



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-118453

54. TÍTULO

Moléculas de Ligando GSTR y Relacionadas
Con Ligando GSTR y Anticuerpos y Usos de Estas.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTES

WYETZ y THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES
AS REPRESENTED, by the SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES.

DOMICILIO S

MADISON y ROCKVILLE, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
RESPECTIVAMENTE.

74. APODERADO

EMILIO AGUIRRE
CC 438.019 de USAGUEN.

22. BOGOTÁ, D. C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05118453 00000000
Fecha (AMD): 2005-11-22 17:56:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE HACI 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Folios: 365

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: WYETH y
THE GOVERNMENT OF THE UNITED
STATES as represented by THE
SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF
HEALTH AND HUMAN SERVICES
sociedad y entidad gubernamental
constituida y existente bajo las leyes del
estado de Delaware, Estados Unidos de
América y Estados Unidos de América,
respectivamente

Dirección Five Giralda Farms, Madison
New Jersey 07940
Estados Unidos de América y

National Institutes of Health
Office of Technology Transfer
6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, Maryland 20852-3804
Estados Unidos de América
respectivamente

Domicilio
Madison, Estados Unidos de América y
Rockville, Estados Unidos de América
respectivamente.

IDENTIFICACIÓN

C.C.☐

C.E.☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre EMILIO FERRERO
Dirección Carrera 4ª No 72-35
Teléfono 347 36 11
Fax 211 86 50
E-mail clientes@camvp.com
Domicilio Bogotá, Colombia

IDENTIFICACIÓN

C.C.☒

C E☐

NIT☐

Otro☐

Cual

Número 438 019 T P 31 929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. Mary COLLINS
54 Rathbun Road,
Natick, Massachusetts 01760
Estados Unidos de América

3. Rebecca Suzanne McHUGH
2D, QBA Apts, 51-75
Webb St, Wellington, 6001
Nueva Zelanda

5. Deborah Ann YOUNG
39 Nelson Road,
Melrose Massachusetts 02176
Estados Unidos de América

2. Ethan Menahem SHEVACH
5 Defoe Court,
Rockville, Maryland 20850
Estados Unidos de América

4. James Matthew WHITTERS
14 Brenton Wood Road,
Hudson Massachusetts 01749
Estados Unidos de América

6. Michael Chapman BYRNE
34 Hyslop Road
Brookline, Massachusetts
Estados Unidos de América

7. Padmalatha, F. REDDY
127 Mylod Street
Walpole, Massachusetts 02081
Estados Unidos de América

8. Geoffrey, Laurence STEPHENS
26051 Ridge Manor Drive
Damascus, Maryland 20872
Estados Unidos de América

9. Beatriz M. CARRENO
37 Nash Road
Acton, Massachusetts 01720
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2004/016381Fecha: 24 de mayo de 2004Publicación Internacional No WO 2004/107618 A3Fecha: 9 de diciembre de 2004

6

Título (54)

**MOLECULAS DE LIGANDO GITR Y RELACIONADAS CON LIGANDO GITR Y
ANTICUERPOS Y USOS DE ESTAS**

7

Clasificación Internacional (51) CO7K 14/715

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐US
US23 de mayo de 2003
26 de febrero de 200460/472,844
60/547,975

9

Comprobante de pago No.: 05-87,640**Fecha: noviembre 15 de 2005**

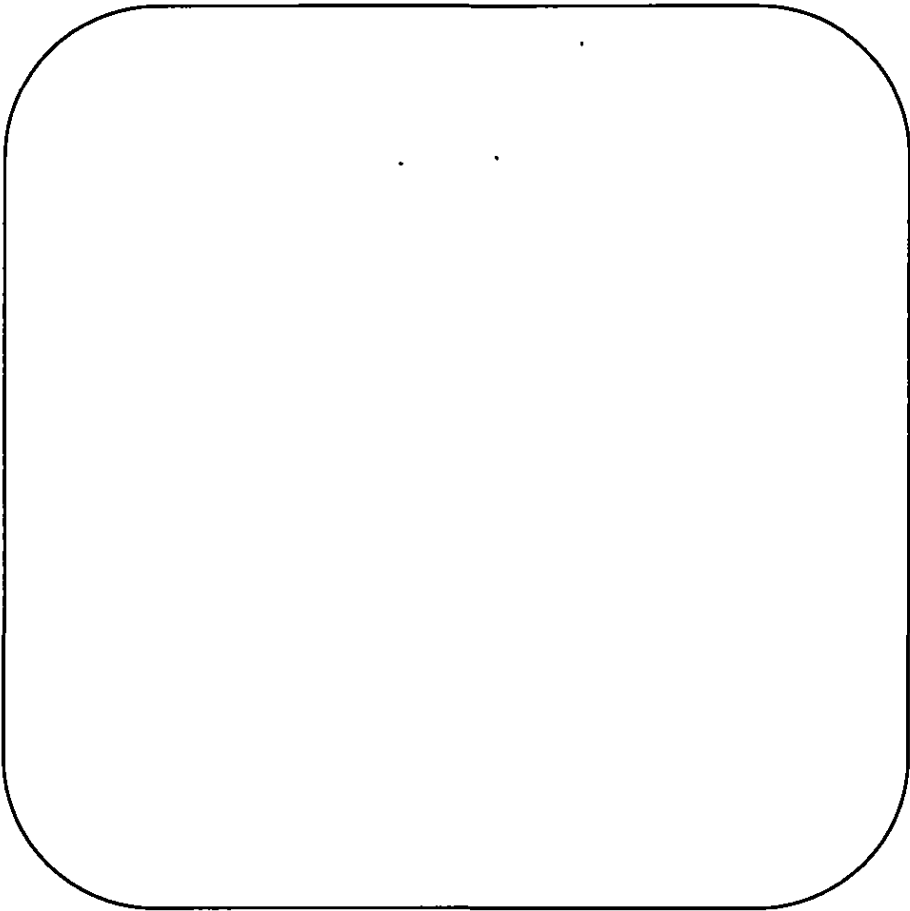
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **WYETH**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☒ Otros VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

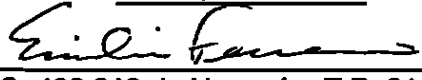
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE. EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C C 438 019 de Usaquén T P 31.929

JDF

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/107618 A2**

Descripción:

Páginas 109 en el idioma original

Páginas 156 en español

Reivindicaciones: Número (s) 54

Figuras: Número (s) 14

2. ☐ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
3. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
4. ☒ **Extracto de publicación.**

13665
8070

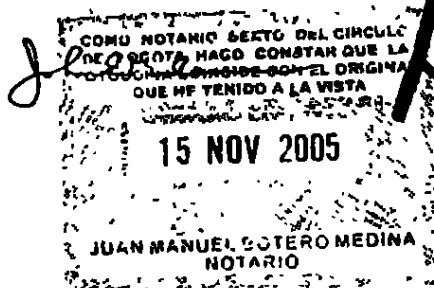
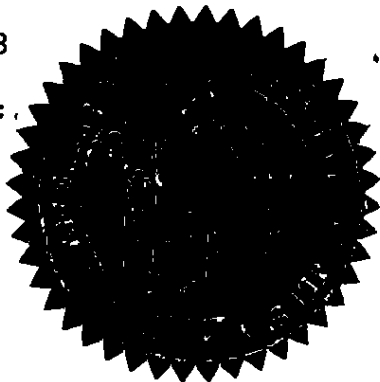
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 26TH DAY OF JUNE 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A175618
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostilla para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

Wyeth

domiciliado (s) en/of Five Giralda Farms

Madison, NJ 07940, United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o judiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (emos) a los dichos apoderados para que mis (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, quejen o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems and domain names, vegetal varieties and denominations of origin; their renewal, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits, including labor suits, actions and suits

NOTARIO

estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir - o mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Wyeth

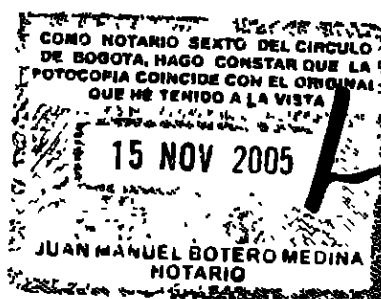
Dado y firmado hoy/Given and signed this 16th JUNE 2003

en/in Madison, New Jersey 07940; USA

por/by William H. Calnan

Assistant Secretary

Firma [Signature] Signature



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

On this 16 day of June 2003 before me, Notary Public or Functionary Authorized

personally appeared William H. Calnan

to me known and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

Notario Público o Funcionario Autorizado - Notary Public or Acting Official

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

On this 16 day of June 2003 appeared before me William H. Calnan

who(s) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named Wyeth

I certify:

Que he visto los siguientes documentos:
Certificado de Constitución Replanteado
presentado el 22 de Abril, 1988 ante el
Secretario del Estado de Delaware
Que dichos documentos prueban lo siguiente:

1. Que Wyeth

una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes del Delaware

2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es:
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey
07940 United States of America

3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
Poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

4. Que el(los) Sr.(s) William H. Calnan

autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

lugar Morristown

estado New Jersey

on 16 day of June 2003

Notario Público o Funcionario Autorizado - Notary Public or Acting Official

Los documentos deben identificarse con fecha y origen

CAVELIER ABOGADOS
PP0DB01-181 (MINUTA N°12.1.1.2.6 USA)

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 16 day of June 2003 before me, a Notary Public or Acting Official of

personally appeared

to me known and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16 day of June 2003 appeared before me William H. Calnan

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named Wyeth

I certify:

1. That I have seen the following documents:
Restated Certificate of Incorporation filed
April 22, 1988 with Secretary of State of
Delaware

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Wyeth

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey
07940 United States of America

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the Corporation
purposes set forth in the 15th Article of the mentioned
Corporation/Company.

2.4. That Mr. (Messrs.) William H. Calnan

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Morristown

State New Jersey

This 16th day of June 2003

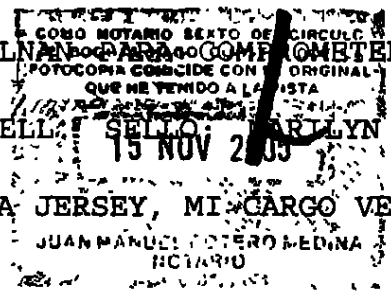
Marilyn L. Mitchell

Documents must be identified with date and origin

MARILYN L MITCHELL
NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 8, 2005

TRADUCCIÓN OFICIAL 101/2003 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL WYETH, EMPRESA DOMICILIADA EN FIVE GIRALDA FARMS, MADISON, NJ 07940 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 16 DE JUNIO DE 2003 EN MADISON, NEW JERSEY 07940, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: WILLIAM H. CALNAN, SUBSECRETARIO.

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE FECHA 16 DE JUNIO DE 2003 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE WILLIAM H. CALNAN PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE WYETH Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE WILLIAM H. CALNAN PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA. FIRMADO: MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE NUEVA JERSEY, MI CARGO VENCE EL 6 DE FEBRERO DE 2005.



APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por MARILYN L. MITCHELL

2/10
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA
JERSEY

4. lleva el sello de MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO
CERTIFICADO

5. en TRENTON, NUEVA JERSEY

6. el 26 DE JUNIO DE 2003

7. por JOHN E. MCCORMAC, CONTADOR PÚBLICO AUTORIZADO, TESORERO
DE NUEVA JERSEY

8. Número A175618

9. Sello:

El sello del estado de Nueva Jersey

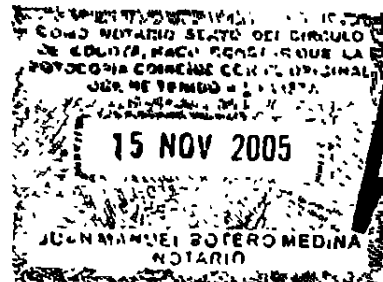
10. Firma: (ilegible)

COLO-13798-841-001-5

WPCL002G. ID. 4628

Bogotá, 12 de julio de 2003.

Eduardo Calado W.
Eduardo Calado Noguera
"TRADUCIONES OFICIALES"
INGLES - ESPAÑOL
Res 541 Febrero de 1999



COLOMBIA OFICIO DEL CÍRCULO DE SANTAFÉ
 BOGOTÁ, D. C. 11 JULIO 2003
 ANTERIOR(ES) E...
Eduardo Calado
Noguera
 SANTAFÉ DE BORDABUENA 11 JUL 2003

TARIFA SEXTA
 PABLO MENDEZ
 BARAJAS
 NOTARIO SANTIAGO ENRIQUE

RECIBO DEL TEXTO
 2003 JUL 11 P 12:55
 Jefe de Legación
 SANTAFÉ DE BORDABUENA

MINISTERIO DE RELACIONES
 4594
 Oficina de...
 CLAVIA FERNANDEZ
 BOGOTÁ 11 JUL 2003

OFICIO DEL CÍRCULO DE SANTAFÉ
 BOGOTÁ, D. C. 15 NOV 2005
 JUAN MANUEL...
 NOTARIO

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 December 2004 (09.12.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/107618 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/715,
C12N 15/11, C07K 16/00, A01K 67/00, A61K 38/00,
39/00, G01N 33/50

Damascus, MD 20872 (US). CARRENO, Beatriz, M.
[US/US]; 37 Nash Road, Acton, MA 01720 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2004/016381

(74) Agents: MANDRA, Raymond, R. et al.; Fitzpatrick,
Cella, Harper & Scinto, 30 Rockefeller Plaza, New York,
NY 10112-3801 (US)

(22) International Filing Date: 24 May 2004 (24.05.2004)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/472,844 23 May 2003 (23.05.2003) US
60/547,975 26 February 2004 (26.02.2004) US

(71) Applicants (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF
AMERICA as represented by THE SECRETARY OF
THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES [US/US], National Institutes of Health, Office
of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite
325, Rockville, MD 20852-3804 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

— with international search report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): COLLINS, Mary
[US/US]; 54 Rathbun Road, Natick, MA 01760 (US).
SHEVACH, Ethan, Menahem [US/US]; 5 Defoe
Court, Rockville, MD 20850 (US). McHUGH, Re-
becca, Suzanne [US/US]; 2D, QBA Apts., 51-75 Webb
St., Wellington, NZ 6001 (NZ). WHITTERS, James,
Matthew [US/US]; 14 Brenton Wood Road, Hudson,
MA 01749 (US) YOUNG, Deborah, Ann [US/US];
39 Nelson Road, Melrose, MA 02176 (US). BYRNE,
Michael, Chapman [US/US]; 34 Hyslop Road, Brook-
line, MA (US). REDDY, Padmalatha, F. [US/US]; 127
Mylod Street, Walpole, MA 02081 (US) STEPHENS,
Geoffrey, Laurence [US/US]; 26051 Ridge Manor Drive,

(88) Date of publication of the international search report:
10 February 2005

(48) Date of publication of this corrected version:
9 June 2005

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 23/2005 of 9 June 2005, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: GITR LIGAND AND GITR LIGAND-RELATED MOLECULES AND ANTIBODIES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides novel isolated and purified polynucleotides and polypeptides related to a novel ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR). The invention also provides antibodies to the GITR ligand (GITRL). The present invention also is directed to novel methods for diagnosing, prognosing, monitoring the progress of, and treating disorders arising from dysregulation of the immune system (e.g., autoimmune disorders, inflammatory diseases, and transplant rejection, and cancers and infectious diseases) using GITRL and/or modulators of GITRL. The present invention is further directed to novel therapeutics and therapeutic targets and to methods of screening and assessing test compounds for the intervention (treatment) and prevention of said disorders arising from dysregulation of the immune system, as related to GITRL and GITR.

WO 2004/107618 A3

- 1 -

TITLE

GITR LIGAND AND GITR LIGAND-RELATED MOLECULES AND ANTIBODIES AND USES THEREOF

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Application Ser. No. 60/472,844, filed May 23, 2003, and U.S. Provisional Application Ser. No. 60/547,975, filed February 26, 2004, both of which are incorporated herein by reference in their entireties.

[0002] This invention was made with Government support under NIH Intramural Research Project #Z01-AI-000224. The Government has certain rights in the invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[0003] The present invention is directed to novel methods for diagnosing, prognosing, monitoring the progress of, and treating disorders arising from dysregulation of the immune system (e.g., autoimmune disorders, inflammatory diseases, and transplant rejection, and cancer and infectious diseases) related to glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) and the ligand associated with GITR (GITRL) and modulators related thereto. The present invention is further directed to novel therapeutics and therapeutic targets, and to methods of screening and

assessing test compounds for the intervention (treatment) and prevention of disorders arising from dysregulation of the immune system, as related to GITR and GITRL.

Related Background Art

[0004] Generally, T lymphocytes are responsible for cell-mediated immunity and play a regulatory role by enhancing or suppressing the responses of other white blood cells. The notion that T lymphocytes play a role in suppression of the immune response is well known (see, e.g., Gershon et al. (1970) *Immunology* 18:723-35). However, the target antigens for these suppressor cells and the mechanisms controlling their function are still subjects of study.

[0005] One population of regulatory T cells that is generated in the thymus is distinguishable from effector T cells by the expression of unique membrane antigens. These regulatory T cells make up a subpopulation of CD4⁺ T cells (i.e., T cells that express the CD4 antigen) that coexpress the CD25 antigen. CD25 is also known as the interleukin-2 receptor (IL-2R) α -chain. Cotransfer of, or reconstitution with, CD25⁺ T cells is associated with prevention of both inflammatory lesions and autoimmunity in various animal models (see Shevach (2000) *Ann. Rev. Immunol.* 18:423-49, and references therein). CD4⁺CD25⁺ T cells have also been associated with inhibition of T cell activation *in vitro*, and adoptive suppression of CD4⁺CD25⁻ T cells in coculture (Shevach, *supra*).

