTE DE ÓRGÃO, MÉTODO PARA TRANSPLANTAR UM TECIDO DE UM DOADOR PARA UM HOSPEDEIRO, MÉTODO PARA INIBIR A EXPRESSÃO CLONAL DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 COGNATAS, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO PULMONAR, ANTAGONISTA DE TNFR25 ISOLADO, COMPOSIÇÃO E VETOR DE EXPRESSÃO".

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a agonistas, imunotoxinas, antagonistas da Super Família 25 de Receptor de Fator de Necrose Tumoral (TNFR25) e a seu uso no tratamento do câncer, inflamação e para efetuar imunossupressão, respectivamente.

Histórico da invenção

Muitos distúrbios do sistema imune humano enquadram-se em duas amplas categorias: os que se caracterizam por uma resposta imune atenuada e os que se caracterizam por respostas imunes exageradas. A imunodeficiência é caracterizada por uma resposta atenuada. Há formas congênitas (inatas) e adquiridas de imunodeficiência. A doença granulomatosa crônica, na qual os fagócitos encontram dificuldade em destruir os patógenos, é um exemplo da primeira. A AIDS ("Síndrome da Imunodeficiência Adquirida"), uma doença infecciosa, causada pelo vírus HIV que destrói as células T CD4+, é um exemplo da última. Uma outra doença que pode ser caracterizada por uma resposta imune atenuada é o câncer. Ao contrário dos indivíduos sadios, os sistemas imunes de pacientes com câncer não são capazes de reconhecer

eficazmente e/ou de destruir as células tumorais.

Apesar das grandes expectativas, não existem medicamentos até o momento que aumentem diretamente a atividade do sistema imune. Porém, terapias biológicas têm sido recentemente utilizadas para recrutar o sistema imune, seja direta ou indiretamente, no combate a doenças, tal como o câncer. Os anticorpos monoclonais (MAb) são atualmente utilizados com frequência como terapia biológica. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem reagir com tipos específicos de células cancerosas, e possuem efeitos antitumorais diretos ou indiretos.

As vacinas antitumorais podem ser empregadas terapêuticamente ou para profilaxia após terapia primária. As vacinas antitumorais podem precisar induzir a imunidade celular na forma de células T citotóxicas tumor-específicas do fenótipo CD4 ou CD8. Considera-se que a imunidade antitumoral eficaz requer a geração e a manutenção de tais células citotóxicas por longos períodos de tempo. Além disso, as evidências indicam que o braço inato do sistema imune deve ser ativado para gerar vacinas antitumorais eficazes. As vacinas que aumentam ou que geram respostas humorais produzem anticorpos que podem ser detectados durante um período relativamente longo. Para serem eficazes, esses anticorpos devem ser capazes de direcionar antígenos de superfície celular em ensaios com célula viva. A manutenção de respostas imunes celulares específicas a epítomos antigênicos (imunidade adaptativa) pode requerer imunizações mais frequentes, embora as células de memória possam manter a capacidade de responder e de reopor-se ao epítomo de imunização. Como tal, seria substancialmente benéfico ter acesso a terapias que fossem capazes de reforçar as respostas imunes celulares específicas a vacinas antitumorais.

Por outro lado, um sistema imune superativo figura em diversos outros distúrbios, especialmente nos distúrbios autoimunes, tais como o lupus eritematoso, diabetes tipo I

(às vezes denominada "diabete de início juvenil"), esclerose múltipla, psoríase, artrite reumatóide, e doenças intestinais inflamatórias, tais como Doença de Crohn e colite ulcerativa (UC). Nestes, o sistema imune
 5 não distingue adequadamente entre o "próprio" ("self") e o "não-próprio" ("non-self") e ataca uma parte do organismo do próprio paciente. Outros exemplos de respostas imunes exageradas em doenças incluem hipersensibilidades, tais como alergias e asma.

10 A supressão do sistema imune é freqüentemente utilizada para controlar os distúrbios autoimunes ou a inflamação quando isso causa dano excessivo aos tecidos. A medicação imunossupressora induz intencionalmente uma imunodeficiência para impedir a rejeição de órgãos
 15 transplantados. Os imunossupressores comumente utilizados incluem glucocorticóides, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, ciclofosfamida e mercaptopurina. Em transplantes de órgãos, a inibição seletiva de célula T previne a rejeição do órgão, sendo utilizados a
 20 ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetil e diversos outros.

Os linfócitos T desempenham um papel central na regulação das respostas imunes. As células T auxiliares expressam o marcador de superfície de CD4 e ajudam as células B na
 25 produção de anticorpos e as células T CD8 a desenvolverem atividade citotóxica. Outras células T CD4 inibem a produção de anticorpos e a citotoxicidade. As células T regulam o equilíbrio entre o ataque de células infectadas ou tumorigênicas e a tolerância às células corporais. Um
 30 ataque imune desregulado pode levar à autoimunidade, ao passo que a responsividade imune diminuída resulta em infecção crônica e câncer.

O Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25) aqui também alternadamente designado Receptor de Morte 3
 35 (DR3), conforme aqui discutido, é um regulador de função da célula T. O receptor de morte (DR3) (Chinnaiyan et al., Science 274:990, 1996) é um membro da família de

receptor TNF. É também conhecido como TRAMP (Bodmer et al., Immunity 6:79, 1997), wsl-1 (Kitson et al., Nature 384:372, 1996), Apo-3 (Masters et al., Curr.Biol. 6:1669, 1996) e LARD (Screaton et al., Proc. Natl.Acad.Sci USA 94:4615, 1997) e contém um domínio de morte típico. A transfecção de 293 células com DR3 humano (hDR3) induziu a apoptose e ativou o NF- κ B. O ligante cognato para DR3 foi recentemente identificado como TL1A (Migone et al., Immunity 16:479, 2002) e demonstrou ter atividade co-estimulatória para DR3 sobre células T através da indução de NF- κ B e supressão de apoptose através de expressão de cIAP2 (Wen et al., J.Biol Chem 25:25, 2003). O TL1A também se liga ao receptor chamariz 3 (DcR3/TR-6) indicando que a sintonia fina de acessibilidade biológica de TL1A é de importância crítica. Foram observadas formas de ligação múltiplas de mRNA de DR3 humano, indicando regulação a nível pós-transcricional (Screaton et al., Proc. Natl Acad Sci USA 94:4615, 1997).

Muitos membros da família de receptor TNF têm a capacidade de induzir a morte celular através de apoptose ou de induzir sinais co-estimulatórios para a função de célula T. A regulação dessas vias opostas foi recentemente esclarecida para TNF-R1, o receptor contendo domínio de morte prototípico que pode causar apoptose ou proliferação de células T positivas para receptor (Micheau e Tschopp. Cell 114:181, 2003). A ativação de NF- κ B através de um complexo sinalizador composto de TNF-R1 via TRADD, TRAF2 e RIP induz a associação FLIPL com um segundo complexo sinalizador composto de TNFR1, TRADD e FADD, impedindo a ativação de caspase 8 enquanto persistir a sinalização de NF- κ B. O DR3 demonstrou ser capaz de induzir a apoptose em células transfectadas e de induzir NF- κ B e todas as três vias de MAP-quinase (Chinnaiyan et al., Science 274:990, 1996; Bodmer et al., Immunity 6:79, 1997; Kitson et al., Nature 384:372, 1996; Marsters et al., Curr.Biol. 6:1669, 1996; Screaton et al.Proc.Natl.Acad Sci USA 94:4615, 1997; Wen et al.

J.Biol Chem 25:25, 2003). O bloqueio de NF- κ B, mas não o de MAP-quinase e a inibição de síntese protéica resultou na morte celular mediada por DR3, indicando que os sinais NF- κ B mediam os efeitos anti-apoptóticos através da síntese de proteínas anti-apoptóticas.

A expressão de mRNA de DR3 é pronunciada em tecidos linfóides, principalmente no baço, nódulos linfáticos, timo e intestino delgado, indicando um papel importante de DR3 sobre os linfócitos. DR3 murino foi eliminado através de recombinação homóloga em células tronco embrionárias (Wang et al., Mol Cell Biol 21:3451, 2001). Camundongos-/-DR3 mostraram seleção negativa reduzida por anti-CD3 no timo, mas seleção negativa normal por superantígenos e seleção positiva não prejudicada de timócitos. As células T periféricas maduras não foram afetadas pela deficiência de DR3. Apesar da considerável quantidade de pesquisa preliminar, a função fisiológica de DR3 permanece precariamente caracterizada.

Todas as publicações científicas incluindo os documentos patentários aqui citados são aqui incorporados por referência em sua totalidade, para todos os fins.

Sumário da invenção

Um aspecto da invenção refere-se a um anticorpo que liga-se ao antígeno de Receptor de Fator de Necrose Tumoral (TNFR25) e que pode atuar como um agonista de TNFR25. Numa concretização, o anticorpo é capaz de aumentar a expansão de célula CD8 OT-I quando de uma preparação cruzada ("cross-priming") através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle. Numa outra concretização, o anticorpo é o anticorpo monoclonal 4C12 purificado.

Outro aspecto da invenção refere-se a uma toxina TNFR25-específica compreendendo um agente tóxico ligado a polipeptídeo que se liga ao receptor TNRF25. Numa concretização deste aspecto, a porção compreendendo toxina inclui o anticorpo monoclonal 4C12 ou uma porção imuno-específica de 4C12. Em outra concretização, o agente

tóxico é selecionado de um isótopo radioactivo, ricina, abrina, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, ou íon metálico. Numa outra concretização, o polipeptídeo que se liga ao TNFR25 é a proteína de TL1A ou um
5 fragmento ou variante da mesma.

Em outro aspecto da invenção, a toxina TNFR25-específica é usada num método para tratar câncer num paciente. Especificamente, o método inclui a depleção de células T CD4+/CD25+ reguladoras (Tregs) de um paciente,
10 administrando ao mesmo toxina TNFR25-específica e também um agente quimioterápico.

Outro aspecto da presente invenção refere-se ainda a um método para ativar receptor de TNFR25 expressado numa célula compreendendo contatar a célula com um agonista de
15 TNFR25. O agonista pode ser selecionado de um anticorpo monoclonal 4C12; um anticorpo que se liga a TNFR25 e que pode aumentar a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle; um proteína de TL1A
20 solúvel; um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo de agonista de TNFR25; um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um TL1A solúvel; ou um vetor de expressão
25 com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um TNFR25. Esse método inclui ainda observar um aumento na sinalização de receptor TNFR25.

Um aspecto adicional da presente invenção refere-se a um anticorpo que seja capaz de atuar como um antagonista de
30 TNFR25. Em uma concretização, o anticorpo liga-se a um TL1A e é capaz de reduzir a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle. Numa outra concretização, o anticorpo é o anticorpo monoclonal
35 purificado L4G6.

Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para inibir a sinalização de receptor TNFR25 numa célula. O

método inclui contatar a célula com um antagonista de TNFR25. O método inclui ainda observar uma redução na sinalização de receptor TNFR25.

5 Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma vacina antitumoral compreendendo um antígeno tumoral e um agonista de TNFR25 como modificador de resposta biológica. Uma outra concretização dessa vacina também inclui um adjuvante.

10 Em outro aspecto da presente invenção, após isolar um antígeno tumor-específico, uma vacina compreendendo um antígeno tumor-específico e um agonista de TNFR25 é utilizada para imunizar um paciente contra o tumor.

Um outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para tratar e/ou prevenir inflamação intestinal
15 compreendendo prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição terapêutica compreendendo um agonista de TNFR25.

Um outro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição terapêutica para a facilitação de um
20 transplante de órgão compreendendo um antagonista de TNFR25 e um imunossupressor. Numa concretização deste aspecto, o imunossupressor é o glucocorticóide, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, ciclofosfamida, mercaptopurina, tacrolimus ou micofenolato mofetil.

25 Em outro aspecto da invenção, uma composição antagonista de TNFR25 é usada num método para transplante de tecido de um doador para um hospedeiro. Esse método inclui as etapas de obter tecido de um doador; prover um hospedeiro com uma composição antagonista de TNFR25; e transplantar
30 o tecido no hospedeiro.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para inibir a expansão clonal de uma população de células T CD8 cognatas. Esse método inclui expor as células T CD8 a seu antígeno cognato e expor as células T CD8 a um
35 antagonista de TNFR25. Em outra concretização, o antígeno cognato está associado com o tecido a ser transplantado de um doador para um hospedeiro.

Outro aspecto da presente invenção refere-se a um antagonista de TNFR25 isolado compreendendo um polipeptídeo codificado por uma seqüência compreendendo ácido nucleico que hibridiza sob condições estringentes com SEQ ID NOS: 4, 5, 6 e/ou 16 e sendo que a seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de TL1A. Numa concretização, a seqüência hibridiza sob condições estringentes com SEQ ID NO:4. Numa outra concretização, a seqüência hibridiza sob condições estringentes com SEQ ID NO: 5. Numa outra concretização, a seqüência hibridiza sob condições estringentes com SEQ ID NO:6. Em outra concretização, a seqüência hibridiza sob condições estringentes com a SEQ ID NO:16. Em outra concretização, o TL1A é um TL1A humano ou de camundongo.

Outro aspecto da invenção refere-se a um método para tratar e/ou prevenir inflamação pulmonar compreendendo prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição terapêutica compreendendo o antagonista de TNFR25 compreendendo um polipeptídeo codificado por uma seqüência compreendendo ácido nucleico que hibridiza sob condições estringentes com SEQ ID NOS: 4, 5, 6 e/ou 16, e sendo que a seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de TL1A.

Outro aspecto da invenção refere-se a um método para transplantar um tecido de um doador para um hospedeiro compreendendo obter o tecido do doador, prover o hospedeiro com o antagonista de TNFR25 compreendendo um polipeptídeo codificado por uma seqüência compreendendo ácido nucleico que hibridiza sob condições estringentes com SEQ ID NOS: 4, 5, 6 e/ou 16 e sendo que a seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de TL1A; e transplantar o tecido no hospedeiro.

Outro aspecto da invenção refere-se a uma composição compreendendo um polipeptídeo codificado por uma seqüência que hibridiza sob condições estringentes com

SEQ ID NOs: 3 e/ou 7, e sendo que a seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se à proteína de receptor TNFR25; e um agente tóxico. Numa concretização, o agente tóxico é selecionado do grupo
5 consistindo de um isótopo radioativo, ricina, abrina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas, e íon metálico.

Outro aspecto da invenção refere-se a um método para tratar câncer num paciente compreendendo a depleção de
10 células T CD4+/CD25+ reguladoras (Tregs) num paciente, provendo ao paciente uma composição que compreenda a toxina da reivindicação 39; e prover a um paciente um agente quimioterápico.

Um outro aspecto da invenção refere-se a um método para
15 tratar e/ou prevenir inflamação intestinal compreendendo prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um polipeptídeo codificado por uma seqüência que hibridiza sob condições estridentes com SEQ ID NOs: 3 e/ou 7, e sendo que a
20 seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor de TNFR25. Numa concretização, a inflamação é resultado de síndrome do intestino irritável. Em outra concretização, a inflamação intestinal é resultado de doença de Crohn.

25 Um outro aspecto da invenção refere-se a uma vacina antitumoral compreendendo um antígeno tumoral e um polipeptídeo codificado por uma seqüência que hibridiza sob condições estridentes com SEQ ID NOs: 3 e/ou 7, e sendo que a seqüência codifica uma seqüência de
30 aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor de TNFR25, como modificador de resposta biológica.

Outro aspecto da invenção refere-se ainda a um vetor de expressão compreendendo uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições estridentes com SEQ ID NOs:
35 3 e/ou 7, e que codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor de TNFR25.

Outro aspecto da invenção refere-se ainda a um vetor de

expressão compreendendo uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições estridentes com SEQ ID NOS: 4, 5, 6 e/ou 16, e sendo que a seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de TL1A.

Vantagens adicionais da presente invenção tornar-se-ão evidentes aos habilitados na técnica a partir da descrição detalhada a seguir, sendo que apenas a concretização preferida da invenção é mostrada e descrita, simplesmente com a finalidade de ilustrar o melhor modo previsto para executar a invenção. Conforme será realizado, a invenção é capaz de outras e diferentes concretizações, e seus diversos detalhes são capazes de modificações em diversos aspectos óbvios, desde que não fujam do escopo da invenção. A presente invenção pode ser praticada sem alguns ou todos esses detalhes específicos. Em outros casos, operações de processo conhecidas não foram descritas com detalhes, de forma a não confundir desnecessariamente a presente invenção. Conseqüentemente, os desenhos e descrições devem ser considerados como ilustrativos por natureza e não restritivos.

Breve descrição dos desenhos

A Figura 1A mostra a expressão de TNFR25 murino em células de nódulos linfáticos. MFI é indicado por números em preto para o anticorpo de controle de isótipo como anticorpo primário e em tracejado para anti-TNFR25. A detecção de TNFR25 necessitou de um sanduíche triplo de anticorpo monoclonal anti-TNFR25 primário de hamster, seguido de biotina anti-hamster de cabra e estreptavidina (Strept-Avidin) marcada com PE. 1B ilustra a expressão de TNFR25 sobre os linfócitos ativados. A ativação de esplenócitos foi realizada com anti-CD3 imobilizado (5 µg/ml) e anti-CD28 (1µg/ml) ou LPS (1µg/ml) por 24 horas. As células foram assistidas pelas células CD4 ou CD8 ou células positivas B220 e células negativas 7-AAD (a subscrição a significa células CD4, CD8 ou B ativadas). Nos histogramas, é mostrado o MFI para expressão de

TNFR25 nos esplenócitos em repouso e nos esplenócitos ativados. 1C ilustra a expressão de TNFR25 sobre os timócitos. Os timócitos foram assistidos pelas células CD4/CD8 duplas negativas, duplas positivas ou positivas simples e avaliados quanto à fluorescência anti-TNFR25.

A Figura 2A ilustra as formas de ligação de TNFR25 murino. As formas de ligação foram obtidas através de RT-PCR de mRNA obtido de esplenócitos murinos e linhagens celulares murinas em repouso. CRD: domínio rico em cisteína; TM: domínio transmembrânico; DD: domínio de morte. Asteriscos: códon de parada na estrutura. Nas formas de ligação 1-4 o íntron entre o éxon 2 e 3 não é ligado e contém um códon de parada prematuro. As formas de ligação 1-4 provavelmente são proteínas não funcionais. $\Delta 5$ e $\Delta 6$ murino (correspondendo a $\Delta 5$ e $\Delta 6,7$ humano) são desprovidos de domínio transmembrânico completo, sendo provavelmente formas secretadas que poderiam atuar como receptor chamariz solúvel para TL1A. $\Delta 5,6$ (potencialmente correspondendo a A3 humano) e formas de ligação FL são estudadas como transgenes neste relatório. $\Delta 5,6, 8$ e $\Delta 5, 6, 9$ (sem homólogos humanos) são provavelmente ancorados em membrana, sendo, porém, desprovidos de domínio de morte, podendo ter propriedades de sinalização alteradas ou atuar como formas de ligação negativas dominantes. O DN TNFR25 preferido aqui descrito foi truncado após o domínio TM. 2B ilustra a ligação alternativa de TNFR25 induzida por ativação. O TNFR25 tanto humano como de camundongo são ligados após ativação. A ligação humana é aqui mostrada já que as formas de ligação de TNFR25 são melhor separadas quanto ao tamanho após eletroforese em gel do que as formas murinas. As formas de ligação foram confirmadas por seqüenciamento. PBL foram isolados por centrifugação de gradiente de Ficoll-Hypaque. Cinco milhões de células foram usadas em cada amostra e mRNAs foram extraídos e convertidos em cDNA utilizando o kit de síntese de cDNA Invitrogen. Ativação de PBL através de PHA ($5\mu\text{g/ml}$),

anti-CD3 imobilizado (5 $\mu\text{g/ml}$) e anti-CD28 solúvel (1 $\mu\text{g/ml}$) ou PMA (10 ng/ml) e ionomicina (400 ng/ml) conforme indicado. As células foram coletadas nos pontos de tempo indicados e as análises RT-PCRs conduzidas; β -actina foi usada como controle interno. 2C ilustra que a ligação induzida por ativação é dependente de PKC e independente de síntese de proteína. As células PBL recentemente isoladas foram estimuladas com PMA (10 ng/ml) isoladamente, ou ionomicina (400 ng/ml) isoladamente ou em combinação. PBL foram pré-tratados com H7 (50 μM), ou cicloheximida (10 $\mu\text{g/ml}$) por meia-hora, então PMA e ionomicina foram adicionados à cultura de células. As células foram coletadas após 12 horas para análise de RT-PCR.

A Figura 3 ilustra a expressão e função de transgenes-TNFR25 sob o promotor e intensificador de CD2. 3A ilustra a expressão de TNFR25 em camundongos transgênicos em comparação com camundongos B6 tipo selvagem e controle de isótipo. Células de nódulo linfático inguinal foram assistidas pelas células positivas CD4, CD8, B220, CD11c, ou células positivas NK1.1 e negativas CD3 ou células positivas duplas NK1.1/CD3. É indicado o MFI correspondente. O perfil de expressão para FL TNFR25, $\Delta 5,6$ TNFR25 e DN TNFR25 eram idênticos. 3B ilustra um Western blot de células tumorais transfectadas com TNFR25 alternativamente ligadas. 50 μg de proteína de lisados de P815 transfectados com três formas de ligação de TNFR25 foram carregados e borrados ("blotted") com o anticorpo anti-TNFR25 1OD1. Pista 1: DN TNFR25; pista 2: $\Delta 5,6$ TNFR25; pista 3: FL TNFR25. O anticorpo não detecta $\Delta 5,6$ TNFR25 em western blots. 3C ilustra a celularidade reduzida das células positivas CD4 e CD8 em células de nódulo linfático FL TNFR25-tg e timócitos em comparação com as ninhadas tipo selvagem ($n=5$) * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. 3D ilustra a proliferação de FL induzida por ativação danificada e as células transgênicas $\Delta 5,6$ TNFR25. A proliferação de células CD4 ou CD8 purificadas

foi medida após 3 dias de estímulo através de captação de timidina durante as últimas 6 horas. As células foram ativadas em placas de microtitulação com anti-CD3 imobilizado (2 µg/ml) com ou sem anti-CD28 solúvel (1 µg/ml) ou PMA (10 ng/ml) e ionomicina (400 ng/ml). IL-2 de camundongo recombinante foi usado a 1000 U/ml. 3E ilustra que FL TNFR25 e Δ5,6 TNFR25 ativam NF-κB. A ativação de NF-κB foi medida em células EL4 transfectadas com FL TNFR25 (painel superior) ou com Δ5,6 TNFR25 (painel inferior) em resposta à ativação de TNFR25. As células foram tratadas com o anticorpo 4C12 TNFR25 agonista (5 µg/ml) durante 50 minutos; TL1A solúvel foi provido por 25, 50 ou 75 min conforme indicado, na forma de 25% de sobrenadantes de células EL4 transfectadas com TL1A; o TL1A ligado à membrana (MTL1A) foi provido durante 50 minutos mediante adição de células EL4 transfectadas com TL1A diretamente a TNFR25 expressando EL4. Os controles receberam sobrenadantes de EL4 (não transfectados) durante 50 minutos. Os extratos nucleares foram preparados e analisados através de EMSA; a seta indica NF-κB ativado. 3F ilustra produção de citocina polarizada para Th2 por células T CD4 padrão, FL TNFR25 e Δ5,6 TNFR25-transgênicas. As células T CD4 de baços foram purificadas através de seleção negativa e ativadas com anti-CD3 imobilizado (2 µg/ml) e anti-CD28 solúvel (1 µg/ml) durante 3 dias. Os sobrenadantes foram coletados para ensaios ELISA de citocina. A figura representa três experimentos independentes. n.s.: não significativo; *p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001. 3G ilustra que TNFR25 pode co-estimular a produção de citocina Th1 ou Th2. A produção de citocina de células T CD4 FL TNFR25-tg reestimuladas foi determinada sob condições não-polarizantes (Th neutro), Th1, ou Th2. As células CD4 foram ativadas com anti-CD3 imobilizado (2 µg/ml) e anti-CD28 solúvel (1 µg/ml) isoladamente (Th neutro) ou combinadas com IL-12 (5 ng/ml) e anti-IL-4 (20 µg/ml) para polarização de Th1, ou combinadas com IL-4 (10

ng/ml), anti-IFN- γ (10 μ g/ml) e anti-IL-12 (10 μ g/ml) para polarização de Th2 durante 4 dias. As células foram coletadas, lavadas e replaqueadas sobre anti-CD3 durante 24 horas e os sobrenadantes coletados para análise por ELISA de citocina.

A Figura 4 ilustra que a proliferação diminuída de células transgênicas-TNFR25 não se deve à apoptose, falta de IL-2 ou de expressão do receptor IL-2. 4A ilustra a regulação para cima ("upregulation") normal de IL-2-Ra (CD25) em células CD4 e CD8 transgênicas mediante ativação. Após ativação de 72 horas com anti-CD3 imobilizado e anti-CD28 solúvel, os esplenócitos foram coletados, lavados e corados com anti-CD25-FITC, anti-CD8-PE, e anti-CD4-CY. Células tipo padrão nos painéis superiores, células Δ 5,6 TNFR25-tg nos painéis inferiores. 4D demonstra que as células transgênicas não sofrem apoptose aumentada quando da ativação. As células CD4 foram ativadas com CD3 anti-camundongo imobilizado (2 μ g/ml) com anti-mCD28 solúvel (1 μ g/ml) durante três dias e coradas com Annexin-V-PE e 7-AAD. Células positivas coradas com Anexina-V e negativas coradas com 7-AAD representam as células apoptóticas. 4C ilustra a produção reduzida de IL-2 pelas células T transgênicas Δ 5,6 TNFR25. As células T foram purificadas através de seleção negativa e ativadas com anti-CD3 imobilizado e anti-CD28 solúvel durante 3 dias. Os sobrenadantes foram analisados quanto à produção de IL-2 através de ensaio ELISA; **p=0,0078. 4D ilustra que as células TNFR25-transgênicas dominantes negativas não são polarizadas para Th2 em resposta primária. As células T CD4 do baço foram purificadas através de seleção negativa e ativadas com anti-CD3 imobilizado (2 μ g/ml) e anti-CD28 solúvel (1 μ g/ml) durante 3 dias. Os sobrenadantes foram coletados para os ensaios ELISA de citocina. A figura representa três experimentos independentes. 4E ilustra a mesma resposta anticorpo-isótipo de camundongos transgênicos-DN TNFR25 e do tipo selvagem. Os camundongos foram

imunizados intraperitonealmente com 100 μ g de DNP-KLH em PBS estéril e anticorpos IgG1 e IgG2a DNP-específicos em soro foram avaliados por ELISA três semanas após imunização. Placas contendo 96 cavidades de alta ligação foram revestidas com DNP-BSA a 0,8 μ g/ml para detectar anticorpos anti-DNP específicos. A Figura representa um dos três experimentos independentes.

A figura 5 ilustra que os camundongos transgênicos TNFR25 desenvolvem uma resposta polarizada para Th-2 após desafio in vivo. 5A demonstra que um anticorpo-isótipo é polarizado para Th2 em camundongos TNFR25-tg imunizados. Os camundongos foram imunizados intraperitonealmente com 100 μ g DNP-KLH em PBS estéril sem adjuvante. Anticorpos IgG1 e IgG2a DNP-específicos em soro foram avaliados através de ELISA uma semana após imunização. Placas com 96 cavidades de alta ligação foram revestidas com DNP-BSA a 0,8 μ g/ml para detectar anticorpos anti-DNP específicos. Os dados representam um dos três experimentos independentes. **p<0,01; n.s.: não significativo. 5B ilustra que os sinais TNFR25 regulam a eosinofilia no líquido brônquio-alveolar (BALF). A imunização e o desafio das vias aéreas de camundongos tipo selvagem e Δ 5,6 TNFR25-tg foram realizados conforme descrito nos Exemplos 10-15. As vias aéreas foram lavadas e a contagem diferencial de células obtida de preparações em "cytospins" coradas com Wright-Giemsa. *:p<0,05; n.s.: não significativo. 5C ilustra o aumento na inflamação pulmonar dos camundongos TNFR25-tg. Histologia pulmonar de camundongos sensibilizados i.p. e submetidos a desafio de vias aéreas com ovalbumina. Após lavagem brônquica, os pulmões foram removidos e fixados em formalina neutra tamponada a 10%. Os pulmões foram então embebidos em parafina, cortados a uma espessura de 5 μ m e corados com H&E (painéis esquerdos) ou corante periódico ácido de Schiff (PAS, painéis direitos) para detectar produção de muco. Camundongos B6 tipo selvagem dos dois painéis superiores; camundongos Δ 5,6 TNFR25-tg de painéis

inferiores. 5D ilustra que os sinais TNFR25 controlam os níveis séricos de IgE. Os camundongos foram sangrados no dia 0 e três dias após o desafio por aerossol (dia 15). O soro foi separado e analisado através de ELISA para determinação de IgE ovalbumina-específica através de sanduíche ELISA. Uma vez que não há proteína padrão disponível para IgE OVA-específica, os resultados são apresentados em unidades O.D. A figura representa um dos três experimentos independentes. **:p<0,01. 5E ilustra a produção aumentada de Th2 citocina por células de nódulos linfáticos brônquicos em camundongos TNFR25-tg. Os nódulos linfáticos brônquicos foram coletados um dia após o desafio por aerossol (dia 13) e as células foram reestimuladas in vitro com 100µg/ml ovalbumina durante 4 dias. Os sobrenadantes foram então analisados quanto à produção de citocina através de ELISA. Essa figura é representativa de dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

A Figura 6 ilustra que TNFR25 dominante negativo interfere com a polarização para Th2 e com a inflamação pulmonar. 6A ilustra que o transgene DN TNFR25 bloqueia a co-estimulação de citocina através de TNFR25 endógeno. As células tipo padrão e CD4 DN TNFR25-tg foram estimuladas durante três dias com anti-CD3 ou com o anticorpo 4C12 anti-TNFR25 agonista e anti-CD3 combinado e os sobrenadantes analisados quanto às citocinas através de ELISA. 6B ilustra que DN TNFR25 bloqueia a co-estimulação de proliferação através de TNFR25 endógeno. Nos ensaios de proliferação, as células tipo padrão e CD4 DN TNFR25-tg foram ativadas com anti-CD3, com 4C12 ou com a combinação de anti-CD3 e 4C12 durante 3 dias e a incorporação de timidina medida durante as 8 horas finais. 6C ilustra que as células T CD4 DN TNFR25-tg produzem citocinas Th2 reduzidas na ativação secundária. As células T CD4 tipo padrão e transgênicas foram purificadas por seleção negativa e ativadas com anti-CD3 imobilizado (2µg/ml) e anti-CD28 solúvel (1µg/ml) durante

3 dias. As células foram então coletadas, lavadas, replaqueadas e reestimuladas com anti-CD3 imobilizado (1µg/ml) durante 2 dias. Os sobrenadantes foram coletados para ensaio de citocina por ELISA. n.s.-não
5 significativo.; ***p<0,001. 6D ilustra que as células T CD4 DN TNFR25-tg resistem à polarização para Th2 in vitro. As células tipo padrão e CD4 DN TNFR25-tg foram purificadas e ativadas durante quatro dias com anti-CD3 e anti-CD28 sob condições neutras (ThN) ou polarizadas para
10 Th2 (adicionando-se IL-4 e bloqueando-se IFN-γ com anticorpo). As células foram coletadas, lavadas e replaqueadas em anti-CD3 durante 24h, os sobrenadantes coletados e as citocinas analisadas por ELISA. 6E ilustra a exudação celular reduzida em BALF em camundongos DN
15 TNFR25-tg em comparação com camundongos tipo selvagem. Os camundongos foram preparados e então submetidos à desafio por aerossol com ovalbumina de acordo com o protocolo padrão; n=5; *:p<0,05. 6F ilustra a supressão de inflamação pulmonar em camundongos DN TNFR25 após
20 imunização e desafio das vias aéreas. Painel superior: Ausência de infiltrados perivasculares em camundongos DN TNFR-25-tg após exposição a antígeno por aerossol. Painel inferior: Ausência de muco durante a produção e hiperplasia de células calciformes em camundongos DN
25 TNFR25-tg. A inflamação pulmonar foi induzida como na Fig. 5 através de imunização com ovalbumina e posterior exposição ao aerossol. Os camundongos de controle tipo selvagem apresentaram inflamação típica conforme mostra a Fig. 5. 6G ilustra a supressão de produção de IgE
30 ovalbumina-específica em camundongos DN TNFR25-tg. A IgE ovalbumina-específica no soro foi determinada por ELISA. **p<0,01. 6H ilustra a supressão da produção de citocina Th2, mas não de Th1 através de DN TNFR25 nos nódulos linfáticos brônquicos. Os nódulos linfáticos brônquicos
35 foram coletados um dia após desafio por aerossol e as células reestimuladas com 1001.tg/ml ovalbumina durante 4 dias. Os sobrenadantes foram então analisados quanto à

produção de citocina através de ELISA. Essa figura representa dois experimentos independentes. n.d.: não detectado; n.s.: não significativo; *:p<0,05.