[0006] More than two decades ago it was demonstrated that some self-reactive T cells escape mechanisms of central tolerance and exist in the periphery under the control of thymic-derived regulatory T cells. In 1995, Sakaguchi and colleagues demonstrated that a small population of CD4⁺ T cells that naturally express the α -chain of IL-2R (i.e., CD25) are involved in the control of organ-specific autoreactive T cells (Sakaguchi et al. (1995) *J. Immunol.* 155:1151-64). Specifically, they demonstrated that transfer of CD4⁺CD25⁻ T cells to immunodeficient hosts led to a spectrum of autoimmune diseases, which could be prevented by cotransfer of CD4⁺CD25⁺ T cells (Sakaguchi et al., *supra*). Subsequent studies have implicated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the suppression of immune responses to viral, bacterial and protozoal infections (Aseffa et al. (2002) *J. Immunol.* 169:3232-41; Belkaid et al. (2002) *Nature*

420:502-07; Hisaeda et al. (2004) *Nat. Med.* 10:29-30; Kursar et al. (2002) *J. Exp. Med.* 196:1585-92; Lundgren et al. (2003) *Infect. Immun.* 71:1755-62; Maloy et al. (2003) *J. Exp. Med.* 197:111-19). Together, these studies provided evidence that removal of CD4⁺CD25⁺ T cells enhanced the immune response. Many attempts have been made to define the activation of, and suppression by, these CD4⁺CD25⁺ T cells. These cells represent a unique lineage of thymic-derived cells that potently suppress both *in vitro* and *in vivo* effector T cell function.

[0007] Several *in vitro* studies revealed that CD4⁺CD25⁺ cells suppress proliferation of CD4⁺ T cells in response to both mitogens and antigens by turning off transcription of IL-2 (e.g., Thornton and Shevach (1998) *J. Exp. Med.* 188:287-96; Takahashi et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:1969-80). Cotransfer of CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo* with autoreactive CD4⁺ T cells is sufficient to suppress both the induction and effector phase of organ-specific autoimmunity (Suri-Payer et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:669-77; Suri-Payer et al. (1998) *J. Immunol.* 160:1212-18). Other properties of the CD4⁺CD25⁺ T cells include hyporesponsiveness to T cell receptor (TCR) stimulation in the absence of exogenous IL-2, immunosuppression via cell-cell interaction, and a requirement for TCR signaling to induce their suppressive phenotype (once they have been activated, however, their suppressive function is independent of antigenic stimulus). It has also been demonstrated that the mere acquisition of CD25 expression, as can be achieved by stimulation of CD4⁺CD25⁻ T cells, does not induce the suppressive phenotype. These CD4⁺CD25⁺ T cells are known to exist in humans (Shevach (2001) *J. Exp. Med.* 193:F1-F6).

[0008] One study demonstrated that altered thymic selection is required for generation of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (Jordan et al. (2001) *Nat. Immunol.* 2:301-06). In addition, studies with knockout mice demonstrated that molecules involved in IL-2 synthesis and responsiveness are required for generation of these cells; mice genetically deficient for IL2 or IL2R β , or B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86), or CD28 all have severe reduction in CD4⁺CD25⁺ cells, with resulting lymphadenopathy and hyperproliferation in the periphery of some of these mice (Papiernik et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:371-78; Salomon et al. (2000) *Immunity* 12:431-40; Kumanogoh et al. (2001) *J. Immunol.* 166:353-60).

[0009] Until recently, the art had failed to determine the mechanisms involved in CD4⁺CD25⁺-mediated suppression of the immune system, e.g., the antigen specificity, the molecules involved in acquisition of suppression, and the cell surface molecules or short acting cytokines involved in the effector phase of suppression; the molecular targets of CD25⁺ T cells in modulating autoimmunity remained largely unknown as well. It has now been demonstrated, by examining differential expression of genes through the use of gene chip analyses on CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells, that several CD25⁺ differential genes exist (McHugh et al. (2002) *Immunity* 16:311-23; see also U.S. Patent Application 10/194,754, incorporated herein by reference in its entirety). These genes, determined to be preferentially expressed on the CD4⁺CD25⁺ T cells, can serve as targets for therapeutic intervention and screening methods for autoimmune disorders, inflammatory diseases and transplant rejection, as well as for cancer and infectious diseases.

[0010] Significantly, one of the genes determined to be differentially expressed in CD25⁺ cells is glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR) (McHugh et al., *supra*). GITR, a cell-surface, transmembrane protein receptor, is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily. GITR has been demonstrated to be constitutively present on nonactivated T cells (Gavin et al. (2002) *Nat. Immunol.* 3:33-41; McHugh et al., *supra*; Shimizu et al. (2002) *Nat. Immunol.* 3:135-42). GITR binds to another transmembrane protein referred to as GITR Ligand (GITRL). Agonistic antibodies to GITR have been shown to abrogate the suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ T cells, demonstrating a functional role for GITR in regulating the activity of these cells (McHugh et al., *supra*). Another study confirmed that stimulation of GITR with a specific monoclonal antibody abrogated CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression, thereby inducing autoimmunity (Shimizu et al., *supra*). These studies have led to the proposal that GITR is a more faithful marker of CD4⁺CD25⁺ T cells (Uraushihara et al. (2003) *J. Immunol.* 171:708-16); however, GITR expression alone does not exclusively distinguish this subset, as upregulation of GITR also occurs following activation of CD4⁺CD25⁻ T cells (McHugh et al., *supra*; Shimizu et al., *supra*).

[0011] Because GITR has been shown to be important in the regulation of suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ T cells on CD4⁺CD25⁻ T cells, it is desirable to

identify and characterize novel molecules that interact with GITR. Such novel molecules that interact with GITR are disclosed herein. Additionally, modulators of these molecules are provided.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0012] The present invention provides the nucleotide and amino acid sequences of a novel mouse homolog of human GITRL. The present invention also provides antibodies to mouse GITRL. The present invention also provides methods both to reverse immune suppression by inducing agonistic GITR-GITRL binding, and to restore or enhance immune suppression by antagonizing GITR-GITRL binding, e.g., through the use of neutralizing antibodies that inhibit GITRL activity (e.g., that block the interaction between GITR and GITRL). Such reversal, or restoration/enhancement, of immune suppression is beneficial in the treatment of varied disorders resulting from dysregulated immune responses, such as autoimmune disorders, inflammatory diseases and transplant rejection, and cancer and infectious diseases. The methods of the present invention are directed to manipulation of GITRL and GITR, including, but not limited to, mouse GITRL and GITR and their homologs; specifically included among these homologs is human GITRL and human GITR.

[0013] The present invention provides novel isolated and purified polynucleotides and polypeptides related to a novel ligand for GITR (GITRL). The invention also provides antibodies to GITRL, as well as methods for treating, diagnosing, prognosing, and monitoring the progress of autoimmune disorders, inflammatory diseases, and transplant rejection, and cancers and infectious diseases. In one embodiment of the invention, the disclosed methods and molecules can be used to manipulate the outcome of an immune response during the treatment of a disease or disorder, including autoimmune disorders, inflammatory diseases, and transplant rejection, as well as cancers and infectious diseases. In another embodiment, disclosed polynucleotides and polypeptides of the invention that block or inhibit the interaction between GITR and GITRL, for example by downregulating the expression or activity of GITRL or by binding to GITRL, but do not induce GITR signaling, can be used to restore or enhance suppression of the immune system. In another embodiment, the interaction between GITR and

GITRL can be blocked or inhibited by a small molecule. It will be appreciated by one of skill in the art that these types of regulation (i.e., these embodiments) will be most beneficial in the treatment of autoimmune disorders and some inflammatory diseases, and similar or related disorders, as well as in the treatment of transplant rejection. In another embodiment, disclosed polynucleotides and polypeptides of the invention that induce GITR signaling, for example by upregulating the expression or activity of GITRL or by agonistic binding to GITR, can be used to reverse, block, or abrogate suppression of the immune system. In another embodiment, the interaction between GITR and GITRL can be enhanced or mimicked by a small molecule. It will be appreciated by one of skill in the art that these types of regulation will be most beneficial in the treatment of cancers and like diseases, as well as infectious diseases. One of skill in the art would also be aware of the likely benefits of combining these novel therapies with established and other therapies.

[0014] In one embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In another embodiment, the nucleic acid molecule is operably linked to at least one expression control sequence. In another embodiment, a host cell transformed or transfected with the nucleic acid molecule is provided.

[0015] In another embodiment, the invention provides an isolated allele of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In another embodiment, the invention provides an isolated gene comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3.

[0016] In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule that specifically hybridizes under highly stringent conditions to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or the complement thereto.

[0017] In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule that encodes a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof that encodes an active fragment of the protein. In another embodiment, the nucleic acid molecule, or fragment thereof, is operably linked to at least one expression control sequence. In another embodiment, a host cell transformed or transfected with the isolated nucleic acid molecule, or fragment

thereof, operably linked to at least one expression control sequence is provided. In another embodiment, the invention provides a nonhuman transgenic animal in which the somatic and germ cells contain the isolated nucleic acid molecule, or fragment thereof. In another embodiment, the invention provides a nonhuman transgenic animal in which the somatic and germ cells contain DNA comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

[0018] In another embodiment, the invention provides an isolated protein comprising the amino acid sequence encoded for by an isolated nucleic acid that specifically hybridizes under highly stringent conditions to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or the complement thereto. In another embodiment, the invention provides an isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or an active fragment thereof.

[0019] In another embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein expression of the nucleic acid molecule in a cell results in decreased production of GITRL. In another embodiment, the nucleic acid molecule, or fragment thereof, is operably linked to at least one expression control sequence. In another embodiment, a host cell transformed or transfected with the isolated nucleic acid molecule, or fragment thereof, operably linked to at least one expression control sequence is provided. In another embodiment, the invention provides a nonhuman transgenic animal in which the somatic and germ cells contain the isolated nucleic acid molecule, or fragment thereof.

[0020] In another embodiment, the invention provides an antisense oligonucleotide complementary to a mRNA corresponding to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein the oligonucleotide inhibits expression of GITRL. In another embodiment, the invention provides a siRNA molecule corresponding to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein the siRNA molecule inhibits expression of GITRL.

[0021] In another embodiment, the invention provides an isolated antibody capable of specifically binding to an isolated protein comprising the amino acid sequence encoded for by an isolated nucleic acid that specifically hybridizes under highly stringent conditions to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or the complement thereto. In another embodiment, the antibody neutralizes GITRL activity. In another embodiment, the antibody is 5F1, having ATCC number PTA-5336, or 10F12, having ATCC number PTA-5337. In another embodiment, the antibody comprises the antigen binding fragments of 5F1 or 10F12. In another embodiment, the invention provides an isolated antibody capable of specifically binding to an isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or an active fragment thereof. In another embodiment, the antibody neutralizes GITRL activity. In another embodiment, the antibody is 5F1, having ATCC number PTA-5336, or 10F12, having ATCC number PTA-5337. In another embodiment, the antibody comprises the antigen binding fragments of 5F1 or 10F12.

[0022] In another embodiment, the invention provides a method of screening for test compounds capable of inhibiting or blocking the interaction of GITRL with GTR comprising the steps of contacting a sample containing GITRL and GTR with a test compound and determining whether the interaction of GITRL with GTR in the sample is decreased relative to the interaction of GITRL with GTR in a sample not contacted with the compound, whereby a decrease in the interaction of GITRL with GTR in the sample contacted with the compound identifies the compound as one that inhibits or blocks the interaction of GITRL with GTR. In another embodiment, the identified compound is used in a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection, the method comprising the steps of isolating T cells from the subject, treating the isolated T cells with the identified compound, and transferring the treated T cells back into the subject. In another embodiment, the identified compound is used in a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection, the method comprising administering to the subject the identified compound. In another embodiment, the invention provides a method for assessing the efficacy of the identified compound in a subject comprising the steps of

detecting a first number of effector T cells from the subject prior to administration of the compound to the subject, detecting a second number of effector T cells from the subject after administration of the compound to the subject, and comparing the first number and the second number, whereby a significant decrease in the number of effector T cells in the second number as compared to the first number indicates that the compound is efficacious in treating an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection in the subject. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

[0023] In another embodiment, the invention provides a method of screening for test compounds capable of enhancing or mimicking the interaction of GITRL with GITR comprising the steps of contacting a sample containing GITRL and GITR with a test compound and determining whether the interaction of GITRL with GITR in the sample is increased relative to the interaction of GITRL with GITR in a sample not contacted with the compound, whereby an increase in the interaction of GITRL with GITR in the sample contacted with the compound identifies the compound as one that enhances or mimics the interaction of GITRL with GITR. In another embodiment, the identified compound is used in a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, cancer or an infectious disease, the method comprising the steps of isolating T cells from the subject, treating the isolated T cells with the identified compound, and transferring the treated T cells back into the subject. In another embodiment, the identified compound is used in a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, cancer or an infectious disease, the method comprising administering to the subject the identified compound. In another embodiment, the invention provides a method for assessing the efficacy of the identified compound in a subject comprising the steps of detecting a first number of effector T cells from the subject prior to administration of the compound to the subject, detecting a second number of effector T cells from the subject after administration of the compound to the subject, and comparing the first number and the second number, whereby a significant increase in the number of effector T cells in the second number as compared to the first number indicates that the compound is efficacious in treating cancer or an infectious disease in the subject. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

[0024] In another embodiment, the invention provides a method for diagnosing an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection in a subject comprising the steps of detecting a test amount of a GITRL gene product in a sample from the subject, and comparing the test amount with a normal amount of the GITRL gene product in a control sample, whereby a test amount significantly above the normal amount provides a positive indication in the diagnosis of an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection. In another embodiment, the invention provides a method for diagnosing cancer or an infectious disease in a subject comprising the steps of detecting a test amount of a GITRL gene product in a sample from the subject, and comparing the test amount with a normal amount of the GITRL gene product in a control sample, whereby a test amount significantly below the normal amount provides a positive indication in the diagnosis of cancer or an infectious disease.

[0025] In another embodiment, the invention provides a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, an autoimmune disorder, inflammatory disease, or transplant rejection comprising administering to the subject a GITR antagonist. In another embodiment, the method comprises administering the GITR antagonist such that the susceptibility of the effector T cells in the subject to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is maintained (e.g., in an amount effective to maintain such susceptibility). In another embodiment, the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule. In another embodiment, the autoimmune disorder or inflammatory disease is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, encephalomyelitis, osteoarthritis, multiple sclerosis, autoimmune gastritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis and other inflammatory dermatoses, type I diabetes, asthma, allergy, and inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis.

[0026] In another embodiment, the invention provides a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, cancer or an infectious disease comprising administering to the subject a GITR agonist. In another embodiment, the method

comprises administering the GITR agonist such that GITR agonist provides a costimulatory signal to effector T cells in the subject and renders them less susceptible to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the subject (e.g., in an amount effective to provide such a signal). In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, and an agonistic GITR antibody.

[0027] In another embodiment, the invention provides a method of inducing proliferation of a cell population containing effector T cells comprising administering a GITR agonist to the cell population. In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, and an agonistic GITR antibody. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

[0028] In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting proliferation of a cell population containing effector T cells comprising administering a GITR antagonist to the cell population. In another embodiment, the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells. In another embodiment, the GITR antagonist is 5F1 or 10F12.

[0029] In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting or blocking suppression of a cell population comprising effector T cells in the presence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells comprising administering a GITR agonist to the cell population. In another embodiment, the method comprises administering the GITR agonist such that the GITR agonist provides a costimulatory signal to the effector T cells and renders them less susceptible to suppression by the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (e.g., in an amount effective to provide such a signal). In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein

containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, and an agonistic GITR antibody. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

[0030] In another embodiment, the invention provides a method of suppressing a cell population comprising effector T cells in the presence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells comprising administering a GITR antagonist to the cell population. In another embodiment, the method comprises administering the GITR antagonist such that the susceptibility of the effector T cells to suppression by the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is maintained (e.g., in an amount effective to maintain such susceptibility). In another embodiment, the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells. In another embodiment, the GITR antagonist is 5F1 or 10F12.

[0031] In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population with an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein expression of the nucleic acid molecule in a cell results in decreased production of GITRL. In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population with an antisense oligonucleotide complementary to a mRNA corresponding to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein the oligonucleotide inhibits expression of GITRL.

[0032] In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population with a siRNA molecule targeted to a mRNA corresponding to an isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population

with a siRNA molecule targeted to a mRNA corresponding to an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.

[0033] In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population with an antisense oligonucleotide to a nucleic acid molecule encoding GITRL. In another embodiment, the invention provides a method of inhibiting the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population with a siRNA molecule targeted to a mRNA encoding GITRL.

[0034] In another embodiment, the invention provides a method of inducing the expression of GITRL in a cell population comprising treating the cell population by transforming or transfecting the cell population with an isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or with an isolated nucleic acid molecule that encodes a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or a fragment thereof that encodes an active fragment of the protein, wherein the nucleic acid molecule is operably linked to at least one expression control sequence.

[0035] In another embodiment, the invention provides a population of effector T cells that have been contacted *in vitro* or *ex vivo* with a GITR agonist. In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, or an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

[0036] In another embodiment, the invention provides a method of treating cancer or an infectious disease in a subject, the method comprising the steps of obtaining a population of effector T cells, treating the population with a GITR agonist, and administering the treated population to the subject afflicted with cancer or an infectious disease. In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody. In another

embodiment, the subject is afflicted with cancer and the treated population is used as a tumor vaccine.

[0037] In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a GITR agonist and a pharmaceutically acceptable carrier. In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody.

[0038] In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a GITR antagonist and a pharmaceutically acceptable carrier. In another embodiment, the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule. In another embodiment, the antibody comprises the antigen binding fragments of 5F1 or 10F12.

[0039] In another embodiment, the invention provides a vaccine adjuvant comprising a GITR agonist and an antigen selected from the group consisting of a viral antigen, a bacterial antigen, a fungal antigen, a parasitic antigen, a cancer antigen, a tumor-associated antigen, and fragments thereof. In another embodiment, the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, or an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody.

[0040] In another embodiment, the invention provides a vaccine adjuvant comprising a GITR antagonist and an antigen selected from the group consisting of an autoantigen, amyloid peptide protein, an alloantigen, a transplant antigen, an allergen, and fragments thereof. In another embodiment, the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an

antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule. In another embodiment, the antibody comprises the antigen binding fragments of 5F1 or 10F12.

[0041] In another embodiment, the invention provides a method of screening for test compounds capable of neutralizing GITRL activity comprising the steps of contacting a sample containing GITRL and a neutralizing antibody with the compound, and determining whether the interaction of GITRL with the neutralizing antibody in the sample is decreased relative to the interaction of GITRL with the neutralizing antibody in a sample not contacted with the compound, whereby a decrease in the interaction of GITRL with the neutralizing antibody in the sample contacted with the compound identifies the compound as one that inhibits or blocks the interaction of GITRL with the neutralizing antibody. In another embodiment, the antibody is 5F1 or 10F12.

[0042] In another embodiment, the invention provides a method of providing a costimulatory signal to a cell population comprising effector T cells, the method comprising administering a GITR agonist. In another embodiment, the GITR agonist is protein selected from the group consisting of selected from the group consisting of GITRL, or an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITR, and an agonistic anti-GITR antibody. In another embodiment, the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0043] Figure 1 shows the alignment (based on BLOSUM62 amino acid substitution matrix; see Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-19) of the amino acid sequences for mouse (m) and human (h) GITRL.

[0044] Figure 2 shows the results of experiments on the effects of GITRL:GITR binding on proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells. Thymidine incorporation is measured (CPM) as a means of assessing cellular proliferation. Figure 2A shows that an agonistic anti-GITR antibody stimulated the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells, but not CD4⁺CD25⁻ T cells. Figure 2B shows that YB2/0 cells expressing GITRL stimulated the proliferation of CD4⁺CD25⁺ cells.

[0045] Figure 3A shows that GITRL expressed by YB2/0 cells (~50,000), as well as agonistic anti-GITR antibody (2 µg/ml), reversed the suppression (i.e., negative percent suppression) produced by freshly isolated CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells (# suppressors). Figure 3B shows that GITRL-YB2/0 cells in numbers less than 50,000 (i.e., ~3,000-25,000) were able to partially reverse suppression in a dose-dependent manner.

[0046] Figure 4 shows that GITRL-YB2/0 cells (~50,000) did not reverse suppression when activated CD4⁺CD25⁺ T cells were used in place of freshly isolated CD4⁺CD25⁺ T cells; similar results were obtained with agonistic anti-GITR antibody.

[0047] Figures 5A and 5B show that the GITRL-induced reversal of the suppression produced by freshly isolated CD4⁺CD25⁺ T cells can itself be reversed (i.e., restoration of suppression) in the presence of anti-GITRL antibody ("anti-GITRL" = 5F1 antibody). Figure 5B includes an additional experiment showing that a control antibody ("control Ig") did not restore suppression.

[0048] Figure 6 shows that anti-GITRL antibody can only enhance suppression in the presence of CD4⁺CD25⁺ T cells. Figure 6A shows the suppression of the proliferation of lymph node cells in the presence of anti-GITRL antibody (5F1). Figure 6B shows the lack of the suppressive activity of anti-GITRL antibody when the lymph node cell population was depleted of CD4⁺CD25⁺ T cells.

[0049] Figure 7 shows the distribution of GITRL expressing cells in lymphoid tissues. Figure 7A: Flow cytometric analysis was performed on CD11c⁺ cells, enriched from the spleen of BALB/c mice with magnetic beads, by staining with anti-CD4, anti-CD8 and anti-GITRL antibodies. GITRL expression was determined by comparing the fluorescence intensity of CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁻CD8⁻ -gated subsets (top, middle, and bottom histogram panels, respectively) stained with anti-GITRL antibody (filled histograms) to the fluorescence intensity of these cells stained with an isotype control antibody (unfilled histograms). Figure 7B: Expression of GITRL by splenic dendritic cells (DCs) and B-1 B cells was determined by staining freshly isolated BALB/c CD11c⁺ splenic DCs (top histogram panel) and CD11c^{low}B220⁺ plasmacytoid DCs (bottom histogram panel) with anti-GITRL mAb (filled histograms) or an isotype control antibody (unfilled

histograms) and performing flow cytometric analysis. Figure 7C (top histogram panel): The fluorescence intensities of B220⁺ B cells among total splenocytes (filled histogram), and CD11b⁺B220⁺-gated peritoneal (perC) B-1 B cells (solid line unfilled histogram) stained with anti-GITRL antibody were compared with the fluorescence intensity of cells stained with an isotype control (broken line unfilled histogram). Figure 7C (bottom histogram panel): A comparison of the fluorescence intensity of GITRL-antibody stained (filled histogram) and isotype antibody stained (unfilled histogram) perC macrophages (CD11b⁺B220⁻ cells) is shown. Figure 7D: Thymocytes were stained for expression of CD4, CD8, and either GITRL or an isotype control. The fluorescence intensities of CD4⁺CD8⁻ (top left quadrant), CD4⁺CD8⁺ (top right quadrant) and CD4⁻CD8⁺ (bottom right quadrant) cells stained with anti-GITRL antibody (filled histogram) were compared with the fluorescence intensities of these cells stained with an isotype control antibody (unfilled histogram). Figure 7E: Expression of GITRL by gated CD44⁺CD25⁻ (R1), CD44⁺CD25⁺ (R2), CD44⁻CD25⁺ (R3) or CD44⁻CD25⁻ (R4) thymic precursors was determined by comparing the fluorescence of these cells stained with anti-GITRL antibody (filled histogram) with the fluorescence of these cells stained with isotype control antibody (unfilled histogram). Figure 7F: Unstimulated lymph node cells were stained with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 and/or anti-GITRL antibodies. CD4⁺CD8⁻ cells (top left quadrant), and not CD4⁻CD8⁺ cells (bottom right quadrant), were further delineated with respect to the expression of CD25 by these cells. Expression of GITRL by CD4⁺CD8⁻CD25⁻ (top right histogram panel), CD4⁺CD8⁻CD25⁺ (lower right histogram panel) or CD4⁻CD8⁺ (bottom (middle) histogram panel) -gated lymph node cells was determined by comparing the fluorescence intensity of these cells stained with anti-GITRL antibody (filled histograms) with the fluorescence of these cells stained with an isotype control antibody (unfilled histograms). Results are representative of five independent experiments.

[0050] Figure 8 shows the downregulation by APCs of GITRL following stimulation. Figure 8A: Expression of GITRL by purified splenic B220⁺ B cells or total peritoneal (PerC) B220⁺CD11b⁺ B-1 B cells was determined for different time points following treatment with polyI:C (10µg/ml), LPS (0.5µg/ml), CpGs (ODN 1826, 1µM), anti-CD40 and IL-4 (10µg/ml and 20ng/ml, respectively) and

anti-IgM (F(ab')₂ fragment of goat-anti-IgM μ -chain, 1 μ g/ml). The fluorescence intensities of anti-GITRL-stained stimulated cells (filled histograms), anti-GITRL-stained unstimulated (medium) cells (solid line unfilled histograms) and isotype control antibody stained cells (broken line unfilled histograms) are presented. Figure 8B: Expression of GITRL by B220⁺ B cells (filled histogram) present among total splenocytes treated with anti-CD3 mAb (0.5 μ g/ml) after a 48-hour culture period was compared with expression of GITRL by unstimulated B220⁺ B cells (solid line unfilled histogram) and B220⁺ B cells stained with an isotype control antibody (broken line unfilled histogram). Figure 8C: Expression of GITRL (top histogram panels) and B7.2 (i.e., CD86) (bottom histogram panels) by purified CD11c⁺ DCs following culture with or without LPS (0.5 μ g/ml) at the indicated time points. Figure 8D: Expression of GITRL by total splenocytes gated on CD4⁺ or CD8⁺-expressing cells after a 48-hour culture period in the absence or presence of soluble anti-CD3 mAb (0.5 μ g/ml). Graphs are representative of two to four independent experiments; all experiments were carried out with tissues isolated from BALB/c mice.

[0051] Figure 9 demonstrates the effects of blocking GITR/GITRL interactions on inhibition of lymphocyte proliferation. For Figures 9A and 9B, bars indicate the s.d. values. Figure 9A: Proliferation (y-axis) of lymph node (LN; 1×10^5) and spleen cells (Sp; 0.5×10^5) with or without CD25⁺ cells (Total or $\Delta 25$, respectively) was determined after 72-hour culture with different concentrations of soluble anti-CD3 (x-axis). Cells were incubated either in the presence of purified anti-GITRL mAb (10 μ g/ml; closed circles) or a rat IgG2_a isotype control (10 μ g/ml; open circles). Results are representative of three independent experiments. Figure 9B: CD4⁺CD25⁻ or CD8⁺ T cells were cultured in the presence of 5×10^4 irradiated (3000R) T-depleted APCs and 5×10^4 irradiated (8000R) YB2/0-GITRL (open circles) or control YB2/0 (closed circles) cells. Cultures were activated with different concentrations of soluble anti-CD3 mAb (x-axis), and proliferation (y-axis) was measured after a 72-hour culture period. Figure 9C: Mean fluorescence (x-axis) of purified CD4⁺CD25⁻ T cells stained with anti-GITR antibody was determined at different time points following activation with soluble anti-CD3 (0.5 μ g/ml) in the presence of irradiated (3000R) T-depleted splenocytes. Results are representative of at least two independent experiments.

[0052] Figure 10 demonstrates that GITR expression by CD25⁺ T cells is required to reverse suppression. Figure 10A: Proliferation of cocultures of CD4⁺CD25⁺ T cells (5×10^4) from various knockout mice, and variable numbers of CD4⁺CD25⁺ T cells (x-axis) from various knockout mice [(Aa) CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{+/+}, CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{+/+}; (Ab) CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{+/+}, CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{-/-}; (Ac) CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{-/-}, CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{+/+}; and (Ad) CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{-/-}, CD4⁺CD25⁺: *GITR*^{-/-}], incubated with irradiated APCs from wild type mice (5×10^4) and with soluble anti-CD3 (0.5 μg/ml) and 2 μg/ml of either anti-GITR antibody (filled circles) or an isotype control antibody (open circles) was determined by measuring ³H-thymidine uptake (cpm; y-axis). Figure 10B: Proliferation of cocultures was performed as above (Fig. 10A) with variable numbers of mouse CD4⁺CD25⁺ T cells (x-axis) and either (Ba) mouse CD4⁺CD25⁺ T cells or (Bb) rat CD4⁺CD25⁺ T cells in the presence of irradiated (3000R) rat APCs. Cultures were stimulated with a cocktail of antibodies against both rat and mouse anti-CD3 (0.25 μg/ml of each), and were treated with 2 μg/ml of either an isotype control (Rat IgG; open circles) or anti-GITR (DTA-1; filled circles) antibody. Bars indicate the s.d. values calculated from proliferation in triplicate cultures. Figure 10C: Fluorescence (x-axis) of CFSE-stained mouse CD4⁺CD25⁺ (top panels) and rat CD4⁺CD25⁺ T cells (bottom panels) cocultured at a 1:8 suppressor to responder ratio with isotype control (Rat IgG; left panels) or anti-GITR antibody (DTA-1; right panels) is depicted. Mouse and rat T cell subsets were distinguished by staining with specific anti-CD4 antibodies. Results are representative of two to four independent experiments.

[0053] Figure 11 demonstrates that GITR signals are required to overcome suppression mediated by endogenous regulatory T cells. Figure 11A: CFSE-labeled lymph node (LN) cells (5×10^4) from B6 (wild type), *GITR*^{+/+}, *CD28*^{-/-} and *GITR*^{-/-} mice were cultured for 72 hours with different concentrations of soluble anti-CD3 mAb (x-axis). Total LN cells were cultured without (Aa) or with (Ac) exogenous of IL-2 (50U/ml). LN cells depleted of CD25⁺ cells (LNΔ25) were cultured without (Ab) or with (Ad) exogenous IL-2 (50U/ml). Bars indicating the s.d. values were omitted for clarity. Figure 11B: Flow cytometric assessment of CFSE dilution by CD4⁺ and CD8⁺-gated lymph node T cells isolated from *CD28*^{-/-}, *GITR*^{-/-}, *GITR*^{+/+} or *GITR*^{+/+} animals was performed after 72-hour culture. The

results correspond to the 0.63 µg/ml concentration of soluble anti-CD3 (as in Fig. 11A). Figure 11C: Flow cytometric analysis of CD25 expression was performed on H-2D^b positive CD4⁺CD25⁻ cells that remained unstimulated (broken line unfilled histograms), were obtained from *GITR*^{-/-} mice (solid line unfilled histograms), or were obtained from *GITR*^{+/+} mice (filled histograms). CD25 expression by CD4⁺CD25⁻ cells obtained from *GITR*^{-/-} or *GITR*^{+/+} mice was determined after 24-hour culture with LN APCs from wild type mice, in the presence of anti-CD3 (0.5 µg/ml), and in the absence (left histogram panels) or presence (right histogram panels) of CD4⁺CD25⁺ cells from BALB/c mice at a 1:2 suppressor to responder ratio. CD25 expression was also determined in the absence (top histogram panels) or presence (bottom histogram panels) of 50U/ml rhIL-2. Results above are representative of three independent experiments.

[0054] Figure 12 demonstrates that CD28-dependent costimulation enhances GITR expression and responsiveness. Figure 12A: Flow cytometric analysis of GITR expression by purified CD4⁺CD25⁻ or CD8⁺ T cells (2.5×10^4) after 72-hour culture with plate-bound anti-CD3 and 2 µg/ml of either plate-bound hamster isotype ("aCD3") or plate-bound anti-CD28 ("aCD3+aCD28"). Figure 12B (left histogram panel): Anti-GITR staining of CD4⁺CD25⁻ T cells cultured in the presence of irradiated, T cell-depleted splenocytes and soluble anti-CD3 (0.5 µg/ml) with or without a cocktail of anti-CD80/86 (10 µg/ml of each) antibodies (i.e., anti-B7.1/7.2 antibodies) for 72 hours. Figure 12B (right histogram panel): Anti-GITR staining of CD4⁺CD25⁻ T cells cultured in the presence of irradiated, T cell-depleted splenocytes and soluble anti-CD3 (0.5 µg/ml) with or without a cocktail of antibodies against IL-2 and IL-2Rα. Figure 12C: Proliferation was assessed in the presence or absence of anti-CD80/86 mAbs (10 µg/ml of each; "aB7") with the addition of either anti-GITR mAb (2 µg/ml; "DTA-1") or an isotype control antibody (2 µg/ml; "Rat IgG"). Bars indicate the s.d. values. Results are representative of two to three independent experiments.

[0055] Figure 13 demonstrates that GITRL binding to GITR provides a costimulatory signal to effector T cells. Figure 13A: Proliferation of effector GITR⁺/TCR⁺ HT-2 T cells (4×10^4) alone (white bars) or cocultured with 1×10^4

control YB2/0 cells (cross-hatch bars) or GITRL-expressing YB2/0 cells (filled bars), in the absence or presence of one or two anti-CD3 beads per HT-2 cell, was determined by measuring ^3H -thymidine uptake (cpm; y-axis). Figure 13B: Proliferation of 4×10^4 HT-2 cells cocultured with two anti-CD3 beads per cell, 1×10^4 GITRL-expressing YB2/0 cells, and increasing concentrations (ng/ml; x-axis) of an anti-GITRL antibody (5F1.1; filled circles) or an isotype control antibody (rIgG1; open circles) was determined by measuring ^3H -thymidine uptake (cpm; y-axis). Figure 13C: Proliferation of 4×10^4 HT-2 cells cocultured with two anti-CD3 beads per cell, 1×10^4 GITRL-expressing YB2/0 cells, and increasing concentrations (ng/ml; x-axis) of four different anti-GITRL antibodies: 5F1.1 (filled circles), MGLT-10 (filled squares), MGTL-15 (open squares) or a polyclonal antibody (open circles) was determined by measuring ^3H -thymidine uptake (cpm; y-axis).

[0056] Figure 14 demonstrates that blocking GITR-GITRL binding with an anti-GITRL antibody prevents adoptive transfer of PLP-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The incidence of EAE in mice was assessed. Mice were injected with 5×10^6 splenocytes that were isolated from female SLJ mice immunized with 150 μg PLP peptide and restimulated *ex vivo* for 3 days in three different conditions: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLP alone (open circles), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLP and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of an isotype control antibody (CKO1; filled circles), or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLP and anti-GITRL antibody (5F1.1; filled squares). The incidence of EAE was monitored for 52 days (x-axis) and scored on a scale of 0 to 5 (y-axis).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0057] As the antibodies to GITR that produce a reversal of suppressive activity appear to produce an agonistic signal, it was predicted that engagement of GITR by GITRL should also inhibit the suppressive activity of regulatory T cells. The lack of suitable reagents previously has precluded a detailed functional analysis of GITR/GITRL interactions under more physiological conditions. Here, the mouse ortholog of GITRL has been identified, and antagonistic antibodies that specifically bind to the mouse ortholog of GITRL, i.e., do not cross-react with human GITRL, have been generated.

[0058] Using this reagent, the tissue distribution and regulation of GITRL were examined. In addition, the ability of GITR/GITRL interactions to regulate T cell suppression was investigated using *GITR*^{-/-} mice. As both CD25⁻ and CD25⁺ T cells express GITR, albeit to varying degrees, the previous studies demonstrating an inhibition of suppressor function upon treatment of cocultures with an agonistic anti-GITR antibody yielded equivocal results regarding the cellular target of engagement of GITR. Here, using combinations of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells from wild type and *GITR*^{-/-} mice in coculture experiments, it was found that ligation of GITR on the CD4⁺CD25⁻ responder T cells, not the CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells, was required to abrogate suppression. In the absence of CD4⁺CD25⁺ T cells, *GITR*^{-/-} T cells mounted proliferative responses similar to those of wild type animals, although they were totally suppressed in the presence of physiological numbers of CD4⁺CD25⁺ T cells. These results suggest, for the first time, that GITR/GITRL engagement provides a previously undefined signal that renders effector T cells resistant to the inhibitory effects of CD4⁺CD25⁺ T cells. Thus, the downregulation of GITRL expression subsequent to secondary inflammatory signals may facilitate CD4⁺CD25⁺-mediated suppression and prevent the deleterious consequences of an exuberant effector cell response.