A Figura 7 ilustra que os anticorpos que bloqueiam TL1A debelam a inflamação pulmonar e diminuem a produção de Th2 citocina no pulmão. 7A-D ilustra que o anticorpo L4G6 anti-TL1A é um antagonista funcional de TL1A. a. transfectantes P815 com FL TNFR25, b. com $\Delta 5,6$ TNFR25 e c. com TL1A corado através de citometria de fluxo com os anticorpos apropriados. d. L4G6 bloqueia a citotoxicidade mediada por TL1A de células transfectadas com TNFR25. TL1A solúvel diluído coletado serialmente de sobrenadantes de células transfectadas com P815-TL1A foram misturadas com células alvo P815-TNFR25 marcadas com 51Cr. Anticorpos monoclonais TL1A anti-murinos diferentes foram adicionados ao ensaio e a liberação de 51Cr foi analisada cinco horas mais tarde. 7E ilustra que o anticorpo L4G6 bloqueador de TL1A suprime a produção de muco e a inflamação pulmonar in vivo em camundongos C57B16 tipo selvagem. Esquema: Programa de preparação de ovalbumina, desafio por aerossol, e administração de anticorpo de bloqueio (L4G6) ou anticorpo de controle. A histologia pulmonar após coloração com PAS com IgG de controle (à esquerda) e L4G6-IgC (à direita). Observou-se ausência de produção de muco em animais tratados com L4G6 (as setas apontam para muco em camundongos tratados com IgG de controle). 7F demonstra exudação celular reduzida em BALF em camundongos tratados com L4G6 em comparação com animais tratados com IgG de controle. *:p<0,05; **:p<0,01; n.s. não significativo. 7G ilustra a produção reduzida de Il-5 e Il-13 através de células de nódulo linfático brônquico reestimuladas com ovalbumina após bloqueio de TL1A com L4G6. **p<0,01; ***p<0,001. Detalhes experimentais como na Fig. 5. 7H ilustra a expressão de TL1A após desafio por aerossol numa subpopulação de células CD11c positivas (seta) no pulmão. Os nódulos linfáticos brônquicos foram coletados antes e após o

desafio por aerossol de ovalbumina, e as células CD11c analisadas quanto à expressão de TL1A. Todas as outras células de nódulo linfático brônquico foram TL1A negativas. 7I ilustra falta de expressão de TL1A em linfócitos de células de nódulo linfático brônquico de camundongos imunizados com ovalbumina após desafio das vias aéreas. As suspensões de uma célula foram coradas num sanduíche triplo com anti-TL1A como anticorpo monoclonal primário. As células foram assistidas utilizando o respectivo anticorpo marcado como marcador de população e o histograma de TL1A exibido. Anti-TL1A; controle de isótipo. 7J ilustra que TL1A é expressada em linfócitos T ativados in vitro. Os esplenócitos foram ativados durante 24h com anti-CD3 ligado à placa ou com LPS e então corados com o sanduíche triplo de anti-TL1A como ilustra a Fig. 1 e com o marcador de população conforme indicado. As células B são negativas para TL1A mesmo após ativação com LPS. É mostrada assistência ("gating") no marcador de população e a expressão de TL1A nas células ativadas.

A Figura 8 ilustra que os sinais de TNFR25 são necessários nas células NKT para indução de inflamação pulmonar. Camundongos nocauteados para $J\alpha 18$ desprovidos de NKT (Cui, J. et al. Science 278, 1623-6(1997)) foram preparados com ovalbumina e alum como no protocolo padrão de material e métodos. No dia 11 os camundongos receberam por transferência adotiva i.v. 3,1 milhões de células NKT tipo padrão parcialmente purificadas ou de células NKT DN TNFR25-tg ou PBS conforme indicado. Os camundongos foram aerosolizados no dia 12 com ovalbumina e no dia 14 analisados. Os camundongos tipo selvagem serviram como controles positivos para indução de inflamação pulmonar, camundongos $J\alpha 18$ k.o. foram imunizados e ovalbumina aplicada por aerossol sem transferência celular adotiva como controles negativos. Os dados referem-se a quatro camundongos de cada grupo em dois experimentos independentes. $J\alpha$ são camundongos desprovidos de NKT

(Cui, J. et al. Science 278, 1623-6(1997)).

A Figura 9 ilustra um modelo para ativação de células NKT mediada por TL1A/TNFR25 e de células CD4 polarizadas para Th2 no pulmão. O modelo ilustra a interação potencial entre TL1A e TNFR25 que pode contribuir para a produção de IL-13 e indução de AHR. A evidência da necessidade de produção de IL-13 pelas células NKT já foi relatada anteriormente (Akbari, O. et al. Nat Med 9, 582-8(2003)). A presente comunicação mostra a necessidade de sinais de TNFR25 em células NKT para inflamação pulmonar, de expressão de TL1A por células CD11c+ e a co-estimulação de efetores CD4 Th2 através de TNFR25. Uma vez que os efetores CD4 podem expressar TL1A, é possível que a interação TL1A/TNFR25 entre células CD4 e NKT possam prover a ligação molecular para sua sinergia na asma. Além disso, outras células associadas com pulmão podem expressar TL1A e ajudar a induzir inflamação pulmonar. As Figuras 10a a 10c ilustram os resultados de um experimento no qual os camundongos receberam 1 milhão-OT-I-gfp i.v. Dois dias depois, eles foram imunizados i.p. com a dose indicada de ovalbumina em PBS (curva azul); com EG7-gp96-Ig de 3T3-ova-gp96-Ig - a quantidade de gp96-Ig (em ng) secretada no prazo de 24h pelo número de células injetadas está indicada na abcissa; com 3T3-ova - a quantidade de ovalbumina secretada no prazo de 24 horas pelo número de células injetadas está indicada na abcissa. Após 5 dias a expansão de OT-I foi determinada através de citometria de fluxo na cavidade peritoneal (PEC) e no baço. A frequência de OT-I entre células CD8 foi de até 50% na PEC e até 8% no baço com imunização com 3T3-ova-gp96-Ig.

A Figura 11 ilustra os resultados de um experimento no qual mAb 4C12 anti-TNFR25 atuou agonisticamente e matou as células EL4 transfectadas com TNFR25, mas não EL4 tipo padrão. Em 11B, 50 µg de 4C12 agonista ou L4G6 anti-TL1A antagonista ou IgG de controle foram administrados i.p. 24h e 72h após imunização com EG7-gp96-Ig. 4C12 causou um

aumento de 8-10 vezes na expansão de OT-1 e duplicação de células de exudato peritoneal (n= 4 camundongos por grupo). Anti-TL1A inibe a expansão de CD8.

A Figura 12 ilustra a preparação cruzada ("cross priming") de células CD8 através de proteína gp96 de choque térmico. As células de vacina (alogeneicas ou singeneicas) foram transfectadas com gp96-Ig e ovalbumina, quando então secretaram peptídeos de ovalbumina gp96-Ig chaperonados. Gp96 foi detectado por CD91 e TLR2/4 em DC resultando em sua ativação e absorção de gp96-Ig com seus peptídeos ligados. O DC ativado regulou B7 para cima (independente de CD40-L) e os peptídeos ligados a gp-96 reenviados de forma cruzada via Kb (em camundongos B6). OT-I expressa gfp, as células CD8 TCR transgênicas adotivamente transferidas para camundongos B6 específicas para Kb-ova. Sua expansão podem ser facilmente medida por proteína fluorescente verde.

A Figura 13 ilustra Tregs CD4+CD25+ positivas FoxP3 expressando TNFR25. As células CD4 foram purificadas através de depleção de células B, células CD8 e monócitos e então positivamente selecionadas por classificação magnética para CD25 e então ativadas.

A Figura 14 ilustra a não recuperação de camundongos DN-TNFR25-tg de colite induzida por DSS. 5 camundongos de cada grupo receberam DSS a 2% em água potável durante 8 dias e então retornaram à água normal.

A Figura 15 mostra que os sinais de TNFR25 anulam a inibição de Treg.

A Figura 16 mostra a localização de Gfp-OT-I na mucosa após imunização com gp96-Ig i.p. Os camundongos receberam 1 milhão de gfp-OT-I i.v. através de transferência adotiva. Após 2 dias, os camundongos receberam 4 milhões de EG7-gp96-Ig (à esquerda) ou 4 milhões EG7 (painéis à direita) i.p. como estímulo. Quatro dias depois, a frequência de gfp-OT-I foi analisada em IEL, placas de Peyer e LPL, além da análise usual de células na PEC, no

baço e nos nódulos linfáticos.

As Figuras 17a a 17d mostram as SEQ ID NOs: 1-7 e SEQ ID No:16 e os números de acesso ao banco de dados público selecionado.

5 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

É objeto da invenção prover composições e métodos novos utilizando agentes imunomoduladores que possam estimular ou indiretamente incrementar o sistema imune ou, em outros casos, que tenham um efeito imunossupressor. Os agonistas de TNFR25 aqui descritos representam os modificadores de resposta biológica que alteram a interação entre as defesas imunes celulares do organismo e as células cancerosas para reforçar, direcionar ou restaurar a capacidade do organismo no combate ao câncer quando administrados com vacinas antitumorais. Os agentes tóxicos TNFR25-específicos aqui descritos são capazes de aumentar a eficácia de um regime quimioterápico através da depleção de células imunossupressoras de ocorrência natural num paciente com câncer. Os agonistas de TNFR25 aqui descritos podem também ter um efeito curativo. Podem ser usados, entre outras coisas, para tratar doença causada por inflamação crônica tal como a doença intestinal inflamatória. Os antagonistas de TNFR25 aqui descritos são capazes de inibir as respostas imunes celulares mediadas por célula T CD8 e podem, por exemplo, tratar asma e abrandar a rejeição de órgão ou tecido após um transplante de tecido.

1. Definições

Ao descrever a presente invenção, são empregados os termos a seguir descritos, que devem ser definidos conforme indicado abaixo.

Um "antígeno" inclui qualquer substância que pode ser especificamente ligada por uma molécula de anticorpo. Assim, o termo "antígeno" abrange moléculas biológicas inclusive, porém não limitado a metabólitos intermediários simples, açúcares, lipídios, autoácidos, e hormônios, bem como macromoléculas, tais como

carboidratos complexos, fosfolipídios, ácidos nucleicos e proteínas.

Uma "composição antigênica" pode compreender um antígeno (ex: um peptídio ou polipeptídio), um ácido nucleico
5 codificando um antígeno (ex: um vetor de expressão de antígeno) ou uma célula expressando ou apresentando um antígeno. Vide Pub.USA No.2003/0185840, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Um "imunógeno" é um antígeno macromolecular que é capaz
10 de iniciar a ativação linfocitária resultando numa resposta imune antígeno-específica. Um imunógeno, portanto, inclui qualquer molécula que contenha um ou mais epítomos que estimularão o sistema imune de um hospedeiro para induzir uma resposta antígeno-específica
15 secretória, humoral e/ou celular.

O termo "anticorpo" abrange preparações de anticorpo policlonal e monoclonal. Os anticorpos da invenção podem ser preparados em qualquer mamífero, inclusive camundongos, ratos, coelhos, cabras e humanos. O
20 anticorpo pode ser um membro de uma das seguintes classes de imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE e suas subclasses, e preferivelmente é um anticorpo IgG1.

O termo anticorpo também refere-se a equivalentes funcionais dos anticorpos descritos neste relatório.
25 Equivalentes funcionais possuem características de ligação comparáveis às dos anticorpos, e incluem, por exemplo, anticorpos quiméricos, híbridos, humanizados e de cadeia simples, bem como fragmentos dos mesmos. Métodos para produzir tais equivalentes funcionais são
30 descritos no Pedido PCT WO 93/21319, Pedido de Patente Européia No. 239.400; Pedido PCT WO 89/09622; Pedido de Patente Européia 338.745; e Pedido de Patente Européia EP 332.424. Equivalentes funcionais incluem polipeptídeos com seqüências de aminoácido substancialmente iguais à
35 seqüência de aminoácido das regiões variáveis ou hipervariáveis dos anticorpos da invenção. Seqüência de aminoácido "substancialmente igual" é aqui definida como

uma seqüência com pelo menos 70%, preferivelmente pelo menos cerca de 80%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% de homologia em relação a outra seqüência de aminoácido, conforme determinado pelo método de busca FASTA, de acordo com Pearson and Lipman, Proc. Natl.Acad.Sci. USA 85, 2444-2448 (1998).

Conforme aqui utilizado, o termo "anticorpo monoclonal" refere-se a uma composição de anticorpo que tenha uma população homogênea de anticorpos. O termo não se restringe à espécie ou fonte do anticorpo, e nem pretende ser limitado pela forma como é criado. O termo abrange imunoglobulinas completas.

Métodos para preparar anticorpos policlonais e monoclonais são bastante conhecidos no estado da técnica.

Os anticorpos policlonais são gerados imunizando-se um animal apropriado, tal como um camundongo, rato, coelho, ovelha ou cabra, com um antígeno de interesse. Para aumentar a imunogenicidade, o antígeno pode ser ligado a um portador antes da imunização. Portadores apropriados são tipicamente macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tais como proteínas, polissacarídeos, ácidos poliláticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, agregados lipídicos (tais como gotículas de óleo ou lipossomas) e partículas de vírus inativo. Tais portadores são bem conhecidos no estado da técnica. Além disso, o antígeno pode ser conjugado a um toxóide bacteriano, tal como um toxóide de difteria, tétano, cólera, etc., para aumentar a imunogenicidade do mesmo.

Coelhos, ovelhas e cabras são preferidos na preparação de soros policlonais quando forem desejados grandes volumes de soro. Esses animais são boas escolhas, devido à disponibilidade de anticorpos marcados anti-coelho, anti-ovelha e anti-cabra. A imunização é geralmente realizada misturando-se ou emulsificando-se o antígeno em solução salina, preferivelmente num adjuvante tal como adjuvante completo de Freund ("FCA") e injetando-se a mistura ou

emulsão parenteralmente (geralmente subcutaneamente ou intramuscularmente). O animal é geralmente reforçado 2-6 semanas mais tarde com uma ou mais injeções do antígeno em solução salina, preferivelmente utilizando adjuvante incompleto de Freund ("FIA"). Os anticorpos podem também
5 ser gerados por imunização in vitro, utilizando métodos conhecidos no estado da técnica. Antisoros policlonais são então obtidos do animal imunizado.

Os anticorpos monoclonais são geralmente preparados
10 utilizando o método de Kohler e Milstein, Nature (1975) 256:495-497, ou uma modificação do mesmo, ou Campbell em "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" em Burdon et al., Eds. Laboratory Techniques in Biochemistry
15 and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); bem como através do método de DNA recombinante descrito por Huse et al. em Science 246, 1275-1281 (1989).

Tipicamente, um camundongo ou rato é imunizado conforme
20 descrito acima. Porém, em vez de sangrar o animal para extrair soro, o baço (e opcionalmente diversos nódulos linfáticos grandes) é removido e dissociado em células simples. Se desejado, as células esplênicas podem ser identificadas (após remoção de células não
25 especificamente aderentes) aplicando-se uma suspensão de células a uma placa ou cavidade revestida com o antígeno. Células B, expressando imunoglobulina ligada à membrana específica para o antígeno, ligar-se-ão à placa e não serão removidas com o restante da suspensão quando da
30 lavagem. As células B resultantes, ou todas as células esplênicas dissociadas, são então induzidas a fundirem-se com células de mieloma para formar hibridomas, e são cultivadas num meio seletivo (ex: meio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Os hibridomas resultantes
35 são plaqueadas limitando-se a diluição, e testados quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno imunizador (e que não se ligam a antígenos não

relacionados). Os hibridomas secretores de anticorpo monoclonal selecionado são então cultivados ou in vitro (ex: em frascos para cultura de tecidos ou reatores de fibra oca) ou in vivo (ex: como ascite em camundongos).

5 O "sítio de ligação ao antígeno" ou "porção ligante" refere-se à parte da molécula de imunoglobulina que participa na ligação ao antígeno. O sítio de ligação ao antígeno é formado por resíduos aminoácido das regiões variáveis "V" de terminal N das cadeias pesadas ("H") e
10 leves ("L"). Três trechos altamente divergentes dentro das regiões V das cadeias leve e pesada são designados como "regiões hipervariáveis" que são interpostas entre trechos flanqueadores mais conservados conhecidos como "regiões estruturais" ou "FRs". Assim, o termo "FR"
15 refere-se a seqüências de aminoácido que são naturalmente encontradas entre e adjacentes a regiões hipervariáveis em imunoglobulinas. Numa molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada são dispostas
20 relativamente entre si num espaço tridimensional para formar a superfície de ligação ao antígeno. A superfície de ligação ao antígeno é complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, e as três regiões hipervariáveis das cadeias leve e pesada são designadas
25 "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs". Conforme aqui utilizados, os termos "imuno-específico", "ligação imunológica" e "propriedades de ligação imunológica" referem-se a interações não-covalentes do tipo que ocorre entre uma molécula de imunoglobulina e um
30 antígeno para o qual a imunoglobulina é específica. A força ou afinidade de interações de ligação imunológica pode ser expressada em termos da constante de dissociação (K_d) da interação, sendo que um K_d menor representa maior afinidade. As propriedades de ligação imunológica de
35 polipeptídeos selecionados podem ser quantificadas utilizando métodos conhecidos no estado da técnica. Um desses métodos consiste em medir as taxas de sítio de

ligação ao antígeno/formação e dissociação de complexo antigênico, sendo que tais taxas dependem das concentrações dos pares complexos, da afinidade da interação, e dos parâmetros geométricos que igualmente influenciam a taxa em ambas as direções. Assim, tanto a "constante na taxa" (K_{on}) como a "constante fora da taxa" (K_{off}) podem ser determinadas calculando-se as concentrações e as taxas reais de associação e dissociação. A relação de K_{off}/K_{on} permite o cancelamento de todos os parâmetros não relacionados com a afinidade, sendo assim igual à constante de dissociação K_d . Vide, geralmente, Davies et al.(1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473.

Diversas moléculas terapeuticamente úteis são conhecidas no estado da técnica e compreendem sítios de ligação ao antígeno que são capazes de exibir propriedades de ligação imunológica de uma molécula de anticorpo. A enzima proteolítica papaína preferencialmente cliva moléculas de IgG para produzir diversos fragmentos, dois dos quais (os fragmentos "F(ab)") compreendem cada um um heterodímero covalente que inclui um sítio de ligação a antígeno intacto. A enzima pepsina é capaz de clivar moléculas de IgG para prover diversos fragmentos, inclusive o fragmento "F(ab')₂" que compreende ambos sítios de ligação ao antígeno. Um fragmento "Fv" pode ser produzido através de clivagem proteolítica preferencial de uma IgM, e em raras ocasiões moléculas de imunoglobulina IgG ou IgA. Os fragmentos Fv são, porém, mais comumente derivados utilizando técnicas recombinantes conhecidas no estado da técnica. O fragmento Fv inclui um heterodímero VH::VL não-covalente, inclusive um sítio de ligação a antígeno que retém muito do reconhecimento do antígeno e capacidades de ligação da molécula de anticorpo nativa. Inbar et al.(1972) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69:2659-2662; Hochman et al. (1976) Biochem 15:2706-2710; e Ehrlich et al.(1980) Biochem. 19:4091-4096.

Um polipeptídeo de cadeia simples Fv ("sFv") é um heterodímero VH::VL covalentemente ligado que é expressado a partir de uma fusão de genes incluindo os genes codificadores de VH e VL ligados por um ligante
5 codificador de peptídeo. Huston et al. (1988) Proc.Nat.Acad.Sci. USA 85(16):5879-5883. Diversos métodos foram descritos para discernir as estruturas químicas para converter as cadeias polipeptídicas leves e pesadas naturalmente agregadas mas quimicamente separadas de uma
10 região de anticorpo V numa molécula sFv que irá se moldar numa estrutura tridimensional substancialmente similar à estrutura de um sítio de ligação a antígeno. Vide, por exemplo, as patentes americanas Nos. 5.091.513 e 5.132.405, de Huston et al., e patente americana No.
15 4.946.778 de Ladner et al.

"Antígeno cognato" conforme aqui utilizado refere-se a um antígeno para o qual um receptor de célula T CD8 (TCR) é imuno-específico. Tais antígenos, geralmente derivados por exemplo, de patógeno, tecidos transplantados
20 (aloantígeno) e células tumorais, são reconhecidos pelo sistema imune como "não-próprio" ("non-self"). A ligação do antígeno cognato a seu receptor de célula T CD8 resulta na expansão clonal daquela célula T. Uma população crescente de células T CD8 cognatas está então
25 em posição de montar uma resposta imunológica celular contra a fonte do antígeno cognato agressor.

Os anticorpos da invenção podem também ser usados para preparar "imunotoxinas". A molécula híbrida combina a especificidade de um anticorpo ou antígeno com a
30 toxicidade da toxina. Como tal, as moléculas de imunotoxina possuem uma porção de ligação a antígeno e uma porção de agente tóxico. As imunotoxinas são preferivelmente específicas para uma molécula de superfície celular, por exemplo, TNFR25 e facilitam a
35 liberação de um agente tóxico para uma célula expressando a molécula de superfície celular anteriormente mencionada.

Preferivelmente, os "agentes tóxicos" possuem um efeito citostático e/ou citotóxico sobre a célula à qual são liberados. Agentes tóxicos preferidos são, por exemplo, isótopos radioativos, fluorescentes, quimioluminescentes, enzimas, substratos enzimáticos, cofatores enzimáticos, inibidores enzimáticos, corantes e íons metálicos. Agentes tóxicos incluem, porém não se restringem a Iodo-131, Índio-111, e Tecnécio-99m, Tecnécio-99m, Índio-111, Ítrio-90, doxorubicina (Yang et al.(1988) Proc.Natl.Acad.Sci USA 85:1189-1193), daunorubicina (Diener et al.(1985) Science 231:148-150; Dillman et al.(1988) Cancer Res.48:6097-6102), metotrexato (Uadia et al.(1985) J Natl. Cancer Inst.74:29-35; Deguchi et al.(1986) Cancer Res.46:3751-3755), e clorambucil (Symth et al.(1986) J.Immunol.137:3361-3366). Outros agentes tóxicos incluem ricina, abrina, toxina de difteria e exotoxina de Pseudomonas, ou uma porção enzimaticamente ativa (cadeias A) dos mesmos. Vide, por exemplo, a patente americana No. 4.753.894 de Frankel et al.; Nevelle et al.(1982) Immunol Rev 62:75-91; Ross et al.(1980) European J. Biochem. 104; Vitteta et al. (1982) Immunol Rev 62:158-183; Raso et al.(1982) Cancer Res 42:457-464, e Trowbridge et al.(1981) Nature 294:171-173. São também incluídas as toxinas enzimaticamente ativas e seus fragmentos, tais como modicina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana (PAPI, PAPII E PAP-S), inibidor momordica charantia, curcina, crotina, inibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina e enomicina.

"Agentes tóxicos" podem também ser agentes quimioterápicos. O termo "agente quimioterápico" conforme aqui utilizado geralmente refere-se a compostos administrados para interromper, desacelerar ou reverter a proliferação indesejada de células. Preferivelmente, tais agentes possuem um efeito anti-proliferativo.

Agentes quimioterápicos podem ser anti-metabólitos tais

como 5-FU, por exemplo. A quimioterapia à base de 5-FU compreende administração de 5-FU, seus derivados, isoladamente ou com outros quimioterápicos, tais como leucovorina ou com um inibidor de DPD tal como uracil, 5-etiniluracil, bromoviniluracil, timina, benziloxibenziluracil (BBU) ou 5-cloro-2,4-dihidroxipiridina. Além disso, constatou-se que a co-administração de um derivado de 5'-desoxicitidina da fórmula (I) com 5-FU ou um derivado do mesmo melhora significativamente a liberação de um agente quimioterápico seletivamente para tecidos tumorais em comparação com a combinação de 5-FU ou um derivado do mesmo com um inibidor DPD 5-etiniluracil.

Alternativamente, os agentes genotóxicos são os que formam lesões genômicas persistentes e são preferidos para uso como agentes quimioterápicos no manejo clínico de proliferação celular indesejada. A taxa de reparo celular de danos ao DNA induzidos por genotoxina, bem como a taxa de crescimento celular através do ciclo de divisão celular, afeta o resultado da terapia com genotoxina. Uma classe geral de compostos genotóxicos que são usados para tratar muitos cânceres são os agentes alquilantes de DNA e os agentes intercalantes de DNA. Psoralenos são compostos genotóxicos conhecidos como úteis no tratamento fotoquimioterápico de doenças cutâneas tais como psoríase, vitiligo, infecções fúngicas e linfoma cutâneo de células T. Harrison's Principles of Internal Medicine, Part 2 Cardinal Manifestation of Disease, Ch.60(12th ed 1991). Outra classe geral de compostos genotóxicos, cujos membros podem alquilar ou intercalarem-se no DNA inclui os antibióticos de fontes sintéticas ou naturais. São de especial interesse os antibióticos antineoplásicos, que incluem, porém não se restringem às seguintes classes de compostos representados por: amsacrina; actinomicina A, C, D (alternativamente conhecida como dactinomicina) ou F (alternativamente KS4); azaserina; bleomicina;

carminomicina (carubicina); daunomicina (daunorubicina) ou 14-hidroxi-daunomicina (adriamicina ou doxorubicina); mitomicina A, B ou C; mitoxantrona; plicamicina (mitramicina); e similares. Outra classe geral de agentes genotóxicos que são comumente utilizados e que alquilam o DNA, são os que incluem as haloetilnitrosouréias, especialmente as cloroetilnitrosouréias. Membros representativos desta ampla classe incluem carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina e estreptozotocina. Os primeiros agentes de haloetilnitrosouréia podem ser análogos ou derivados de qualquer um dos compostos representativos anteriormente citados.

Tumores atualmente manejáveis com compostos de coordenação de platina, tais como cisplatina ou oxaliplatina incluem carcinomas testiculares, endometriais, cervicais, gástricos, de células escamosas, adrenocorticais e pulmonares de pequenas células, juntamente com os meduloblastomas e neuroblastomas. Outros agentes terapêuticos citotóxicos anti-câncer incluem, por exemplo, BEP (bleomicina, etoposídeo, cisplatina) para tratamento de câncer testicular, MVAC (metotrexato, vinblastina, doxorubicina, cisplatina) para câncer de bexiga, MVP (mitomicina C, vinblastina, cisplatina) para câncer pulmonar não de pequenas células. Outra classe geral de agentes genotóxicos, cujos membros alquilam o DNA, inclui as mostardas de enxofre e nitrogênio. Esses compostos danificam o DNA principalmente pela formação de adutos covalentes no átomo N7 de guanina. Membros representativos desta ampla classe incluem clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan, mecloroetamina, novembicina, trofosfamida e similares. Oligonucleotídeos ou seus análogos que interagem covalentemente ou não-covalentemente com seqüências específicas no genoma de células selecionadas podem também ser usados como agentes genotóxicos, caso se deseje selecionar um ou mais alvos genômicos predefinidos

como locus de uma lesão genômica.

Outra classe de agentes, cujos membros alquilam o DNA, incluem as etileniminas e metilmelaminas. Essas classes incluem altretamina (hexametilmelamina), trietilenofosforamida (TEPA), trietilenotiofosforamida (TioTEPA) e trietilenomelamina, por exemplo.

Classes adicionais de agentes alquilantes de DNA incluem os sulfonatos de alquila, representados por busulfan; azinidinas, representadas por benzodepa; e outros, representados por exemplo por mitoguazona, mitoxantrona e procarbazina. Cada uma dessas classes inclui análogos e derivados dos respectivos compostos representativos.

Em uma concretização, agentes quimioterápicos são inibidores de receptor tirosina-cinase tais como EGFR e HER-2-neu e são empregados como inibidores seletivos do crescimento de células proliferativas. Por exemplo, erbstatina, um inibidor de receptor tirosina cinase EGF, reduz o crescimento de células de carcinoma humano expressando EGFR. Também se afirma que diversos derivados de estireno possuem propriedades inibidoras de tirosina cinase e encontram utilidade como agentes antitumorais. Dois desses derivados de estireno são os inibidores RTK classe I cuja eficácia foi demonstrada por atenuar o crescimento de carcinoma humano de células escamosas quando injetados em camundongos desnudos. Certos derivados de 4-anilinoquinazolina são úteis como inibidores de receptor tirosina cinase. As relações estrutura-atividade mostradas por esses compostos indicam um modo de ligação claramente definido, onde o anel de quinazolina liga-se na bolsa de adenina e o anel anilino liga-se na bolsa lipofílica específica. Três análogos de 4-anilinoquinazolina (dois inibidores reversíveis e um irreversível) foram avaliados clinicamente como fármacos anticâncer. Adicionalmente, o anticorpo monoclonal trastazumab (HerceptinTM) para o tratamento de cânceres de mama metastáticos superexpressando HER2-neu. Scheurle, et al., Anticancer Res 20:2091-1096, 2000.

Um "vetor de expressão" é qualquer elemento genético, como por exemplo, um plasmídeo, cromossomo, vírus, comportando-se como uma unidade autônoma de replicação de polinucleotídeo dentro de uma célula (ou seja, capaz de replicação sob seu próprio controle) ou tornado capaz de replicação mediante inserção num cromossomo de célula hospedeira, tendo a ele ligado outro segmento de polinucleotídeo, de forma a realizar a replicação e/ou expressão do segmento ligado. Vetores apropriados incluem, porém não se restringem a vírus, plasmídeos e cosmídeos.

Vetores de expressão contém um "cassete de expressão" que inclui uma seqüência de polinucleotídeo a ser transcrita operavelmente ligada às seqüências de polinucleotídeo necessárias para efetuar a ligação ou inserção do vetor numa célula hospedeira desejada e para efetuar a transcrição do polinucleotídeo a ser expressado. Tais seqüências incluem seqüências promotoras para efetuar a transcrição, seqüências intensificadoras para aumentar a transcrição, seqüências de sítio de ligação ribossômico, e seqüências de terminação de transcrição e translação. Alternativamente, os vetores de expressão podem ser capazes de expressar diretamente os produtos da seqüência de ácido nucleico ali codificados sem ligação ou integração do vetor nas seqüências de DNA de célula hospedeira.

O termo "operavelmente ligado" refere-se à ligação de um segmento de DNA a outro segmento de DNA de forma a permitir que os segmentos funcionem nas formas pretendidas. Uma seqüência de DNA codificando um produto gênico é operavelmente ligada à seqüência reguladora quando está ligada à seqüência reguladora, tal como por exemplo promotores, intensificadores, e/ou silenciadores, de forma a permitir a modulação de transcrição da seqüência de DNA, seja direta ou indiretamente. Por exemplo, uma seqüência de DNA é operavelmente ligada a um promotor quando está ligada ao promotor a jusante em

relação ao sítio de iniciação de transcrição do promotor, na região de leitura correta em relação ao sítio de iniciação de transcrição e permite o alongamento da transcrição para proceder através da seqüência de DNA. Um intensificador ou silenciador é operavelmente ligado à seqüência de DNA codificando um produto gênico quando está ligado à seqüência reguladora de forma a aumentar ou reduzir, respectivamente, a transcrição da seqüência de DNA. Intensificadores ou silenciadores podem estar localizados a montante, a jusante ou embutidos nas regiões codificadoras da seqüência de DNA. Um DNA para uma seqüência sinal é operavelmente ligado ao DNA codificando um polipeptídeo se a seqüência sinal for expressada como uma pré-proteína que participa na secreção do polipeptídeo. A ligação de seqüências de DNA a seqüências reguladoras é tipicamente realizada através de ligação em sítios de restrição apropriados ou através de adaptadores ou ligantes inseridos na seqüência utilizando endonucleases de restrição conhecidas no estado da técnica.

"Molécula pequena" conforme aqui utilizado, refere-se a compostos sintéticos de peso molecular, criados para interagir com uma proteína específica conhecida por estar envolvida numa dada condição patológica. Bancos de tais compostos podem ser prontamente sintetizados através de química combinatorial, por exemplo, e identificados quanto à atividade de agonista/antagonista de TNFR25 utilizando técnicas convencionais.

Os termos "TNFR-SF5", "TNFR25" ou "DR3" são todos utilizados na presente invenção, de forma alternativa, para um membro da família de receptor TNF cuja função biológica completa não era anteriormente conhecida. Vide patente americana No. 6.713.061 e Borysenko, et al. Biochem. Biophys Res Commun.2005, Mar 18; 328(3);794-9; Sheikh et al., Curr.Cancer Drug Targets.2004 Feb; 4(1):97-104, que são aqui incorporados por referência em sua totalidade. Porém, os inventores fizeram diversas

descobertas importantes. A sequência cDNA codificando TNFR25 de camundongos é mostrada na SEQ ID NO:1. O cDNA codificando TNFR25 humano é mostrado na SEQ ID NO:2.

Ao contrário de qualquer outro membro da família TNF-R, a
5 expressão de DR3 demonstrou ser controlada por anelamento
alternativo de mRNA. As células T em repouso expressaram
pouca ou nenhuma proteína de DR3, mas continham altos
níveis de mRNA de DR3 aleatoriamente anelado. Mediante
ativação da célula T através do receptor de célula T, a
10 proteína cinase C (PKC) é ativada. A ativação de PKC, por
sua vez, media a ligação correta de DR3 de extensão
completa e a expressão superficial da proteína. Essa
regulação específica de expressão de DR3 permite a rápida
expressão de proteína de DR3 nas células T e a regulação
15 ambiental de expressão de DR3 por influência dos níveis
PKC responsáveis pela ligação e expressão de DR3.