[0059] This research has shed new light on the mechanisms underlying the interaction of GITR and its ligand, GITRL, especially regarding the effects on CD4⁺CD25⁻ T cells, the cells traditionally understood to be the target of suppressive activity. In summary, using *GITR*^{-/-} mice, the capacity of anti-GITR mAb (the agonistic mouse antibody to GITR) to abrogate suppression was demonstrated to be mediated by its action on CD4⁺CD25⁻, not CD4⁺CD25⁺ T cells (as previously proposed by several studies). APCs (antigen presenting cells) constitutively express GITRL, which is downregulated following Toll-like receptor signaling. Although *GITR*^{-/-} mouse CD4⁺CD25⁻ T cells were capable of mounting proliferative responses, they were incapable of proliferation in the presence of physiological numbers of CD4⁺CD25⁺ T cells. Thus, GITRL provides an important signal for CD4⁺CD25⁻ T cells, and other effector T cells (e.g., CD8⁺ T cells), rendering them resistant to CD4⁺CD25⁺-mediated regulation at the initiation of the immune response. The downregulation of GITRL by inflammatory stimuli may enhance the susceptibility of effector T cells (e.g.,

CD4⁺CD25⁻ T cells) to suppressor activity during the course of, e.g., cancer or an infectious insult.

[0060] To this end, the present invention provides the nucleotide and amino acid sequences of a novel mouse homolog of human GITRL. Human GITRL has been identified (Kwon et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:6056-61; Gurney et al. (1999) *Curr. Biol.* 9:215-18); in addition, several groups very recently also reported the cloning of the murine GTR ligand (Kim et al., 2003; Tone et al., 2003; Yu et al., 2003).

[0061] In one aspect, the present invention provides nucleotide sequences, and amino acid sequences, and active fragments and/or fusion proteins thereof, of a novel mouse homolog of human GITRL. GITRL polynucleotides of the invention include polynucleotides that modulate expression of GITRL, e.g., expression vectors comprising GITRL polynucleotides that may upregulate expression of GITRL, and/or antisense and/or RNAi GITRL polynucleotides that downregulate the expression of GITRL. Use of such polynucleotides to modulate the expression of GITRL in cells and/or animals are also provided. In addition to GITRL polypeptides, the invention also provides other agonistic polypeptides, e.g., active fragments of GITRL and/or GITRL fusion proteins that are capable of mimicking GITRL, i.e., inducing GTR activity in effector T cells. Transformed host cells and transgenic animals containing GITRL polynucleotides are also within the scope of the invention.

[0062] In another aspect, antibodies that specifically bind to the novel murine GITRL polypeptides of the invention (i.e., do not bind to human GITRL) are provided. In particular, neutralizing antibodies that inhibit the activity of GITRL (e.g., antibodies that prevent GITRL from binding GTR) are provided; these antibodies can be said to neutralize the activity of GITRL (i.e., render GITRL ineffective). Neutralizing antibodies of the invention include nonhuman and human antibodies to GITRL that inhibit GITRL activity, as well as chimerized and/or humanized versions of nonhuman antibodies of the invention that inhibit GITRL activity. Also included within the scope of the invention are antagonistic antibodies that may have one or more mutations, which may function to increase the half-life, stability or affinity of the antibody, or may function to modify the effector function of the antibody.

[0063] Another aspect of the invention provides screening assays in which the GITRL polynucleotides and polypeptides, including but not limited to human homologs thereof, are used to identify compounds capable of modulating the activity of GITR in a cell, organism or subject. The invention also provides methods to assess the efficacy of identified compounds whereby the number of T cells in a patient is determined before and after administration of the identified compound. Additionally, the invention provides methods of treating patients or subjects using the identified compounds.

[0064] In addition to providing methods of screening test compounds capable of modulating GITR activity, e.g., GITR agonists or GITR antagonists, the invention provides methods for diagnosing, prognosing and monitoring the progress of disorders related to dysregulation of the immune system, e.g., autoimmune diseases, inflammatory diseases and transplant rejection, and cancer and infectious diseases.

[0065] Methods for using GITRL and related molecules of the invention are also disclosed herein, including agonistic GITR molecules (i.e., GITRL polynucleotides, GITRL polypeptides, active fragments thereof and/or fusion proteins thereof, agonistic small molecules, and agonistic GITR antibodies), and antagonistic GITR molecules (i.e., GITRL inhibitory polynucleotides, neutralizing GITR antibodies, neutralizing GITRL antibodies, antagonistic small molecules, and GITR fusion proteins), for the therapeutic treatment of disorders related to dysregulation of the immune system. For example, methods for treating a subject at risk for, or diagnosed with, an autoimmune disorder, transplant rejection, and/or other inflammatory diseases comprising administering GITR antagonists, e.g., a neutralizing anti-GITRL antibody to the subject are provided; also, methods of treating a subject at risk for, or diagnosed with, cancer or infectious diseases comprising administering GITR agonists, e.g., GITRL, or an agonistic fusion protein thereof, are provided. Alternatively, methods of inducing or inhibiting proliferation of T cells via the administration of GITR agonists, e.g., GITRL (including agonistic fusion proteins thereof), or GITR antagonists, e.g., neutralizing anti-GITRL antibodies or antagonistic GITR fusion proteins, respectively, are provided. Similarly, methods of blocking or enhancing suppression of T cells in the presence of CD4⁺CD25⁺ T cells comprising

administration of GITR agonists, e.g., GITRL (including agonistic fusion proteins thereof), or GITR antagonists, e.g., neutralizing anti-GITRL antibodies, respectively, are also provided. T cell populations treated with GITRL polypeptides and related molecules (including agonistic fusion proteins thereof) are within the scope of the invention, and may be administered to a subject in a method of treating cancer or an infectious disease. Other methods of treatment are provided, including a method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection with an antagonistic compound that decreases GITR activity, and methods of treating a subject at risk for, or diagnosed with, cancer or an infectious disease with an agonistic compound that increases GITR activity. Pharmaceutical compositions, e.g., vaccine adjuvants, comprising GITRL polynucleotides, polypeptides and related molecules (including agonistic GITRL fusion proteins and antagonistic anti-GITRL antibodies) of the invention are also within the scope of the invention. The methods of the present invention are directed to GITRL and GITR, including, but not limited to, mouse GITRL and GITR and their homologs; specifically included among these homologs is human GITRL and GITR.

GITRL Polynucleotides and Polypeptides

[0066] The present invention provides novel isolated and purified polynucleotides and polypeptides related to a novel ligand for GITR (GITRL). The genes, polynucleotides, proteins, and polypeptides of the present invention include, but are not limited to, mouse GITRL and its homologs.

[0067] For example, the invention provides purified and isolated polynucleotides encoding murine GITRL. Preferred DNA sequences of the invention include genomic, cDNA and chemically synthesized DNA sequences.

[0068] The nucleotide sequence of a cDNA encoding this novel ligand, designated mouse GITRL cDNA, is set forth in SEQ ID NO:1. Polynucleotides of the present invention also include polynucleotides that hybridize under stringent conditions to SEQ ID NO:1, or its complement, and/or encode polypeptides that retain substantial biological activity (i.e., active fragments) of full-length mouse GITRL. Polynucleotides of the present invention also include continuous portions of the sequence set forth in SEQ ID NO:1 comprising at least 21 consecutive nucleotides.

[0069] The nucleotide sequence of a genomic DNA encoding this novel ligand, designated mouse GITRL genomic DNA, is set forth in SEQ ID NO:3.

Polynucleotides of the present invention also include polynucleotides that hybridize under stringent conditions to SEQ ID NO:3, or its complement, and/or encode polypeptides that retain substantial biological activity of full-length mouse GITRL. Polynucleotides of the present invention also include continuous portions of the sequence set forth in SEQ ID NO:3 comprising at least 21 consecutive nucleotides.

[0070] The amino acid sequence of mouse GITRL is set forth in SEQ ID NO:2.

Polypeptides of the present invention also include continuous portions of the sequence set forth in SEQ ID NO:2 comprising at least 7 consecutive amino acids. A preferred polypeptide of the present invention includes any continuous portion of the sequence set forth in SEQ ID NO:2 that retains substantial biological activity of full-length mouse GITRL. Polynucleotides of the present invention also include, in addition to those polynucleotides of murine origin described above, polynucleotides that encode the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2 or a continuous portion thereof, and that differ from the polynucleotides described above only due to the well-known degeneracy of the genetic code.

[0071] The isolated polynucleotides of the present invention may be used as hybridization probes and primers to identify and isolate nucleic acids having sequences identical to or similar to those encoding the disclosed polynucleotides. Hybridization methods for identifying and isolating nucleic acids include polymerase chain reaction (PCR), Southern hybridizations, *in situ* hybridization and Northern hybridization, and are well known to those skilled in the art.

[0072] Hybridization reactions can be performed under conditions of different stringency. The stringency of a hybridization reaction includes the difficulty with which any two nucleic acid molecules will hybridize to one another. Preferably, each hybridizing polynucleotide hybridizes to its corresponding polynucleotide under reduced stringency conditions, more preferably stringent conditions, and most preferably highly stringent conditions. Examples of stringency conditions are shown in Table 1 below: highly stringent conditions are those that are at least as stringent as, for example, conditions A-F; stringent conditions are at least as

stringent as, for example, conditions G-L; and reduced stringency conditions are at least as stringent as, for example, conditions M-R.

TABLE 1

Stringency Condition	Poly-nucleotide Hybrid	Hybrid Length (bp) ¹	Hybridization Temperature and Buffer ²	Wash Temperature and Buffer ²
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1X SSC -or- 42°C; 1X SSC, 50% formamide	65°C; 0.3X SSC
B	DNA:DNA	<50	T _B *; 1X SSC	T _B *; 1X SSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1X SSC -or- 45°C; 1X SSC, 50% formamide	67°C; 0.3X SSC
D	DNA:RNA	<50	T _D *; 1X SSC	T _D *; 1X SSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1X SSC -or- 50°C; 1X SSC, 50% formamide	70°C; 0.3X SSC
F	RNA:RNA	<50	T _F *; 1X SSC	T _F *; 1X SSC
G	DNA:DNA	>50	65°C; 4X SSC -or- 42°C; 4X SSC, 50% formamide	65°C; 1X SSC
H	DNA:DNA	<50	T _H *; 4X SSC	T _H *; 4X SSC
I	DNA:RNA	>50	67°C; 4X SSC -or- 45°C; 4X SSC, 50% formamide	67°C; 1X SSC
J	DNA:RNA	<50	T _J *; 4X SSC	T _J *; 4X SSC
K	RNA:RNA	>50	70°C; 4X SSC -or- 50°C; 4X SSC, 50% formamide	67°C; 1X SSC
L	RNA:RNA	<50	T _L *; 2X SSC	T _L *; 2X SSC
M	DNA:DNA	>50	50°C; 4X SSC -or- 40°C; 6X SSC, 50% formamide	50°C; 2X SSC
N	DNA:DNA	<50	T _N *; 6X SSC	T _N *; 6X SSC
O	DNA:RNA	>50	55°C; 4X SSC -or- 42°C; 6X SSC, 50% formamide	55°C; 2X SSC
P	DNA:RNA	<50	T _P *; 6X SSC	T _P *; 6X SSC
Q	RNA:RNA	>50	60°C; 4X SSC -or- 45°C; 6X SSC, 50% formamide	60°C; 2X SSC
R	RNA:RNA	<50	T _R *; 4X SSC	T _R *; 4X SSC

¹The hybrid length is that anticipated for the hybridized region(s) of the hybridizing polynucleotides. When hybridizing a polynucleotide to a target polynucleotide of unknown sequence, the hybrid length is assumed to be that of the hybridizing polynucleotide. When polynucleotides of known sequence are hybridized, the hybrid length can be determined by aligning the sequences of the polynucleotides and identifying the region or regions of optimal sequence complementarity.

²SSPE (1xSSPE is 0.15M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, and 1.25mM EDTA, pH 7.4) can be substituted for SSC (1xSSC is 0.15M NaCl and 15mM sodium citrate) in the hybridization and wash buffers; washes are performed for 15 minutes after hybridization is complete.

T_B* - T_R*: The hybridization temperature for hybrids anticipated to be less than 50 base pairs in length should be 5-10°C less than the melting temperature (T_m) of the hybrid, where T_m is determined according to the following equations. For hybrids less than 18 base pairs in length, T_m(°C) = 2(# of A + T bases) + 4(# of G + C bases). For hybrids between 18 and 49 base pairs in length, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀Na⁺) + 0.41(%G + C) - (600/N), where N is the number of bases in the hybrid, and Na⁺ is the concentration of sodium ions in the hybridization buffer (Na⁺ for 1X SSC = 0.165 M).

Additional examples of stringency conditions for polynucleotide hybridization are provided in Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Chs. 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), and Ausubel et al, eds, Current Protocols in Molecular Biology, Sects. 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc. (1995), herein incorporated by reference.

[0073] The isolated polynucleotides of the present invention may be used as hybridization probes and primers to identify and isolate DNA having sequences encoding allelic variants of the disclosed polynucleotides. Allelic variants are naturally occurring alternative forms of the disclosed polynucleotides that encode polypeptides that are identical to or have significant similarity to the polypeptides encoded by the disclosed polynucleotides. Preferably, allelic variants have at least 90% sequence identity (more preferably, at least 95% identity; most preferably, at least 99% identity) with the disclosed polynucleotides.

[0074] The isolated polynucleotides of the present invention may also be used as hybridization probes and primers to identify and isolate DNAs having sequences encoding polypeptides homologous to the disclosed polynucleotides. These homologs are polynucleotides and polypeptides isolated from a different species than that of the disclosed polypeptides and polynucleotides, or within the same species, but with significant sequence similarity to the disclosed polynucleotides and polypeptides. Preferably, polynucleotide homologs have at least 50% sequence identity (more preferably, at least 75% identity; most preferably, at least 90% identity) with the disclosed polynucleotides, whereas polypeptide homologs have at least 30% sequence identity (more preferably, at least 45% identity; most preferably, at least 60% identity) with the disclosed polypeptides. Preferably, homologs of the disclosed polynucleotides and polypeptides are those isolated from mammalian species.

[0075] The isolated polynucleotides of the present invention may also be used as hybridization probes and primers to identify cells and tissues that express the polypeptides of the present invention and the conditions under which they are expressed.

[0076] Additionally, the isolated polynucleotides of the present invention may be used to alter (i.e., enhance, reduce, or modify) the expression of the genes corresponding to the polynucleotides of the present invention in a cell or organism. These corresponding genes are the genomic DNA sequences of the present invention (e.g., SEQ ID NO:3) that are transcribed to produce the mRNAs from which the cDNA polynucleotides of the present invention (e.g., SEQ ID NO:1) are derived.

[0077] Altered expression of the genes of the present invention, including but not limited to mouse GITRL and its homologs, may be achieved in a cell or organism through the use of various inhibitory polynucleotides, such as antisense polynucleotides (e.g., antisense GITRL nucleic acid molecules) and ribozymes that bind and/or cleave the mRNA transcribed from the genes of the invention (see, e.g., Galderisi et al. (1999) *J. Cell Physiol.* 181:251-57; Sioud (2001) *Curr. Mol. Med.* 1:575-88). Such inhibitory polynucleotides may be useful in preventing or treating autoimmune disorders, inflammatory diseases, transplant rejection, and similar or related disorders.

[0078] The antisense polynucleotides or ribozymes of the invention can be complementary to an entire coding strand of a gene of the invention, or to only a portion thereof. Alternatively, antisense polynucleotides or ribozymes can be complementary to a noncoding region of the coding strand of a gene of the invention. The antisense polynucleotides or ribozymes can be constructed using chemical synthesis and enzymatic ligation reactions using procedures well known in the art. The nucleoside linkages of chemically synthesized polynucleotides can be modified to enhance their ability to resist nuclease-mediated degradation, as well as to increase their sequence specificity. Such linkage modifications include, but are not limited to, phosphorothioate, methylphosphonate, phosphoroamidate, boranophosphate, morpholino, and peptide nucleic acid (PNA) linkages (Galderisi et al., *supra*; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243:209-14; Micklefield (2001) *Curr. Med. Chem.* 8:1157-79). Alternatively, these molecules can be produced biologically using an expression vector into which a polynucleotide of the present invention has been subcloned in an antisense (i.e., reverse) orientation.

[0079] The inhibitory polynucleotides of the present invention also include triplex-forming oligonucleotides (TFOs) that bind in the major groove of duplex DNA with high specificity and affinity (Knauert and Glazer (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10:2243-51). Expression of the genes of the present invention can be inhibited by targeting TFOs complementary to the regulatory regions of the genes (i.e., the promoter and/or enhancer sequences) to form triple helical structures that prevent transcription of the genes.

[0080] In one embodiment of the invention, the inhibitory polynucleotides of the present invention are short interfering RNA (siRNA) molecules (e.g., siRNA

GITRL nucleic acid molecules). These siRNA molecules are short (preferably 19-25 nucleotides; most preferably 19 or 21 nucleotides), double-stranded RNA molecules that cause sequence-specific degradation of target mRNA. This degradation is known as RNA interference (RNAi) (e.g., Bass (2001) *Nature* 411:428-29). Originally identified in lower organisms, RNAi has been effectively applied to mammalian cells and has recently been shown to prevent fulminant hepatitis in mice treated with siRNA molecules targeted to Fas mRNA (Song et al. (2003) *Nature Med.* 9:347-51). In addition, intrathecally delivered siRNA has recently been reported to block pain responses in two models (agonist-induced pain model and neuropathic pain model) in the rat (Dorn et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(5):e49).