O DR3 está também envolvido na co-estimulação de
polarização de célula T e na estimulação da produção de
IL-13 e IL-10 em células polarizadas para Th2. Essa é uma
20 importante observação, pois, entre outras coisas, a
produção de IL-10 desempenha um papel crítico na
supressão de doença intestinal inflamatória.

A expressão transgênica de TNFR25 em células T media a
polarização para Th2 de citocina e a produção de
25 anticorpos mediante ativação de célula T e exposição ao
antígeno. Além disso, o TNFR25 transgênico inibe
parcialmente a proliferação de células CD4 e CD8 ativada
por TCR e reduz o número total de células T em órgãos
linfóides sem induzir a apoptose. As células CD8 foram
30 mais afetadas pelo TNFR25 do que as células CD4. Como
tal, os sinais de TNFR25 são importantes nas respostas do
efetor a patógenos ao delinear a polarização subsequente
para TH2 ou para uma resposta mista de TH1/TH2.

Os camundongos transgênicos TNFR25 são altamente
35 suscetíveis à inflamação das vias aéreas induzidas por
antígeno num modelo de asma em camundongos e produziram
quantidades aumentadas de IL-13 e eosinófilos no pulmão

quando da exposição ao antígeno por inalação. Os camundongos transgênicos expressando uma forma negativa dominante de TNFR25 mostraram resistência aumentada à hiperreatividade das vias aéreas quando comparados com
5 camundongos do tipo selvagem.

"TL1A" é aqui designado como um fator do tipo TNF que atua como um coestimulador de secreção IFN-gama através da ligação ao receptor contendo o domínio de morte, DR3. Também se supõe que o TL1A, tal como o TNF, circule como
10 uma forma homotrimérica solúvel. Como tal "TL1A solúvel", conforme aqui utilizado, refere-se a TL1A homotrimérico. O termo não se restringe a qualquer forma específica de espécies. Porém, a sequência de cDNA para o monômero de TL1A humano é provida como SEQ ID NO:7, e a do camundongo
15 como SEQ ID NO:3.

Foi sugerido que o TL1A desempenha um papel na doença intestinal inflamatória (IBD) funcionando como uma citocina polarizadora para Th1. Demonstrou-se que a quantidade de proteína de TL1A e o número de células
20 TL1A-positivas correlacionam-se com a severidade da inflamação, de forma mais significativa na Doença de Chrohn (CD). Também foi demonstrado que a adição de TL1A humano recombinante a culturas de células mononucleares de lâmina própria estimuladas com PHA de pacientes com
25 doença de Crohn aumentaram significativamente a produção de IFN-gama em 4 vezes, enquanto um efeito mínimo foi observado nos pacientes de controle. Adicionalmente, um anticorpo bloqueador anti-TL1A foi capaz de melhorar a asma em camundongos tipo selvagem, indicando que o TNFR25
30 e TL1A estão envolvidos na patogênese da asma.

Os receptores do corpo humano funcionam ao serem estimulados ou inibidos por agonistas naturais (tais como hormônios, citocinas e neurotransmissores) ou sintéticos (tais como fármacos, como por exemplo, anticorpos ou
35 pequenas moléculas).

O agonista TNFR25 é aqui designado como uma substância que se liga ao receptor TNFR25 e que induz uma resposta

na célula na qual o receptor TNFR25 é expressado de forma similar à resposta que seria observada expondo-se a célula a um ligante TNFR25 natural, como por exemplo, TL1A. Um agonista é o oposto de um antagonista, pois
5 embora um antagonista possa também ligar-se ao receptor, ele não ativa o receptor, bloqueando-o completa ou parcialmente da ativação por agonistas endógenos ou exógenos. Um agonista parcial ativa um receptor, porém não causa uma alteração fisiológica como o faz um
10 agonista completo.

TL1A solúvel pode ser administrado na forma terapêutica a um paciente para aumentar a ativação do receptor TNFR25 numa dada população celular como um agonista de TNFR25. Alternativamente, outro exemplo de um agonista de TNFR25
15 é um anticorpo capaz de ligar-se a e ativar TNFR25. Por exemplo, o anticorpo monoclonal 4C12 liga-se a e ativa a sinalização de TNFR25. Em outra concretização e no contexto da presente invenção, um agonista de TNFR25 pode ser derivado de um vetor de expressão com um cassete de
20 expressão capaz de ectopicamente ativar a expressão transgênica de um anticorpo de agonista de TNFR25 e/ou proteína de TL1A num local selecionado ou num momento selecionado. Em outra concretização ainda, um agonista de TNFR25 que leva a um aumento na sinalização de TNFR25 num
25 tecido é provido por um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica do próprio TNFR25. Isso seria útil numa situação em que se deseja sinalização aumentada de TNFR25 num tecido no qual exista um excesso de agonista(s) de TNFR25 exógenos ou
30 endógenos em relação ao receptor.

"Antagonista de TNFR25" é aqui designado como uma substância que inibe a função fisiológica normal de um receptor TNFR25. Tais agentes funcionam interferindo na ligação de agonistas/ligantes de receptor endógenos tais
35 como TL1A, com o receptor TNFR25. Um exemplo de antagonista TNFR25 é um receptor TNFR25 negativo dominante. Preferivelmente, o antagonista de TNFR25 aqui

utilizado é um anticorpo específico para TL1A que interfere com a capacidade de TL1A ativar o receptor TNFR25. O mais preferivelmente, esse anticorpo é o anticorpo monoclonal L4G6. Em outra concretização, o

5 antagonista de TNFR25 é uma proteína de fusão da porção extracelular de TNFR25 ou uma forma de ligação alternativa de TNFR25 com a porção Fc de imunoglobulina ou de qualquer outro par de fusão apropriado. Em outra concretização, o antagonista de TNFR25 é uma forma

10 solúvel de TNFR25 preparada através do truncamento acima do domínio de ligação transmembrânico, seja como uma forma de ligação alternativa ou como um construto artificial. Em outra concretização, o antagonista de TNFR25 é um anticorpo que liga-se especificamente a

15 TNFR25 e que interfere com sua ligação ao seu ligante(s) natural(ais). Em outra concretização, o antagonista de TNFR25 pode ser um vetor de expressão com uma cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um mRNA, RNai não-orientados ou ribozima que é capaz de

20 nocautear a transcrição e/ou translação de TNFR25 e/ou TL1A mRNA endógeno num dado local ou num dado momento. Em outra concretização ainda, pode-se reduzir a sinalização de TNFR25 num tecido provendo-se um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão

25 transgênica de um TNFR25 dominante negativo. Os antagonistas ou agonistas de TNFR25 podem estar na forma de aptâmeros. "Aptâmeros" são moléculas de DNA ou RNA que foram selecionadas de grupos aleatórios baseados em sua capacidade de ligar-se a outras moléculas. Numa

30 concretização, os aptâmeros ligam-se especificamente a TNFR25 para bloquear a ligação de seu ligante natural, como por exemplo, TL1A, ou que ligam-se ao próprio TL1A e o impede de ligar-se a TNFR25. Em outra concretização, os aptâmeros ligam-se especificamente ao receptor TNFR25,

35 ativando-o. "Negativo dominante" ou "DN" conforme aqui utilizado, refere-se a uma variante estrutural de TNFR25

exogenamente provida que atua para bloquear TNFR25 endógeno. Por exemplo, um excesso molar de um DN competirá com o TNFR25 endógeno para ligação do ligante de TNFR25, como por exemplo, TL1A. Preferivelmente, o DN
5 é igual ao TNFR25 do tipo padrão, exceto que nele está ausente o domínio intracelular. Alternativamente, o DN é igual ao TNFR25 do tipo padrão, exceto que nele estão ausentes os domínios transmembrânico e intracelular. A sequência de codificação para o DN TNFR25 de camundongo é
10 provida na SEQ ID NO:4. A sequência de codificação para o DN TNFR25 humano é provida na SEQ ID NO:5. A sequência de codificação para o DN TNFR25 humano contendo apenas o domínio extracelular é provida na SEQ ID NO: 6.

A invenção também envolve as seqüências de codificação
15 que são substancialmente idênticas às SEQ ID NOs: 3-7. O habilitado na técnica apreciará que as seqüências de oligonucleotídeo substancialmente idênticas às SEQ ID NOs: 3-7 podem diferir das SEQ ID NOs: 3-7, respectivamente, com respeito à identidade de pelo menos
20 uma base de nucleotídeo. Porém, todos as seqüências de oligonucleotídeos substancialmente idênticas às SEQ ID NOs: 3-7 hibridizarão sob condições estringentes (conforme aqui definido) com todos ou com uma porção dos complementos de SEQ ID NOs: 3-6 (i.e. seqüências-alvo),
25 respectivamente. Os termos "hibridizar especificamente" ou "especificamente hibridizar" refere-se à hibridização complementar entre um oligonucleotídeo (ex: um preparador ("primer") ou sonda marcada) e uma seqüência alvo. O termo abrange especificamente pareamentos incompatíveis
30 secundários que podem ser acomodados reduzindo-se a estringência dos meios de hibridização para obter a preparação ("priming") desejada para as PCR polimerases ou detecção de sinal de hibridização.

Sob condições estringentes de hibridização, somente as
35 seqüências de aminoácido altamente complementares, ou seja, substancialmente idênticas, hibridizam. Preferivelmente, tais condições impedem a hibridização de

ácidos nucleicos tendo 3 ou mais pareamentos incompatíveis ("mismatches") de 20 nucleotídeos contíguos, mais preferivelmente, 2 ou mais pareamentos incompatíveis de 20 nucleotídeos contíguos, o mais preferivelmente um ou mais pareamentos incompatíveis de 20 nucleotídeos contíguos. A porção hibridizante do ácido nucleico hibridizador é de cerca de pelo menos 90%, preferivelmente cerca de pelo menos 95%, ou o mais preferivelmente cerca de pelo menos 98% idêntica à seqüência de uma seqüência alvo, ou seu complemento.

A hibridização de um ácido nucleico com uma amostra de ácido nucleico sob condições estringentes é definida abaixo. O dúplex ou a estabilidade híbrida de ácido nucleico é expressado(a) como uma temperatura de fusão (T_m) que é a temperatura na qual a sonda se dissocia do DNA alvo. Essa temperatura de fusão é usada para definir as condições de estringência necessárias. Se as seqüências a serem identificadas forem substancialmente idênticas à sonda, em vez de idênticas, será útil então primeiramente estabelecer a temperatura mais baixa na qual apenas a hibridização homóloga ocorre com uma concentração específica de sal (ex: SSC ou SSPE). Então, supondo que 1% de pareamento incompatível resulte numa redução de 1° C na T_m , a temperatura de lavagem final na reação de hibridização é consequentemente reduzida (por exemplo, caso se procure obter seqüências que possuam > 95% identidade com a sonda, a temperatura de lavagem final é reduzida em 5°C). Na prática, a alteração da T_m pode ser entre 0,5°C e 1,5°C, por 1% pareamento incompatível.

As condições estringentes envolvem hibridização a 68°C em solução 5xSSC/5x Denhart/1,0% SDS, e lavagem em 0,2xSSC/0,1% SDS à temperatura ambiente. Condições moderadamente estringentes incluem lavagem em 3xSSC a 42°C. Os parâmetros de concentração salina e de temperatura podem ser alterados para se obter nível ótimo de identidade entre o preparador ("primer") e o ácido

nucleico alvo. A orientação adicional relacionada com tais condições está disponível no estado da técnica, por exemplo em Sambrook, Fischer and Maniatis, Molecular Cloning, um manual laboratorial, (2a.edição), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) e F.M.Ausubel et al. eds. Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons (1994).

"Imunossupressores" conforme o termo aqui utilizado, refere-se a fármacos importantes, necessários para o tratamento de doenças inflamatórias e na facilitação de transplantes de órgãos. Por exemplo, a ciclosporina A (CsA) possui atividade imunossupressora considerável. Ela revolucionou o transplante de órgãos e é comumente utilizada no tratamento de doenças autoimunes. Para uma revisão recente do uso de CsA e de seus mecanismos de ação, vide Wenger et al; Cyclosporine Chemistry, Structure-activity relationships and Mode of Action, Progress in Clinical Biochemistry and Medicine, Vol.2, 176 (1986). Porém, a CsA é uma medicação potente que pode apresentar efeitos colaterais severos, tais como insuficiência renal, supressão de medula óssea, e infertilidade.

Os corticosteróides são também utilizados em condições inflamatórias por seus efeitos antiinflamatórios. Possuem um rápido início de ação, e afetam profundamente muitas partes do sistema imune, bem como a maioria de outros sistemas corporais. Os corticosteróides são fundamentais no tratamento da maioria dos tipos de vasculite e freqüentemente usados em combinação com outros medicamentos imunossupressores. Porém, o uso a longo prazo de corticosteróide pode também apresentar diversos efeitos colaterais incluindo hipertensão, ganho de peso, acne e inchaço no rosto. Outros imunossupressores incluem a azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, mercaptopurina, tacrolimus e micofenolato mofetil.

Geralmente, os agonistas e os antagonistas podem ser administrados a um paciente em quaisquer composições que

possam ser deglutidas, injetadas, inaladas ou através de supositórios. Alternativamente, as composições podem ser formuladas na forma de colírios ou soluções otológicas.

O termo "asma" conforme aqui utilizado, inclui qualquer
5 condição asmática causada por ataques recorrentes de dispnéia paroxismal (ou seja, doença obstrutiva reversível das vias aéreas) com chiado devido à contração espasmódica dos brônquios (denominado broncoespasmo). As condições asmáticas que podem ser tratadas ou até mesmo
10 prevenidas de acordo com a presente invenção incluem asma alérgica e alergia brônquica caracterizada por manifestações em pessoas sensíveis provocadas por uma variedade de fatores, inclusive exercício, especialmente exercício vigoroso ("broncoespasmo induzido por
15 exercício"), partículas irritantes (pólen, pó, algodão, pelo de gato) bem como asma de discreta a moderada, asma crônica, asma crônica severa, asma severa e instável, asma noturna, e estresse psicológico. Os métodos da presente invenção podem ser especialmente úteis na
20 prevenção de manifestação de asma em mamíferos, como por exemplo, humanos acometidos de doença obstrutiva reversível das vias aéreas inferiores e pulmões, bem como o broncoespasmo induzido por exercícios. Nos métodos aqui descritos para tratar asma, o método preferido para
25 liberar os antagonistas da invenção é através de inalação.

Existem vários tipos diferentes de dispositivos que utilizam mecanismos e metodologias geralmente diferentes para produzir aerossóis para inalação. O dispositivo mais
30 comumente utilizado é um inalador dosimetrado (MDI que compreende um recipiente de formulação farmacológica, com a formulação incluindo um propelente com baixo ponto de ebulição. A formulação é mantida no recipiente sob pressão e uma dose medida de formulação é liberada na
35 forma de aerossol quando a válvula do recipiente é aberta. O propelente com baixo ponto de ebulição evapora rapidamente ou "salpica" quando a formulação é exposta à

pressão atmosférica fora do recipiente. As partículas da
formulação contendo o fármaco sem o propelente são
inaladas pelos pulmões do paciente e em seguida migram
para o sistema circulatório do mesmo. Há diversos tipos
5 diferentes de dispositivos MDI. Os dispositivos deste
tipo são descritos na patente americana No. 5.404.871
emitida em 11 de abril de 1995 e na patente americana No.
5.364.838 emitida em 15 de novembro de 1994.

Outro tipo de dispositivo é o dispositivo inalador de pó
10 seco (DPI). Conforme o nome indica, tais dispositivos
utilizam formulações de pó seco em que o pó é soprado
numa nuvem aerossolizada através de dispersão de gás. Os
dispositivos DPI típicos são mostrados na patente
americana No.5.775.320 emitida em 07 de julho de 1998 e
15 patente americana No. 5.740.794 emitida em 21 de abril de
1998.

Outro tipo de dispositivo de liberação em aerossol força
a formulação através de uma membrana porosa. A formulação
que se movimenta através dos poros, rompe-se formando
20 pequenas partículas que são inaladas pelo paciente.
Dispositivos desse tipo são mostrados na patente
americana No. 5.554.646 emitida em 13 de agosto de 1996 e
patente americana No. 5.522.385 emitida em 04 de junho de
1996.

25 Com respeito às composições inaláveis, os materiais
portadores apropriados podem estar na forma de um pó
amorfo, um pó cristalino ou uma combinação de pós amorfos
e cristalinos. Materiais apropriados incluem
carboidratos, como por exemplo, os monossacarídeos, tais
30 como frutose, galactose, glicose, D-manose, sorbose e
similares; dissacarídeos, tais como lactose, trehalose,
celobiose, e similares; ciclodextrinas, tais como 2-
hidroxipropil-beta-ciclodextrina; e polissacarídeos tais
como rafinose, maltodextrinas, dextranos e similares; (b)
35 aminoácidos, tais como glicina, arginina, ácido
aspártico, ácido glutâmico, cisteína, lisina, e
similares; (c) sais orgânicos preparados de ácidos e

bases orgânicas, tais como citrato de sódio, ascorbato de sódio, gluconato de magnésio, gluconato de sódio; cloridrato de trometamina, e similares; (d) peptídeos e proteínas, tais como aspartame, albumina de soro humano, gelatina, e similares; (e) alditóis, tais como manitol, xilitol e similares. Um grupo preferido de portadores incluem lactose, trehalose, rafinose, maltodextrinas, glicina, citrato de sódio, cloridrato de trometamina, albumina de soro humano e manitol.

10 Tais materiais portadores podem ser combinados com os agonistas e antagonistas da invenção, antes da secagem por pulverização, ou seja, adicionando-se o material portador à solução tampão preparada para secagem por pulverização. Assim, o material portador será formado

15 simultaneamente com e como parte das partículas de agonista e antagonista da invenção. Tipicamente, quando o portador é formado através de secagem por pulverização com os agonistas ou antagonistas da invenção, os agonistas ou antagonistas da invenção estarão presentes

20 em cada partícula individual a uma porcentagem em peso na faixa de 5% a 95%, preferivelmente de 20% a 80%. O restante da partícula será principalmente material portador (tipicamente de 5% a 95%, geralmente de 20% a 80% em peso) mas também incluirá tampão(ões), podendo

25 incluir outros componentes conforme acima descrito. A presença de material portador nas partículas que são liberadas para a região alveolar do pulmão (ou seja, aquelas que estão na faixa de tamanho exigida abaixo de 10 μm) demonstrou não interferir de forma significativa

30 com a absorção sistêmica de agonistas ou antagonistas da invenção.

Alternativamente, os portadores podem ser preparados separadamente na forma de um pó seco e combinados com os agonistas ou antagonistas em pó seco da invenção através

35 de mistura. Os portadores em pó preparados separadamente geralmente são cristalinos (para evitar absorção de água) podendo, em alguns casos, ser amorfos ou misturas de

cristalino e amorfo. O tamanho das partículas do portador pode ser selecionado para melhorar a escoabilidade do pó dos agonistas ou antagonistas, tipicamente na faixa de 25 μm a 100 μm . As partículas de portador nesta faixa de tamanho geralmente não penetrarão na região alveolar do pulmão, e com freqüência se separarão dos agonistas ou antagonistas da invenção no dispositivo de liberação antes da inalação. Assim, as partículas que penetram na região alveolar do pulmão consistirão essencialmente de agonistas ou antagonistas da invenção e de tampão. Um material portador preferido é o manitol cristalino com um tamanho na faixa acima citada.

As composições em pó seco da presente invenção são preferivelmente aerosolizadas através de dispersão numa corrente de ar circulante ou outra corrente de gás fisiologicamente aceitável de forma convencional. Um sistema apropriado para tal dispersão é descrito no pedido copendente No.série 07/910.048, publicado como WO 93/00951, cujas descrições completas são aqui incorporadas por referência.

Soluções injetáveis estéreis são preparadas incorporando-se as composições e formulações da invenção na quantidade requerida no solvente apropriado, tal como solução salina tamponada com fosfato sódico, seguido de esterilização em filtro. Conforme aqui utilizado, o termo "portador fisiologicamente aceitável" inclui todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, agentes antibacterianos e antifúngicos que sejam atóxicos para seres humanos, e similares. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é bastante conhecido no estado da técnica. Os meios ou agente devem ser compatíveis com a manutenção de conformação apropriada das cadeias de proteína da invenção, e seu uso nas composições terapêuticas. Ingredientes ativos complementares podem também ser incorporados às composições. Uma descrição de portadores e diluentes farmacologicamente aceitáveis representativos, bem como de formulações farmacêuticas,

pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto padrão nesse campo e em USP/NF.

A dosagem e modo de administração das composições reivindicadas devem ser ajustados de acordo com a
5 identidade, formulação, via de administração e outras características relevantes pertinentes ou prontamente discerníveis no estado da técnica.

2. Agonistas de TNFR25 como Potenciadores Diretos de Polarização de Célula T e Inflamação Pulmonar

10 TNFR25 e seu ligante TL1A foram descobertos como potenciadores diretos de polarização de célula T e inflamação pulmonar. O importante papel de TL1A e TNFR25 na doença pulmonar é reforçado pela inflamação pulmonar exagerada observada em camundongos transgênicos-TNFR25
15 agonista. A superexpressão de TNFR25 resulta numa forte polarização para Th2 de células CD4 mediante ativação. A polarização, por sua vez, é provavelmente responsável pela inflamação pulmonar aumentada no modelo de ovalbumina.

20 Os inventores observaram que num modelo murino de asma, o bloqueio da sinalização de TNFR25 resulta em produção reduzida de Th2 citocina o que inibe a inflamação pulmonar. O TNFR25 sobre as células CD4 ativa a secreção de IL-13 tanto nas células polarizadas para Th1 como para
25 Th2, sendo necessários os sinais de TNFR25 nas células NKT que iniciam e promovem a inflamação pulmonar. A produção crônica de IL-13, ativada por TNFR25, também é responsável pelas seqüelas da inflamação pulmonar crônica, inclusive, porém não restrito a asma crônica,
30 remodelamento de vias aéreas e fibrose. O bloqueio da sinalização de TNFR25 nas células NKT através de um mutante de TNFR25 negativo dominante em experimentos de transferência adotiva debela a inflamação pulmonar. O bloqueio de sinais TNFR25 tal como este seria útil no
35 tratamento de asma aguda e crônica e outros distúrbios pulmonares.

Na cadeia de eventos que levam à inflamação pulmonar, a

produção de IL-13 por células NKT é uma etapa inicial (Akbari, O. et al, Nat Med 9, 582-8(2003)). O papel crítico das células NKT na asma é reforçado pelo presente estudo, já que os experimentos de transferência adotiva
5 indicaram que uma das principais chaves moleculares utilizadas pelas células NKT para induzir inflamação pulmonar é o TNFR25. O TNFR25 possui a capacidade adicional para modular respostas efetoras incipientes através de células de memória CD4 antígeno-específicas
10 através de ligação de TNFR25 mediada por PKC em células ativadas por TCR. O TNFR25 atua, desta forma, na fase bem precoce de iniciação da resposta de memória no pulmão. Portanto, o bloqueio de sinalização de TNFR25 por anti-TL1A ou por outros procedimentos interrompe a cascata de
15 eventos que levam à inflamação aguda do pulmão, supostamente responsável pelos ataques de asma.

O bloqueio de TNFR25 foi obtido em camundongos do tipo selvagem geneticamente, bem como através de bloqueio de anticorpo com os dois métodos independentes, dando
20 resultados similares. A interferência com sinais TNFR25 in vivo resultou na produção reduzida de IL-13, IL-5 e IL-4 através de nódulos linfáticos brônquicos drenantes reestimulados com antígeno e na supressão da inflamação pulmonar. Essencialmente, o bloqueio do anticorpo anti-
25 TL1A durante a fase de desafio por antígeno de vias aéreas de camundongos preparados e polarizados para Th2 mostrou-se eficaz ao inibir a inflamação pulmonar, indicando o papel direto de TNFR25 na fase efetora no pulmão.

30 3. Expressão Constitutiva de TNFR25 em Células NKT e expressão induzível em células T ativadas

Para estudar as funções biológicas de TNFR25 e de seu ligante cognato TL1A, anticorpos monoclonais anti-camundongo de hamster foram gerados através de protocolos
35 padrão. Para detectar de forma confiável o baixo nível de expressão de TNFR25 através de citometria de fluxo em células primárias, foi necessário desenvolver um ensaio

sanduíche de tripla camada. Sem ativação TNFR25 foi detectado a baixos níveis em células T CD4 virgens e a níveis ainda mais baixos também em células T CD8, porém não em células B (Fig.1a). Além disso, uma subpopulação de células CD11c+ expressaram TNFR25. As células NKT expressaram constitutivamente níveis relativamente altos de TNFR25, ao passo que apenas uma pequena fração de células NK11+ CD3 negativas mostraram expressão de TNFR25 (Fig. 1a). No timo, células CD4 e CD8 simples positivas expressaram TNFR25 de forma similar à das células T periféricas. Timócitos CD4, CD8 duplos positivos e duplos negativos não expressaram TNFR25 (Fig.1c).

Quando da ativação de células T periféricas com anti-CD3 e anti-CD28, a expressão de TNFR25 foi regulada para cima tanto nas células CD4+ como nas células CD8+ (Fig. 1b). A ativação de LPS de células B, por outro lado, não resultou na expressão de TNFR25. mRNA TNFR25 murino é constitutivamente expressado em células T, mas aleatoriamente ligado de forma similar ao TNFR25 humano (Screaton, G.R. et al. Proc Natl. Acad Sci USA 94, 4615-9. (1997)) (Fig. 2). A expressão protéica aumentada de TNFR25 nas células T ativadas estava associada com a ligação induzida por ativação de TNFR25 de extensão completa de mRNA TNFR25 aleatoriamente ligado. A ligação induzida por ativação de TNFR25 em células T foi bloqueada pelo inibidor químico H7, indicando um papel para PKC na ligação (Fig. 2).

A expressão preferencial de TNFR25 nas células NKT e T ativadas e sua ligação induzida por ativação de TNFR25 de extensão completa e o rápido aumento na expressão de superfície levantou a questão da função biológica de TNFR25 no sistema imune. A ablação do gene de TNFR25 em camundongos não revelou um fenótipo definitivo para a deficiência de TNFR25, exceto por um discreto defeito na seleção negativa no timo. Assim, foram analisados os efeitos biológicos de transgenes-TNFR25 expressados em célula T ativados pelo promotor e intensificador de CD2.

O TNFR25 de extensão completa (FL TNFR25, na Fig. 2) e um produto de ligação alternativa de TNFR25 desprovido dos éxons 5 e 6 ($\Delta 5,6$ TNFR25, Fig. 2) foram utilizados na expressão transgênica. $\Delta 5,6$ TNFR25 é desprovido na parte
5 codificadora dos éxons 5 e 6 do quarto domínio extracelular rico em cisteína. Porém, ele está ancorado na membrana e possui um domínio de sinalização intracelular completo como o FL TNFR25 e liga-se a TL1A e a um anticorpo anti-TNFR25 agonista (4C12). Além disso,
10 um mutante negativo dominante, DN TNFR25, truncado imediatamente após o domínio transmembrânico, foi expressado como transgene e será descrito abaixo.

4. Superexpressão Transgênica de TNFR25 promove a polarização para Th2 de células CD4 e media a inflamação
15 pulmonar aumentada no modelo de ovalbumina de AHR.

Quatro fundadores independentes para cada transgene de TNFR25 foram obtidos e analisados. O promotor e intensificador de CD2 suportou a expressão transgênica independente de posição em todos os fundadores $\Delta 5,6$
20 TNFR25, FL TNFR25 e DN TNFR25, revelando expressão de alto nível nas células T, NKT e NK em repouso e numa subpopulação de células CD11c+. As células B não expressaram o transgene (Fig.3a). A autenticidade de detecção de anticorpo através de citometria de fluxo foi
25 verificada por Western Blot de células tumorais transfectadas (Fig. 3b) e bandas de Western blot idênticas foram detectadas em esplenócitos transgênicos, ao passo que a molécula endógena estava abaixo do nível de detecção através de Western blot. A forma de ligação-
30 $\Delta 5,6$ não foi detectada pelo anticorpo 10D1 em Western blots (Fig. 3b) indicando sua ligação ao éxon 4 ou 5. A superexpressão transgênica de FL TNFR25 estava associada a números reduzidos de células T em órgãos linfóides primários e secundários em comparação com ninhadas não
35 transgênicas (Fig. 3c); o efeito do transgene $\Delta 5,6$ sobre a celularidade foi modesto no timo e não significativo nos órgãos linfóides secundários. O número reduzido de

células T em camundongos transgênicos foi acompanhado de proliferação reduzida em resposta ao estímulo com anti-CD3 e CD28 ao se comparar números iguais de células CD4 e CD8 de ninhada transgênica purificada com não-transgênica (Fig. 3d). A proliferação reduzida foi observada em todos os pontos de tempo de 24 a 72 horas. Porém, o estímulo de células CD4 ou CD8 TNFR25-tg com forboléster PMA e ionomicina Ca-ionófora restabeleceu a proliferação normal, indicando que as células transgênicas não tinham um defeito intrínseco em sua capacidade de proliferar. As células T TNFR25-tg ativadas por CD3/CD28 regularam para cima o CD25 normalmente, mas produziram apenas cerca de metade da quantidade de IL-2 (Fig. 4) em comparação com controles de ninhada. A adição exógena de IL-2 excedente não restabeleceu a proliferação (Fig. 3d). As células T TNFR25-tg não sofreram apoptose aumentada quando medidas através de coloração com anexina V (Fig. 4) indicando que o déficit proliferativo não se deve aos sinais TNFR25 para morte celular.

Células EL4 transfectadas com FL e $\Delta 5,6$ TNFR25 foram usadas para comparar as propriedades de sinalização das variantes de ligação ativadas com TL1A solúvel, TL1A ligado à membrana (EL4-TL1A) ou um anticorpo anti-TNFR25 agonista (4C12). Todos os três ligantes induziram rapidamente a ativação de NF-kB no prazo de 25 minutos, conforme detectado por EMSA (Fig. 3e).

Após ativação primária com anti-CD3 ligado à placa e anti-CD28 FL solúvel e $\Delta 5,6$ TNFR25, as células transgênicas produziram quantidades significativamente aumentadas de citocinas Th2, incluindo IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, quando comparadas com ninhadas não-transgênicas (Fig. 3f). O IFN- γ foi reduzido quando as células CD4 FL TNFR25-tg foram ativadas, mas não com transgenes $\Delta 5,6$ TNFR25, indicando uma diferença sutil na função de variantes de ligação. Embora a proliferação de células CD4 TNFR-transgênicas tenha diminuído, a produção aumentada de Th2 citocina foi detectável já dentro de um

período de 24 horas de ativação e continuou a aumentar nos dias seguintes, indicando que existia polarização para Th2 antes da ativação.

Em seguida, determinou-se se a polarização para Th2 de células CD4 TNFR-transgênicas poderia ou não ser anulada sob condições de polarização para Th1. Sob condições neutras de Th as células CD4 TNFR25-tg produziram tanto IL-4 quanto as células CD4 tipo padrão, sob condições de polarização para Th2 (Fig. 3g). A incubação de células FL TNFR25-tg sob condições de polarização para Th2 não teve nenhum efeito adicional sobre a produção de IL-4 ou IL-3, indicando que as células já estavam polarizadas ao máximo para Th2 durante a ativação primária sob condições Th-neutras. Porém, as células CD4 FL TNFR25-tg poderiam ser polarizadas para Th1 incluindo-se na cultura anticorpos a IL-4 e adicionando-se IL-12 exógeno. Sob essas condições, as células FL TNFR25-tg produziram IFN- γ em níveis mais elevados do que as células tipo padrão polarizadas para Th1 (fig. 3g) indicando que o transgene TNFR25 pode também coestimular as citocinas Th1. As células CD4 FL TNFR-25 polarizadas para Th1, ao contrário das células Th1 tipo padrão, também produziram IL-13, mas somente quantidades mínimas de IL-4. A superexpressão transgênica de TNFR25, embora espontaneamente polarizada para Th2, pode contudo co-stimular a produção de citocina tipo Th1 ou Th2 sob condições apropriadas de polarização. Além disso, os sinais de TNFR25 coestimulam a produção de IL-13 sob condições de polarização para Th1 ou Th2.

A polarização espontânea para Th2 de camundongos TNFR25-tg in vivo através de imunização e análise de produção de isótipo de anticorpo foi avaliada. Estudos in vivo foram conduzidos com camundongos $\Delta 5,6$ -TNFR25-transgênicos. $\Delta 5,6$ -TNFR25 mostra as mesmas propriedades de sinalização de FL TNFR25 em relação à indução de NF-kB (Fig. 3e) e à indução de apoptose, e gera um perfil similar de citocina polarizada para Th2. Porém, ao contrário de camundongos FL-transgênicos, os camundongos $\Delta 5,6$ -transgênicos possuem

celularidade normal de célula T CD4 nos nódulos linfáticos (Fig. 3c) e no baço e, portanto, podem representar de forma mais precisa a função de TNFR25 para experimentos in vivo.

5 Camundongos TNFR25-tg imunizados com DNP-KLH geraram relações aumentadas de anticorpo IgG1/IgG2a antígeno-específico em comparação com ninhadas não-transgênicas, indicativas de uma relação aumentada de anticorpo tipo Th2 in vivo (Fig. 5a). Sem imunização, os níveis de IgG1
10 e IgG2a de camundongos tipo selvagem e transgênicos foram idênticos, comprovando que a ativação é necessária para revelar a polarização para Th2.

A polarização para Th2 de células CD4 TNFR-25-tg e sua produção aumentada de IL-13 sugeriram que a
15 superexpressão de TNFR25 pode predispor à inflamação pulmonar alérgica aumentada, característica da asma, já que IL-13 é a citocina característica dessa condição (Elias, J.A. et al. Am J Respir Cell Mol Biol 28, 401-4 (2003)). Essa hipótese foi testada utilizando-se o modelo
20 clássico de ovalbumina para inflamação pulmonar experimental em camundongos. Camundongos B6 TNFR25-tg e controles do tipo selvagem foram preparados i.p. com ovalbumina e alum no dia 0 e 5. No dia 12 eles foram submetidos a desafio nas vias aéreas com ovalbumina em
25 aerossol e analisados de um a três dias depois. Os camundongos TNFR25-tg tinham números dramaticamente aumentados de eosinófilos no líquido brônquio-alveolar (BALF, Fig.5b), associados com níveis de IgE ovalbumina-específicos aumentados no soro (Fig. 5d) e produção
30 elevada de citocina Th2 através de reestímulo com ovalbumina de células de nódulos linfáticos brônquicos (Fig. 5e). A produção de IFN- γ foi reduzida em células de nódulos linfáticos brônquicos transgênicas em comparação com células tipo padrão. A análise histopatológica dos
35 pulmões de camundongos TNFR25-tg mostraram infiltração pulmonar perivascular maciçamente aumentada por eosinófilos, produção aumentada de muco brônquico, e

hiperplasia de células calciformes coradas com PAS (Fig. 5c) compatível com exacerbação de inflamação pulmonar por superexpressão de TNFR25 nas células T.

5 O bloqueio genético ou por anticorpo de TNFR25 durante o desafio de vias aéreas de camundongos preparados bloqueia a inflamação pulmonar

Um mutante negativo dominante de TNFR25, DN TNFR25 foi preparado para bloquear a sinalização de TNFR25 durante o desafio das vias aéreas, e o construto expressado como
10 transgene sob o promotor e intensificador de CD2. O transgene DN TNFR25 é desprovido de todo domínio de sinalização intracelular, mas é idêntico ao TNFR25 de extensão completa em seu domínio transmembrânico e extracelular.

15 O DN TNFR25 transgênico foi expressado em níveis idênticos como os transgenes TNFR25 agonistas (Fig. 3a) conforme determinado por citometria de fluxo. Utilizando intensidade de fluorescência superficial como medida para o número de moléculas expressadas, determinou-se um
20 excesso molar triplo ou quadruplo de expressão de TNFR25 transgênico sobre TNFR25 endógeno. Esse nível de superexpressão de DN TNFR25 silenciou a atividade de TNFR25 endógeno. A ativação anti-CD3 primária tanto de células tipo padrão como de células CD4 DN-transgênicas
25 estimula a secreção tanto de citocina Th1 como de citocina Th2 (Figura 4, painel D). A ativação de TNFR25 com um anticorpo agonista (4C12) durante a ativação de anti-CD3 primária de células tipo padrão coestimula a produção tanto de citocina Th1 como de citocina Th2, mas
30 esse efeito coestimulatório de TNFR25 é bloqueado pelo transgene DN TNFR25 (Fig. 6a), indicando que o transgene bloqueia a função do gene endógeno. De forma similar, o efeito agonista de 4C12 coestimula a proliferação de células T4 tipo padrão que foi bloqueada nas células CD4
35 DN TNFR25-tg (Fig. 6b) indicando que o TNFR25 endógeno foi silenciado. De forma importante, a expressão de DN TNFR25 em células CD4 diminuiu muito a produção

normalmente observada de citocina Th2 regulada para cima, mediante ativação secundária de células que tinham sido preparadas sob condições tH-neutras (Fig.6c), indicando que os sinais de TNFR25 promovem fortemente ou são
5 necessários para a polarização para Th2 e que esses sinais são bloqueados pelo transgene Dn. Mais importante ainda, as células DN TNFR25-tg não poderiam ser polarizadas para Th2 mesmo sob condições de polarização para Th2, providas pela adição de IL-4 e bloqueio de
10 anticorpos para IFN- γ e IL-12 (Fig. 6d). A polarização para Th1 de células CD4 DNTNFR25-tg, por outro lado, não foi afetada mesmo sob condições não polarizantes (Th-neutras, ThN). Assim, embora o TNFR25 estimule a produção tanto de citocinas Th1 como de citocinas Th2 na ativação
15 primária de células CD4, os sinais de TNFR25 parecem ser necessários para promover a polarização para Th2 in vitro. A polarização para Th2 é independente de TNFR25, mas os sinais de TNFR25 nas células Th1 promovem a produção de Il-13 (Fig. 3g). A ausência de sinais de
20 TNFR25 em camundongos DN TNFR25-tg in vivo não afeta a relação normal de IgG1 para IgG2a encontrada em camundongos tipo selvagem após imunização de camundongos DN TNFR25-tg com DNP-KLH (Fig. 4).

Em seguida, foi determinado se camundongos DN TNFR25-tg
25 tinham uma resposta alterada no modelo de inflamação pulmonar. Em comparação com camundongos tipo selvagem, camundongos DN TNFR25-tg submetidos a desafio de vias aéreas exibiram infiltração eosinofílica significativamente diminuída no BALF, inflamação pulmonar
30 ausente e produção reduzida de IgE no soro quando examinados através de histopatologia e coloração com PAS (Fig. 6e-g). A reestimulação de nódulos linfáticos brônquicos drenantes de camundongos DN TNFR25 tg submetidos à desafio nas vias áereas com ovalbumina
35 mostrou produção reduzida de citocina Th2, porém produção normal de IFN- γ (Fig.6h). Os dados sugerem que TNFR25 desempenha um papel crítico nas respostas imunes

pulmonares.

Para validar os dados genéticos de bloqueio de TNFR25 em camundongos tipo selvagem, foram desenvolvidos os anticorpos monoclonais contra TL1A murino. Utilizando

5 células transfectadas com TNFR25 e TL1A (Fig. 7 a,b) os anticorpos bloqueadores de TL1A que anularam a sinalização de TNFR25 foram identificados. As células transfectadas com TL1A expressam TL1A em sua superfície (Fig. 7c) e secretam TL1A no sobrenadante similar a

10 outros membros da superfamília TNF. Os sobrenadantes contendo TL1A causaram a rápida liberação de ^{51}Cr de células tumorais transfectadas com FL TNFR25 ou $\Delta 5,6$ TNFR25 através de apoptose, conforme anteriormente citado (Chinnaiyan, A.M. et al. *Science* 274, 990-2(1996); Kitson,

15 J.et al. *Nature* 384, 372-5 (1996); Screatton, G.R.et al. *Proc Natl. Acad Sci USA* 94, 4615-9 (1997); Bodmer, J.L.et al. *Immunity* 6, 79-88 (1997); Masters, S.A. et al. *Curr. Biol* 6, 1669-76 (1996); Tan, K.B.et al. *Gene* 204, 35-46 (1997)). (Fig. 7d). Um dos anticorpos anti-TL1A,

20 L4G6, bloqueou completamente a lise mediada por TL1A de células transfectadas com TNFR25, ao passo que diversos outros anticorpos anti-TL1A não tiveram nenhum efeito ou apenas mediaram a inibição incompleta de lise (Fig. 7d). O anticorpo L4G6, portanto, foi selecionado para uso no

25 bloqueio in vivo de TL1A para bloquear a sinalização de TNFR25 em camundongos tipo selvagem não modificados geneticamente. Os camundongos foram imunizados duas vezes com ovalbumina em alum conforme usual. Um dia antes do desafio das vias aéreas e nos três dias seguintes 50 μg

30 de L4G6 foram injetados i.p. e então os camundongos foram analisados (Fig. 7e). Os controles receberam a mesma quantidade e esquema de IgG de hamster. L4G6 administrado desta forma durante e após o período da fase de desafio por aerossol inibiu a exudação de eosinófilos em BALF,

35 bloqueou a excessiva produção de muco e diminuiu a produção de citocina Th2 de células de nódulos linfáticos brônquicos mediante novo desafio com ovalbumina in vitro

(Fig. 7e-g).

O bloqueio de inflamação pulmonar através de anti-TL1A durante o desafio por aerossol é prova da expressão de TL1A nas vias aéreas. Descobriu-se que níveis modestos de TL1A são expressados numa subpopulação de células CD11c+ em nódulos linfáticos drenantes brônquicos após desafio de vias aéreas, porém não antes do desafio das vias aéreas (Fig. 7h). Todas as outras populações celulares em nódulos linfáticos brônquicos foram negativas para TL1A antes e após o desafio por aerossol (Fig. 7i). Os nódulos linfáticos inguinais não expressaram TL1A em células CD11c+ ou qualquer outro tipo de célula em nenhum momento antes ou após preparação com ovalbumina ou desafio de vias aéreas. A expressão de TL1A, porém, pode ser induzida in vitro no prazo de 24 horas em células CD4+ e CD8+ esplênicas ou de nódulo linfático através de ativação com anti-CD3 e anti-CD28 (Fig. 7j). As células B proliferativas ativadas com LPS não expressam TL1A (Fig. 7j).

6. Células NKT DN-TNFR25-transgênicas não suportam inflamação pulmonar em camundongos desprovidos de NKT, desafiados por aerossol e preparados com antígeno. Foi demonstrado que a transferência adotiva de células NKT tipo padrão para camundongos desprovidos de NKT cura a inflamação pulmonar e a hiperreatividade das vias aéreas no modelo de ovalbumina e que a produção de Il-13 pelas células NKT é necessária (Akbari, O.et al.Nat Med 9, 582-8(2003); Lisbonne, M.et al. J.Immunol 171, 1637-41 (2003); Meyer, E.H. et al.Proc Natl.Acad Sci USA 103, 2782-7 (2006). As células NKT também estão implicadas na fisiopatologia de pacientes asmáticos (Se, Y.et al. J Immunol 175, 4914-26 (2005). Akbari, O.et al. N Engl.J.Med 354, 1117-29(2006)). Para determinar se o TNFR25, que é constitutivamente expressado nas células NKT (Fig. 1a), está envolvido na indução de inflamação pulmonar, células do tipo padrão transferidas e células NKT DN TNFR-tg foram adotivamente transferidas para

camundongos desprovidos de NKT preparados com ovalbumina (Cui, J. et al. Science 278, 1623-6 (1997)) (J α 18 k.o.) (Fig. 8). Embora as células NKT tipo padrão adotivamente transferidas tenham restabelecido a inflamação pulmonar mediante desafio com antígeno nas vias aéreas, o mesmo número de células NKT DN TNFR25-tg não foi capaz disso. Os dados demonstram que os sinais TNFR25 em células NKT são críticos para induzir inflamação pulmonar durante exposição das vias aéreas de camundongos sensibilizados ao antígeno.

7. Agonistas de TNFR25 como Potenciadores Diretos de Respostas Imunes Anti-Tumorais

As células dendríticas maduras executam um processo importante designado "apresentação cruzada" que lhes permite eficazmente preparar células T-citotóxicas que são específicas para peptídeos tumor-específicos. Os antígenos tumorais são degradados e apresentados nas proteínas MHC classe I a células T CD8 circulantes.

Para demonstrar que os agonistas de TNFR25 são BRMs (modificadores de resposta biológica) eficazes em vacina antitumorais, camundongos foram injetados com células tumorais EG7 e células OT-I. As células OT-I foram então observadas quanto à expansão clonal. EG7 são células EL4 linfoblásticas de linfoma de ascite em camundongo, que foram geneticamente modificadas para expressar ovalbumina, o principal componente protéico da clara de ovo. Os camundongos foram inoculados com células EG7 e receberam uma transferência adotiva de células transgênicas de receptor de célula T ovalbumina-específica (OT-I). As células OT-I atuam como células indicadoras in vivo, respondendo ao antígeno de ovalbumina tumor-específico. Teoricamente, as células dendríticas de camundongo apresentam a ovalbumina tumor-específica a e ativa as células T ovalbumina-específicas (OT-I). Porém, sob essas circunstâncias e como é freqüentemente observado nos testes com vacina contra tumor em humanos, as células OT-I reagem com anergia às

células tumorais EG7.

Ao contrário, a co-transfecção de células EG7 com um construto que codifica uma versão secretada da proteína de choque térmico gp96 (gp-96-Ig) proveu um tumor secretando gp96I e contendo ovalbumina como antígeno substituto. A exposição das células CD8 OT-I às chaperonas secretadas pelas proteínas de choque térmico em combinação com a ovalbumina tumor-específica resultou numa expansão de OT-I de uma frequência inicial de 0,5% a mais de 50% de todas as células CD8 após injeção primária e um reforço com secreção de gp96Ig. Portanto, a preparação cruzada de células CD8 através de gp96-Ig-ovalbumina em comparação com a preparação cruzada através de proteína de ovalbumina intacta é aumentada de 10.000 para 1.000.000 vezes. Vide Exemplo 19 e Figuras 10 e 12. Vide também Am J Reprod Immunol. 2002 Oct.; 48(4):220-5.

Quando as células CD8 OT-I foram submetidas à preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina, na presença do anticorpo 4C12 de agonista TNFR25, a expansão de CD8 OT-I aumentou mais 10 vezes em relação a um anticorpo de controle. Porém, quando as células CD8 OT-I submetidas à preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina, na presença do anticorpo L4G6 bloqueador de TL1A, a expansão de CD8 OT-I foi reduzida em 10 vezes em relação a um anticorpo de controle. Vide figura 11.

Como tal, os agonistas de TNFR25 são modificadores de resposta biológica para vacinas contra tumor, pois eles estimulam a ativação de célula T e a resposta imune celular a um antígeno tumor-específico, ao passo que os antagonistas de TNFR25 bloquearam ou inibiram a ativação de célula T. Portanto, outro aspecto da invenção refere-se a métodos e a agentes terapêuticos que aumentam a eficácia de uma vacina antitumoral.

As vacinas contra tumor procuram utilizar os elementos do sistema imune natural do organismo para combater o câncer. As vacinas contra tumor contém um ou mais

antígenos tumor-específicos e podem conter um adjuvante e modificadores de resposta biológica. Um antígeno tumor-específico é um polipeptídeo substancialmente limitado à expressão em ou sobre células tumorais e que podem ser
5 usados para estimular uma resposta imune destinada a atingir aquelas células tumorais. Tipos diferentes de vacinas são utilizados para tratar diferentes tipos de câncer. Para que uma composição antigênica seja útil como vacina, uma composição antigênica deve induzir uma
10 resposta imune ao antígeno numa célula ou tecido. Conforme aqui utilizado, o termo "composição antigênica" pode compreender um antígeno (ex: um peptídeo ou polipeptídeo), um ácido nucleico codificando um antígeno (ex: um vetor de expressão de antígeno) ou uma célula
15 expressando ou apresentando um antígeno. Vide Publicação Americana No. 2003/0185840, aqui incorporada por referência em sua totalidade.

Os modificadores de resposta biológica (VRM), que demonstraram regular para cima a imunidade de célula T ou
20 de regular para baixo a atividade celular supressora. Tais BRMs incluem, porém não se restringem a, Cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); Ciclofosfamida de baixa dose (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ), citocinas tais como g-interferon, IL-2 ou IL-12 ou genes
25 codificando proteínas envolvidas nas funções imunes auxiliares, tal como B-7.

Em uma concretização deste aspecto da invenção, a composição de vacina antitumoral inclui uma composição antigênica tumoral e um agonista de TNFR25. Em outra
30 concretização, o agonista de TNFR25 é o anticorpo 4C12. Na concretização preferida, um agonista de TNFR25 é adicionado à vacina antitumoral como um modificador de resposta biológica. Ainda mais preferivelmente, o agonista de TNFR25 é o anticorpo 4C12. Em outra
35 concretização, a vacina antitumoral inclui um adjuvante. Os adjuvantes de vacina antitumoral podem incluir IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, gama-interferon, GMCSF, BCG,

hidróxido de alumínio, compostos de MDP, tais como thur-MDP, e nor-MDP, CGP (MTP-PE), lipídio A, e monofosforil lipídio A. RIBI, que contém três componentes extraídos de bactérias, MPL, dimicolato de trealose (TDM) e esqueleto de parede celular (CWS) numa emulsão a 2% de esqualeno/Tween 80 é também previsto. Os antígenos MHC podem também ser usados. Os adjuvantes representativos freqüentemente preferidos incluem adjuvante completo de Freund (um estimulante não-específico da resposta imune contendo células mortas de *Mycobacterium tuberculosis*), adjuvantes incompletos de Freund e adjuvante de hidróxido de alumínio.

A preparação de vacinas que contenham seqüências peptídicas como ingredientes ativos é geralmente bastante conhecida no estado da técnica, conforme exemplificado pelas patentes americanas Nos. 4.608.251; 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; 4.596.792 e 4.578.770, todas aqui incorporadas por referência.

Tipicamente, tais vacinas são preparadas na forma injetável. Como soluções ou suspensões líquidas: formas sólidas apropriadas para solução e, ou suspensão em, líquido antes da injeção podem também ser preparadas. A preparação pode também ser emulsificada. O ingrediente imunogênico ativo é freqüentemente misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes apropriados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol, ou similares e suas combinações. Além disso, se desejado, a vacina pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes tamponantes de pH, ou adjuvantes que aumentem a eficácia das vacinas.

8. Imunotoxinas de TNFR25 como Potenciadores Indiretos de Respostas Imunes Inatas Antitumorais

Muitos cientistas e empresas trabalham em células T CD4+/CD25+ reguladoras (Tregs) devido ao seu imenso

impacto potencial sobre o tratamento de muitas doenças. Embora muitas pessoas sejam expostas aos mesmos alérgenos ambientais e a sensibilização aos alérgenos seja comum, somente uma fração de pessoas desenvolvem doenças alérgicas, tais como asma. A razão para isso é incerta no momento, mas pode estar relacionada com a presença de Tregs reguladoras eficientes que suprimem a inflamação das vias aéreas em indivíduos saudáveis expostos a alérgenos. Como tal, as Tregs são conhecidas por contribuir com a manutenção de tolerância periférica contra "próprio" ("self") e "não-próprio" ("non-self"). Porém, também foi documentado que as Tregs impedem a capacidade do organismo de lutar contra o câncer. Nesses casos, as Tregs interferem com as células do sistema imune exterminadoras de tumor. Como tal, as Tregs funcionam como células supressoras dedicadas e podem desempenhar um papel importante na prevenção de tumores, como por exemplo, no carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, ao serem reconhecidas pelo sistema imune. Vide Br J Cancer, 2005 Mar 14; 92(5):913-20.

Os inventores observaram que as Tregs possuem propriedades sugerindo serem elas ativadas. Foi reportado que outros receptores TNF são expressados nas Tregs. GITR é expressado pelas Tregs ativadas. Constatou-se que sua ligação anula a atividade inibidora das Tregs (Nocentini et al., Eur J Immunol. 2005 Apr; 35(4):1016-22). TNFR25 possui muitas propriedades que poderiam torná-lo um regulador versátil de células Tregs. a). a expressão de proteína de TNFR25 é rapidamente regulada para cima pelo anelamento de mRNA induzido por PKC; b). diversas versões funcionais de ligação, incluindo um receptor chamarriz e uma forma negativa dominante, permitem a sintonia fina da regulação; c). a expressão de TL1A parece ser altamente regulada para cima na Doença de Crohn; além disso, a expressão de TL1A sobre linfócitos ativados permite perceber a densidade do linfócito. Finalmente, eles exercem sua ação reguladora pelo menos em parte

- secretando IL-10 e IL-13, uma citocina ativada por sinais de TNFR25. Os inventores são os primeiros a observarem que as Tregs CD4+/CD25+ cultivadas expressando FoxP3 expressam desordenadamente altos níveis de TNFR25. Como tal, os inventores concluem que o TNFR25 modula a função da Treg e que o TNFR25 pode ser usado como marcador molecular na depleção de Tregs in vivo. Vide Exemplo 20. Além disso, os agonistas de TNFR25 anulam a inibição de Treg. Vide Figura 15.
- Outro aspecto da invenção refere-se, portanto, a métodos e agentes terapêuticos que são úteis para aumentar a potência de terapias anti-câncer, através de depleção de células T CD4+/CD25+ reguladoras num paciente. Numa concretização deste aspecto da invenção, uma imunotoxina é usada na depleção de Tregs. Nesta concretização, a imunotoxina possui uma porção ligante ao antígeno que é específica para TNFR25; e é conjugada a um agente tóxico. Numa concretização alternativa, o paciente recebe TL1A solúvel conjugado a um agente tóxico. Outra concretização ainda refere-se a uma composição quimioterápica que possui um agente quimioterápico e uma imunotoxina TNFR25-específica. Outra concretização ainda refere-se a uma composição quimioterápica tendo um agente quimioterápico e um TL1A conjugado a um agente tóxico.
- Outro aspecto da invenção refere-se a métodos e agentes terapêuticos que são úteis para aumentar a potência de terapias anti-câncer provendo ao paciente agonistas de TNFR25 para reduzir a inibição mediada por células T CD4+/CD25+ reguladoras (Tregs).
9. Agonistas de TNFR25 como Agentes Antiinflamatórios
- Utilizando uma forma negativa dominante de TNFR25 (DN-TNFR25) desprovida de domínio de morte intracelular e uma forma alternativamente ligada de TNFR25 (delta 5,6-TNFR25) desprovida dos éxons 5 e 6 codificantes do quarto domínio extracelular rico em cisteína, os inventores descobriram que a função do TNFR25 é necessária para restaurar o balanço homeostático após um trauma à mucosa.

Especificamente, os inventores expressaram transgenicamente uma forma negativa dominante de TNFR25 (DN-TNFR25) sob o promotor CD2 em camundongos. Os camundongos receberam dextran sulfato de sódio (DSS) para induzir colite como modelo para doença de Crohn humana. Camundongos C57B1/6 tipo selvagem desenvolveram colite e diarreia e perderam peso após 5 dias recebendo água potável com DSS a 2%. Porém, quando passaram a receber água normal, os camundongos do tipo selvagem se recuperaram no prazo de uma semana e recuperaram o peso novamente, ao passo que os camundongos expressando DN-TNFR25-tg adquiriram a doença de forma similar à dos camundongos do tipo selvagem, embora a diarreia parecesse mais severa. Adicionalmente, o retorno à água normal não resultou em sua recuperação. Pelo contrário, todos os camundongos expressando DN-TNFR25-tg continuaram a perder peso e morreram na segunda semana. Os camundongos expressando transgenes funcionais de TNFR25 (TNFR25 de extensão completa ou uma versão ligada de $\Delta 5,6$ -TNFR25) recuperaram-se de forma similar à dos camundongos do tipo selvagem. Vide Exemplos 21 e 22 e Fig. 14.

O tratamento atual da doença de Crohn utiliza agentes antiinflamatórios, imunossupressores, e inibidores de TNF. Todos são sintomáticos. A estimulação da sinalização de TNFR25 dá um passo além na cadeia patogênica de eventos. O TNFR25 ativado estimula a produção de Il-10 e Il-13 que, por sua vez, estimula a produção de TGF-beta, resultando no restabelecimento da homeostase. Tal tratamento é curativo ou se aproxima da cura.

Portanto, outro aspecto da invenção refere-se a um método para tratar doença intestinal inflamatória num paciente, administrando ao paciente uma quantidade terapêutica de um agonista TNFR25. Outra concretização refere-se a um método para tratar doença intestinal inflamatória num paciente, elevando os níveis de IL-10 nas áreas mucosais do intestino. Em outra concretização, o agonista de TNFR25 é o anticorpo 4C12. Numa outra

concretização, o agonista de TNFR25 é a forma solúvel de TL1A. Na concretização preferida, a doença intestinal inflamatória é doença de Crohn.

Considerando essa atividade antiinflamatória dos agonistas de TNFR25, outro aspecto da invenção consiste em prover métodos e agentes terapêuticos a um paciente que necessite de redução na inflamação. Em uma concretização, um paciente recebe uma composição contendo um agonista de TNFR25 para reduzir a inflamação e promover a cura. Em uma concretização, um paciente recebe uma composição contendo o agonista de TNFR25 4C12. Tais concretizações são úteis para aliviar os sintomas de distúrbios mediados por respostas inflamatórias crônicas a nível celular, incluindo doenças cardiovasculares (ex: aterosclerose), doenças autoimunes incluindo lúpus eritematoso sistêmico (SLE), esclerose múltipla (MS) diabetes (especialmente diabetes tipo I), espondilite anquilosante, artrite (especialmente artrite reumatóide), asma e alergia, distúrbios de reabsorção óssea, distúrbios oftalmológicos incluindo retinopatias e doenças fibróticas.

10. Antagonistas de TNFR25 como Imunossuppressores

Muitos órgãos e tecidos são atualmente transplantados rotineiramente de um ser humano para outro. Exceto em casos raros, quando o doador e o receptor são gêmeos monozigóticos "idênticos", tais enxertos são denominados aloenxertos. A combinação dos tecidos para transplante de tecidos de um indivíduo para o outro é crítica, pois o receptor de tecido manifestará uma forte reação imune humoral e celular contra as proteínas "não próprias" ("non-self"). A tipagem de tecidos envolve a identificação de antígenos MHC tanto nas células do doador como nas do receptor e o uso de células do doador com tantos alelos MHC idênticos aos do receptor quanto possível. A combinação de alelos MHC Classe I (especialmente HLA-B) e alelos HLA-DR Classe II é muito importante para um transplante bem sucedido, do que a

combinação de outros antígenos MHC; e a combinação de MHC é mais importante do que a combinação de antígenos de histocompatibilidade secundária.

A combinação de HLA melhora a sobrevivência do transplante, não impedindo porém a rejeição, mesmo em
5 irmãos MHC-idênticos (exceto gêmeos idênticos). O MHC alogênico é reconhecido por células T CD8 (Classe I) ou células T CD4 (Classe II); até 10% de células T podem reconhecer um dado MHC alogênico, já que ele lembra MHC
10 próprio + peptídeo estranho.

O aumento do sucesso na área de transplantes deve-se à crescente especialização técnica, ao aumento da disponibilidade de centros de transplante para realizar a combinação HLA e minimizar o tempo de entrega do órgão,
15 ao aumento na disponibilidade de fármacos imunossupressores (ciclosporina e tacrolimus) que bloqueiam a ativação da célula T aos aloantígenos. Ainda problemáticas são a deficiência de órgãos, bem como a capacidade de a doença existente destruir o órgão
20 transplantado (diabete e infecção por HBV são dois exemplos), os efeitos colaterais dos fármacos imunossupressores e o alto custo.

Considerando os principais efeitos colaterais associados aos atuais imunossupressores que bloqueiam a ativação de
25 célula T e a observação de que os antagonistas de TNFR25, tal como o anticorpo L4G6 bloqueador de TL1A tornam eficazes os inibidores da expansão clonal de célula T CD8 cognata (vide, Fig. 11, Exemplo 19), outro aspecto da invenção envolve o uso de antagonistas de TNFR25 para
30 facilitar o transplante de tecidos e prevenir a rejeição de tecidos. Numa concretização, os antagonistas de TNFR25 são providos para um receptor de transplante para suprimir a expansão clonal de células T CD8 que carregam receptores de célula T aloantígeno-específicos (TCRs) e
35 para abrandar a supressão de T-reggs pelo TNFR25. Em outra concretização, os antagonistas de TNFR25 são providos para um receptor de transplante em combinação com um

agente imunossupressor.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Meios e Reagentes

As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco modificado por Iscove (Invitrogen) suplementado com FBS inativado por calor a 10% (Invitrogen), 10µg/ml de gentamicina (Invitrogen) e 50 µM β-mercapto-etanol (Bio-Rad). CD3 anti-camundongo e CD3 anti-humano monoclonais foram purificados de sobrenadantes de cultura das linhagens celulares 2C11 e OKT3, respectivamente (ATCC, Manassas, VA). CD28 anti-camundongo e CD28 anti-humano monoclonais foram adquiridos da eBioscience (San Diego, CA). ConA, PHA e LPS foram adquiridos da Sigma (St.Louis, MO). IL-2 murino recombinante foi adquirido da BioSource International (Camarillo, CA). PMA, ionomicina, H7 e cicloheximida foram adquiridos de Calbiochem (San Diego, CA).

Anticorpos monoclonais diretamente conjugados, incluindo o FITC-CD4, Cychrome-CD4, PE-CD8a, Cychrome-CD8α, FITC-B220, PE-B220, FITC-CD25, PE-CD11c, PEDX5, FITC-CD3, PE-NK1.1, PE-Anexina V e 7-AAD foram adquiridos de BD/PharMingen (San Diego, CA). O controle IgG de hamster foi adquirido da eBioscience.

Exemplo 2 : Geração de anticorpos monoclonais contra mTNFR25 e mTL1A

Hamsters armênios foram imunizados intraperitonealmente três vezes a cada quinze dias com 50µg de mTNFR25-Ig ou mTL1A-MBP (proteína ligante de maltose) em adjuvante de Freund. Três dias antes da fusão, os hamsters receberam um reforço de 50µg das respectivas proteínas, intravenosamente. Os esplenócitos de hamster foram fundidos com o mieloma SP20 murino com PEG e então plaqueados em meio à base de metilcelulose durante duas semanas utilizando kit ClonaCell-HY (StemCell Technologies Inc.BC, Canadá). Mil colônias foram selecionadas e analisadas através de ELISA em placas revestidas com a proteína de fusão imunizante ou a

proteína de controle-proteína de fusão Ig. Os sobrenadantes de clones positivos foram testados quanto à capacidade de detectar isoformas de mTNFR25 em células transfectadas através de citometria de fluxo e western blot. Os anticorpos foram purificados de um sobrenadante Nutridoma-SP (Roche, Indianapolis, IN) sobre uma coluna de proteína-G, dialisada em PBS e esterilizada em filtro. Exemplo 3: Análise citométrica de fluxo para a expressão de mTNFR25 e mTL1A

10 Suspensões de uma célula foram preparadas a partir de órgãos linfóides indicados no experimento individual. Antes da coloração, as células foram tratadas com CD16/CD32 anti-camundongo purificado (receptor Fc- γ III/II; BD) e IgG humana purificada (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) para bloquear a ligação não-específica a FcRs. As células foram coradas com TNFR25 anti-camundongo de hamster armênio ou TL1A anti-camundongo durante 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas em tampão FACS (PBS contendo BSA 0,5% e 2nM EDTA) e então coradas com IgG de anti-hamster armênio de cabra marcada com biotina (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas e então coradas com Estreptavidina-PE ou Estreptavidina-Cychrome (BD) durante 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas e então coradas com marcadores de superfície celular diretamente conjugados para populações celulares distintas. As amostras foram analisadas utilizando um instrumento FACS LSR da Becton Dickinson e software CELLQuest™.

30 Exemplo 4 : RT-PCR

Identificação de formas de ligação de mTNFR25: RNA Mensageiro foi extraído de linhagens celulares murinas ou tecidos com o kit Micro Fast-Track (Invitrogen, Carlsbad, CA), e o cDNA foi submetido à transcrição reversa utilizando o kit Superscript II (Invitrogen). Os produtos de RT-PCR foram subclonados no vetor PCR II utilizando o kit de clonagem TOPO (Invitrogen) e foram confirmados

como formas de ligação de mTNFR25 através de sequenciamento de DNA. Para análise da ligação de TNFR25 murino, foram utilizados os seguintes preparadores ("primers"). Primer a montante, éxon 2: CAG TGA GTC CCA
 5 GAA GAG GT (SEQ ID NO: 8); primer a jusante, éxon 7: GGA TAG CCC CAA AAA GGA AC (SEQ ID NO: 9); primer a montante, éxon 7 : TCC TTT TTG GGG CTA TCC TG (SEQ ID NO:10), primer a jusante, éxon 10: GGT ATT TCT CCA TGA CGC TT (SEQ ID NO:11).

10 A ligação alternativa induzida por ativação de TNFR25 humano foi analisada, já que nos camundongos os produtos de PCR com diferentes formas de ligação eram mais difíceis de distinguir em gel de agarose, embora parecessem similares às formas de ligação humana. Foram
 15 utilizados os primers de PCR a seguir descritos. Éxon 4 a montante: TTC ACC CTT CTA CTG CCA AC (SEQ ID NO: 12); éxon 7, a jusante: TAA CCA GGG GCT TGT GAG GC (SEQ ID NO: 13). As células mononucleares sangüíneas periféricas humanas foram isoladas de doadores sadios através de
 20 centrifugação em gradiente de densidade Ficoll Hypaque. Cinco milhões de células por amostra foram ativadas com PHA (5µg/ml), ou anti-CD3 imobilizado (OKT3, 5µg/ml), e anti-CD28 (1µg/ml) ou PMA (10 ng/ml) e ionomicina (400 ng/ml). As células foram coletadas nos pontos de tempo
 25 indicados e o mRNA extraído e convertido em cDNA utilizando o kit Invitrogen. β -actina humana foi utilizada como controle interno. A quantificação de produtos de PCR foi realizada com auxílio de software Molecular Analyst (BioRad).