[0081] The siRNA molecules of the present invention can be generated by

annealing two complementary single-stranded RNA molecules together (one of which matches a portion of the target mRNA) (Fire et al., U.S. Patent No. 6,506,559) or through the use of a single hairpin RNA molecule that folds back on itself to produce the requisite double-stranded portion (Yu et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6047-52). The siRNA molecules can be chemically synthesized (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-98) or produced by *in vitro* transcription using single-stranded DNA templates (Yu et al., *supra*). Alternatively, the siRNA molecules can be produced biologically, either transiently (Yu et al., *supra*; Sui et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20) or stably (Paddison et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1443-48), using an expression vector(s) containing the sense and antisense siRNA sequences. Recently, reduction of levels of target mRNA in primary human cells, in an efficient and sequence-specific manner, was demonstrated using adenoviral vectors that express hairpin RNAs, which are further processed into siRNAs (Arts et al. (2003) *Genome Res.* 13:2325-32).

[0082] The siRNA molecules targeted to the polynucleotides of the present invention can be designed based on criteria well known in the art (e.g., Elbashir et al. (2001) *EMBO J.* 20:6877-88). For example, the target segment of the target mRNA preferably should begin with AA (most preferred), TA, GA, or CA; the GC ratio of the siRNA molecule preferably should be 45-55%; the siRNA molecule preferably should not contain three of the same nucleotides in a row; the siRNA molecule preferably should not contain seven mixed G/Cs in a row; and the target

segment preferably should be in the ORF region of the target mRNA and preferably should be at least 75 bp after the initiation ATG and at least 75 bp before the stop codon. Based on these criteria, or on other known criteria (e.g., Reynolds et al. (2004) *Nature Biotechnol.* 22:326-30), siRNA molecules of the present invention, targeted to the mRNA polynucleotides of the present invention, can be designed by one of ordinary skill in the art.

[0083] Altered expression of the genes of the present invention in an organism may also be achieved through the creation of nonhuman transgenic animals into whose genomes polynucleotides of the present invention have been introduced. Such transgenic animals include animals that have multiple copies of a gene (i.e., the transgene) of the present invention. A tissue-specific regulatory sequence(s) may be operably linked to the transgene to direct expression of a polypeptide of the present invention to particular cells or a particular developmental stage. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional and are well known in the art (e.g., Bockamp et al., *Physiol. Genomics*, 11:115-32 (2002)).

[0084] Altered expression of the genes of the present invention in an organism may also be achieved through the creation of animals whose endogenous genes corresponding to the polynucleotides of the present invention have been disrupted through insertion of extraneous polynucleotide sequences (i.e., a knockout animal). The coding region of the endogenous gene may be disrupted, thereby generating a nonfunctional protein. Alternatively, the upstream regulatory region of the endogenous gene may be disrupted or replaced with different regulatory elements, resulting in the altered expression of the still-functional protein. Methods for generating knockout animals include homologous recombination and are well known in the art (e.g., Wolfer et al., *Trends Neurosci.*, 25:336-40 (2002)).

[0085] The isolated polynucleotides of the present invention may be operably linked to an expression control sequence and/or ligated into an expression vector for recombinant production of the polypeptides of the present invention. General methods of expressing recombinant proteins are well known in the art. Such recombinant proteins may be expressed in soluble form for use in treatment of disorders resulting from dysregulation of the immune system; such disorders include, for example, cancers and infectious diseases, and autoimmune disorders

and inflammatory diseases, and transplant rejection. Autoimmune disorders and inflammatory diseases include, but are not limited to, rheumatoid arthritis, encephalomyelitis, osteoarthritis, multiple sclerosis, autoimmune gastritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis and other inflammatory dermatoses, type I diabetes, asthma, allergy, and inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis.

[0086] An expression vector, as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a plasmid, which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., nonepisomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operably linked. Such vectors are referred to herein as recombinant expression vectors (or simply, expression vectors). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, plasmid and vector may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses) that serve equivalent functions.

[0087] In one embodiment, the polynucleotides of the present invention are used to create GITR agonists, e.g., GITRL polypeptides, including active fragments and/or fusion polypeptides thereof, which are also within the scope of the invention. For example, a GITRL polypeptide or active fragments thereof may be fused to a second moiety, e.g., an immunoglobulin or a fragment thereof (e.g., an Fc binding fragment thereof). In some embodiments, the first polypeptide includes full-length GITRL polypeptide. Alternatively, the first polypeptide may comprise less than the full-length GITRL polypeptide. Additionally, soluble forms of GITRL may be

XY

fused through "linker" sequences to the Fc portion of an immunoglobulin. Other fusion proteins, such as those with glutathione-S-transferase (GST), Lex-A, thioredoxin (TRX) or maltose-binding protein (MBP), may also be used.

[0088] The fusion proteins may additionally include a linker sequence joining the GITRL or GITRL fragment to the second moiety. Use of such linker sequences are well known in the art. For example, the fusion protein can include a peptide linker, e.g., a peptide linker of about 2 to 20, more preferably less than 10, amino acids in length. In one embodiment, the peptide linker may be 2 amino acids in length.

[0089] In another embodiment, the fusion protein includes a heterologous signal sequence (i.e., a polypeptide sequence that is not present in a polypeptide encoded by a GITRL nucleic acid) at its N-terminus. For example, a signal sequence from another protein may be fused with a GITRL polypeptide, including active fragments and/or fusion proteins thereof. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of GITRL can be increased through use of a heterologous signal sequence.

[0090] A signal peptide that can be included in the fusion protein is MKFLVNVALVFMVVYISYTYA (SEQ ID NO:11). If desired, one or more amino acids can additionally be inserted between the first polypeptide moiety comprising the GITRL moiety and the second polypeptide moiety. The second polypeptide is preferably soluble. In some embodiments, the second polypeptide enhances the half-life, (e.g., the serum half-life) of the linked polypeptide. In some embodiments, the second polypeptide includes a sequence that facilitates association of the fusion polypeptide with a second GITRL polypeptide. In preferred embodiments, the second polypeptide includes at least a region of an immunoglobulin polypeptide. Immunoglobulin fusion polypeptides are known in the art and are described in e.g., US Patent Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; and 5,455,165, all of which are hereby incorporated by reference.

[0091] A chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with

conventional techniques, e.g., by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, Ausubel et al. (Eds.)

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992).

Moreover, many expression vectors are commercially available that encode a fusion moiety (e.g., an Fc region of an immunoglobulin heavy chain). A GITRL-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the immunoglobulin protein. In some embodiments, GITRL fusion polypeptides exist as oligomers, such as dimers or trimers.

[0092] A number of cell lines may act as suitable host cells for recombinant expression of the polypeptides of the present invention. Mammalian host cell lines include, for example, COS cells, CHO cells, 293T cells, A431 cells, 3T3 cells, CV-1 cells, HeLa cells, L cells, BHK21 cells, HL-60 cells, U937 cells, HaK cells, Jurkat cells, as well as cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue and primary explants.

[0093] Alternatively, it may be possible to recombinantly produce the polypeptides of the present invention in lower eukaryotes such as yeast or in prokaryotes.

Potentially suitable yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*,

Schizosaccharomyces pombe, *Kluyveromyces* strains, and *Candida* strains.

Potentially suitable bacterial strains include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Salmonella typhimurium*. If the polypeptides of the present invention are made in yeast or bacteria, it may be necessary to modify them by, for example, phosphorylation or glycosylation of appropriate sites, in order to obtain functionality. Such covalent attachments may be accomplished using well-known chemical or enzymatic methods.

[0094] Expression in bacteria may result in formation of inclusion bodies incorporating the recombinant protein. Thus, refolding of the recombinant protein may be required in order to produce active or more active material. Several methods for obtaining correctly folded heterologous proteins from bacterial inclusion bodies are known in the art. These methods generally involve solubilizing the protein from the inclusion bodies, then denaturing the protein completely using a chaotropic agent. When cysteine residues are present in the primary amino acid sequence of the protein, it is often necessary to accomplish the refolding in an environment that allows correct formation of disulfide bonds (a redox system). General methods of refolding are disclosed in Kohno (1990) *Meth. Enzymol.* 185:187-95. EP 0433225, and patent application U.S. Ser. No. 08/163,877 describe other appropriate methods.

[0095] The polypeptides of the present invention may also be recombinantly produced by operably linking the isolated polynucleotides of the present invention to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, such as baculovirus vectors, and employing an insect cell expression system. Materials and methods for baculovirus/Sf9 expression systems are commercially available in kit form (e.g., the MaxBac[®] kit, Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0096] GITR agonists, e.g., GITRL protein, active fragments and/or fusion protein thereof, may be prepared by growing a culture transformed host cells under culture conditions necessary to express the desired protein. Following recombinant expression in the appropriate host cells, the polypeptides of the present invention may then be purified from culture medium or cell extracts using known purification processes, such as gel filtration and ion exchange chromatography. Soluble forms of GITR agonists, e.g., GITRL protein, active fragments and/or fusion protein thereof, can be purified from conditioned media. Membrane-bound forms of, e.g., a GITRL protein of the invention can be purified by preparing a total membrane fraction from the expressing cell and extracting the membranes with a nonionic detergent such as Triton X-100. Purification may also include affinity chromatography with agents known to bind the polypeptides of the present invention. These purification processes may also be used to purify the polypeptides of the present invention from other sources, including natural sources. As previously described, GITR agonists, e.g., GITRL protein, active fragments

and/or fusion protein thereof, may also be expressed as a product of transgenic animals, e.g., as a component of the milk of transgenic cows, goats, pigs, or sheep, which are characterized by somatic or germ cells containing a polynucleotide sequence encoding the GTR agonists.

[0097] The methods that may be used to purify GTR agonists, e.g., GTRL protein, active fragments and/or fusion protein thereof, are known to those skilled in the art. For example, a GTRL protein of the invention may be concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an Amicon or Millipore Pellicon ultrafiltration unit. Following the concentration step, the concentrate can be applied to a purification matrix such as a gel filtration medium. Alternatively, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) or polyethyleimine (PEI) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification. Alternatively, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. Sulfopropyl groups are preferred (e.g., S-Sepharose® columns). The purification of GTR agonists, e.g., GTRL protein, active fragments and/or fusion protein thereof, from culture supernatant may also include one or more column steps over such affinity resins as concanavalin A-agarose, heparin-toyopearl® or Cibacrom blue 3GA Sepharose®; or by hydrophobic interaction chromatography using such resins as phenyl ether, butyl ether, or propyl ether; or by immunoaffinity chromatography. Finally, one or more reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to further purify the GTRL protein. Affinity columns including antibodies to the GTRL protein can also be used in purification in accordance with known methods. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations or with other known methods, can also be employed to provide a substantially purified isolated recombinant protein. Preferably, the isolated GTRL protein is purified so that it is substantially free of other mammalian proteins.

[0098] Alternatively, GTR agonists, e.g., GTRL protein, active fragments and/or fusion protein thereof, may also be recombinantly expressed in a form that

facilitates purification. For example, the polypeptides may be expressed as fusions with proteins such as maltose-binding protein (MBP), glutathione-S-transferase (GST), or thioredoxin (TRX). Kits for expression and purification of such fusion proteins are commercially available from New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), and Invitrogen, respectively. GPCR agonists, e.g., GPCR protein, active fragments and/or fusion protein thereof, can also be tagged with a small epitope and subsequently identified or purified using a specific antibody to the epitope. A preferred epitope is the FLAG epitope, which is commercially available from Eastman Kodak (New Haven, CT).

[0099] GPCR agonists, e.g., GPCR protein, active fragments and/or fusion protein thereof, may also be produced by known conventional chemical synthesis.

Methods for chemically synthesizing such polypeptides are well known to those skilled in the art. Such chemically synthetic polypeptides may possess biological properties in common with the natural, purified polypeptides, and thus may be employed as biologically active or immunological substitutes for the natural polypeptides.

[0100] GPCR agonists, e.g., GPCR protein, active fragments and/or fusion protein thereof, also encompass molecules that are structurally different from the disclosed polypeptides (e.g., which have a slightly altered sequence), but which have substantially the same biochemical properties as the disclosed polypeptides (e.g., are changed only in functionally nonessential amino acid residues). Such molecules include naturally occurring allelic variants and deliberately engineered variants containing alterations, substitutions, replacements, insertions, or deletions. Techniques for such alterations, substitutions, replacements, insertions, or deletions are well known to those skilled in the art. In some embodiments, the GPCR polypeptide moiety is provided as a variant GPCR polypeptide having mutations in the naturally occurring GPCR sequence (wild type) that results in a GPCR sequence more resistant to proteolysis (relative to the nonmutated sequence).

[0101] The methods disclosed herein for the generation of GPCR agonists, e.g., GPCR, active fragments thereof and/or fusion proteins thereof, may be used to generate GPCR antagonists, especially soluble GPCR proteins, active fragments thereof and/or fusion proteins thereof. One of skill in the art will recognize that

XP

to generate GITR antagonists, e.g., soluble GITR, active fragments thereof, and/or fusion proteins thereof, all that would be required is the nucleic acid sequence or amino acid sequence of GITR, both of which are known. Using these sequences, GITR antagonists, e.g., soluble GITR, active fragments thereof, and/or fusion proteins thereof, may be generated using recombinant DNA techniques and/or chemical synthesis, as described above.

Anti-GITRL Antibodies

[0102] In other embodiments, the invention provides GITR antagonists as antibodies, or antigen binding fragments thereof, that specifically bind to GITRL, preferably, mammalian (e.g., murine) GITRL, and neutralize GITR activity.

[0103] One of skill in the art will recognize that as used herein, the term "antibody" refers to a protein comprising at least one, and preferably two, heavy (H) chain variable regions (abbreviated herein as VH), and at least one and preferably two light (L) chain variable regions (abbreviated herein as VL). The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed "complementarity determining regions" ("CDR"), interspersed with regions that are more conserved, termed "framework regions" ("FR"). The extent of the FRs and CDRs has been precisely defined (see, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, which are hereby incorporated by reference). Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0104] The antibody can further include a heavy and light chain constant region to thereby form a heavy and light immunoglobulin chain, respectively. In one embodiment, the antibody is a tetramer of two heavy immunoglobulin chains and two light immunoglobulin chains, wherein the heavy and light immunoglobulin chains are inter-connected by, e.g., disulfide bonds. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The variable region of the heavy and light chains contains a binding domain that interacts with an antigen.

The constant regions of the antibodies typically mediate the binding of the antibody to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

[0105] Immunoglobulin refers to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes. The recognized human immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha (IgA1 and IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Full-length immunoglobulin "light chains" (about 25 Kd, or 214 amino acids) are encoded by a variable region gene at the NH₂-terminus (about 110 amino acids) and a kappa or lambda constant region gene at the COOH-terminus. Full-length immunoglobulin "heavy chains" (about 50 Kd, or 446 amino acids), are similarly encoded by a variable region gene (about 116 amino acids) and one of the other aforementioned constant region genes, e.g., gamma (encoding about 330 amino acids). The immunoglobulin heavy chain constant region genes encode for the antibody class, i.e., isotype (e.g., IgM or IgG1). The antigen binding fragment of an antibody (or simply "antibody portion," or "fragment"), as used herein, refers to one or more fragments of a full-length antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (e.g., CD3). Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen binding fragment" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-46), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-26; and Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

85:5879-83). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen binding fragment" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those skilled in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

[0106] One of skill in the art will recognize that the methods disclosed herein for generation of antibody molecules to the polypeptides of the present invention, e.g., murine GITRL, may also be used to generate antibody molecules to other proteins, e.g., GTR or human GITRL. Consequently, the methods for generating antibody molecules apply not only to the polypeptides of the present invention as disclosed, but also to, for example, GTR or human GITRL.

[0107] Antibody molecules to the polypeptides of the present invention, e.g., neutralizing antibodies to murine GITRL, including but not limited to mouse GITRL and its homologs, may be useful in preventing or treating autoimmune disorders, inflammatory diseases, transplant rejections, and similar or related disorders. Other antibody molecules e.g., agonistic GTR antibodies, may be useful in the methods of the invention for treating cancer, infectious diseases, and similar and related disorders. Such antibody molecules may be produced by methods well known to those skilled in the art. For example, monoclonal antibodies can be produced by generation of hybridomas in accordance with known methods. Hybridomas formed in this manner are then screened using standard methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to identify one or more hybridomas that produce an antibody that specifically binds with the polypeptides of the present invention. For example, GITRL proteins of the invention may also be used to immunize animals to obtain polyclonal and monoclonal antibodies that specifically react with the GITRL protein and which may inhibit binding of ligands to the receptor, i.e., GTR. Similarly, GTR proteins may also be used to obtain polyclonal and monoclonal antibodies that specifically react with GTR. The peptide immunogens additionally may contain a cysteine residue at the carboxyl terminus, and are conjugated to a hapten such as keyhole limpet hemocyanin (KLH). Additional peptide immunogens may be generated by replacing tyrosine residues with sulfated tyrosine residues. Methods for synthesizing such peptides are known in the art, for example, as in Merrifield

(1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54; Krstenansky et al. (1987) *FEBS Lett.* 211:10. A full-length polypeptide of the present invention may be used as the immunogen, or, alternatively, antigenic peptide fragments of the polypeptides may be used. An antigenic peptide of a polypeptide of the present invention comprises at least 7 continuous amino acid residues and encompasses an epitope such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the polypeptide. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, more preferably at least 15 amino acid residues, even more preferably at least 20 amino acid residues, and most preferably at least 30 amino acid residues.

[0108] Monoclonal antibodies may be generated by other methods known to those skilled in the art of recombinant DNA technology. As an alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal antibody to a polypeptide of the present invention may be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (e.g., an antibody phage display library) with a polypeptide of the present invention (e.g., GITRL) or with GITR, to thereby isolate immunoglobulin library members that bind to the polypeptides of the present invention, or to GITR, respectively. Techniques and commercially available kits for generating and screening phage display libraries are well known to those skilled in the art. Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display libraries can be found in the literature. For example, the "combinatorial antibody display" method has been developed to identify and isolate antibody fragments having a particular antigen specificity, and can be utilized to produce monoclonal antibodies (for descriptions of combinatorial antibody display, see, e.g., Sastry et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275; Orlandi et al. 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833).