30 Exemplo 5 : Geração de Camundongos Transgênicos

Os construtos de TNFR25 murino foram clonados sob o promotor CD2 humano e região de controle local (doação do Dr. A.Singer, NIH) utilizando os sítios de endonuclease de restrição EcoR I e Sal I. Três construtos mTNFR25
 35 foram gerados por PCR utilizando uma enzima com mecanismo de revisão ("proofreading"). Os construtos eram a molécula de extensão completa de TNFR25 murino (FL

TNFR25), a variante de ligação de TNFR25 desprovida do 5° e 6° éxon ($\Delta 5,6$ TNFR25) e a versão negativa dominante de TNFR25 (DN TNFR25, como 1-234) terminando na extremidade do domínio transmembrânico e desprovido do domínio intracelular completo. A sequência dos produtos de PCR foi confirmada por seqüenciamento. Microinjeções de DNA nos ovos fertilizados foram conduzidas pela unidade transgênica na University of Miami, School of Medicine. Fundadores potenciais foram identificados através de PCR de DNA de biópsias da cauda. O par preparador (primer) foi localizado a montante e a jusante dos sítios de clonagem; portanto, o mesmo par preparador foi utilizado para todos os transgenes mTNFR25. O primer a montante é 5'CGC TCT TGC TCT CTG TGT ATG 3' (SEQ ID NO:14) e o primer a jusante é o 5'CTG CCA GCC CTC TTC CAT C 3' (SEQ ID NO:15). Os camundongos transgênicos foram criados no "background" C57BL/L6 através de combinação serial de animais transgênicos hemizigotos com C57BL/6J tipo selvagem (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME). Todos os camundongos foram usados na 6a.-12a.semana de vida, e mantidos em dependências livres de patógenos. O "University of Miami Animal Care and Use Committee" aprovou todos os procedimentos para utilização dos animais.

Exemplo 6 : Preparação de extrato nuclear e ensaios de desvio de mobilidade eletroforética para ativação de NFkB

Cento e sete células EL4- $\Delta 5,6$ TNFR25 ou EL4-FL TNFR25 foram tratadas com TL1A solúvel ou ligado a membrana ou com anticorpo 4C12 agonista de TNFR25 conforme indicado nas legendas das figuras, e então coletadas por centrifugação a 800g durante 5 min. Extratos nucleares foram isolados utilizando um protocolo de minipreparação e submetidos a EMSA conforme descrito (Harhaj, E.W. et al. Virology 333, 145-58 (2005). Os extratos nucleares (6 μ g) foram incubados à temperatura ambiente durante 20 minutos com uma sonda kB de alta afinidade marcada com

32P seguido de separação dos complexos de DNA-proteína em géis de poliacrilamida nativa a 5%.

Exemplo 7 : Ensaio de Proliferação de Célula T

Os esplenócitos foram plaqueados em triplicata a 1×10^5 células/cavidade em placas de fundo plano de 96 cavidades. As células foram ativadas com anti-CD3 imobilizado ($2\mu\text{g/ml}$) com ou sem anti-CD28 solúvel ($1\mu\text{g/ml}$) ou com ConA ($5\mu\text{g/ml}$) ou com PMA ($1\mu\text{g/ml}$) e ionomicina (400 ng/ml). Para proliferação de célula T, células T CD4 purificadas a 1×10^5 células/cavidade ou células T CD8 a 5×10^4 células/cavidade foram estimuladas com anti-CD3 revestido ($2\mu\text{g/ml}$) e anti-CD28 solúvel ($1\mu\text{g/ml}$). mIL-2 recombinante foi adicionado à cultura a 1000U/ml em experimentos indicados. As células foram cultivadas durante 72 horas e pulsadas durante as últimas seis horas de incubação com $1\mu\text{Ci/cavidade}$ de 3H-timidina (Perkin Elmer, Boston, MA), e a incorporação de timidina foi quantificada utilizando um contador de cintilação.

Células CD4 ou CD8 ou T murinas foram purificadas de esplenócitos e/ou nódulos linfáticos através de seleção negativa utilizando o kit SpinSep (StemCell Technology Inc.) de acordo com o protocolo do fabricante. A pureza estava rotineiramente em torno de 90%/96% ao ser examinada por análise FACS.

Exemplo 8 : Imunização de camundongos com DNP-KLH, determinação de isótipo de anticorpo, e ELISA de citocina.

Camundongos transgênicos e do tipo selvagem adultos (6-10 semanas de vida) foram imunizados intraperitonealmente com $100\mu\text{g}$ de hemocianina de lapa ("keyhole limpet") conjugada a DNP (DNP-KLH) (CalBiochem). Uma semana e três semanas após imunização, os camundongos foram sangrados e o soro separado para análise de anticorpos IgG1, IgE e Ig2a anti-DNP específicos através de ELISA de acordo com o protocolo do fabricante (BD). Os soros de animais individuais foram absorvidos em placas de 96 cavidades

revestidas com 0,8µg/ml DNP-albumina (DNP-BSA) (CalBiochem) e o isótipo de anticorpo ligado determinado através de ELISA.

Para analisar a produção de citocina nos sobrenadantes de culturas celulares, testes ELISA "sanduíche" foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante. Pares de anticorpo de BD foram usados para análise de IL-2, IFN-γ e IL-4. Reagentes para ELISA de IL-13 foram adquiridos da R&D Systems (Minneapolis, MN) e os reagentes para o teste ELISA de IL-5 e IL-10 foram adquiridos da eBioscience.

Exemplo 9: Polarização in vitro de células T CD4 em células Th1 ou Th2

As células T CD4 foram purificadas através de seleção negativa conforme acima mencionado. As células T CD4 foram ativadas com anti-mCD3 imobilizado (2µg/ml) e anti-mCD28 solúvel (1 µg/ml) isoladamente, ou na presença de IL-12 (10 ng/ml) e anti-mIL-4 (20 µg/ml) para diferenciação de Th1, ou com IL-4 (10 ng/ml), anti-mIFN-γ (10µg/ml) e anti-mIL-12 (10 µg/ml) durante 7 dias. As células foram coletadas, lavadas e replaqueadas a 1 x 10⁵ células por cavidade e reestimuladas com anti-CD3 imobilizado. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados e avaliados quanto à produção de citocina através de ELISA.

Exemplo 10 : Protocolos de imunização para o modelo murino de asma alérgica

Camundongos DN TNFR25-tg (codificado pela SEQ ID NO: 16), Camundongos Δ5,6 TNFR25-tg, e FL TNFR25-tg gerados conforme anteriormente descrito e retro-cruzados em pelo menos sete gerações no "background" C57BL/6J, foram comparados com os camundongos C57BL/6J do tipo selvagem adquiridos de National Cancer Institution (Frederick, MD). Os camundongos foram sensibilizados através de injeção intraperitoneal de 66µg de ovalbumina (albumina cristalizada de ovo de galinha, grau V, Sigma) absorvida em 6,6 mg sulfato de alumínio potássio (alum; Sigma) em

200 μ l PBS no dia 0. No dia 5, os camundongos receberam reforço intraperitonealmente com a mesma dose de ovalbumina em alum. No dia 12, os camundongos foram desafiados por aerossol com 0,5% ovalbumina em PBS por uma hora utilizando um Nebulizador Ultrasônico (MABIS Healthcare Inc., Lake Forest, IL). Os camundongos foram avaliados quanto à inflamação alérgica dos pulmões três dias após a exposição única ao aerossol. Os camundongos foram sacrificados através de inalação de CO₂. Após canulação da traquéia, o pulmão foi lavado 4 vezes com 1 ml de PBS. As células recuperadas do líquido BAL foram contadas e usadas para preparações em "cytospins" (50.000 células ou menos/lâmina). > 200 células foram contadas para cada lâmina de "cytospin" corada com corante Wright-Giemsa (Sigma) para determinar as contagens diferenciais de células para macrófagos, eosinófilos, linfócitos e neutrófilos.

Exemplo 11 : Histologia Pulmonar

Os pulmões foram removidos dos camundongos após o procedimento de lavagem brônquica e fixados em formalina tamponada neutra a 10%. As amostras foram entregues aos cuidados do "Histopathology Core of the Sylvester Cancer Center University of Miami, School of Medicine" onde as amostras foram embebidas, cortadas e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes foram também corados com ácido de Schiff periódico (PAS) para determinar a produção de muco.

Exemplo 12 : ELISA para IgE total sérica e Ig ovalbumina-específica

Os camundongos foram sangrados antes da sensibilização (dia 0), 3 dias após o desafio por aerossol (dia 15) e em alguns experimentos um dia antes do desafio por aerossol (dia 11). O nível de IgE total foi quantificado através de ELISA de acordo com o protocolo do fabricante (BD). IgE ovalbumina-específica foi determinada em ELISA Sanduíche, primeiramente revestindo-se a placa com OVA 0,01% em PBS, seguido de carregamento das amostras de

soro diluída e então do anticorpo anti-IgE secundário marcado com biotina (BD).

Exemplo 13 : Reestimulação in vitro de células de nódulos linfáticos e produção de citocina

5 Um dia ou três dias após o desafio por aerossol, os nódulos linfáticos brônquicos foram coletados e as suspensões de uma célula preparadas. As células foram inoculadas em placas de 96 cavidades de fundo redondo a 1×10^6 células/cavidade e cultivadas com 100 $\mu\text{g/ml}$
10 ovalbumina durante 4 dias. Então, os sobrenadantes foram coletados para os ensaios ELISA de citocina conforme descrito.

Exemplo 14 : Ensaio de Citotoxicidade

Os sobrenadantes de mTL1A diluídos serialmente e
15 coletados de células transfectadas com P815-TL1A foram adicionados às células alvo transfectadas com P815-TNFR25 marcadas com ^{51}Cr . Para testar a atividade de bloqueio de TL1A, foram adicionados anticorpos monoclonais anti-TL1A diferentes à cultura e a liberação de Cr determinada após
20 4 horas em amostras em triplicata. A liberação espontânea foi calculada a partir de cavidades que continham apenas células alvo marcadas com ^{51}Cr . 100% liberação (controle positivo) foi calculada das cavidades que continham células alvo marcadas com ^{51}Cr e 1% SDS. A porcentagem de
25 atividade de citotoxicidade foi calculada conforme a seguir descrito: (leitura média de amostra - leitura média de liberação espontânea)/leitura média de controle positivo. Dados similares foram também obtidos com transfectantes EL4.

30 Exemplo 15: Bloqueio de Inflamação Pulmonar por anticorpo anti-mTL1A antagonista

Os camundongos foram sensibilizados intraperitonealmente com ovalbumina em alum no dia 0 e no dia 5 seguido de desafio por aerossol com 0,5% ovalbumina em PBS durante
35 uma hora no dia 12. Os camundongos receberam L4G6 ou uma quantidade equivalente da IgG de hamster de controle (Jackson Immuno Research) através de injeção

intraperitoneal de 50µg/camundongo a cada dia do dia 11 ao dia 14. A inflamação pulmonar alérgica foi avaliada no dia 15.

Exemplo 16: Transferência adotiva de células NKT

5 Os camundongos Jα18 k.o. (Cui, J.et al. Science 278, 1623-6(1997)) foram doados por Michael Lotze (U.Pittsburgh) com a gentil permissão de M.Taniguchi (Ciba University, Japão). Células NKT de camundongos tipo selvagem e DN TNFR25-tg foram isoladas de células
10 esplênicas agrupadas de 10 camundongos através de seleção positiva utilizando o Kit de Seleção Positiva Pan NK de camundongo "EasySep" (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) de acordo com instruções do fabricante.

Exemplo 17: Análises Estatísticas

15 As análises estatísticas utilizando um teste t de Student foram conduzidas com o software GraphPad Prism (San Diego, CA); p<0,05 é considerado significativo. Os dados no texto são apresentados como a média ± SEM.

Exemplo 18 : Geração de anticorpos DR3 e TL1A

20 Uma proteína de fusão DR-3 foi gerada, purificada e usada para imunizar hamsters. Os sobrenadantes de hibridoma foram obtidos e verificados através de ELISA utilizando a proteína de fusão DR3-Ig como agente de verificação. A natureza dos hibridomas foi verificada através de
25 citometria de fluxo de células tumorais transfectadas com DR3, através de Western blots, e através de estudos funcionais. Todos os anticorpos detectaram DR3 de extensão completa e alternativamente ligada em células transfectadas por FACS, um dos anticorpos detectou DR3 em
30 Western blots, e o anticorpo (4C12) exibiu atividade agonista, mediando a sinalização de DR3 na ausência de TL1A.

Os anticorpos monoclonais de TL1A foram obtidos imunizando-se hamsters com uma fusão de proteína de
35 ligação a maltose-TL1A. Os anticorpos de TL1A detectaram TL1A transfectado através de citometria de fluxo. O anticorpo (L4G6) exibiu atividade antagonista, bloqueando

a ligação de TL1A a DR3.

Exemplo 19 : A Sinalização através de TNFR25 Aumenta a Preparação Cruzada de CD8

Um sistema novo baseado em proteína gp96 de choque
5 térmico que media forte expansão de CD8-CTL antígeno-
específica in vivo foi recentemente descrito em Strbo et
al., Am J Reprod Immunol.2002 Oct;48(4):220-5. Neste
sistema modelo a gp96-Ig liberada (construída para ser
secretada) ativa as células dendríticas e provê peptídeos
10 chaperonados para a apresentação cruzada e preparação
cruzada de células CD8 (Fig. 12). O sistema é muito útil,
pois independe do auxílio de CD4. A gp96 secretada provê
o sinal de ativação para DC através de CD91 e TLR2/4 que
é de outra forma provido por CD409-L nas células CD4.
15 Conseqüentemente, a expansão de CD8 (OT-I) neste sistema
funciona bem em camundongos deficientes em CD40-L e foi
empregada no estudo de imunidade mucosal e para
determinar o papel de TNFR25 na expansão de CD8.

EG7-gp96 é uma linhagem celular derivada do linfoma EL4
20 através de transfecção com ovalbumina e gp96-Ig. As
células secretam gp96-Ig associada com peptídeos de
ovalbumina. Os peptídeos de ovalbumina chaperonados
através de gp96-Ig aumentam a preparação cruzada de
células CD8 (Fig. 10) em cerca de 10.000 vezes quando
25 comparados com a ovalbumina isoladamente. 100ng ova-gp96-
Ig expandem OT-I em camundongos B6 de uma frequência de
0,5% entre células CD8 pós-transferência a 20% no baço
após imunização com EG7-gp96-Ig.

Para determinar o efeito dos sinais TNFR25 sobre a
30 expansão de CD8, modelo OT-I transgênico de TCR conforme
descrito acima, foi utilizado juntamente com estimulação
mediada por EG7-gp96-Ig. Para determinar o efeito dos
sinais de TNFR25, os camundongos receberam um anticorpo
anti-TNFR25 agonista (4C12), um anticorpos de ligação a
35 TNFR25 mas não agonista (L4G6) ou uma IgG de controle,
24h e 72h após imunização com EG7-gp96-Ig. A expansão de
OT-I foi monitorada na cavidade peritoneal no dia 5 após

imunização. 4C12 causou um recrutamento aumentado de células para a cavidade peritoneal através de EG7-gp96-I, resultando na duplicação do número de células. Além disso, 4C12 causou especificamente um aumento em mais de

5 oito vezes na expansão de OT-I.O anticorpo L4G6 anti-TNFR25 não induziu aumento no recrutamento de células para a cavidade peritoneal e inibiu a expansão de OT-I.

Esses dados mostram que os anticorpos anti-TNFR25 agonistas coestimulam as células CD8 e/ou inibem os

10 efeitos supressores de Tregs via TNFR25. A coestimulação de células T virgens por TNFR25 resulta na proliferação aumentada e na polarização para Th2 mediante ativação secundária. Além disso, a sinalização de TNFR25 sobre as células T reguladoras resulta em sua inibição temporária

15 de supressão. O efeito combinado é então responsável pela expansão aumentada de CD8 e pelo recrutamento de células observado na Fig. 11.

Exemplo 20 : As Células T CD4+CD25+ reguladoras expressam altos níveis em TNFR25

20 Para determinar a expressão de TNFR25 as Tregs CD4+CD25+ foram purificadas dos baços através de seleção negativa de células CD4 seguido de classificação magnética com anti-CD25. As células foram cultivadas com grânulos de anti-CD3, anti-CD28 a uma relação de grânulo para célula

25 de 3:1, sendo utilizados 2000u/ml de IL-2 humano. Sob essas condições, as células começam a proliferar após 3-4 dias e continuam expandindo-se por cerca de 3 semanas. As células cultivadas foram analisadas através de análise FACS para CD4 e CD25, através de citofluorimetria

30 intracelular para expressão de FoxP3 e para análise de superfície de TNFR25. A Fig. 13 mostra que as Tregs obtidas desta forma são essencialmente puras e expressam tanto FoxP3 como TNFR25.

Exemplo 21 : O Bloqueio de TNFR25 causa letalidade de

35 colite induzida por dextran sulfato de sódio

O modelo de dextran sulfato de sódio (DSS) tem sido amplamente utilizado como modelo de colite, lembrando, em

alguns aspectos, a doença de Crohn. O trauma inicial é o efeito danoso do DSS sobre a barreira de permeabilidade normalmente provida pelo epitélio intestinal. Esse efeito do DSS permite acesso da flora intestinal normal aos locais do sistema imune mucosal que deflagram uma resposta imunológica inflamatória lembrando a colite de Crohn. Camundongos do tipo selvagem (w.t.), durante um período de 8 dias de exposição à água potável contendo DSS a 2% desenvolveram diarreia e perda de peso. Quando do retorno à água normal, os camundongos B6 se recuperaram e voltaram seu peso normal. O TNFR25 também influi sobre o curso da doença na Colite. No presente experimento, camundongos tipo selvagem e transgênicos foram expostos à água contendo DSS a 2% por sete dias. Conforme mostra a Fig. 14, os camundongos DN-TNFR25-tg desenvolveram uma doença semelhante à dos camundongos tipo selvagem, porém quando retornaram à água normal, os camundongos DN-TNFR25-tg não se recuperaram como os camundongos tipo selvagem. Em vez disso, os camundongos DN-TNFR25-tg continuaram a perder peso e morreram entre o dia 12 e 16. Os camundongos $\Delta 5,6$ -TNFR25-tg assemelharam-se aos camundongos tipo selvagem embora a morte de um camundongo poderia também sugerir distúrbio no sistema imune. Chegou-se a duas conclusões: em camundongos DNTNFR25-tg, a resposta imune resultante é muito mais forte do que a dos camundongos tipo selvagem, levando à letalidade, e o restabelecimento da saúde normal e da homeostase em camundongos tipo selvagem são dependentes do funcionamento normal das células T reguladoras (Treg). A função da Treg é afetada nos camundongos DNTNFR25-tg. A última hipótese é a mais provável, pois se sabe que a função da Treg é extraordinariamente importante para manter a homeostase no sistema imune mucosal, mantendo o balanço correto entre a tolerância aos nutrientes e a flora intestinal normal e a resposta imune a patógenos intestinais.

Exemplo 22 : A Imunização com EG7-gp96-Ig induziu as

células OT-I a migrarem para os sítios mucosais de placas de Peyer, linfócitos da lâmina própria (LPL) e linfócitos intraepiteliais (IEL)

Conforme mostra a Fig. 16 (coluna à direita), as células EG7 são incapazes de causar expansão clonal de OT-I ou migração aos sítios mucosais. As células EG7 secretoras de gp96-Ig, por outro lado, causam a expansão clonal de OT-I no baço, nódulos linfáticos e cavidade peritoneal (não mostrada) e sua migração aos sítios mucosais (Fig. 16). Nas placas de Peyer, 8% das células são CD8+ e 6,7% das células CD-8 são OT-I; em IEL 61% das células são CD8+ e 9% das células CD8 são OT-I. Em LPL, 29% das células CD8 são OT-I. As células OT-I migrando para IEL após imunização são α Eb7+ e α 4 β 7+, mas permanecem CD8 $\alpha\beta$ e TCR $\alpha\beta$, ao contrário de CD8 IEL residente, cuja maioria são CD8 $\alpha\alpha$ e 50% TCR $\gamma\delta$.

No presente relatório, foram descritas apenas as concretizações preferidas da invenção, e alguns exemplos de sua versatilidade. Deve ficar entendido que a invenção pode ser utilizada em diversas outras combinações e ambientes, sendo capaz de mudanças ou modificações sempre dentro do escopo do conceito inventivo aqui expressado. Assim, por exemplo, os habilitados na técnica reconhecerão, ou poderão verificar, utilizando nada além da experimentação de rotina, numerosos equivalentes às substâncias e procedimentos específicos aqui descritos. Tais equivalentes são considerados como enquadrados no escopo da presente invenção.

LISTAGEM DA SEQUÊNCIA

<110> University of Miami School of Medicine
Podack, Eckhard
Levy, Robert
Deyev, Vadim

<120> "ANTICORPO ISOLADO, TOXINA ESPECÍFICA PARA RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA ATIVAR O RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25) NUMA CÉLULA, VACINA ANTITUMORAL, MÉTODO PARA IMUNIZAR UM PACIENTE CONTRA TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER NUM PACIENTE, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO INTESTINAL, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA A FACILITAÇÃO DE UM TRANSPLANTE DE ÓRGÃO, MÉTODO PARA TRANSPLANTAR UM TECIDO DE UM DOADOR PARA UM HOSPEDEIRO, MÉTODO PARA INIBIR A EXPRESSÃO CLONAL DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 COGNATAS, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO PULMONAR, ANTAGONISTA DE TNFR25 ISOLADO, COMPOSIÇÃO E VETOR DE EXPRESSÃO".

<130> 071342-0041

<140> 11/512,412

<141> 2006-08-30

<150> 60/712,084

<151> 2005-08-30

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1665

<212> DNA

<213> Camundongo

<400> 1

```

gggagttggt ctggatggcg cgggggaggg cgggcagcag ctactctagt ctaggaacat 60
aggggctgag ctggttgggg aagccccggg ttacgcgacc gaccagagcc gcactcaca 120
gggcccaggc ggtacacacc gcaatggagg cacggctgct gcggggctgc gtggtggagc 180
ctctgttcct accactgctg ctgctgctgc tgetgctgct gctgcttggg ggccagggcc 240
agggcgcat gtctggcagg tgtgactgtg ccagtgagtc ccagaagagg tatggcccg 300

```

```

tttgttgacag gggctgcccc aagggacact acatgaaggc cccctgcgca gaaccctgtg 360
gcaactccac ctgccttccc tgccctcgg acaccttctt gaccagagac aaccacttta 420
agactgactg taccgcgtgc caagtctgtg atgaagaggc cttcaagtg acccttgaga 480
actgctcggc aaagtcggac acccactgtg gctgccagtc aggctggtgt gttgactgct 540
ccaccgtgcc atgtgggaaa agctcacctt tctcttgtgt cccatgcggg gctacgacac 600
cagtccatga ggctccaacc ccccgccctt gcctgcctgg cttctatata cgtggcaatg 660
actgcacgtc ctgccccacg ggcttcagca gcgtttgccc taaggcttgc actgctgtct 720
gtggctggaa gcagatgttt tgggtccagg tgcttctagg agtcgcgttc ctttttgggg 780
ctatcctgat ctgtgcatat tgcgatggc agccttgtaa ggccgtggtc actgcagaca 840
cagctgggac ggagccctg gcctcaccac agactgcccc tctctcagcc tcagacagcg 900
cccacaccct cttggcacct ccaagcagta ctgggaaaat ctgtaccact gtccagttgg 960
taggcaacaa ctggaccctt ggcttatccc agactcagga ggtggtctgc ggacaggcct 1020
cacaaccctg ggatcagctg ccaaacagaa ctcttggaac tcctctggca tctccgctct 1080
cgccagcgcc ccttgcgggc tctccggctg ctgtgctcca gcctggcccg cagctctacg 1140
atgtgatgga tgcggtccca gcacgaaggt ggaaggagtt cgtgcgcacg ctggggctgc 1200
gggaagcggg aattgaagcc gtggaggtgg aaatctgccg cttccgagac cagcagtatg 1260
agatgctcaa gcgctggcgt cagcagcagc ctgcaggcct cggtgccatc tatgcggctc 1320
tgagagcgaa ggtcttgga ggctgtgccg aggacctgcg cagccgcctg cagcgtggcc 1380
cgtgatggaa ggtccatcat ccactttgac accctagtga cccttgaagg agccttaagt 1440
attgttactt atgctgttag acattttatg tcaattacta accccctgcc gtggctcctgc 1500
gtagcagggc tggctgcctc acttttgctt atctgcagca cggagctcct gctaagggaa 1560
gcgtcatgga gaaataccag aaggggccaa gtgattggtt gtcagctgt taattagccc 1620
gagtttgac ttggtattaa atttcataag aaaagcagct gcttg 1665

```

```

<210> 2
<211> 1665
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

<400> 2

cgggccctgc gggcgcgggg ctgaaggcgg aaccacgacg ggcagagagc acggagccgg 60
 gaagcccctg ggcgcccgtc ggagggctat ggagcagcgg ccgcggggct gcgcggcggt 120
 ggcggcgggc ctccctcctg tgctgctggg ggcccggggc cagggcgggc ctcgtagccc 180
 caggtgtgac tgtgccgggtg acttccacaa gaagattggg ctgttttgtt gcagaggctg 240
 cccagcgggg cactacctga agggcccttg cacggagccc tgcggcaact ccacctgcct 300
 tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccc 360
 ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgctg gagaactgtt cagcagtggc 420
 cgacacccgc tgtggctgta agccaggctg gtttgtggag tgccaggcca gccaatgtgt 480
 cagcagttca cccttctact gcccaacctg cctagactgc ggggccctgc accgccacac 540
 acggctactc tggtcccgca gagatactga ctgtgggacc tgccctgcctg gcttctatga 600
 acatggcgat ggctgcggtg cctgccccac gccacccccg tcccttgacg gagcaccctg 660
 gggagctgtc cagagcgctg tgccgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg 720
 ggtccagggtg ctccctggctg gccttgtggt cccctcctg cttggggcca ccctgacct 780
 cacataccgc cactgctggc ctcaaaagcc cctggttact gcagatgaag ctgggatgga 840
 ggctctgacc ccaccacggg ccacccatct gtcacccttg gacagcgccc acacccttct 900
 agcacctcct gacagcagtg agaagatctg caccgtccag ttggtgggta acagctggac 960
 ccctggctac cccgagaccc aggaggcgct ctgcccgcag gtgacatggg cctggggacca 1020
 gttgccacgc agagctcttg gcccgcgtgc tgcgccaca ctctcgccag agtccccagc 1080
 cggctcgcca gccatgatgc tgcagccggg cccgcagctc tacgacgtga tggacgcggg 1140
 cccagcgcgg cgctggaagg agttcgtgcg cacgctgggg ctgcgcgagg cagagatcga 1200
 agccgtggag gtggagatcg gccgcttccg agaccagcag tacgagatgc tcaagcgctg 1260
 gcgccagcag cagc'ccgcgg gcctcggagc cgtttacgcg gccctggagc gcatggggct 1320
 ggacggctgc gtggaagact tgcgcagccg cctgcagcgc ggcccgtgac acggcgccca 1380
 cttgccacct aggcgctctg gtggcccttg cagaagccct aagtacgggt acttatgcgt 1440
 gtagacattt tatgtcactt attaagccgc tggcacggcc ctgcgtagca gcaccagccg 1500

gccccacccc tgctcgcccc tatcgctcca gccaaaggcga agaagcacga acgaatgtcg 1560
 agaggggggtg aagacatttc tcaacttctc ggccggagtt tggctgagat cgcggtatta 1620
 aatctgtgaa agaaaacaaa acaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1665

<210> 3
 <211> 759
 <212> DNA
 <213> Camundongo

<400> 3
 atggcagagg agctgggggtt gggcttcgga gaaggagtcc cagtgggaagt gctgccggaa 60
 ggctgtagac acaggccaga ggccagggcc gggctagctg ccaggagcaa agcctgcctg 120
 gctctcacct gctgcctggt gtcatttccc atcctcgcag gacttagcac cctcctaattg 180
 gctggccagc tccgggtccc cgaaaagac 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 ctatttcac c tactcccaga tcacattccg agggaccaca 480
 tctgtgtgtg gtgacatcag tcgggggaga cgaccaaaca agccagactc catcactgtg 540
 gtcacacca aggtagcaga cagctaccct gagcctgccc gcctactaac aggggtccaag 600
 tctgtgtgtg aaataagcaa caactgggtc cagtccctct accttggggc catgtttctc 660
 ttggaagaag gggacagact aatggtaaac gtcagtgaca tctccttggg ggattacaca 720
 aaagaagata aaactttctt tggagctttc ttgctataa 759

<210> 4
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> Camundongo

<400> 4
 atggaggcac ggctgctgcg gggctgctg gtggagcctc tgttcctacc actgctgctg 60
 ctgctgctgc tgctgctgct gcttgggtggc cagggccagg gcggcatgtc tggcaggtgt 120
 gactgtgcca gtgagtccca gaagaggtat ggcccgtttt gttgcagggg ctgccccaaag 180

ggacactaca tgaaggcccc ctgcgcagaa ccctgtggca actccacctg ccttccctgt 240
 ccctcggaca ccttcttgac cagagacaac cactttaaga ctgactgtac ccgctgccaa 300
 gtctgtgatg aagaggccct tcaagtgacc cttgagaact gctcggcaaa gtcggacacc 360
 cactgtggct gccagtcagg ctgggtgtgtt gactgtctca ccgtgccatg tgggaaaagc 420
 tcacctttct cttgtgtccc atgcgggggt acgacaccag tccatgaggc tccaaccccc 480
 cggccctgcc tgcttggtt ctatatacgt ggcaatgact gcacgtcctg cccacgggc 540
 ttcagcagcg tttgccctaa ggcttgact gctgtctgtg gctggaagca gatgttttgg 600
 gtccaggtgc ttctaggagt cgcgttcctt tttggggcta tcctgatctg tgcatat 657

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

<400> 5
 atggagcagc ggccgcgggg ctgcgcggcg gtggcggcgg cgctcctcct ggtgctgctg 60
 ggggcccggg ccagggcg cactcgtagc ccaggtgtg actgtgccgg tgacttccac 120
 aagaagattg gtctgttttg ttgcagaggc tgcccagcgg ggcactacct gaaggccct 180
 tgcacggagc cctgcggcaa ctccacctgc cttgtgtgtc cccaagacac cttcttggcc 240
 tgggagaacc accataattc tgaatgtgcc cgctgccagg cctgtgatga gcaggcctcc 300
 caggtggcgc tggagaactg ttcagcagtg gccgacacce gctgtggctg taagccaggc 360
 tggtttgtgg agtgccaggt cagccaatgt gtcagcagtt cacccttcta ctgccaacca 420
 tgcttagact gcggggccct gcaccgccac acacggctac tctgttcccg cagagatact 480
 gactgtggga cctgcctgcc tggcttctat gaacatggcg atggctgcgt gtccctgccc 540
 acgccacccc cgctcccttg aggagcacce tggggagctg tccagagcgc tgtgccgctg 600
 tctgtggctg gaggcagagt aggtgtgttc tgggtccagg tgctcctggc tggccttgtg 660
 gtccccctcc tgcttggggc caccctgacc tacaca 696

<210> 6
 <211> 633

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

```

<210> 7

<211> 2016

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

```

gagagggaaa agggaaggag gagactgagt gattaagtca ccactgtga agagctggtc    60
ttctatttaa tgggggctct ctctgccag gagtcagagg tgctccagg agcagcagga    120
gcatggccga ggatctggga ctgagctttg gggaaacagc cagtgtggaa atgctgccag    180
agcacggcag ctgcaggccc aaggccagga gcagcagcgc acgctgggct ctcacctgct    240
gcctggtgtt gctccccttc cttgcaggac tcaccacata cctgcttgct agccagctcc    300
gggcccaggg agaggcctgt gtgcagttcc aggtctaaa aggacaggag tttgcacctt    360
cacatcagca agtttatgca cctcttagag cagacggaga taagccaagg gcacacctga    420
cagttgtgag acaaactccc acacagcact ttaaaaatca gttcccagct ctgcactggg    480
aacatgaact aggctgggcc ttcaccaaga accgaatgaa ctataccaac aaattcctgc    540

```

```

tgatcccaga gtcgggagac tacttcattt actcccaggt cacattccgt gggatgacct 600
ctgagtgcag tgaaatcaga caagcaggcc gaccaaacia gccagactcc atcactgtgg 660
tcatcaccaa ggtaacagac agctaccctg agccaaccca gtcctcatg gggaccaagt 720
ctgtatgcga agtaggtagc aactgggtcc agcccatcta cctcggagcc atgtttctct 780
tgcaagaagg ggacaagcta atgggtgaacg tcagtgcacat ctctttgggtg gattacacaa 840
aagaagataa aaccttcttt ggagccttct tactatagga ggagagcaaa tatcattata 900
tgaaagtcct ctgccaccga gttcctaatt ttctttgttc aaatgtaatt ataaccaggg 960
gttttcttgg ggccgggagt agggggcatt ccacagggac aacggtttag ctatgaaatt 1020
tggggccccaa aatttcacac ttcattgtgc ttactgatga gactactaac tggaaaaggc 1080
tgaagagagc aaatatatta ttaagatggg ttggaggatt ggcgagtttc taaatattaa 1140
gacactgatc actaaatgaa tggatgatct actcgggtca ggattgaaag agaaatatatt 1200
caacacctcc ctgctataca atggtcacca gtgggtccagt 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 gatattctaaa 1500
taaggaagta tgagtttcac atgtatatca aaaatacaac agttgcttgt attcagtaga 1560
gttttcttgc ccacctattt tgtgctgggt tctaccttaa ccagaagac actatgaaaa 1620
acaagacaga ctccactcaa aatttatatg aacaccacta gatacttcct gatcaaacat 1680
cagtcaacat actctaaaga ataactcaa gtcttggcca ggcgagtggt ctcacacctg 1740
taatcccaac actttgggag gccaagggtg gtggatcatc taaggccggg agttcaagac 1800
cagcctgacc aacgtggaga aaccccatct ctactaaaaa tacaaaatta gccgggcgtg 1860
gtagcgcagtg gctgtaatcc tggctactca ggaggccgag gcagaagaat tgcttgaact 1920
ggggaggcag aggttgcggt gagcccagat cgcgccattg cactccagcc tgggtaacaa 1980
gagcaaaact ctgtccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 2016

```

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 8
 cagtgagtcc cagaagaggt 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 9
 ggatagcccc aaaaaggaac 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 10
 tccttttttg ggctatcctg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 11
 ggtattttctc catgacgctt 20

<210> 12

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 12
 ttcacccttc tactgccaac 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 13
 taaccagggg cttgtgaggc 20

<210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 14
 cgctcttgct ctctgtgtat g 21

<210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Sintetizado quimicamente

<400> 15
 ctgccagccc tcttccatc 19

<210> 16

<211> 702
 <212> DNA
 <213> Camundongo

<400> 16
 atggaggcac ggctgctgcg gggctgctg gtggagcctc tgttcctacc actgctgctg 60
 ctgctgctgc tgctgcttgg tggccagggc cagggcggca tgtctggcag gtgtgactgt 120
 gccagtgagt ccagaagag gtatggcccg ttttgttgca ggggctgccc aaagggacac 180
 tacatgaagg cccctgcgcg agaaccctgt ggcaactcca cctgccttcc ctgtccctcg 240
 gacaccttct tgaccagaga caaccacttt aagactgact gtaccgctg ccaagtctgt 300
 gatgaagagg cccttcaagt gacccttgag aactgctcgg caaagtcgga caccactgt 360
 ggctgccagt caggctggtg tgttgactgc tccaccgagc catgtgggaa aagctcacct 420
 ttctcttggtg tcccatgcgg ggctacaaca ccagtccatg aggctccaac ccccggccc 480
 tgctgctgctg gcttctatat acgtggcaat gactgcacgt cctgccccac gggcttcagc 540
 agcgtttgcc ctaaggcttg cactgctgtc tgtggctgga agcagatgtt ttgggtccag 600
 gtgcttctag gagtcgcggt cctttttggg gctatcctga tctgtgcata tggctctgga 660
 agcgggagcg tcgacgatct ttacgacgat gataaatagt aa 702

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado, que se liga a um antígeno de Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), caracterizado pelo fato de ser capaz de atuar como um agonista de TNFR25.
- 5 2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser capaz de aumentar a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle.
3. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1,
10 caracterizado pelo fato de o antígeno de Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25) ser humano ou de camundongo.
4. Toxina específica para Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), caracterizada pelo fato de compreender um agente tóxico ligado a um polipeptídeo que se liga ao
15 receptor TNFR25.
5. Toxina, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de dito polipeptídeo compreender o anticorpo monoclonal 4C12 ou uma porção imuno específica do mesmo.
6. Toxina, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada
20 pelo fato de dito agente tóxico ser selecionado do grupo consistindo de um isótopo radioativo, ricina, abrina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas, e íon metálico.
7. Toxina, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada
25 pelo fato de dito polipeptídeo compreender uma proteína TL1A de uma porção ligante a TNFR25 da mesma.
8. Método para ativar o Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), expressado numa célula, caracterizado pelo fato de compreender:
30 a). contatar a célula com um agonista de TNFR25, sendo que dito agonista é selecionado do grupo consistindo de:
 - i. um anticorpo monoclonal 4C12;
 - ii. um anticorpo que se liga a um Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), sendo que dito anticorpo é
35 capaz de aumentar a expansão de células OT-I CD8 quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle;

- iii. um TL1A solúvel;
- iv. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo de agonista de TNFR25;
- 5 v. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um TL1A solúvel; e
- vi. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um TNFR25;
- b. observar um aumento na sinalização do receptor TNFR25.
- 10 9. Anticorpo isolado, que se liga a um antígeno de Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), caracterizado pelo fato de ser capaz de atuar como um antagonista de TNFR25.
- 10. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ligar-se a um antígeno de TL1A,
- 15 sendo que dito anticorpo é capaz de reduzir a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle.
- 11. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de dito antígeno de Receptor de
- 20 Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25) ser humano ou de camundongo.
- 12. Método para inibir a sinalização do Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25) numa célula, caracterizado pelo fato de compreender:
- 25 a. contatar a célula com um antagonista de TNFR25, sendo que dito agonista é selecionado do grupo consistindo de:
 - i. um anticorpo monoclonal L4G6
 - ii. um anticorpo que se liga ao Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), sendo que dito anticorpo é
 - 30 capaz de reduzir a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle;
 - iii. um anticorpo específico para TL1A solúvel;
 - iv. uma proteína de fusão compreendendo uma porção
 - 35 extracelular de TNFR25;
 - v. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica da porção extracelular de

TNFR25;

- v. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo específico para TL1A solúvel; e
- 5 vi. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de L4G6;
- b. observar uma redução na sinalização de receptor TNFR25.
- 13. Vacina antitumoral, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno tumoral e um agonista de TNFR25
- 10 como modificador de resposta biológica.
- 14. Vacina, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de dito agonista de TNFR25 ser selecionado do grupo consistindo de:
 - a. um anticorpo monoclonal 4C12;
 - 15 b. um anticorpo que se liga a um Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), sendo que dito anticorpo é capaz de aumentar a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle;
 - 20 c. um TL1A solúvel;
 - d. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo de agonista de TNFR25;
 - e. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz
 - 25 de ativar a expressão transgênica de um TL1A solúvel; e
 - f. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de TNFR25.
- 15. Vacina, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de compreender ainda um adjuvante.
- 30 16. Método para imunizar um paciente contra tumor, caracterizado pelo fato de compreender isolar um antígeno tumor-específico de dito tumor, e administrar ao paciente uma vacina antitumoral, conforme definida na reivindicação 14.
- 35 17. Método para tratar câncer num paciente, caracterizado pelo fato de compreender a depleção de células T CD4+/CD25+ reguladoras (Tregs) num paciente, provendo ao paciente uma

composição que compreende a toxina, conforme definida na reivindicação 4; e prover um agente quimioterápico ao paciente.

18. Método para tratar e/ou prevenir inflamação intestinal, caracterizado pelo fato de compreender prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição terapêutica compreendendo um agonista de TNFR25.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de a condição de inflamação intestinal ser selecionada do grupo consistindo de doença intestinal inflamatória, doença de Crohn e colite ulcerativa.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de dito agonista de TNFR25 ser selecionado do grupo consistindo de

15 a. TL1A solúvel

b. um anticorpo monoclonal 4C12

c. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo de agonista de TNFR25;

20 d. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um TL1A solúvel; e

e. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um TNFR25.

21. Composição terapêutica para a facilitação de um transplante de órgão, caracterizada pelo fato de compreender um antagonista de TNFR25 e um imunossupressor.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de o imunossupressor ser selecionado do grupo consistindo de glucocorticóide, azatioprina, metotrexato, ciclosporina, ciclofosfamida, mercaptopurina, tacrolimus e micofenolato mofetil.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de dito antagonista de TNFR25 ser selecionado do grupo consistindo de:

35 a. um anticorpo monoclonal L4G6

b. um anticorpo que se liga a um Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25) e que é capaz de reduzir a

- expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle;
- c. um anticorpo específico para TL1A solúvel;
 - 5 d. uma proteína de fusão compreendendo uma porção extracelular de TNFR25;
 - e. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica da porção extracelular de TNFR25;
 - 10 f. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo específico para TL1A solúvel; e
 - g. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de L4G6.
- 15 24. Método para transplantar um tecido de um doador para um hospedeiro, caracterizado pelo fato de compreender:
- a. obter o tecido do doador;
 - b. prover ao hospedeiro a composição, conforme definida na reivindicação 21;
 - 20 c. transplantar o tecido no hospedeiro.
- 25 25. Método para inibir a expressão clonal de uma população de células T CD8 cognatas, caracterizado pelo fato de compreender:
- a. expor as células T CD8 a seu antígeno cognato; e
 - 25 b. expor as células T CD8 a um antagonista de TNFR25.
26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de dito antagonista de TNFR25 ser selecionado do grupo consistindo de:
- a. um anticorpo monoclonal L4G6
 - 30 b. um anticorpo que se liga a um Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), sendo que dito anticorpo é capaz de reduzir a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle;
 - 35 c. um anticorpo específico para TL1A solúvel;
 - d. uma proteína de fusão compreendendo uma porção extracelular de TNFR25;

e. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica da porção extracelular de TNFR25;

5 f. um vetor de expressão com um cassete de expressão, capaz de ativar a expressão transgênica de um anticorpo específico para TL1A solúvel; e

g. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica de L4G6.

10 27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de o antígeno cognato estar associado com o tecido a ser transplantado de um doador para um hospedeiro.

28. Método para tratar e/ou prevenir inflamação pulmonar, caracterizado pelo fato de prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição terapêutica
15 compreendendo o antagonista de TNFR25.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de dita condição inflamatória ser resultado de asma.

20 30. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de o antagonista de TNFR25 ser selecionado do grupo consistindo de:

a. um anticorpo monoclonal L4G6

b. um anticorpo que se liga a um Receptor de Fator de Necrose Tumoral 25 (TNFR25), sendo que dito anticorpo é
25 capaz de reduzir a expansão de célula CD8 OT-I quando da preparação cruzada através de gp96-Ig-ovalbumina em relação a um anticorpo de controle;

c. um anticorpo específico para TL1A solúvel;

d. uma proteína de fusão compreendendo uma porção
30 extracelular de TNFR25;

e. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz de ativar a expressão transgênica da porção extracelular de TNFR25;

f. um vetor de expressão com um cassete de expressão, capaz
35 de ativar a expressão transgênica de um anticorpo específico para TL1A solúvel; e

g. um vetor de expressão com um cassete de expressão capaz

de ativar a expressão transgênica de L4G6.

31. Antagonista de TNFR25 isolado, caracterizado pelo fato de compreender um polipeptídeo codificado por um ácido nucleico compreendendo uma seqüência que hibridiza sob
5 condições estringentes com as SEQ ID NOS: 4, 5, 6 e/ou 16, e sendo que dita seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína TL1A.

32. Antagonista, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de dita seqüência hibridizar sob
10 condições estringentes com a SEQ ID NO: 4.

33. Antagonista, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de dita seqüência hibridizar sob condições estringentes com a SEQ ID NO: 5.

34. Antagonista, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de dita seqüência hibridizar sob
15 condições estringentes com a SEQ ID NO: 6.

35. Antagonista, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de dito TL1A ser TL1A humano.

36. Antagonista, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de dito TL1A ser TL1A de
20 camundongo.

37. Método para tratar e/ou prevenir inflamação pulmonar, caracterizado pelo fato de prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição terapêutica
25 compreendendo o antagonista de TNFR25, conforme definido na reivindicação 31.

38. Método para transplantar um tecido de um doador para um hospedeiro, caracterizado pelo fato de compreender:

- a. obter o tecido do doador;
- 30 b. prover ao hospedeiro o antagonista de TNFR25, conforme definido na reivindicação 31;
- c. transplantar o tecido para o hospedeiro.

39. Composição, caracterizada pelo fato de compreender um polipeptídeo codificado por uma seqüência que hibridiza sob
35 condições estringentes com as SEQ ID NOS: 3 e/ou 7, e sendo que dita seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor TNFR25; e um

agente tóxico.

40. Composição, de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de dito agente tóxico ser selecionado do grupo consistindo de isótopo radioativo, ricina, abrina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas, e íon metálico.

41. Método para tratar câncer num paciente, caracterizado pelo fato de compreender a depleção de células T CD4+/CD25+ reguladoras (Treg) de um paciente, provendo ao paciente uma composição compreendendo a toxina, conforme definina na reivindicação 39; e prover um agente quimioterápico a um paciente.

42. Método para tratar e/ou prevenir inflamação intestinal, caracterizado pelo fato de compreender prover a um paciente necessitado uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo um polipeptídeo codificado por uma seqüência que hibridiza sob condições estringentes com as SEQ ID NOS: 3 e/ou 7, e sendo que dita seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor TNFR25.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de dita inflamação intestinal estar associada com a síndrome do intestino irritável.

44. Método, de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de dita inflamação intestinal ser doença de Crohn.

45. Vacina antitumoral, caracterizada pelo fato de compreender um antígeno tumoral e um polipeptídeo codificado por uma seqüência que hibridiza sob condições estringentes com as SEQ ID NOS: 3 e/ou 7, e sendo que dita seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor TNFR25, como modificador de resposta biológica.

46. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza sob condições estringentes com as SEQ ID NOS: 3 e/ou 7, e sendo que dita seqüência codifica uma seqüência de

aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína de receptor TNFR25.

47. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de ácido nucleico que hibridiza
5 sob condições estridentes com as SEQ ID NOs: 4, 5 e/ou 16, e sendo que dita seqüência codifica uma seqüência de aminoácido capaz de ligar-se a uma proteína TL1A.

FIG.1a

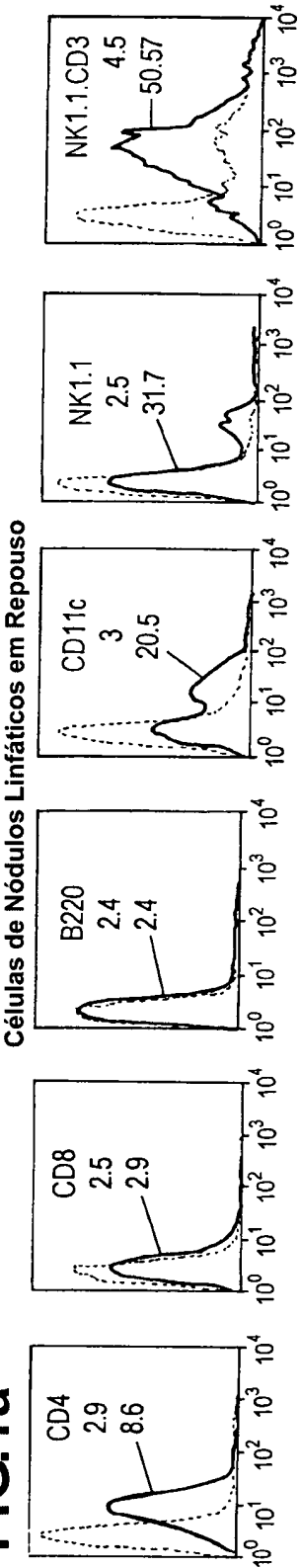
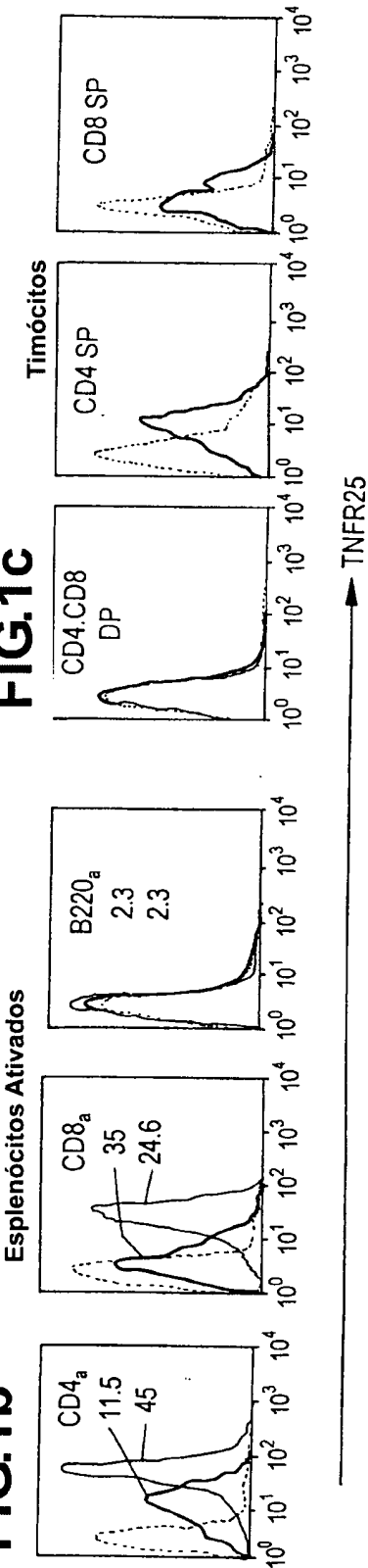


FIG.1b



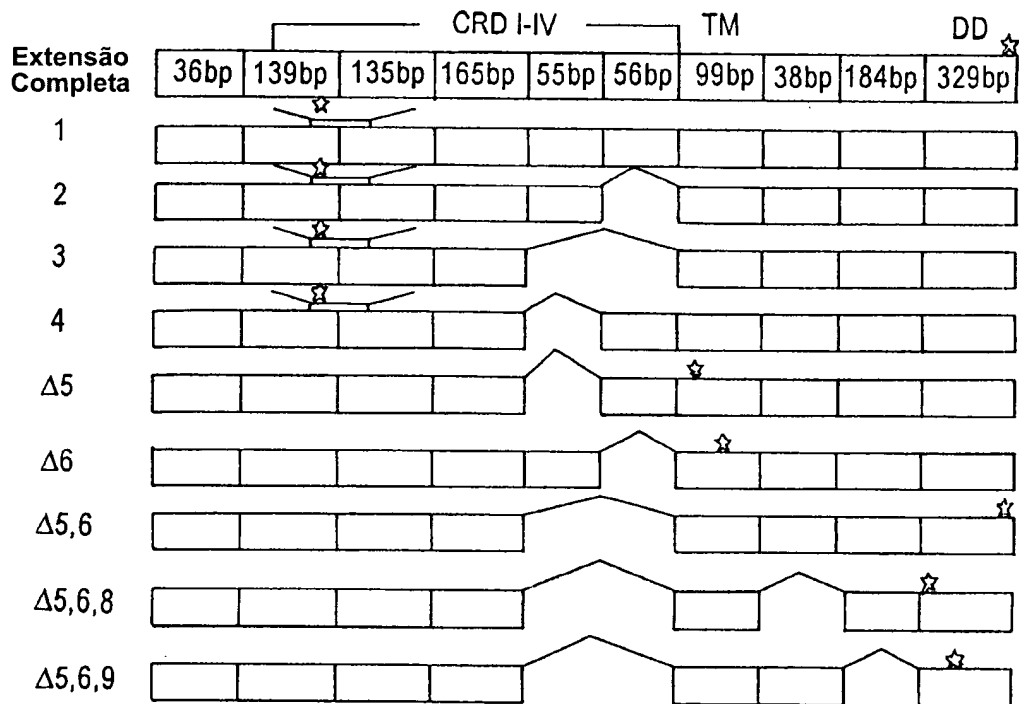
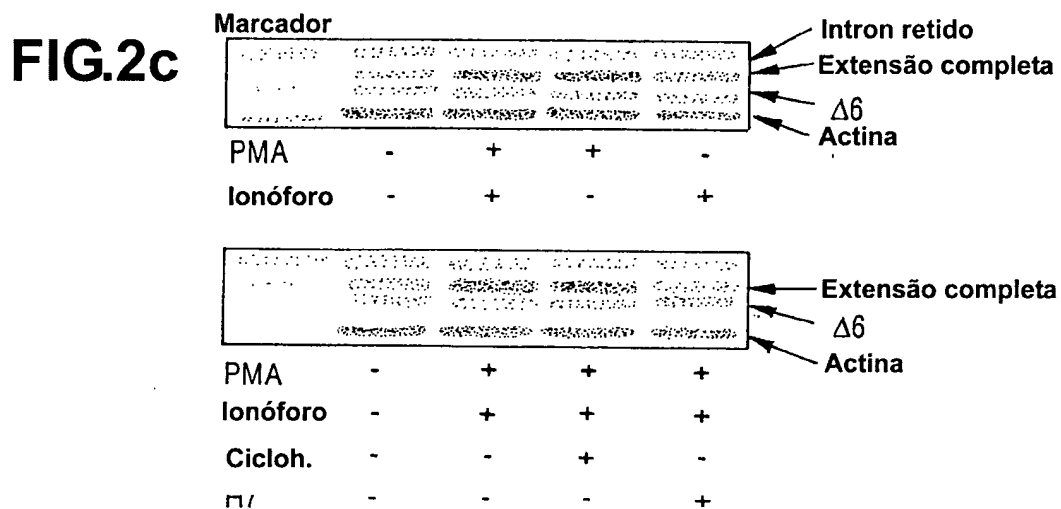
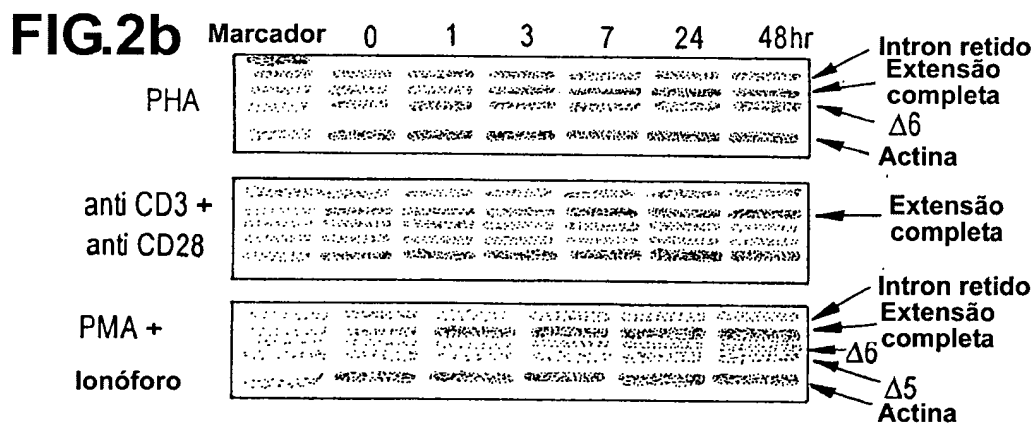


FIG.2a



Células de nódulos linfáticos TNFR25-tg

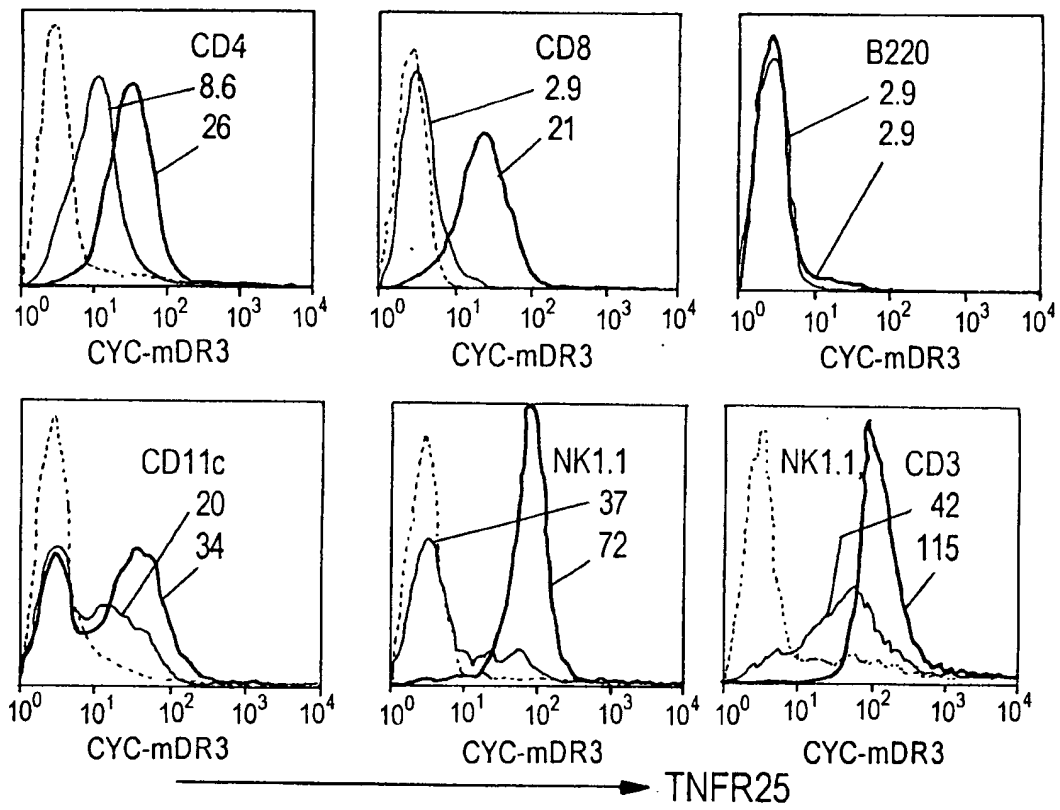


FIG.3a

4/26

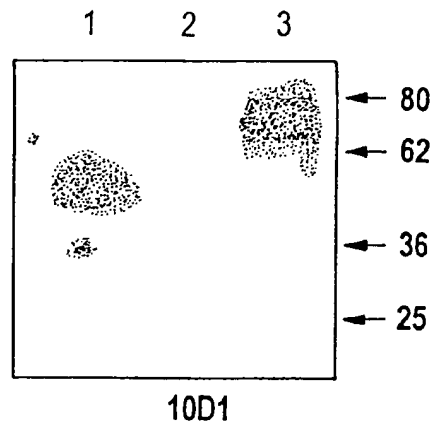


FIG.3b

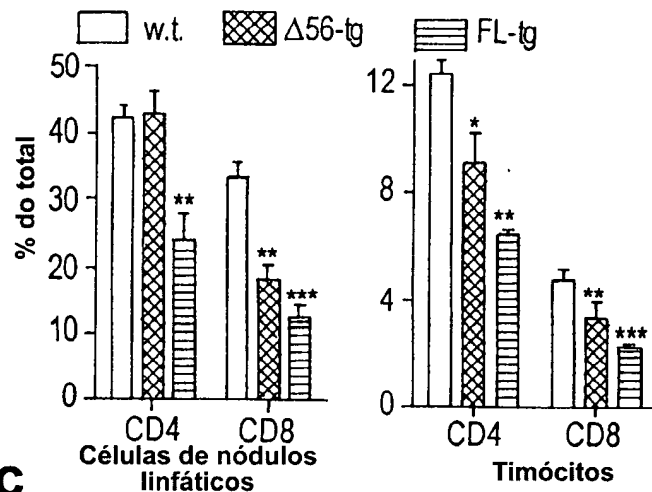


FIG.3c

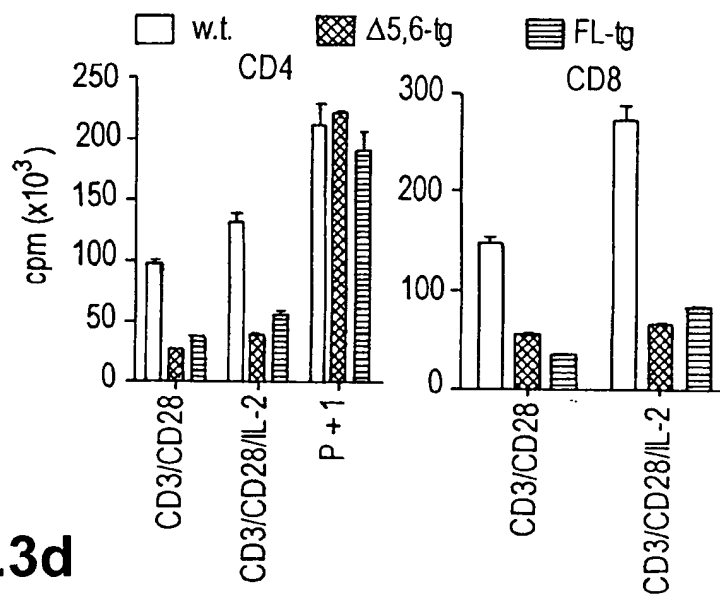


FIG.3d

5/26

FIG.3e

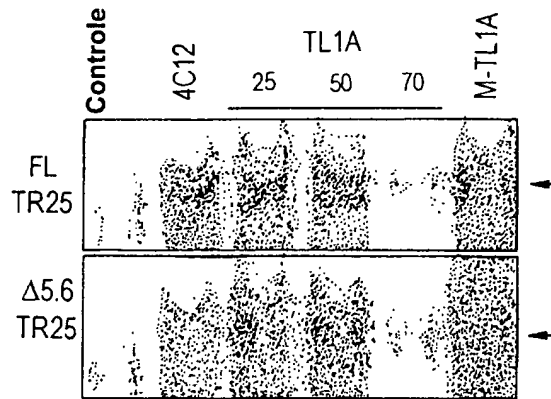


FIG.3f

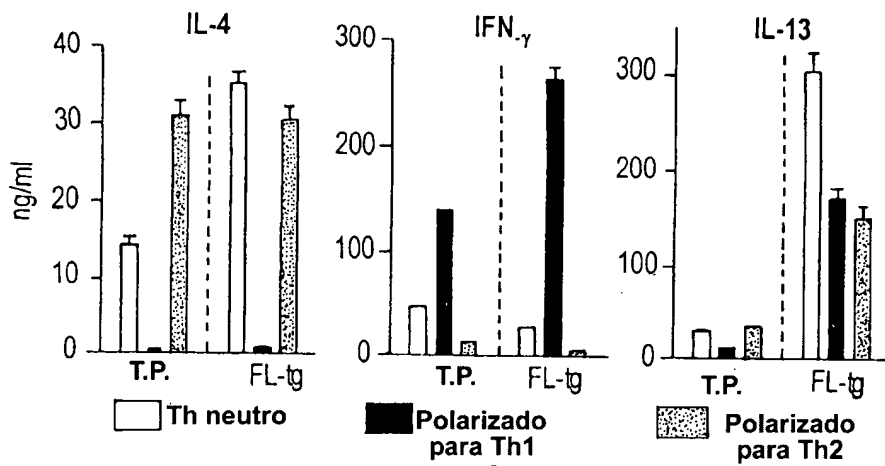
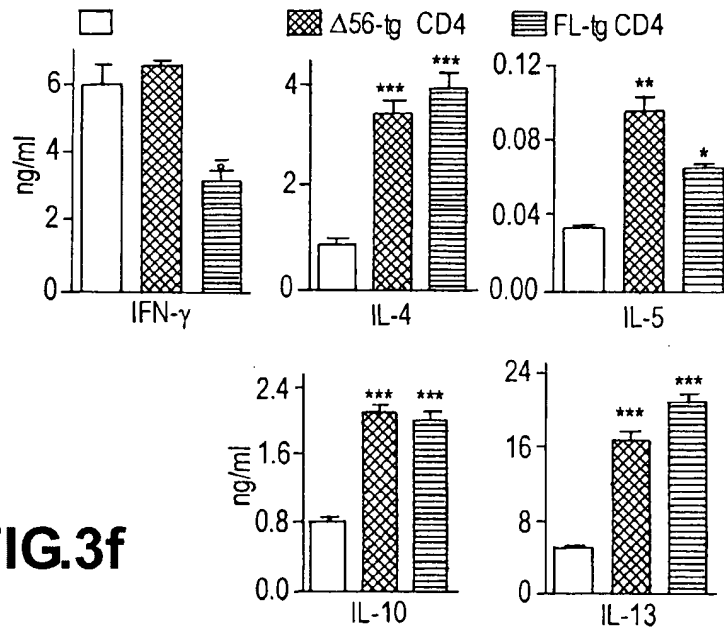