After immunizing an animal with an immunogen as described above, the antibody repertoire of the resulting B-cell pool is cloned. Methods are generally known for obtaining the DNA sequence of the variable regions of a diverse population of immunoglobulin molecules by using a mixture of oligomer primers and PCR. For instance, mixed oligonucleotide primers corresponding to the 5' leader (signal peptide) sequences and/or framework 1 (FR1) sequences, as well as

primers to a conserved 3' constant region can be used for PCR amplification of the heavy and light chain variable regions from a number of murine antibodies (Larrick et al. (1991) *Biotechniques* 11:152-56). A similar strategy can also been used to amplify human heavy and light chain variable regions from human antibodies (Larrick et al. (1991) *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2:106-10).

[0109] Polyclonal sera and antibodies may be produced by immunizing a suitable subject with a polypeptide of the present invention. The antibody titer in the immunized subject may be monitored over time by standard techniques, such as with ELISA using immobilized marker protein. If desired, the antibody molecules directed against a polypeptide of the present invention may be isolated from the subject or culture media and further purified by well-known techniques, such as protein A chromatography, to obtain an IgG fraction.

[0110] Fragments of antibodies to the polypeptides of the present invention may be produced by cleavage of the antibodies in accordance with methods well known in the art. For example, immunologically active Fab and F(ab')₂ fragments may be generated by treating the antibodies with an enzyme such as pepsin.

[0111] Additionally, chimeric, humanized, and single-chain antibodies to the polypeptides of the present invention, comprising both human and nonhuman portions, may be produced using standard recombinant DNA techniques and/or a recombinant combinatorial immunoglobulin library. Humanized antibodies may also be produced using transgenic mice which are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chain genes, but which can express human heavy and light chain genes. For example, human monoclonal antibodies (mAbs) directed against GITRL may be generated using transgenic mice carrying the human immunoglobulin genes rather than murine immunoglobulin genes. Splenocytes from these transgenic mice immunized with the antigen of interest may then be used to produce hybridomas that secrete human mAbs with specific affinities for epitopes from a human protein (see, e.g., Wood et al., WO 91/00906; Kucherlapati et al., WO 91/10741; Lonberg et al. WO 92/03918; Kay et al., WO 92/03917; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856-59; Green et al. (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21; Morrison et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

37

81:6851-55; Bruggeman (1993) *Year Immunol* 7:33-40; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-24; Bruggeman et al. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:1323-26).

[0112] Chimeric antibodies, including chimeric immunoglobulin chains, can be produced by recombinant DNA techniques known in the art. For example, a gene encoding the Fc constant region of a murine (or other species) monoclonal antibody molecule is digested with restriction enzymes to remove the region encoding the murine Fc, and the equivalent portion of a gene encoding a human Fc constant region is substituted (see Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., WO 86/01533; Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-43; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-26; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-18; Nishimura et al. (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-49; and Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59).

[0113] An antibody or an immunoglobulin chain may be humanized by methods known in the art. Humanized antibodies, including humanized immunoglobulin chains, may be generated by replacing sequences of the Fv variable region that are not directly involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable regions. General methods for generating humanized antibodies are provided by Morrison (1985) *Science* 229:1202-07; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; Queen et al., U.S. Patent Nos. 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762, the contents of all of which are hereby incorporated by reference. Those methods include isolating, manipulating, and expressing the nucleic acid sequences that encode all or part of immunoglobulin Fv variable regions from at least one of a heavy or light chain. Sources of such nucleic acid sequences are well known to those skilled in the art and, for example, may be obtained from a hybridoma producing an antibody against a predetermined target. The recombinant DNA encoding the humanized antibody, or fragment thereof, can then be cloned into an appropriate expression vector.

[0114] Humanized or CDR-grafted antibody molecules or immunoglobulins may be produced by CDR grafting or CDR substitution, wherein one, two, or all CDRs of an immunoglobulin chain can be replaced. See, e.g., U.S. Patent No. 5,225,539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-25; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-60; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539, the contents of all of which are hereby incorporated by reference. Winter describes a CDR-grafting method that may be used to prepare the humanized antibodies of the present invention (UK Patent Application GB 2188638A; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539), the contents of which are hereby incorporated by reference. All of the CDRs of a particular human antibody may be replaced with at least a portion of a nonhuman CDR, or only some of the CDRs may be replaced with nonhuman CDRs. It is only necessary to replace the number of CDRs required for binding of the humanized antibody to a predetermined antigen.

[0115] Monoclonal, chimeric and humanized antibodies that have been modified by, e.g., deleting, adding, or substituting other portions of the antibody, e.g., the constant region, are also within the scope of the invention. For example, an antibody can be modified as follows: (i) by deleting the constant region; (ii) by replacing the constant region with another constant region, e.g., a constant region meant to increase half-life, stability, or affinity of the antibody, or a constant region from another species or antibody class; or (iii) by modifying one or more amino acids in the constant region to alter, for example, the number of glycosylation sites, effector cell function, Fc receptor (FcR) binding, complement fixation, etc.

[0116] Methods for altering an antibody constant region are known in the art. Antibodies with altered function, e.g. altered affinity for an effector ligand, such as FcR on a cell, or the C1 component of complement, can be produced by replacing at least one amino acid residue in the constant portion of the antibody with a different residue (see, e.g., EP 388,151 A1, U.S. 5,624,821 and U.S. 5,648,260, the contents of all of which are hereby incorporated by reference). Similar types of alterations to the murine (or other species') immunoglobulin may be applied to reduce or eliminate these functions. Such alterations are known in the art.

[0117] For example, it is possible to alter the affinity of an Fc region of an antibody (e.g., an IgG, such as a human IgG) for an FcR (e.g., Fc gamma R1), or for C1q binding by replacing the specified residue(s) with a residue(s) having an appropriate functionality on its side chain, or by introducing a charged functional group, such as glutamate or aspartate, or an aromatic nonpolar residue such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan or alanine (see, e.g., U.S. 5,624,821).

[0118] Anti-GITRL antibodies of the invention may be useful for isolating, purifying, and/or detecting GITRL polypeptides in supernatant, cellular lysate, or on the cell surface. Antibodies disclosed in this invention can be also used diagnostically to monitor GITRL protein levels as part of a clinical testing procedure, or clinically to target a therapeutic modulator to a cell or tissue comprising the antigen of the GITRL antibody. For example, a therapeutic such as a small molecule, or other therapeutic of the invention can be linked to the GITRL antibody in order to target the therapeutic to the cell or tissue expressing GITRL. Neutralizing or nonneutralizing antibodies (preferably monoclonal antibodies) binding to GITRL protein may also be useful in the treatment of conditions involving dysregulation of the immune system, e.g., autoimmune diseases. These neutralizing monoclonal antibodies may be capable of blocking GITRL binding to GTR. The present invention further provides compositions comprising an antibody that specifically reacts with GITRL. Similarly, anti-GTR antibodies may be useful in isolating, purifying and/or detecting GTR, diagnostically monitoring GTR levels, or clinically targeting a therapeutic modulator to a cell or tissue comprising GTR. Agonistic antibodies to GTR (preferably monoclonal antibodies) may also be useful in the treatment of conditions involving dysregulation of the immune system e.g., cancer or infectious diseases. These agonistic antibodies may be capable of inducing GTR activity. Thus the present invention further provides compositions comprising an antibody to GTR.

GITRL Screening Assays

[0119] The polynucleotides and polypeptides of the present invention may be used in screening assays to identify pharmacological agents or lead compounds for agents that are capable of modulating the activity of GITRL, and thereby GTR, in a cell or organism, and are thereby potential regulators of immune

responses. For example, samples containing GITRL (either natural or recombinant) can be contacted with one of a plurality of test compounds (either biological agents or small organic molecules), and the activity of GITRL in each of the treated samples can be compared with the activity of GITRL in untreated samples or in samples contacted with different test compounds. Such comparisons will determine whether any of the test compounds results in: 1) a substantially decreased level of expression or activity of GITRL, thereby indicating an inhibitor of GITRL (e.g., a compound that restores or enhances immune suppression), or 2) a substantially increased level of expression or activity of GITRL, thereby indicating an activator of GITRL (e.g., a compound that reverses immune suppression). In one embodiment, the identification of test compounds capable of modulating GITRL activity is performed using high-throughput screening assays, such as BIACORE® (Biacore International AB, Uppsala, Sweden), BRET (bioluminescence resonance energy transfer), and FRET (fluorescence resonance energy transfer) assays, as well as ELISA and cell-based assays.

Small Molecules

[0120] Decreased GTR activity in an organism (or subject) afflicted with (or at risk for) autoimmune disorders, inflammatory diseases, or transplant rejection, or in a cell from such an organism (or subject) involved in such disorders, may also be achieved through the use of small molecules (usually organic small molecules) that antagonize, i.e., inhibit the activity of, GTR. Novel antagonistic small molecules may be identified by the screening methods described above and may be used in the treatment methods of the present invention described below.

Conversely, increased GTR activity in an organism (or subject) afflicted with (or at risk for) cancer or infectious disease, or in a cell from such an organism (or subject) involved in such disorders, may also be achieved through the use of small molecules (usually organic small molecules) that agonize, i.e., enhance the activity of, GTR. Novel agonistic small molecules may be identified by the screening methods described above and may be used in the methods of treating cancer and/or infectious disease as described below.

Methods for Diagnosing, Prognosing, and Monitoring the Progress of Autoimmune Disorders and Cancers

[0121] It is well known in the art that immunological mechanisms studied in animal models, particularly murine models, may be and often are, translatable to the human immune system. As such, although the Examples disclosed herein demonstrate the role of GITR in immune suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells in a murine model, the disclosed methods for diagnosing, prognosing, and monitoring disorders related to dysregulation of the immune system, e.g., autoimmune disorders, inflammatory disorders and transplant rejection, and cancer and infectious disease, will be particularly useful for diagnosing, prognosing and monitoring such disorders in humans. In practicing the disclosed methods, a skilled artisan will recognize that the human homologs of GITR and GITRL, as well as human GITR agonists and antagonists, may be used in the claimed methods of diagnosing, prognosing, and monitoring such disorders in humans.

X **[0122]** The present invention provides methods for diagnosing, prognosing, and monitoring the progress of autoimmune disorders in a subject (e.g., that directly or indirectly involve increases in the levels of GITRL) by detecting an upregulation of GITR activity, e.g., by detecting the upregulation of GITRL, including but not limited to the use of such methods in human subjects. One of skill in the art will recognize that these methods can apply to inflammatory diseases and transplant rejection as well. These methods may be performed by utilizing prepackaged diagnostic kits comprising at least one of the group comprising GITRL polynucleotide or fragments thereof, GITRL polypeptide or portions thereof (including fusion proteins thereof), or antibodies to GITRL polypeptides or derivatives thereof, or modulators of GITRL polynucleotides and/or polypeptides as described herein, which may be conveniently used, for example, in a clinical setting. In addition, one of skill in the art would recognize that the upregulation of GITRL could also be detected by indirect methods, such as counting the number of immune cells.

Y **[0123]** "Diagnostic" or "diagnosing" means identifying the presence or absence of a pathologic condition. Diagnostic methods include detecting upregulation of GITRL by determining a test amount of GITRL gene product (e.g., mRNA,

cDNA, or polypeptide, including fragments thereof) in a biological sample from a subject (human or nonhuman mammal), and comparing the test amount with a normal amount or range (i.e., an amount or range from an individual(s) known not to suffer from autoimmune disorders) for the GITRL gene product. Although a particular diagnostic method may not provide a definitive diagnosis of autoimmune disorders, it suffices if the method provides a positive indication that aids in diagnosis.

[0124] The present invention also provides methods for prognosing such autoimmune disorders by detecting the upregulation of GTR activity, e.g., by detecting upregulation of GITRL. "Prognostic" or "prognosing" means predicting the probable development and/or severity of a pathologic condition. Prognostic methods include determining the test amount of a GITRL gene product in a biological sample from a subject, and comparing the test amount to a prognostic amount or range (i.e., an amount or range from individuals with varying severities of autoimmune disorders) for the GITRL gene product. Various amounts of the GITRL gene product in a test sample are consistent with certain prognoses for autoimmune disorders. The detection of an amount of GITRL gene product at a particular prognostic level provides a prognosis for the subject.

[0125] The present invention also provides methods for monitoring the progress or course of such autoimmune disorders by detecting the upregulation of GTR activity, e.g., by detecting upregulation of GITRL. Monitoring methods include determining the test amounts of a GITRL gene product in biological samples taken from a subject at a first and second time, and comparing the amounts. A change in amount of GITRL gene product between the first and second times indicates a change in the course of autoimmune disorders, with a decrease in amount indicating remission of autoimmune disorders, and an increase in amount indicating progression of autoimmune disorders. Such monitoring assays are also useful for evaluating the efficacy of a particular therapeutic intervention in patients being treated for autoimmune disorders.

[0126] Increased expression of GITRL in methods outlined above can be detected in a variety of biological samples, including bodily fluids (e.g., whole blood, plasma, and urine), cells (e.g., whole cells, cell fractions, and cell

extracts), and tissues. Biological samples also include sections of tissue, such as biopsies and frozen sections taken for histological purposes. Preferred biological samples include blood, plasma, lymph, tissue biopsies, urine, CSF (cerebrospinal fluid), synovial fluid, and BAL (bronchoalveolar lavage). It will be appreciated that analysis of a biological sample need not necessarily require removal of cells or tissue from the subject. For example, appropriately labeled agents that bind GITRL gene products (e.g., antibodies, nucleic acids) can be administered to a subject and visualized (when bound to the target) using standard imaging technology (e.g., CAT, NMR (MRI), and PET).

[0127] In the diagnostic and prognostic assays of the present invention, the GITRL gene product is detected and quantified to yield a test amount. The test amount is then compared with a normal amount or range. An amount significantly above the normal amount or range is a positive sign in the diagnosis of autoimmune disorders. Particular methods of detection and quantitation of GITRL gene products are described below.

[0128] Normal amounts or baseline levels of GITRL gene products can be determined for any particular sample type and population. Generally, baseline (normal) levels of GITRL protein or mRNA are determined by measuring the amount of GITRL protein or mRNA in a biological sample type from normal (i.e., healthy) subjects. Alternatively, normal values of GITRL gene product can be determined by measuring the amount in healthy cells or tissues taken from the same subject from which the diseased (or possibly diseased) test cells or tissues were taken. The amount of GITRL gene product (either the normal amount or the test amount) can be determined or expressed on a per cell, per total protein, or per volume basis. To determine the cell amount of a sample, one can measure the level of a constitutively expressed gene product or other gene product expressed at known levels in cells of the type from which the biological sample was taken.

[0129] It will be appreciated that the assay methods of the present invention do not necessarily require measurement of absolute values of GITRL gene product because relative values are sufficient for many applications of these methods. It will also be appreciated that in addition to the quantity or abundance of GITRL gene products, variant or abnormal GITRL gene products or their expression

80
61

patterns (e.g., mutated transcripts, truncated polypeptides) may be identified by comparison to normal gene products and expression patterns.

[0130] The diagnostic, prognostic, and monitoring assays of the present invention involve detecting and quantifying GITRL gene products in biological samples. GITRL gene products include GITRL mRNA and GITRL polypeptide, and both can be measured using methods well known to those skilled in the art.

[0131] For example, GITRL mRNA can be directly detected and quantified using hybridization-based assays, such as Northern hybridization, *in situ* hybridization, dot and slot blots, and oligonucleotide arrays. Hybridization-based assays refer to assays in which a probe nucleic acid is hybridized to a target nucleic acid. In some formats, the target, the probe, or both are immobilized. The immobilized nucleic acid may be DNA, RNA, or another oligonucleotide or polynucleotide, and may comprise naturally or nonnaturally occurring nucleotides, nucleotide analogs, or backbones. Methods of selecting nucleic acid probe sequences for use in the present invention are based on the nucleic acid sequence of GITRL and are well known in the art.

[0132] Alternatively, GITRL mRNA can be amplified before detection and quantitation. Such amplification-based assays are well known in the art and include polymerase chain reaction (PCR), reverse-transcription-PCR (RT-PCR), PCR-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA), and ligase chain reaction (LCR). Primers and probes for producing and detecting amplified GITRL gene products (e.g., mRNA or cDNA) may be readily designed and produced without undue experimentation by those of skill in the art based on the nucleic acid sequence of GITRL. Amplified GITRL gene products may be directly analyzed, for example, by gel electrophoresis; by hybridization to a probe nucleic acid; by sequencing; by detection of a fluorescent, phosphorescent, or radioactive signal; or by any of a variety of well-known methods. In addition, methods are known to those of skill in the art for increasing the signal produced by amplification of target nucleic acid sequences. One of skill in the art will recognize that whichever amplification method is used, a variety of quantitative methods known in the art (e.g., quantitative PCR) may be used if quantitation of GITRL gene products is desired.

[0133] GITRL polypeptide (or fragments thereof) can be detected using various well-known immunological assays employing the anti-GITRL antibodies described above. Immunological assays refer to assays that utilize an antibody (e.g., polyclonal, monoclonal, chimeric, humanized, scFv, and fragments thereof) that specifically binds to GITRL polypeptide (or a fragment thereof). Such well-known immunological assays suitable for the practice of the present invention include ELISA, radioimmunoassay (RIA), immunoprecipitation, immunofluorescence, fluorescence-activated cell sorting (FACS), and Western blotting. GITRL polypeptide can also be detected using labeled GITR.

[0134] One of skill in the art will understand that the aforementioned methods can be applied to autoimmune disorders and other disorders (such as inflammatory diseases), including, but not limited to, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, multiple sclerosis, autoimmune gastritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis and other inflammatory dermatoses, type I diabetes, asthma, allergy, and inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis.