FIG.3g

6/26

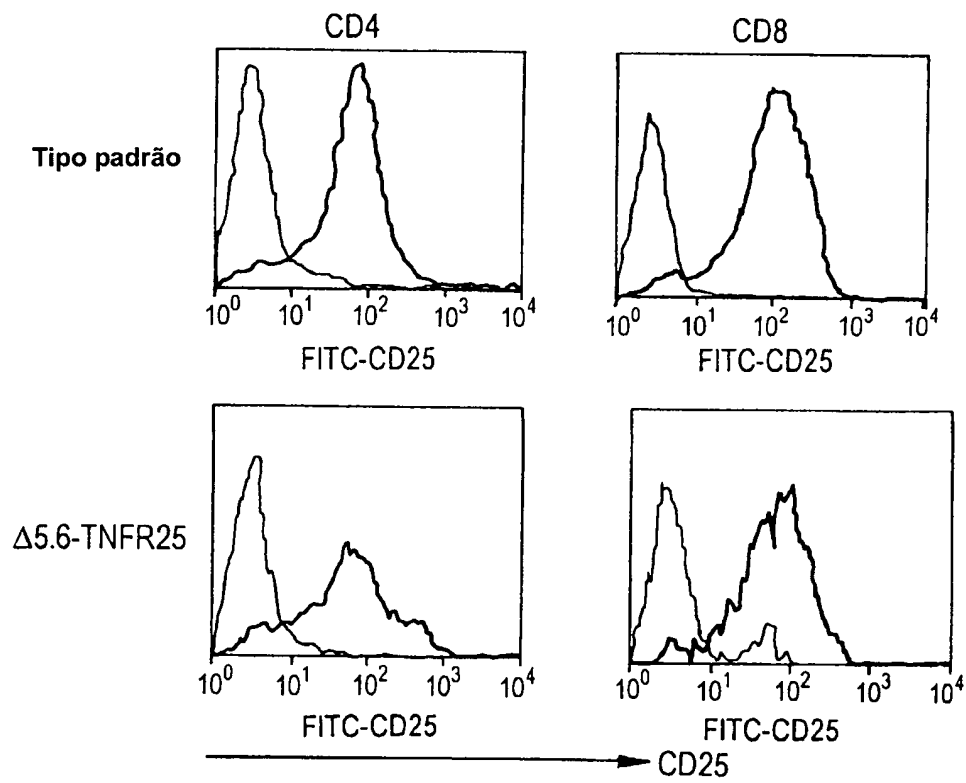


FIG.4a

7/26

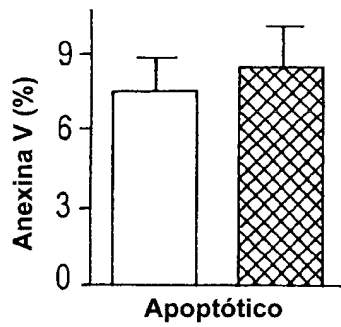


FIG.4b

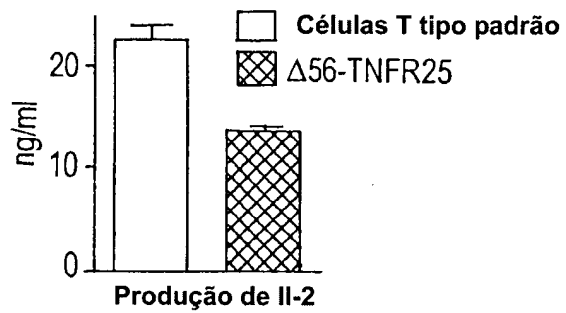


FIG.4c

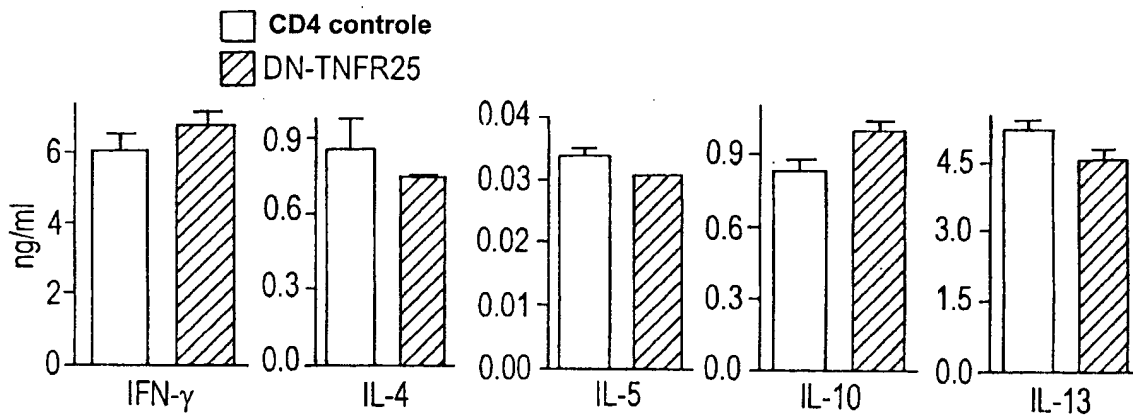


FIG.4d

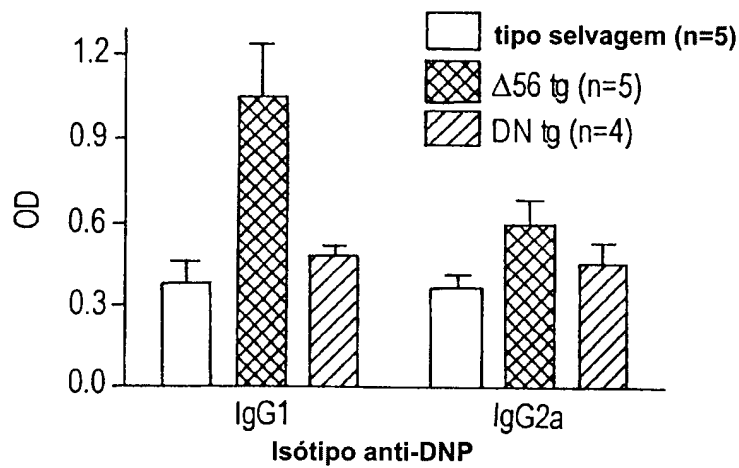


FIG.4e

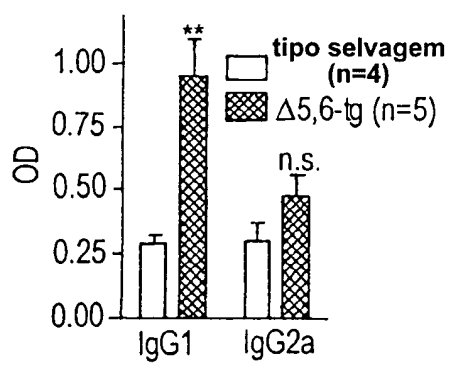


FIG.5a

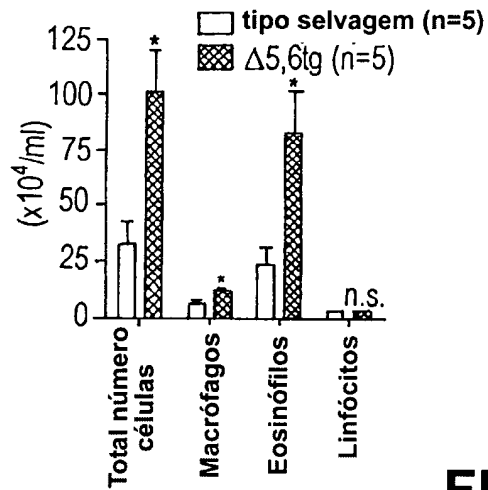


FIG.5b

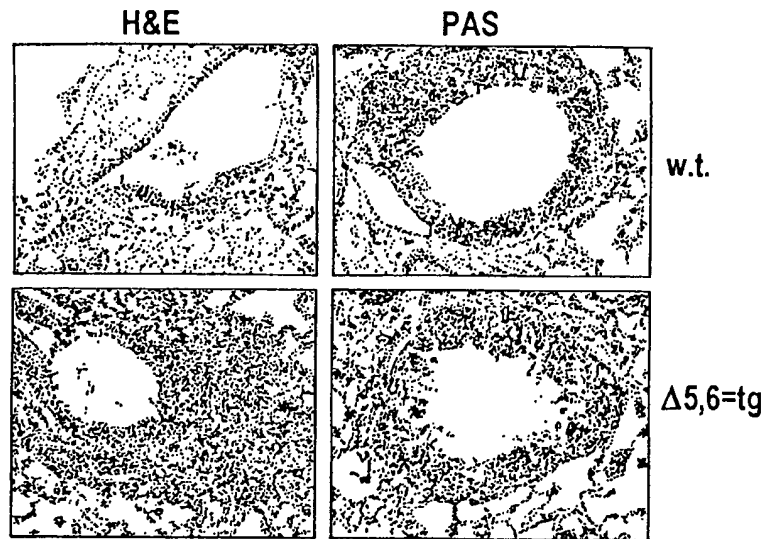


FIG.5c

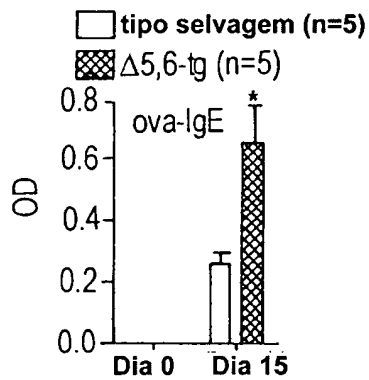


FIG.5d

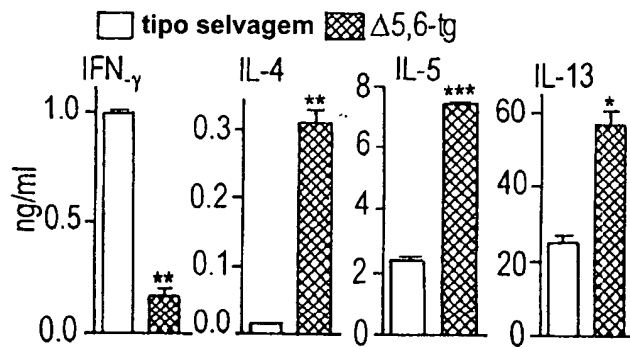


FIG.5e

9/26

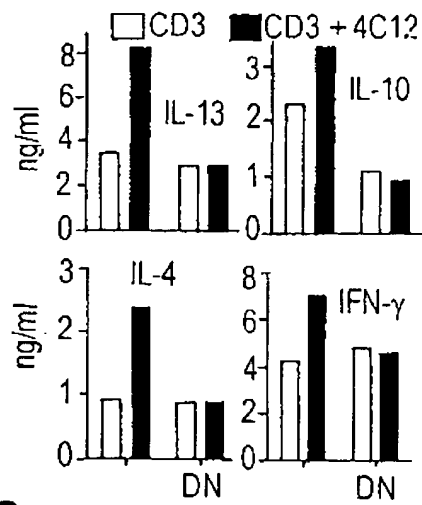


FIG.6a

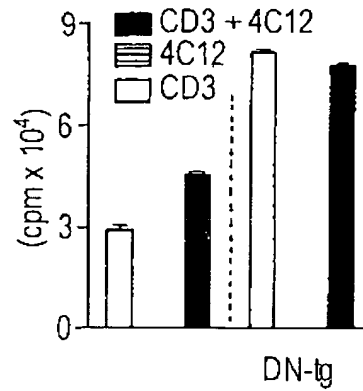


FIG.6b

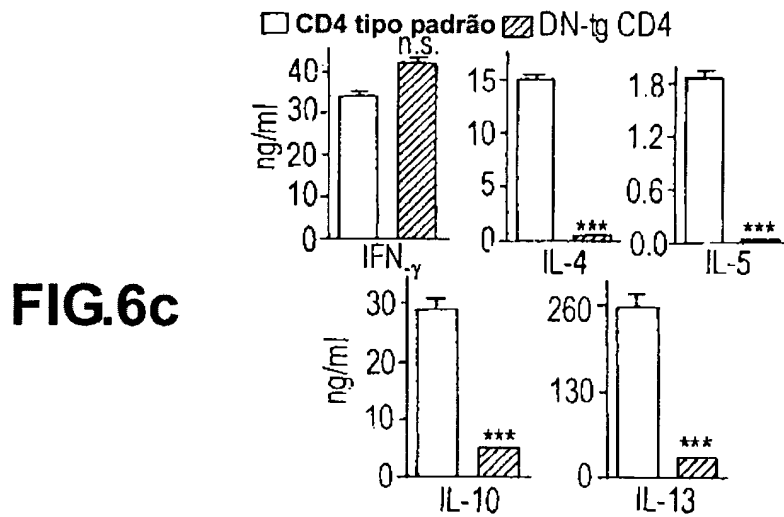


FIG.6c

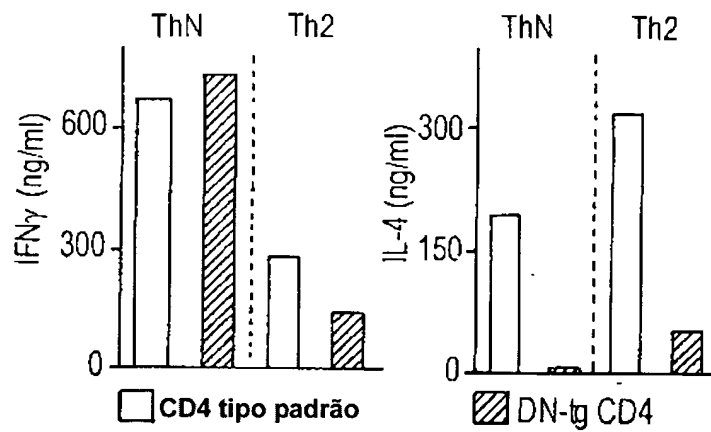


FIG.6d

10/26

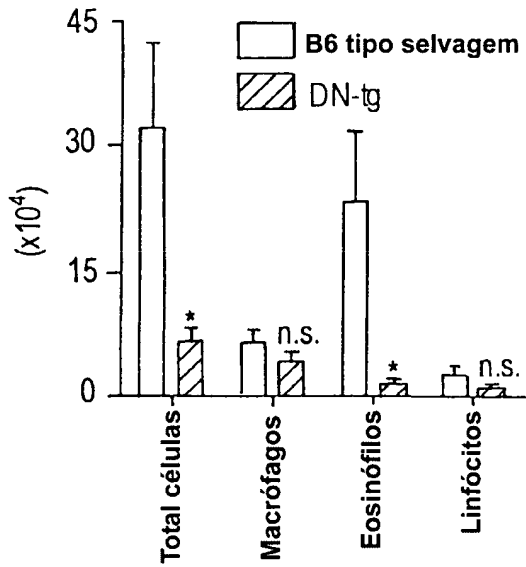


FIG.6e

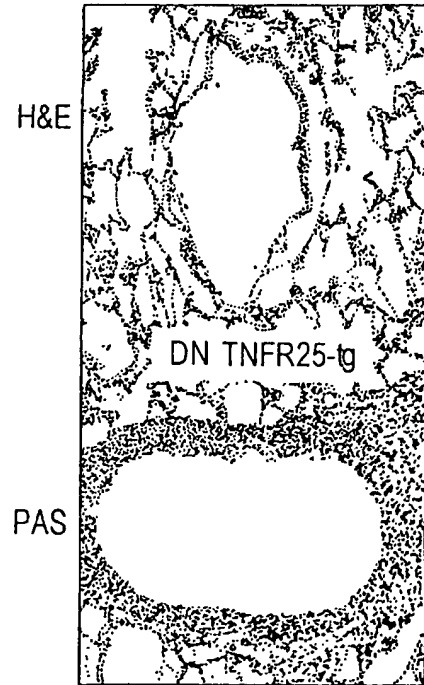


FIG.6f

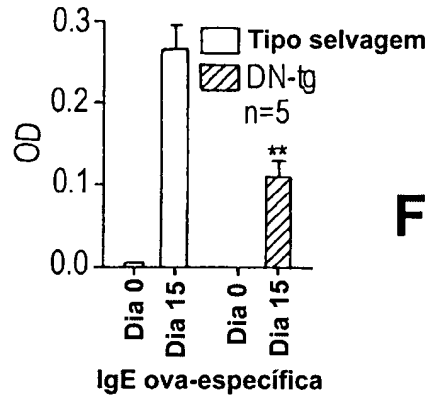


FIG.6g

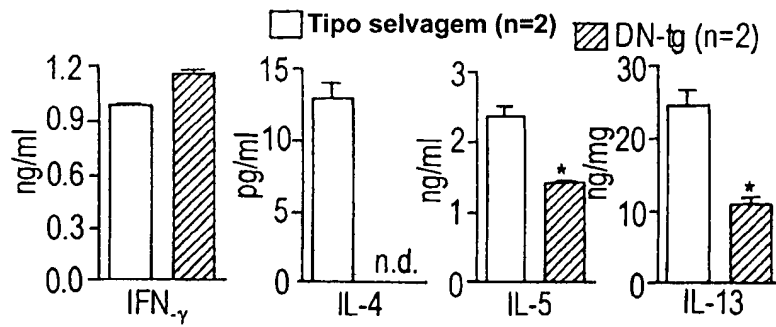


FIG.6h

FIG.7c

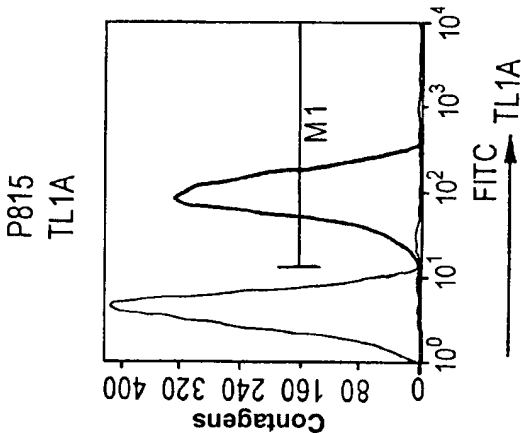


FIG.7b

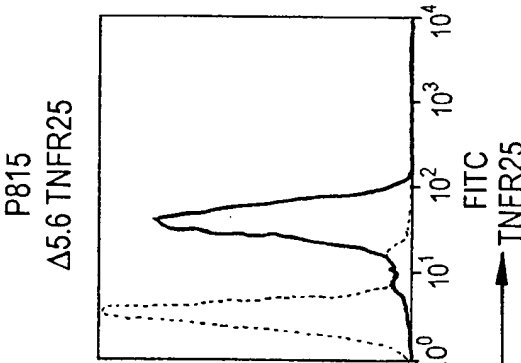
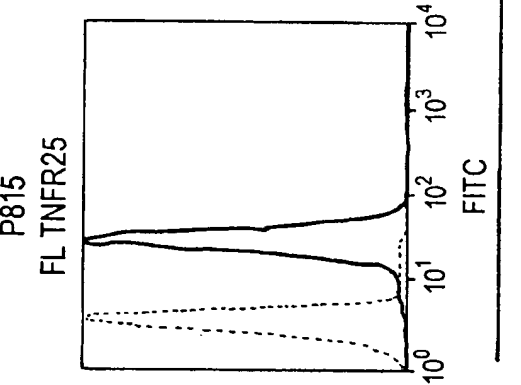


FIG.7a



12/26

FIG.7d

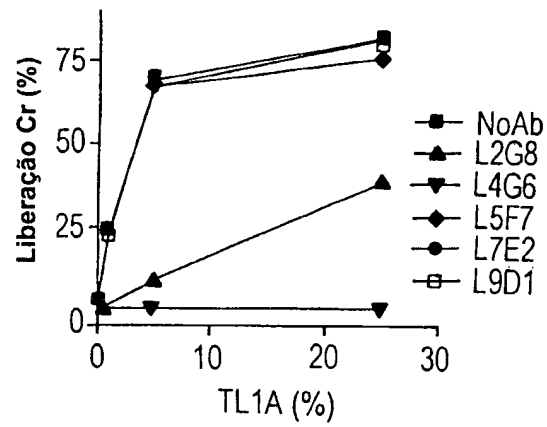


FIG.7e

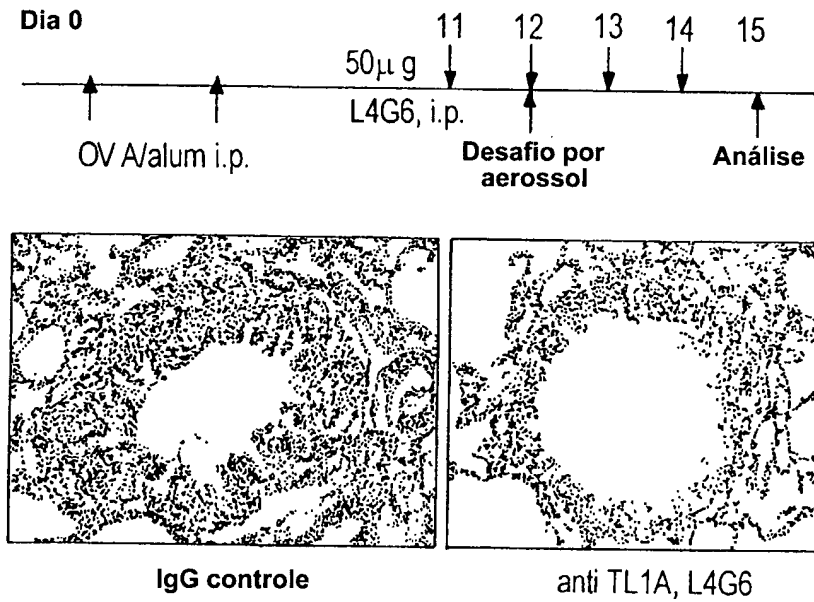


FIG.7f

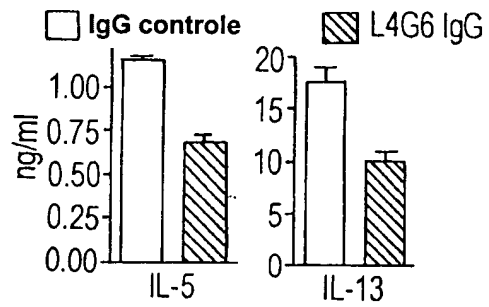
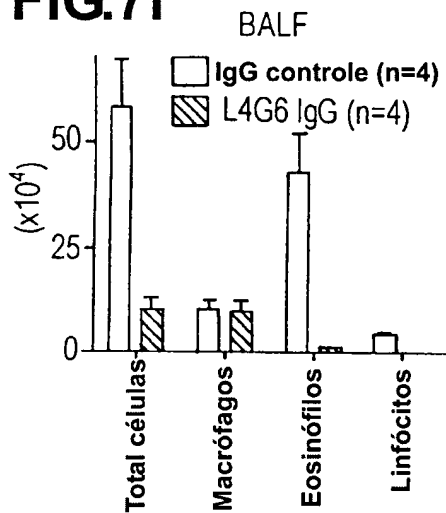


FIG.7g

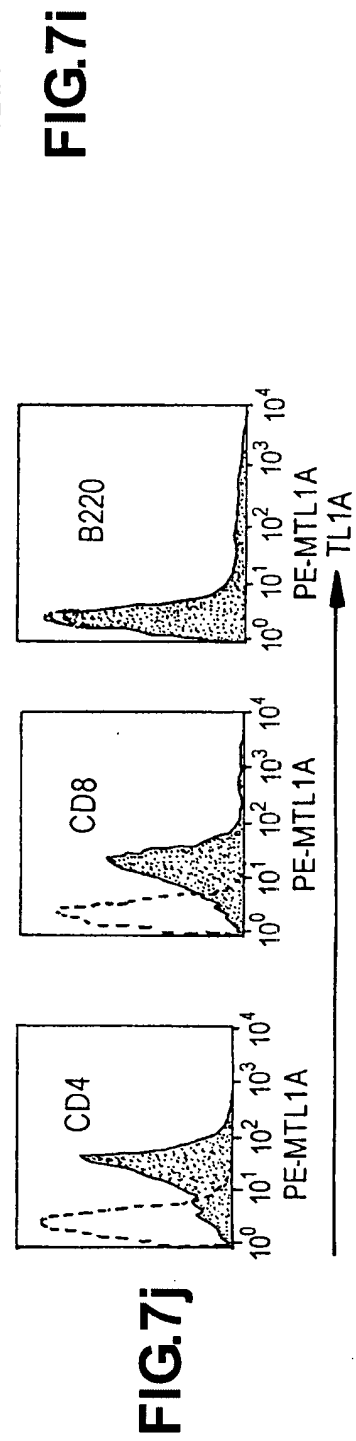
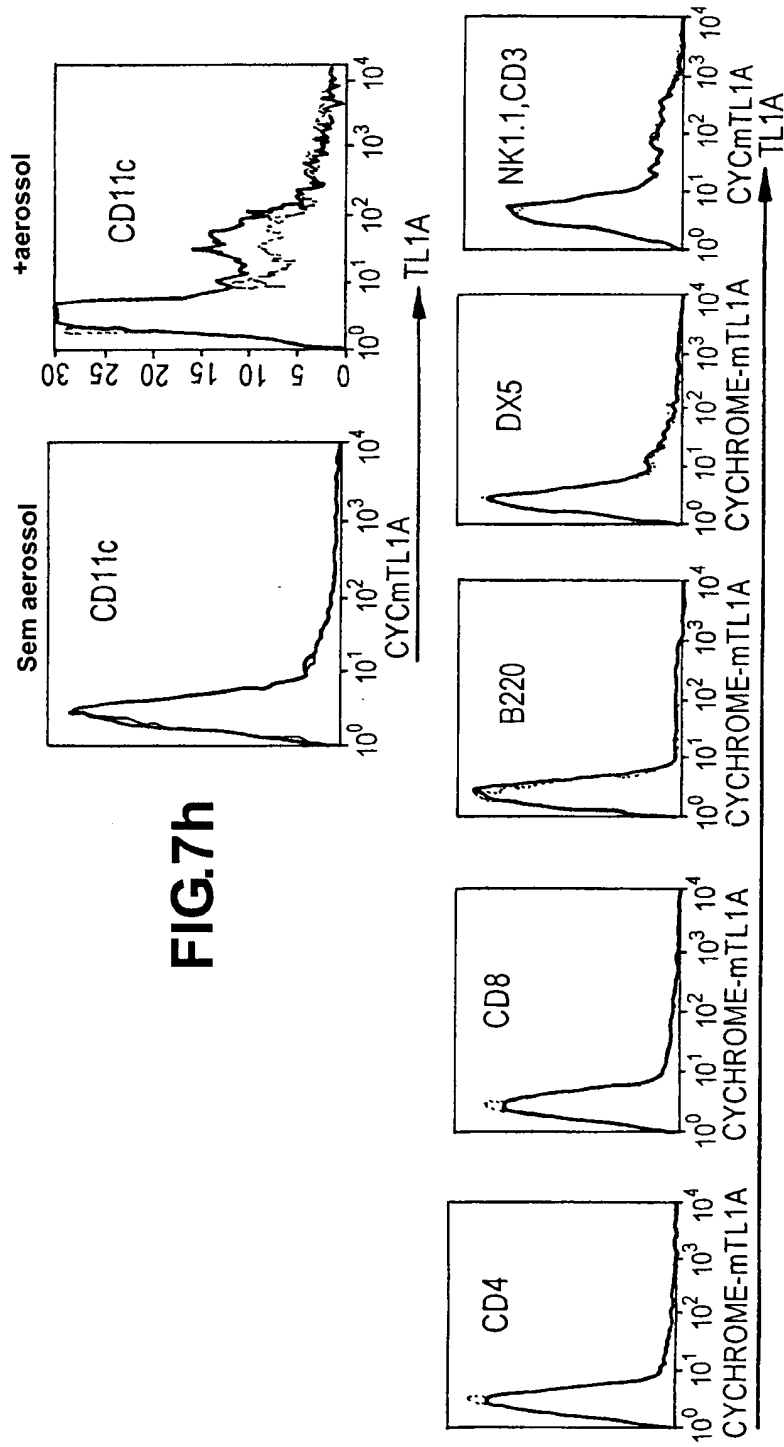


FIG.7j

14/26

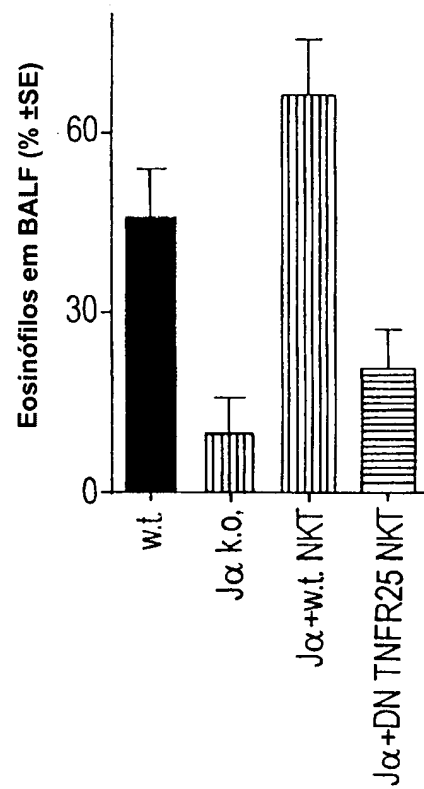


FIG.8

15/26

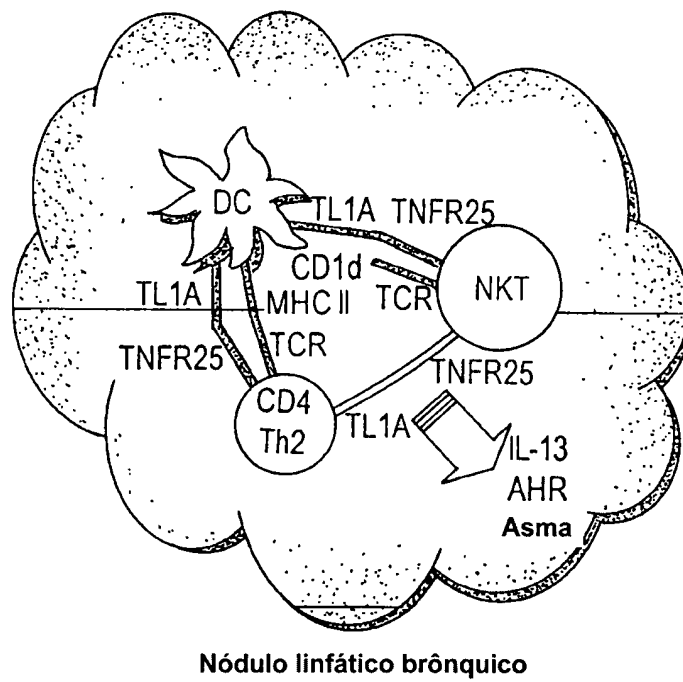


FIG.9

16/26

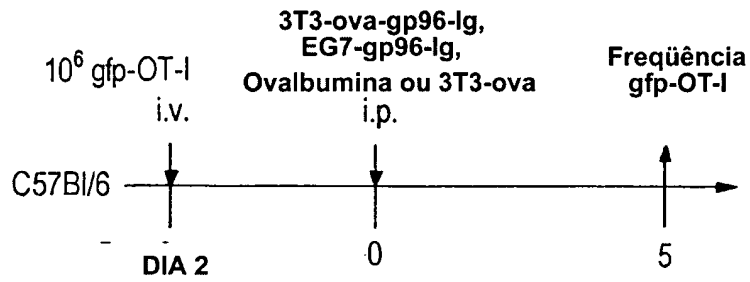


FIG.10a

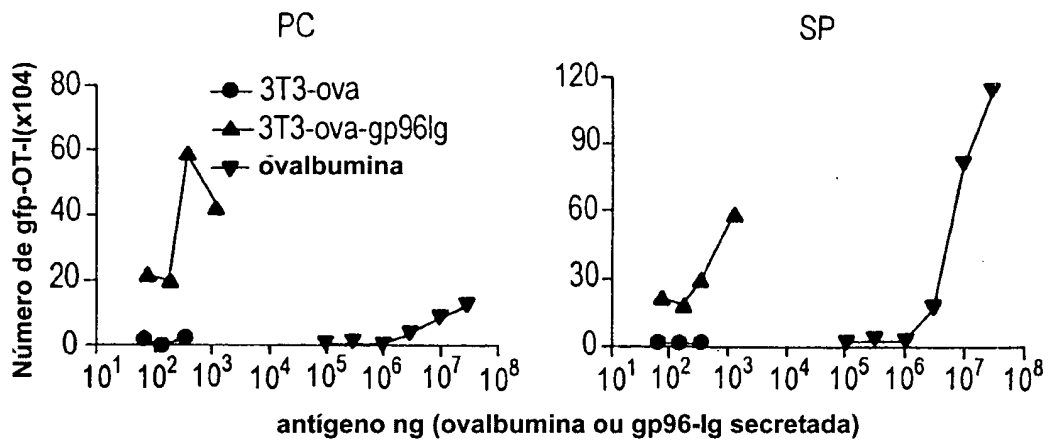


FIG.10b

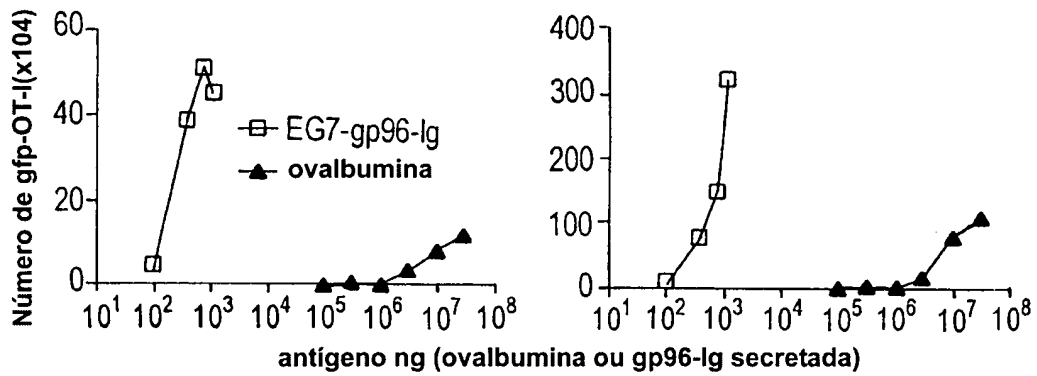
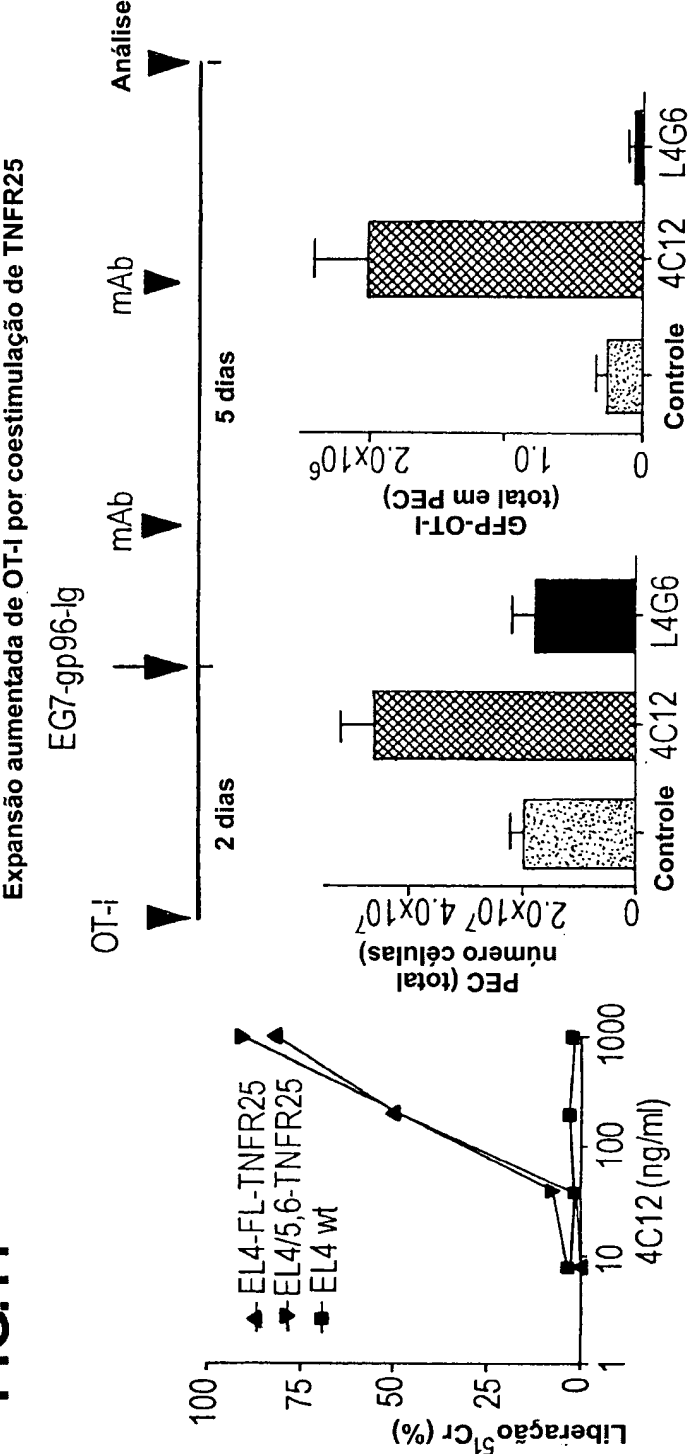


FIG.10c

FIG.11



Mecanismo de Preparação cruzada de CD8 através de gp96-Ig secretada

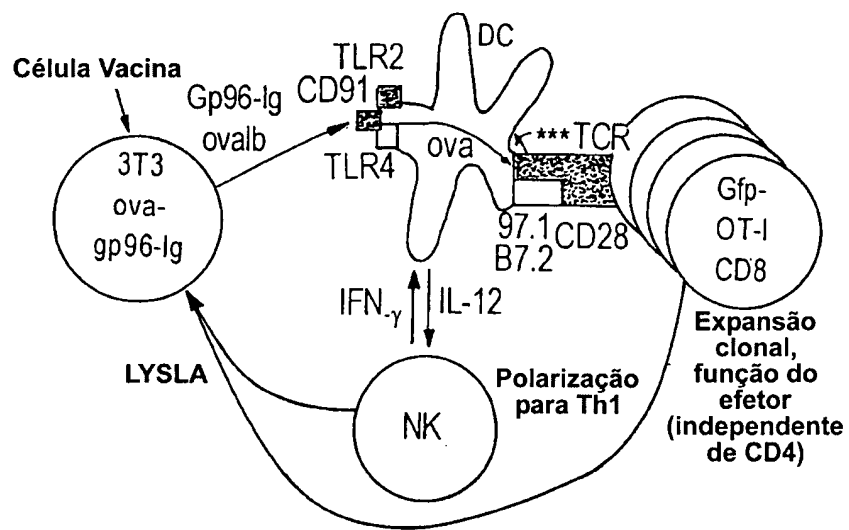


FIG.12

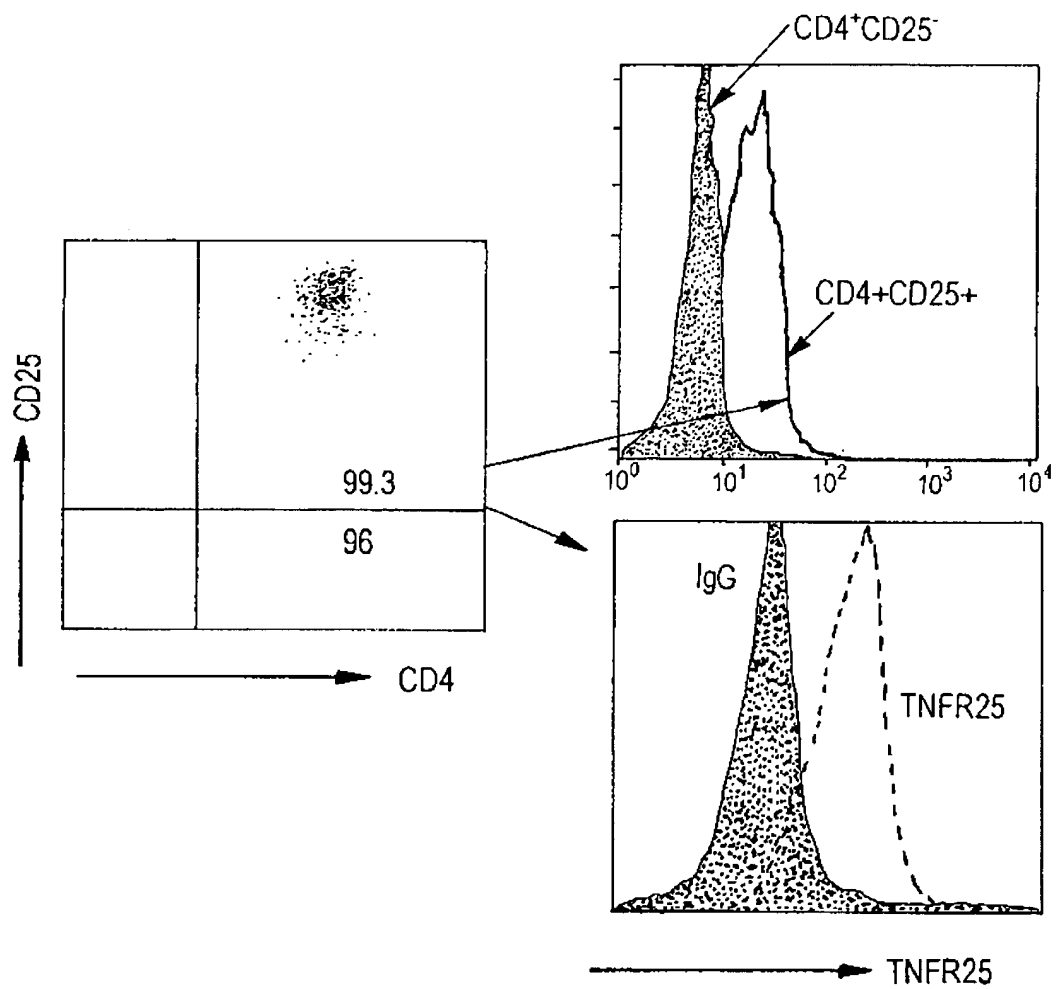


FIG.13

Requisito de TNFR25 para recuperação de colite

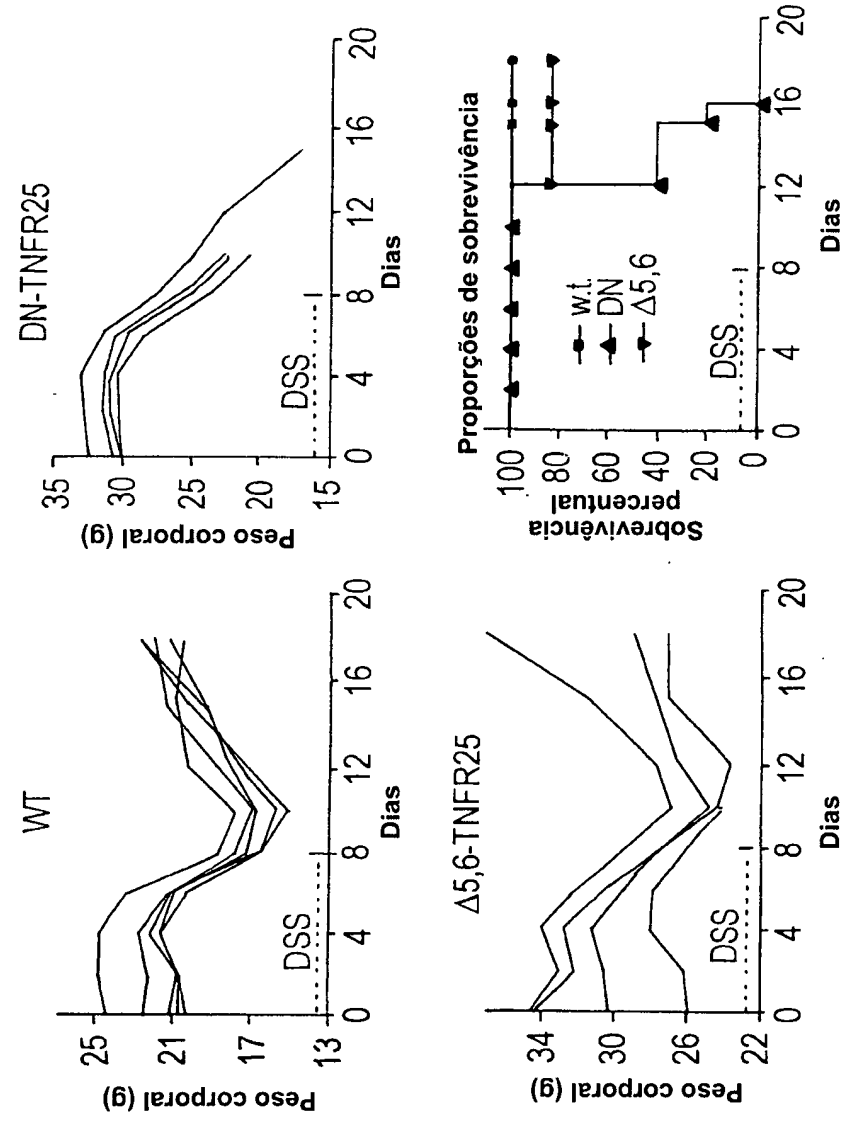


FIG.14

21/26

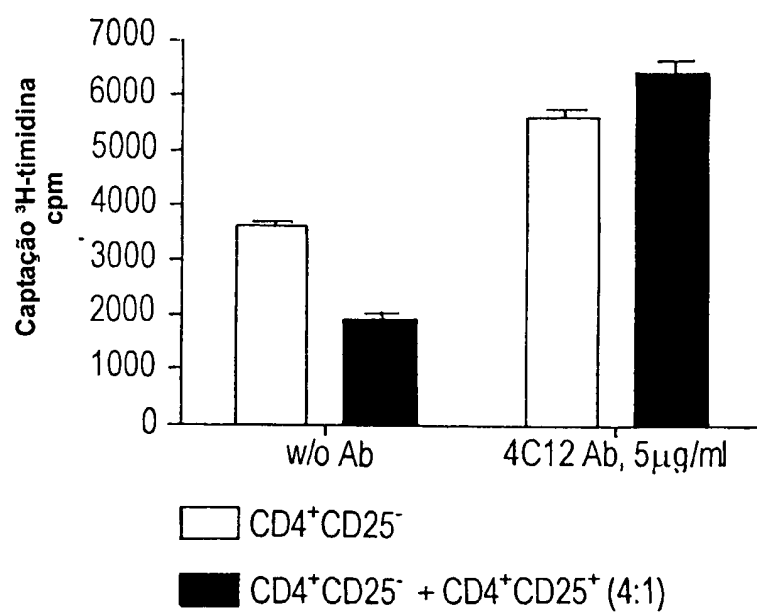


FIG.15

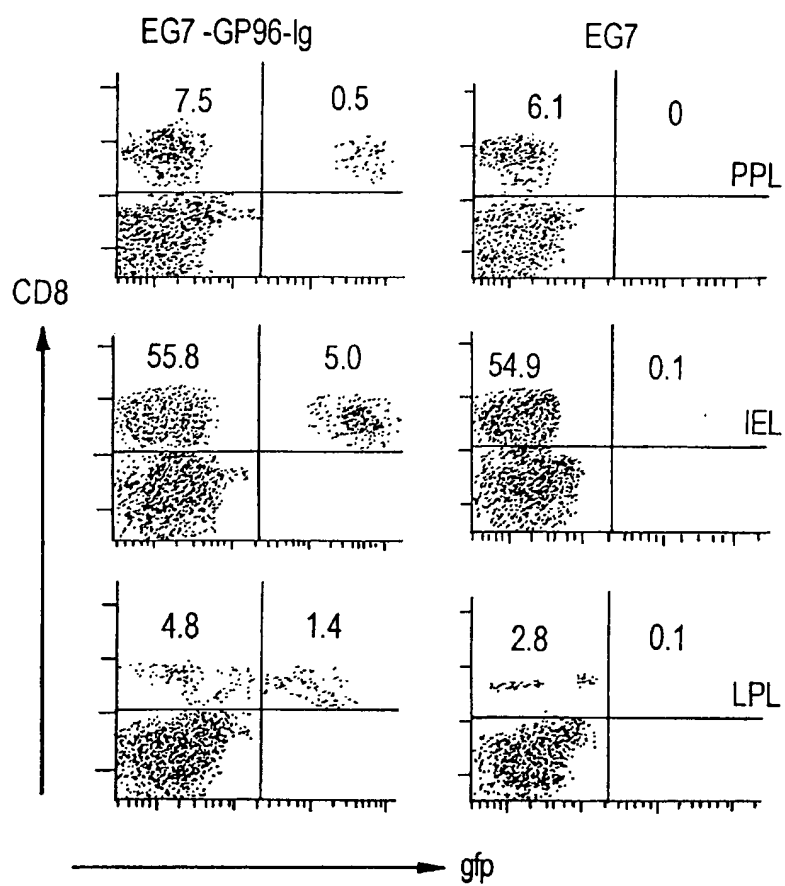


FIG.16

SEQ ID NO: 1 - TNFR25 cDNA de camundongo; NM_033042

1	gggagttggt	ctggatggcg	cgggggagg	cgggcagcag	ctactctagt	ctaggaacat
61	aggggctgag	ctggttgggg	aagccccggg	ttacgcgacc	gaccagagcc	gcactcacia
121	ggggccaggc	ggtacacacc	gcaatggagg	cacggctgct	gcggggctgc	gtggtggagc
181	ctctgttcct	accactgctg	ctgctgctgc	tgctgctgct	gctgcttggg	ggccaggggc
241	agggcggcat	gtctggcagg	tgtgactgtg	ccagtgaagc	ccagaagagg	tatggcccgt
301	tttgttcgag	gggctgcccc	aagggaact	acatgaaggc	cccctgcgca	gaaccctgtg
361	gcaactccac	ctgccttccc	tgtccctcgg	acaccttctt	gaccagagac	aaccacttta
421	agactgactg	taccgctgct	caagtctgtg	atgaagaggc	ccttcaagtg	acccttgaga
481	actgctcggc	aaagtccggc	acccaactgt	gctgccagtc	aggctggtgt	gttgactgct
541	ccaccgtgcc	atgtgggaaa	agctcacctt	tctcttgtgt	cccatgcccc	gctacgacac
601	cagtcctatg	ggctccaacc	ccccggccct	gcctgcctgg	cttctatata	cgtggcaatg
661	actgcacgct	ctgccccacg	ggcttcagca	gcgtttgccc	taaggcttgc	actgctgtct
721	gtggctggaa	gcagatgttt	tgggtccagg	tgcttctagg	agtcgcgttc	ctttttgggg
781	ctatcctgat	ctgtgcatat	tgtcgatggc	agccttgtaa	ggccgtgggt	actgcagaca
841	cagctgggac	ggagcccctg	gcctcaccac	agactgcccc	tctctcagcc	tcagacagcg
901	cccacaccct	cttggcacct	ccaagcagta	ctgggaaaat	ctgtaccact	gtccagttag
961	taggcaacaa	ctggaccctt	ggcttatccc	agactcagga	ggtggtctgc	ggacaggcct
1021	cacaaccctg	ggatcagctg	ccaaacagaa	ctcttggaac	tcctctggca	tctccgctct
1081	cgccagcgcc	ccctgcgggc	tctccggctg	ctgtgctcca	gcctggcccc	cagctctacg
1141	atgtgatgga	tgccgtccca	gcacgaaggt	ggaaggagtt	cgtgcgcacg	ctggggctgc
1201	gggaagcgga	aattgaagcc	gtggaggtgg	aaatctgccg	cttccgagac	cagcagtatg
1261	agatgctcaa	gcgctggcgt	cagcagcagc	ctgcaggcct	cgggtgccatc	tatgcggctc
1321	tggagcgcaa	gggtctggaa	ggctgtgccg	aggacctgcg	cagccgcctg	cagcgtggcc
1381	cgtgatggaa	ggtccatcat	ccactttgac	accctagtga	cccttgaagg	agccttaagt
1441	attgttactt	atgcgtgtag	acattttatg	tcaattacta	acccctgcc	gtggtcctgc
1501	gtagcagggc	tggctgcctc	acttttgctt	atctgcagca	cggagctcct	gctaagggaa
1561	gcgtcatgga	gaaataccag	aaggggcccc	gtgattggtt	gctcagctgt	taattagccc
1621	gagtttggac	ttggtattaa	atttcataag	aaaagcagct	gcttg	

SEQ ID NO: 2 - TNFR25 cDNA humano; NM_148965

1	cgggccctgc	gggcgcgggg	ctgaaggcgg	aaccacgacg	ggcagagagc	acggagccgg
61	gaagcccctg	ggcgcccctc	ggagggttat	ggagcagcgg	ccgcggggct	gcgcggcggt
121	ggcgccggcg	ctcctccttg	tgtgctggg	ggccccggcc	cagggcgcca	ctcgtagccc
181	caggtgtgac	tgtgccgggt	acttccacaa	gaagattggt	ctgttttgtt	gcagaggctg
241	cccagcgggg	caactacctg	agcccccttg	cacggagccc	tgccgcaact	ccacctgcct
301	tgtgtgtccc	caagacacct	tcttgccctg	ggagaaccac	cataattctg	aatgtgcccc
361	ctgccaggcc	tgtgatgagc	aggcctccca	ggtggcgctg	gagaactggt	cagcagtggt
421	cgacacccgc	tgtggctgta	agccaggctg	gtttgtggag	tgccaggctc	gccaatgtgt
481	cagcagttca	cccttctact	gccaaccatg	cctagactgc	ggggccctgc	accgccacac
541	acggctactc	tgttcccgca	gagatactga	ctgtgggacc	tgccctgcctg	gcttctatga
601	acatggcgat	ggctgcgtgt	cctgccccac	gccacccccg	tcccttgca	gagcaccctg
661	gggagctgtc	cagagcgctg	tgcgcgtgtc	tggtggctgga	ggcagagtag	gtgtgttctg
721	ggtccagggt	ctcctggctg	gccttgtggt	ccccctcctg	cttggggcca	ccctgacctg
781	cacataccgc	caactgctgg	ctcacaagcc	cctggttact	gcagatgaag	ctgggatgga
841	ggctctgacc	ccaccacccg	ccaccatctt	gtcacccttg	gacagcgccc	acacccttct
901	agcacctcct	gacagcagtg	agaagatctg	caccgtccag	ttggtgggta	acagctggac
961	ccctggctac	cccagagacc	aggaggcgct	ctgcccgcag	gtgacatggt	cctgggacca
1021	gttggcccag	agagctcttg	gccccgctgc	tgcccccaca	ctctcgccag	agtccccagc
1081	cggctcgcca	gccatgatgc	tgcagccggg	cccgcagctc	tacgacgtga	tgagcgcggt
1141	cccagcgcgg	cgtggaagg	agttcgtgcg	cacgctgggg	ctgcgcgagg	cagagatcga
1201	agccgtggag	gtggagatcg	gccgcttccg	agaccagcag	tacgagatgc	tcaagcgtgc
1261	gcgccagcag	cagcccgcgg	gcctcgagac	cgtttacgcg	gccctggagc	gcatggggct

24/26

```

1321 ggacggctgc gtggaagact tgcgcagccg cctgcagcgc ggcccgtgac acggcgccca
1381 cttgccacct aggcgctctg gtggcccttg cagaagccct aagtacgggt acttatgcgt
1441 gtagacattt tatgtcactt attaaagcgc tggcacggcc ctgcgtagca gcaccagccg
1501 gccccacccc tgctcgcccc tatcgctcca gccaaaggcg agaagcacga acgaatgtcg
1561 agaggggggtg aagacatttc tcaacttctc ggccggaggt tggctgagat cgcggtatta
1621 aatctgtgaa agaaaacaaa acaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaa

```

SEQ ID NO: 3 - TL1A cDNA de camundongo; AF520786

```

1 atggcagagg agctgggggtt gggcttcgga gaaggagtcc cagtggaaagt gctgccggaa
61 ggctgtagac acaggccaga ggccagggcc gggctagctg ccaggagcaa agcctgcctg
121 gctctcacct gctgcctggt gtcatttccc atcctcgtag gacttagcac cctcctaagt
181 gctggccagc tccgggtccc cggaaaagac tgtatgcttc gggccataac agaagagaga
241 tctgagcctt caccacagca agtttactca cctccagag gcaagccgag agcacacctg
301 acaattaaga aacaaacccc agcaccacat ctgaaaaatc agctctctgc tctacactgg
361 gaacatgacc tagggatggc cttaccaag aacgggatga agtacatcaa caaatccctg
421 gtgatccag agtcaggaga ctatttcac taccaccaga tcacattccg agggaccaca
481 tctgtgtgtg gtgacatcag tcgggggaga cgaccaaaca agccagactc catcactgtg
541 gtcacacca aggtagcaga cagctaccct gagcctgccc gcctactaac agggccaag
601 tctgtgtgtg aaataagcaa caactgggtc cagtccctct accttggggc catgttctcc
661 ttggaagaag gggacagact aatggtaaac gtcagtgaac tctccttggg ggattacaca
721 aaagaagata aaactttctt tggagcttcc ttgctataa

```

SEQ ID NO: 4 - DN TNFR25 cDNA de camundongo

```

atggagg cacggtgct gcggggctgc gtggtggagc
ctctgttctt accactgctg ctgctgctgc tgctgctgct gctgcttggg ggccagggcc
agggcgcat gtctggcagg tgtgactgtg ccagttagtc ccagaagagg tatggcccgt
tttgttgtag ggctgcca aagggaact acatgaaggc cccctgcgca gaaccctgtg
gcaactccac ctgccttccc tgtccctcgg acaccttctt gaccagagac aaccacttta
agactgactg taccgctgct caagtctgtg atgaagaggc ctttcaagt acccttgaga
actgtcggc aaagtgggac acccactgtg gctgccagtc aggttgggtg gttgactgct
ccaccgtgcc atgtgggaaa agctcacctt tctcttgtgt cccatgcggg gctacgacac
cagtccatga ggctccaacc ccccgccctt gcctgcctgg cttctatata cgtggcaatg
actgcacgtc ctgccccacg ggcttcagca gcgtttgcc taaggcttgc actgctgtct
gtggtgggaa gcagatgttt tgggtccagg tgcttctagg agtcgcgttc ctttttgggg
ctatcctgat ctgtgcatat

```

**SEQ ID NO: 5 - DN TNFR25 cDNA de camundongo
(extracelular + transmembrana apenas)**

```

atggagcagcgg ccgcggggct gcgcggcggt
ggcgcgggcg ctccctcctg tgctgctggg ggcccggggc cagggcggca ctcgtagccc
caggtgtgac tgtgccgtg acttccacaa gaagattggt ctgttttgtt gcagaggctg
cccagcgggg cactacctga aggcccttg cacggagccc tgcggcaact ccacctgcct
tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg
ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgctg gagaactgtt cagcagtggc
cgacacccgc tgtggctgta agccaggctg gtttgtggag tgccagggtca gccaatgtgt
cagcagttca cccttctact gccaacatg cctagactgc gggggcctgc accgccacac
acggctactc tgttcccgca gagatactga ctgtgggacc tgcctgcctg gcttctatga
acatggcgat ggctgcgtgt cctgccccac gccacccccg tcccttgtag gagcacctg
gggagctgtc cagagcgctg tgccgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg
ggtccagggt ctccctggctg gccttgtggt cccctcctg cttggggcca ccctgaceta
caca

```

FIG.17b

SEQ ID NO: 6 - DN TNFR25 cDNA humano (extracelular apenas)

at ggagcagcgg ccgcggggct gcgcggcggt
 ggcggcgcg ctcctcctgg tgcctgctgg ggcccgggccc caggcgcgga ctcgtagccc
 cagggtgtgac tgtgccggtg acttccacaa gaagattgggt ctgttttgtt gcagaggctg
 cccagcgggg cactacctga agggcccttg cacggagccc tgcggcaact ccacctgcct
 tgtgtgtccc caagacacct tcttggcctg ggagaaccac cataattctg aatgtgcccg
 ctgccaggcc tgtgatgagc aggcctccca ggtggcgctg gagaactgtt cagcagtggc
 cgacaccgcg tgtggctgta agccaggctg gtttgtggag tgcaggta gccaatgtgt
 cagcagttca cccttctact gccaacatg cctagactgc ggggcccctgc accgccacac
 acggctactc tgttcccgca gagatactga ctgtgggacc tgcctgcctg gcttctatga
 acatggcgat ggctgcgtgt cctgccccac gccacccccg tcccttgag gagcacctg
 gggagctgtc cagagcgctg tgcgctgtc tgtggctgga ggcagagtag gtgtgttctg
 g

SEQ ID NO: 7 - TL1A humano; cDNA; AF520785

1 gagagggaaa aggggaaggag gagactgagt gattaagtca cccactgtga agagctggtc
 61 ttctatttaa tgggggctct ctctgccag gagtcagagg tgcctccagg agcagcagga
 121 gcatggccga ggatctggga ctgagctttg gggaaacagc cagtgtggaa atgctgccag
 181 agcacggcag ctgcaggccc aaggccagga gcagcagcgc acgctgggct ctcacctgct
 241 gcctgggtgt gtcctccctc cttgcaggac tcaccacata cctgcttgtc agccagctcc
 301 gggcccaggg agaggcctgt gtgcagttcc aggcctctaaa aggacaggag tttgcacctt
 361 cacatcagca agtttatgca cctcttagag cagacggaga taagccaagg gcacacctga
 421 cagttgtgag acaaaactccc acacagcact ttaaaaatca gttccagct ctgcaactggg
 481 aacatgaact aggcctggcc ttcaccaaga accgaatgaa ctataccaac aaattcctgc
 541 tgatcccaga gtcgggagac tacttcattt actcccaggt cacattccgt gggatgaact
 601 ctgagtgcag tgaaatcaga caagcaggcc gaccaaaca gccagactcc atcactgtgg
 661 tcatcaccaa ggtaacagac agctaccctg agccaaccca gtcctcatg gggaccaagt
 721 ctgtatgcga agtaggtagc aactggttcc agcccatcta cctcggagcc atgttctcct
 781 tgcaagaagg ggacaagcta atgggtgaacg tcagtgcacat ctctttgggt gattacacaa
 841 aagaagataa aaccttcttt ggagccttct tactatagga ggagagcaaa tatcattata
 901 tgaaagtcc ctgccaccga gttcctaatt ttctttgttc aaatgtaatt ataaccaggg
 961 gttttcttgg ggccgggagt agggggcatt ccacagggac aacggtttag ctatgaaatt
 1021 tggggcccaa aatttcacac ttcattgtgcc ttactgatga gactactaac tggaaaaggc
 1081 tgaagagagc aaatatatta ttaagatggg ttggaggatt ggcgagtttc taaatatata
 1141 gacactgatc actaaatgaa tggatgatct actcgggtca ggattgaaag agaaatattt
 1201 caacacctcc ctgtatata atgttcacca gtgtccagt tattgttcaa tttgatcata
 1261 aatttgcctc aattcaggag ctttgaagga agtccaagga aagctctaga aaacagtata
 1321 aactttcaga ggcaaaatcc ttcaccaatt ttccacata ctttcatgcc ttgcctaaaa
 1381 aaaatgaaaa gagagtttgt atgtctcatg aatgttcaca cagaaggagt tggttttcat
 1441 gtcacttaca gcatatgaga aaagctacct ttcttttgat tatgtacata gatattctaaa
 1501 taaggaagta tgagtttcac atgtatatca aaaatacaac agttgcttgt attcagtaga
 1561 gttttcttgc ccacctatct tgtgctgggt tctaccttaa cccagaagac actatgaaaa
 1621 acaagacaga ctccactcaa aatttatatg aacaccacta gatacttcct gatcaaacat
 1681 cagtcaacat actctaaaga ataactcaa gtcttgcca ggcgcagtgg ctcacacctg
 1741 taatcccaac actttgggag gccaaagggt gtggatcatc taaggccggg agttcaagac
 1801 cagcctgacc aacgtggaga aaccccatct ctactaaaaa tacaaaatta gccggcgctg
 1861 gtagcgcatg gctgtaatcc tggctactca ggaggccgag gcagaagaat tgcttgaact
 1921 ggggaggcag aggttgcggg gagccagat cgcgccattg cactccagcc tgggtaacaa
 1981 gagcaaaact ctgtccaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

SEQ ID NO:16 - mDN-TNFR25 cDNA

ATGGAGGCAC GGCTGCTGCG GGGCTGCGTG GTGGAGCCTC TGTTCCTACC ACTGCTGCTG
 CTGCTGCTGC TGCTGCTTGG TGGCCAGGGC CAGGGCGGCA TGTCTGGCAG GTGTGACTGT
 GCCAGTGAGT CCCAGAAGAG GTATGCCCCG TTTTGTGCA GGGGCTGCC AAAGGGACAC

26/26

TACATGAAGG	CCCCCTGCGC	AGAACCCTGT	GGCAACTCCA	CCTGCCTTCC	CTGTCCCTCG
GACACCTTCT	TGACCAGAGA	CAACCACTTT	AAGACTGACT	GTACCCGCTG	CCAAGTCTGT
GATGAAGAGG	CCCTTCAAGT	GACCCTTGAG	AACTGCTCGG	CAAAGTCGGA	CACCCACTGT
GGCTGCCAGT	CAGGCTGGTG	TGTTGACTGC	TCCACCGAGC	CATGTGGGAA	AAGCTCACCT
TTCTCTTG TG	TCCCATGCGG	GGCTACAACA	CCAGTCCATG	AGGCTCCAAC	CCCCCGGCC
TGCCTGCCTG	GCTTCTATAT	ACGTGGCAAT	GACTGCACGT	CCTGCCCCAC	GGGCTTCAGC
AGCGTTTGCC	CTAAGGCTTG	CACTGCTGTC	TGTGGCTGGA	AGCAGATGTT	TTGGGTCCAG
GTGCTTCTAG	GAGTCGCGTT	CCTTTTGGG	GCTATCCTGA	TCTGTGCATA	TGGCTCTGGA
AGCGGGAGCG	TCGACGATCT	TTACGACGAT	GATAAATAGT	AA	

FIG.17d

R-0617057-9

RESUMO

"ANTICORPO ISOLADO, TOXINA ESPECÍFICA PARA RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA ATIVAR O RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25), MÉTODO PARA INIBIR A SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE FATOR DE NECROSE TUMORAL 25 (TNFR25) NUMA CÉLULA, VACINA ANTITUMORAL, MÉTODO PARA IMUNIZAR UM PACIENTE CONTRA TUMOR, MÉTODO PARA TRATAR CÂNCER NUM PACIENTE, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO INTESTINAL, COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA PARA A FACILITAÇÃO DE UM TRANSPLANTE DE ÓRGÃO, MÉTODO PARA TRANSPLANTAR UM TECIDO DE UM DOADOR PARA UM HOSPEDEIRO, MÉTODO PARA INIBIR A EXPRESSÃO CLONAL DE UMA POPULAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 COGNATAS, MÉTODO PARA TRATAR E/OU PREVENIR INFLAMAÇÃO PULMONAR, ANTAGONISTA DE TNFR25 ISOLADO, COMPOSIÇÃO E VETOR DE EXPRESSÃO".

O objeto da presente invenção consiste em prover composições e métodos novos utilizando agentes imunomoduladores que podem estimular ou indiretamente aumentar o sistema imune ou, em outros casos, ter um efeito imunossupressor.

Os agonistas de TNFR25 aqui descritos possuem um efeito antiinflamatório e curativo. Podem ser usados, entre outras coisas, para tratar doença causada por asma e inflamação crônica, tais como, por exemplo, doenças intestinais inflamatórias, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn. Os antagonistas de TNFR25 aqui descritos são capazes de inibir as respostas imunes celulares mediadas por célula T CD8 e podem, por exemplo, mitigar a rejeição de órgão ou tecido, após um transplante de tecido. Os agonistas de TNFR25 aqui descritos representam modificadores de resposta biológica que alteram a interação entre as defesas imunes celulares do organismo e as células cancerosas para reforçar, direcionar ou restaurar a capacidade do organismo no combate ao câncer quando administrados com vacinas antitumorais. As imunotoxinas TNFR25 específicas aqui descritas são também capazes de aumentar a eficácia de um esquema quimioterápico através da depleção de células imunossupressoras de ocorrência natural num paciente com câncer.