[0135] One of skill in the art will also recognize that the aforementioned methods or variations thereupon can also be used for diagnosing, prognosing, and monitoring the progress of various cancers and infectious diseases in a subject (e.g., that directly or indirectly involve decreases in the levels of GITRL) by detecting a downregulation of GITR activity, e.g., by detecting the downregulation of GITRL, including but not limited to the use of such methods in human subjects.

Uses of GITRL and Related Molecules in Therapy

[0136] Applicants believe they are the first to recognize that binding of GITR on effector T cells by GITRL, or other GITR agonists, provides a costimulatory signal to effector T cells, wherein such signal renders the effector T cells less susceptible to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and increases the ability of effector T cells to proliferate in response to anti-CD3 or other activating signals. Although the murine model was used to uncover the mechanism, it is well known in the art that immunological mechanisms studied in murine models, may be and often are, translatable to the human immune system. As such, the

disclosed methods for using GITRL and related molecules, i.e., GTR agonists or GTR antagonists, to treat disorders related to the dysregulation of the immune system, e.g., autoimmune disorders, inflammatory disorders and transplant rejection, and cancer and infectious disease, will be particularly useful for treating such disorders in humans. In practicing the disclosed methods, a skilled artisan will recognize that the human homologs of GTR and GITRL, as well as human GTR agonists and antagonists, may be used in the claimed methods of using GITRL and GITRL-related proteins, i.e., GTR agonists and antagonists, in treating autoimmune disorders, inflammatory disorders and transplant rejection, and cancer and infectious diseases in humans.

[0137] The GITRL-related molecules disclosed herein, i.e., GTR agonists and antagonists, including modulators of GITRL polynucleotide and/or polypeptide activity identified using the methods described above, can be used *in vitro*, *ex vivo*, or incorporated into pharmaceutical compositions and administered to individuals *in vivo* to treat, for example, autoimmune disorders by administration of a GTR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, neutralizing anti-GTR antibodies, and/or neutralizing anti-GITRL antibodies), or, e.g., cancers by administration of a GTR agonist (e.g., GITRL polynucleotides, GITRL polypeptides, or fusion proteins thereof, agonistic small molecules and/or agonistic anti-GTR antibodies). Such GITRL and/or related molecules (including modulators) include, but are not limited to, mouse GITRL and its homologs (and antibodies to such molecules), and such homologs include, but are not limited to, human GITRL. Several pharmacogenomic approaches to be considered in determining whether to administer GITRL and/or GITRL related molecules are well known to one of skill in the art and include genome-wide association, candidate gene approach, and gene expression profiling. A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration (e.g., oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier). Other nonlimiting examples of routes of administration include parenteral (e.g., intravenous), intradermal, subcutaneous, oral (e.g., inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. The pharmaceutical compositions compatible with each intended route are well known in the art.

[0138] GTR agonists or antagonists may be used as pharmaceutical compositions when combined with a pharmaceutically acceptable carrier. Such a composition may contain, in addition to the GTR agonists or antagonists and carrier, various diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The term "pharmaceutically acceptable" means a nontoxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). The characteristics of the carrier will depend on the route of administration.

[0139] The pharmaceutical composition of the invention may also contain cytokines, lymphokines, or other hematopoietic factors such as M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, stem cell factor, and erythropoietin. The pharmaceutical composition may also include anticytokine antibodies as described in more detail below. The pharmaceutical composition may contain thrombolytic or antithrombotic factors such as plasminogen activator and Factor VIII. The pharmaceutical composition may further contain other anti-inflammatory agents as described in more detail below. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with GTR agonists or antagonists, or to minimize side effects caused by the GTR agonists or antagonists. Conversely GTR agonists or antagonists may be included in formulations of the particular cytokine, lymphokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or antithrombotic factor, or anti-inflammatory agent to minimize side effects of the cytokine, lymphokine, other hematopoietic factor, thrombolytic or antithrombotic factor, or anti-inflammatory agent.

[0140] The pharmaceutical composition of the invention may be in the form of a liposome in which GTR agonists or antagonists are combined, in addition to other pharmaceutically acceptable carriers, with amphipathic agents such as lipids that exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile acids, etc. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No.

6/K
6/5

4,837,028; and U.S. Pat. No. 4,737,323, all of which are hereby incorporated by reference.

[0141] As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total amount of each active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful patient benefit, e.g., amelioration of symptoms of, healing of, or increase in rate of healing of such conditions. When applied to an individual active ingredient, administered alone, the term refers to that ingredient alone. When applied to a combination, the term refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously.

[0142] In practicing the method of treatment or use of the present invention, a therapeutically effective amount of a GITR agonist (e.g., a GITRL polynucleotide or GITRL polypeptide expressed therefrom) or a GITR antagonist (e.g., a neutralizing anti-GITRL antibody or a neutralizing anti-GITR antibody) is administered to a subject, e.g., a mammal (e.g., a human). A GITR agonist or antagonist may be administered in accordance with the method of the invention either alone or in combination with other therapies, such as treatments employing cytokines, lymphokines or other hematopoietic factors, or anti-inflammatory agents. When coadministered with one or more agents, GITR agonists or antagonists may be administered either simultaneously with the second agent, or sequentially. If administered sequentially, the attending physician will decide on the appropriate sequence of administering, e.g., a GITRL polypeptide (or fusion protein thereof) or neutralizing anti-GITRL antibody in combination with other agents.

[0143] When a therapeutically effective amount of a GITR agonist or antagonist is administered orally, the binding agent will be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition of the invention may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% binding agent, and preferably from about 25 to 90% binding agent. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical

65
66

composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol, or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of the binding agent, and preferably from about 1 to 50% by weight of the binding agent.

[0144] When a therapeutically effective amount of a GITR agonist or antagonist is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, the GITR agonist or antagonist will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable protein solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill of those in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to the GITR agonist or antagonist, an isotonic vehicle such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Dextrose Injection, Dextrose and Sodium Chloride Injection, Lactated Ringer's Injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the present invention may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additive known to those of skill in the art.

[0145] The amount of a GITR agonist or antagonist in the pharmaceutical composition of the present invention will depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments that the patient has undergone. Ultimately, the attending physician will decide the amount of GITR agonist or antagonist with which to treat each individual patient. Initially, the attending physician will administer low doses of GITR agonist or antagonist and observe the patient's response. Larger doses of GITR agonist or antagonist may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the patient, and at that point the dosage is not generally increased further. It is contemplated that the various pharmaceutical compositions used to practice the method of the present invention should contain about 0.1 μ g to about 100 mg of e.g., GITRL polypeptide or neutralizing anti-GITRL antibody per kg body weight.

[0146] The duration of intravenous (i.v.) therapy using a pharmaceutical composition of the present invention will vary, depending on the severity of the

disease being treated and the condition and potential idiosyncratic response of each individual patient. It is contemplated that the duration of each application of the GITR agonist or antagonist may be in the range of 12 to 24 hours of continuous i.v. administration. Also contemplated is subcutaneous (s.c.) therapy using a pharmaceutical composition of the present invention. These therapies can be administered daily, weekly, or, more preferably, biweekly, or monthly. It is also contemplated that where the GITR agonist or antagonist is a small molecule, the therapies may be administered daily, twice a day, three times a day, etc. Ultimately the attending physician will decide on the appropriate duration of i.v. or s.c. therapy, or therapy with a small molecule, and the timing of administration of the therapy, using the pharmaceutical composition of the present invention.

[0147] The polynucleotides and proteins of the present invention are expected to exhibit one or more of the uses or biological activities (including those associated with assays cited herein) identified below. Uses or activities described for proteins of the present invention may be provided by administration or use of such proteins or by administration or use of polynucleotides encoding such proteins (such as, for example, in gene therapies or vectors suitable for introduction of DNA).

Uses of GITRL and Other GITR Agonists to Enhance an Immune Response

[0148] In one aspect, the present invention provides methods for increasing immune cell, e.g., T cell (e.g., an effector T cell) proliferation by contacting an immune cell or a population of immune cells with a GITR agonist, e.g., a GITRL polynucleotide or polypeptide of the invention (e.g., a fusion protein thereof) and/or an agonistic anti-GITR antibody, which potentiates or enhances the activity of GITR. These methods are based, at least in part, on the finding that an agonistic anti-GITR antibody reversed CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression of CD4⁺CD25⁻ T cell proliferation (Example 5). The methods are also based, in part, on the finding that GITR binding by, e.g., GITRL or an agonistic anti-GITR antibody, induces proliferation of effector T cells (e.g., CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells) (Example 9 and Example 13). Applicants also showed that GITR binding by GITRL provides a costimulatory signal to effector T cells (e.g., CD4⁺ and CD8⁺ T cells), thereby increasing the abilities of effector T cells to overcome

68

suppression mediated by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and proliferate in response to anti-CD3 (Examples 11 and 13); i.e., binding of GITR expressed on effector T cells by GITR agonists (e.g., GITRL polypeptide, active fragments thereof, and/or agonistic anti-GITR antibody) renders effector T cells less susceptible to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Accordingly, GITR agonists that stimulate the GITR activity in effector T cells can be used by themselves or in combination with an antigen, e.g., as an adjuvant (e.g., a vaccine adjuvant), to upregulate an immune response *in vivo*, e.g., for use in treating cancer and infectious disorders.

[0149] In one embodiment, GITR agonists (e.g., GITRL polynucleotides, polypeptides, active fragments and/or fusion proteins thereof, agonistic small molecules and/or agonistic anti-GITR antibodies) may be useful in the treatment of various immune deficiencies and disorders (including severe combined immunodeficiency (SCID)), e.g., in upregulating growth and proliferation of T cells. These immune deficiencies may be genetic or be caused by viral (e.g., HIV) as well as bacterial or fungal infections, or may result from autoimmune disorders. More specifically, infectious diseases caused by viral, bacterial, fungal or other infection may be treatable using a protein of the present invention, including infections by HIV, hepatitis viruses, herpesviruses, mycobacteria, *Leishmania* spp., malaria spp. and various fungal infections such as candidiasis. Of course, in this regard, a protein of the present invention may also be useful where a boost to the immune system generally may be desirable, i.e., in the treatment of cancer.

[0150] Upregulation of antigen presenting cell (APC) antigens (e.g., upregulation of B7.1, B7.2, and B7.3), as a means of upregulating immune responses, may also be useful in therapy. Upregulation of immune responses may be in the form of enhancing an existing immune response or eliciting an initial immune response. For example, enhancing an immune response through stimulating dendritic cell antigen presenting functions may be useful in cases of viral infection. In addition, systemic viral diseases such as influenza, the common cold, and encephalitis might be alleviated by the administration of stimulatory forms antigen presenting molecules, e.g., dendritic cell antigens, systemically.

68
69

[0151] Alternatively, antiviral immune responses may be enhanced in an infected patient by removing T cells from the patient, costimulating the T cells *ex vivo* with viral antigen-pulsed professional APCs (e.g., B cells, macrophages and/or dendritic cells) and GITR agonists (e.g., GITRL polynucleotides, polypeptides, active fragments and/or fusion proteins thereof, agonistic small molecules and/or agonistic anti-GITR antibodies). GITR agonists (e.g., GITRL polynucleotides, polypeptides, active fragments and/or fusion proteins thereof, and/or agonistic anti-GITR antibodies) may be supplied either as soluble protein or as expressed by the APCs. Another method of enhancing antiviral immune responses would be to isolate infected cells from a patient, transfect them with a nucleic acid encoding a GITRL protein of the present invention as described herein, such that the cells express all or a portion of the protein on their surface, and reintroduce the transfected cells into the patient. The infected cells would now be capable of delivering a costimulatory signal to effector T cells *in vivo*, i.e., expression of GITRL protein, or an active fragment thereof, by the infected cell, and binding of such GITRL protein to GITR on effector T cells could render the effector T cells less susceptible to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

[0152] In another application, upregulation or enhancement of an APC antigen function may be useful in the induction of tumor immunity. Tumor cells (e.g., sarcoma, melanoma, lymphoma, leukemia, neuroblastoma, and carcinoma) transfected with a nucleic acid encoding at least one peptide of the present invention can be administered to a subject to overcome tumor-specific tolerance in the subject. If desired, the tumor cell can be transfected to express a combination of peptides. For example, tumor cells obtained from a patient can be transfected *ex vivo* with an expression vector directing the expression of a GITR agonist (e.g., GITR polypeptides, active fragments and/or fusion proteins thereof, and/or agonistic anti-GITR antibodies), alone or in combination with a peptide having B7.2-like activity alone, or in conjunction with a peptide having B7.1-like activity, etc. The transfected tumor cells are returned to the patient to result in expression of the peptides on the surface of the transfected cell. Alternatively, gene therapy techniques can be used to target a tumor cell for transfection *in vivo*.

[0153] The presence of a GITR agonist (e.g., a GITRL polypeptide, active fragments and/or fusion proteins thereof, an agonistic small molecule and/or an

6/7
70

agonistic anti-GITR antibody), in combination with a peptide having the activity of an APC antigen (e.g., B7.1, B7.2, etc) on the surface of the tumor cell provides the necessary costimulatory signals to T cells to induce a T cell-mediated immune response against the transfected tumor cells. In addition, tumor cells which lack MHC class I or MHC class II molecules, or which fail to reexpress sufficient amounts of MHC class I or MHC class II molecules, can be transfected with nucleic acids encoding all or a portion (e.g., a cytoplasmic-domain truncated portion) of an MHC class I α chain protein and β_2 microglobulin protein or an MHC class II α chain protein and an MHC class II β chain protein (or corresponding human HLA nucleic acids) to thereby express MHC class I or MHC class II proteins (or corresponding HLA molecules) on the cell surface. Expression of the appropriate class I or class II MHC in conjunction with a GITR agonist (e.g., a GITRL polypeptide, active fragments and/or fusion proteins thereof, and/or an agonistic anti-GITR antibody), and/or a peptide having the activity of an APC antigen (e.g., B7.1, B7.2, etc.) induces a T cell-mediated immune response against the transfected tumor cell. Optionally, a gene encoding an antisense construct which blocks expression of an MHC class II-associated protein, such as the invariant chain, can also be cotransfected with a DNA encoding a GITR agonist (e.g., a GITRL polypeptide, active fragment thereof, a fusion protein thereof, and/or an agonistic anti-GITR antibody) and/or a peptide having the activity of an APC antigen to promote presentation of tumor associated antigens and induce tumor specific immunity. Thus, the induction of a T cell-mediated immune response in a human subject may be sufficient to overcome tumor-specific tolerance in the subject.

[0154] In other embodiments, GITR agonists (e.g., GITRL polypeptides, active fragments and/or fusion proteins thereof, fusion proteins thereof, agonistic small molecules, and/or agonistic anti-GITR antibodies) of the invention may be used as vaccine adjuvants. Adjuvants are immune modulating compounds that have the ability to enhance and/or steer the development and profile of immune responses against various antigens that are themselves poorly immunogenic. Cytokines and/or lymphokines can be used as adjuvants. The appropriate selection of adjuvants can induce good humoral and cellular immune responses that would not develop in the absence of adjuvant. In particular, adjuvants have

70
71

significant effects in enhancing the immune response to subunit and peptide antigens in vaccines. Their stimulatory activity is also beneficial to the development of antigen-specific immune responses directed against protein antigens. For a variety of antigens that require strong mucosal responses, high serum titers, induction of CTL (cytotoxic T lymphocytes) and vigorous cellular responses, adjuvant and cytokine/lymphokine combinations provide stimuli that are not provided by most antigen preparations.

[0155] As used herein, the phrase "vaccine adjuvant" or "vaccine therapy" is intended to mean the use of a GITR agonist (e.g., a GITRL polynucleotide, GITRL polypeptide, an active fragment thereof, a fusion protein thereof, and/or an agonistic anti-GITR antibody), in combination with an antigen (e.g., viral, parasitic and bacterial polypeptides, proteins or peptides), or other antigens (e.g., tumor or cancer cell polypeptides, proteins or peptides) or polynucleotides encoding the antigen to enhance, suppress or otherwise modulate an immune response to the antigen. For the purpose of this definition, "combination" shall mean use in conjunction with, simultaneous with (combined or uncombined) or sequentially with an antigen.

[0156] The term "vaccine adjuvant composition" refers to a vaccine adjuvant that additionally includes immunologically acceptable diluents or carriers in a conventional manner to prepare injectable liquid solutions or suspensions. The vaccine adjuvant composition may additionally include agents that further enhance an immune response elicited by a GITR agonist. For example, the vaccine adjuvant composition may additionally include 3-O-deacylated monophosphoryl lipid A (MPL[®]; Corixa Corporation, Seattle, WA) or monophosphoryl lipid A and derivatives and analogs thereof. MPL[®] can be used in a range of 1-100 µg/dose.

[0157] The antigens used for vaccine therapy include proteins, peptides or polypeptides derived from immunogenic and nonimmunogenic proteins, as well as any of the following: saccharides, proteins, polynucleotides or oligonucleotides, or other macromolecular components, or fragments thereof. As used in this section, a "peptide" comprises a series of at least six amino acids and contains at least one antigenic determinant, while a "polypeptide" is a longer molecule than a peptide, but does not constitute a full-length protein. As used

herein, a "fragment" comprises a portion, but less than all of a saccharide, protein, polynucleotides or oligonucleotide, or other macromolecular components.

[0158] As used herein, the term "effective adjuvanting amount" means a dose of the combination of adjuvants described herein, which is suitable to elicit an increased immune response in a vertebrate host. The particular dosage will depend in part upon the age, weight and medical condition of the host, as well as on the method of administration and the antigen.

[0159] The vaccine adjuvant composition of the invention can be administered to a human or nonhuman vertebrate by a variety of routes, including, but not limited to, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradermal, transdermal (see, e.g., International application WO 98/20734, which is hereby incorporated by reference), intramuscular, intraperitoneal, subcutaneous, intravenous and intraarterial. The amount of the antigen component or components of the antigenic composition will vary depending in part upon the identity of the antigen, as well as upon the age, weight and medical condition of the subject, as well as on the method of administration. Again, suitable doses are readily determined by persons skilled in the art. It is preferable, although not required, that the antigen and the combination of adjuvants be administered at the same time. The number of doses and the dosage regimen for the antigenic composition are also readily determined by persons skilled in the art. In some instances, the adjuvant properties of the combination of adjuvants may reduce the number of doses needed or the time course of the dosage regimen.

[0160] The combinations of adjuvants of this invention are suitable for use in combination with wide variety of antigens from a wide variety of pathogenic microorganisms, including but not limited to those from viruses, bacteria, fungi or parasitic microorganisms that infect humans and nonhuman vertebrates, or from a cancer cell or tumor cell (e.g., sarcoma, melanoma, lymphoma, leukemia, neuroblastoma, and carcinoma). The antigen may comprise peptides or polypeptides derived from proteins, as well as fragments of any of the following: saccharides, proteins, polynucleotides or oligonucleotides, cancer or tumor cells, or other macromolecular components. In some instances, more than one antigen is included in the antigenic composition.

72
13

[0161] Desirable viral vaccines containing the adjuvant combinations of this invention include those directed to the prevention and/or treatment of disease caused by, without limitation, Human immunodeficiency virus, Simian immunodeficiency virus, Respiratory syncytial virus, Parainfluenza virus types 1-3, Influenza virus, Herpes simplex virus, Human cytomegalovirus, Hepatitis A virus, Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, Human papillomavirus, poliovirus, rotavirus, caliciviruses, Measles virus, Mumps virus, Rubella virus, adenovirus, rabies virus, canine distemper virus, rinderpest virus, coronavirus, parvovirus, infectious rhinotracheitis viruses, feline leukemia virus, feline infectious peritonitis virus, avian infectious bursal disease virus, Newcastle disease virus, Marek's disease virus, porcine respiratory and reproductive syndrome virus, equine arteritis virus and various Encephalitis viruses.

[0162] Desirable bacterial vaccines containing the adjuvant combinations of this invention include those directed to the prevention and/or treatment of disease caused by, without limitation, *Haemophilus influenzae* (both typable and nontypable), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*- *Mycobacterium* intracellular complex, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Mycoplasma gallisepticum*.

[0163] Desirable vaccines against fungal pathogens containing the adjuvant combinations of this invention include those directed to the prevention and/or treatment of disease caused by, without limitation, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* and *Histoplasma*.

[0164] Desirable vaccines against parasites containing the adjuvant combinations of this invention include those directed to the prevention and/or treatment of disease caused by, without limitation, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*,

73
74

Giardia, Schistosoma, Cryptosporidium, Trichomonas, Toxoplasma gondii and Pneumocystis carinii.

[0165] Desirable vaccines for eliciting a therapeutic or prophylactic anticancer effect in a vertebrate host, which contain the adjuvant combinations of this invention, include those utilizing a cancer antigen or tumor-associated antigen including, without limitation, prostate specific antigen (PSA), prostate-specific membrane antigen (PSMA), carcino-embryonic antigen (CEA), MUC-1, Her2, CA-125, MAGE-3, EGFR, HELP, GCC, CD66-c, prostasin, TMPRSS3, TADG 12 and TADG 15.

[0166] In the case of HIV and SIV, the antigenic compositions comprise at least one protein, polypeptide, peptide or fragment derived from said virus. In some instances, multiple HIV or SIV proteins, polypeptides, peptides and/or fragments are included in the antigenic composition.

[0167] The adjuvant combination formulations of this invention are also suitable for inclusion as an adjuvant in polynucleotide vaccines (also known as DNA vaccines). Such vaccines may further include facilitating agents such as bupivacaine (see U.S. Patent No. 5,593,972, which is hereby incorporated by reference).

[0168] Methods of 1) stimulating antigen presenting cell function, e.g., dendritic cell functions; 2) removing T cells from the patient, costimulating them *ex vivo*, and reintroducing them into the subject; 3) transfecting tumor cells to induce tumor immunity; and 4) using vaccine adjuvants are well known in the art (see, e.g., Cerundolo et al. (2004) Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat. Immunol.* 5(1):7-10; Ko et al. (2003) Immunotherapy of malignant diseases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132:294-309; Valmori et al. (1999) An antigen-targeted approach to adoptive transfer therapy of cancer. *Cancer Res.* 59:2167-73).

Uses of GfTR Antagonists to Decrease Immune Cell Activity

[0169] In yet another aspect, the invention features a method for maintaining the susceptibility of effector T cells, e.g., CD4⁺ and CD8⁺ T cells, or a population thereof, to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. The method may

2X
2.5

comprise contacting a population of T cells with a GITR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule, a neutralizing anti-GITR antibody, and/or a neutralizing anti-GITRL antibody) in an amount sufficient to inhibit the activity of the immune cell or population. Antagonists of GITR may also be administered to subjects for whom suppression of an immune response is desired. These conditions include, e.g., autoimmune disorders (e.g., arthritic disorders), inflammatory diseases, or organ transplantation.

[0170] These methods are based, at least in part, on the finding that reduction of GITR activity, e.g., by using a neutralizing anti-GITRL antibody, restores CD4⁺CD25⁺-mediated suppression (Example 13), i.e., neutralizing anti-GITRL antibody maintains the susceptibility of effector T cells, e.g., CD4⁺ and CD8⁺ T cells, to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell. Additionally, applicants have demonstrated that incubation of effector T cells with neutralizing anti-GITRL antibody ameliorates disease in murine experimental autoimmune encephalitis (EAE) (Example 14). Accordingly, GITR antagonists, i.e., molecules that inhibit GITR activity (e.g., anti-GITRL antibodies) may be used to maintain the susceptibility of effector T cells to suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells *in vivo*, e.g., for treating or preventing immune cell-associated pathologies, including transplant rejection, inflammatory diseases, and autoimmune disorders.

[0171] The methods of using GITR antagonists may also be used inhibit the activity (e.g., proliferation, differentiation, survival) of an effector T cell, and thus, can be used to treat or prevent a variety of immune disorders. Nonlimiting examples of the disorders that can be treated or prevented include, but are not limited to, transplant rejection, autoimmune diseases (including, for example, diabetes mellitus, arthritis (including rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis), multiple sclerosis, encephalomyelitis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, autoimmune thyroiditis, dermatitis (including atopic dermatitis and eczematous dermatitis), psoriasis, Sjögren's Syndrome, Crohn's disease, aphthous ulcer, iritis, conjunctivitis, keratoconjunctivitis, ulcerative colitis, spondyloarthropathy, ankylosing spondylitis, intrinsic asthma, allergic asthma, cutaneous lupus erythematosus, scleroderma, vaginitis, proctitis, drug eruptions, leprosy reversal reactions, erythema nodosum leprosum, autoimmune uveitis, allergic encephalomyelitis,

25
26

acute necrotizing hemorrhagic encephalopathy, idiopathic bilateral progressive sensorineural hearing loss, aplastic anemia, pure red cell anemia, idiopathic thrombocytopenia, polychondritis, Wegener's granulomatosis, chronic active hepatitis, Stevens-Johnson syndrome, idiopathic sprue, lichen planus, Graves' disease, sarcoidosis, primary biliary cirrhosis, uveitis posterior, and interstitial lung fibrosis), graft-versus-host disease, and allergy such as, atopic allergy. Preferred disorders that can be treated using methods which comprise the administration of GITR antagonists, e.g., a neutralizing GITRL antibody, include arthritic disorders (e.g., rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis (preferably, rheumatoid arthritis)), multiple sclerosis, type I diabetes, lupus (SLE), IBD, Crohn's disease, asthma, vasculitis, allergy, scleroderma and psoriasis.

[0172] In another embodiment, GITR antagonists, alone or in combination with, other therapeutic agents as described herein (e.g., TNF antagonists) can be used to treat multiple myeloma and related B lymphocytic malignancies (Brenne, A. *et al.* (2002) *Blood* 99(10):3756-62).

[0173] Using GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL), it is possible to modulate immune responses in a number of ways. Downregulation may be in the form of inhibiting or blocking an immune response already in progress, or may involve preventing the induction of an immune response. The functions of activated T cells may be inhibited by enhancing the suppression of T cell responses, or by inducing specific tolerance in T cells, or both. Immunosuppression of T cell responses is generally an active, non-antigen-specific, process that requires continuous exposure of the T cells to the suppressive agent. Tolerance, which involves inducing nonresponsiveness or anergy in T cells, is distinguishable from immunosuppression in that it is generally antigen-specific and persists after exposure to the tolerizing agent has ceased. Operationally, tolerance can be demonstrated by the lack of a T cell response upon reexposure to specific antigen in the absence of the tolerizing agent.

[0174] Downregulating or preventing one or more functions of an antigen presenting cell antigen (e.g., B7.1), and thus preventing high level lymphokine

synthesis by activated T cells will be useful in situations of tissue, skin and organ transplantation and in graft-versus-host disease (GVHD). For example, blockage of T cell function should result in reduced tissue destruction in tissue transplantation. Typically, in tissue transplants, rejection of the transplant is initiated through its recognition as foreign by T cells, followed by an immune reaction that destroys the transplant. The administration of a GITR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule, a neutralizing anti-GITR antibody, and/or a neutralizing anti-GITRL antibody), in combination with a molecule which inhibits or blocks interaction of a B7 lymphocyte antigen with its natural ligand(s) on immune cells (such as a soluble, monomeric form of a peptide having B7.2 activity alone or in conjunction with a monomeric form of a peptide having an activity of another B lymphocyte antigen (e.g., B7.1) or blocking antibody), prior to transplantation can lead to the binding of the molecule to the natural ligand(s) on the immune cells without transmitting the corresponding costimulatory signal. Blocking B7 lymphocyte antigen function in this manner prevents cytokine synthesis by immune cells, such as effector T cells, and thus acts as an immunosuppressant. Moreover, the lack of costimulation may also be sufficient to anergize the T cells, thereby inducing tolerance in a subject. Induction of long-term tolerance by B7 lymphocyte antigen-blocking reagents may avoid the necessity of repeated administration of these blocking reagents. To achieve sufficient immunosuppression or tolerance in a subject, it may also be necessary to block the function of a combination of B lymphocyte antigens.

[0175] The efficacy of particular blocking reagents in preventing organ transplant rejection or GVHD can be assessed using animal models that are predictive of efficacy in humans. Examples of appropriate systems which can be used include allogenic cardiac grafts in rats and xenogenic pancreatic islet cell grafts in mice, both of which have been used to examine the immunosuppressive effects of CTLA4Ig fusion proteins *in vivo* as described in Lenschow et al. (1992) *Science* 257:789-92 and Turka et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102-05. In addition, murine models of GVHD (see, e.g., Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-47) can be used to

77
78

determine the effect of blocking B lymphocyte antigen function *in vivo* on the development of that disease.

[0176] Blocking the function of an APC antigen may also be therapeutically useful for treating autoimmune diseases. Many autoimmune disorders are the result of inappropriate activation of T cells that are reactive against self tissue and which promote the production of cytokines and autoantibodies involved in the pathology of the diseases. Preventing the activation of autoreactive T cells may reduce or eliminate disease symptoms. Administration of GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) in combination with reagents that block costimulation of T cells by disrupting receptor:ligand interactions of APC antigens can be used to inhibit T cell activation and prevent production of autoantibodies or T cell-derived cytokines that may be involved in the disease process. Additionally, GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) in combination with blocking reagents may induce antigen-specific tolerance of autoreactive T cells, which could lead to long-term relief from the disease. The efficacy of these agents in preventing or alleviating autoimmune disorders can be determined using a number of well-characterized animal models of human autoimmune diseases. Examples include murine experimental autoimmune encephalitis (EAE), systemic lupus erythematosus in MRL/lpr/lpr mice or NZB hybrid mice, murine autoimmune collagen arthritis, diabetes mellitus in NOD mice and BB rats, and murine experimental myasthenia gravis (see, e.g., Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-56).

[0177] In one embodiment, GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL), including pharmaceutical compositions thereof, are administered in combination therapy, i.e., combined with other agents, e.g., therapeutic agents, that are useful for treating pathological conditions or disorders, such as immune disorders and inflammatory diseases. The term "in combination" in this context means that the agents are given substantially contemporaneously, either simultaneously or sequentially. If given sequentially,

at the onset of administration of the second compound, the first of the two compounds is preferably still detectable at effective concentrations at the site of treatment.

[0178] For example, the combination therapy can include one or more GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL), coformulated with, and/or coadministered with, one or more additional therapeutic agents, e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more detail below. Furthermore, one or more GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) described herein may be used in combination with two or more of the therapeutic agents described herein. Such combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies. Moreover, the therapeutic agents disclosed herein act on pathways that differ from the GITRL receptor pathway, and thus are expected to enhance and/or synergize with the effects of the GITR antagonists, i.e. wherein effector T cells maintain their susceptibility to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

[0179] Preferred therapeutic agents used in combination with a GITRL antagonist are those agents that interfere at different stages in the autoimmune and subsequent inflammatory response. In one embodiment, one or more GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) described herein may be coformulated with, and/or coadministered with, one or more additional agents such as other cytokine or growth factor antagonists (e.g., soluble receptors, peptide inhibitors, small molecules, ligand fusions); or antibodies or antigen binding fragments thereof that bind to other targets (e.g., antibodies that bind to other cytokines or growth factors, their receptors, or other cell surface molecules); and anti-inflammatory cytokines or agonists thereof. Nonlimiting examples of the agents that can be used in combination with the GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small

7/8
80

molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) described herein, include, but are not limited to, antagonists of one or more interleukins (ILs) or their receptors, e.g., antagonists of IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, and IL-22; antagonists of cytokines or growth factors or their receptors, such as tumor necrosis factor (TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF and PDGF. GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) can also be combined with inhibitors of, e.g., antibodies to, cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, or their ligands, including CD154 (gp39 or CD40L), or LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al. (2002) *Med. Res. Rev.* 22:146-67). Preferred antagonists that can be used in combination with GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) described herein include antagonists of IL-1, IL-12, TNF α , IL-15, IL-17, IL-18, and IL-22.

[0180] Examples of those agents include IL-12 antagonists, such as chimeric, humanized, human or *in vitro*-generated antibodies (or antigen binding fragments thereof) that bind to IL-12 (preferably human IL-12), e.g., the antibody disclosed in WO 00/56772; IL-12 receptor inhibitors, e.g., antibodies to human IL-12 receptor, and soluble fragments of the IL-12 receptor, e.g., human IL-12 receptor. Examples of IL-15 antagonists include antibodies (or antigen binding fragments thereof) against IL-15 or its receptor, e.g., chimeric, humanized, human or *in vitro*-generated antibodies to human IL-15 or its receptor, soluble fragments of the IL-15 receptor, and IL-15-binding proteins. Examples of IL-18 antagonists include antibodies, e.g., chimeric, humanized, human or *in vitro*-generated antibodies (or antigen binding fragments thereof), to human IL-18, soluble fragments of the IL-18 receptor, and IL-18 binding proteins (IL-18BP, Mallet et al. (2001) *Circ. Res.* 28). Examples of IL-1 antagonists include Interleukin-1-converting enzyme (ICE) inhibitors, such as Vx740, IL-1 antagonists, e.g., IL-1RA (Anikinra, Amgen), sIL1RII (Immunex), and anti-IL-1 receptor antibodies (or antigen binding fragments thereof).

80
81

[0181] Examples of TNF antagonists include chimeric, humanized, human or *in vitro*-generated antibodies (or antigen binding fragments thereof) to TNF (e.g., human TNFa), such as D2E7, (human TNFa antibody, U.S. 6,258,562), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (humanized anti-TNFa antibody; Celltech/Pharmacia), cA2 (chimeric anti-TNFa antibody; Remicade™, Centocor); anti-TNF antibody fragments (e.g., CPD870); soluble fragments of the TNF receptors, e.g., p55 or p75 human TNF receptors or derivatives thereof, e.g., 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, Enbrel™; Immunex; see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1994) 37:S295; *J. Invest. Med.* (1996) 44:235A), p55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fusion protein (Lenercept)); enzyme antagonists, e.g., TNFa converting enzyme (TACE) inhibitors (e.g., an alpha-sulfonyl hydroxamic acid derivative, WO 01/55112, and N-hydroxyformamide TACE inhibitor GW 3333, -005, or -022); and TNF-bp/s-TNFR (soluble TNF binding protein; see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) 39(9)(supplement):S284; *Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology* (1995) 268:37-42). Preferred TNF antagonists are soluble fragments of the TNF receptors, e.g., p55 or p75 human TNF receptors or derivatives thereof, e.g., 75 kDTNFR-IgG, and TNFa converting enzyme (TACE) inhibitors.

[0182] In other embodiments, the GITR antagonists described herein can be administered in combination with one or more of the following: IL-13 antagonists, e.g., soluble IL-13 receptors (sIL-13) and/or antibodies against IL-13; IL-2 antagonists, e.g., DAB 486-IL-2 and/or DAB 389-IL-2 (IL-2 fusion proteins; Seragen; see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1993) 36:1223), and/or antibodies to IL-2R, e.g., anti-Tac (humanized anti-IL-2R; Protein Design Labs, *Cancer Res.* (1990) 50(5):1495-502). Yet another combination includes GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) in combination with nondepleting anti-CD4 inhibitors (IDEC-CE9.1/SB 210396; nondepleting primatized anti-CD4 antibody; IDEC/SmithKline). Yet other preferred combinations include antagonists of the costimulatory pathway CD80 (B7.1) or CD86 (B7.2), including antibodies, soluble receptors or antagonistic ligands; as well as p-selectin glycoprotein ligand (PSGL), anti-inflammatory cytokines, e.g., IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; recombinant IL-10

8/82

DNAX/Schering); IL-13 and TGF- β , and agonists thereof (e.g., agonist antibodies).

[0183] In other embodiments, one or more GITR antagonists can be coformulated with, and/or coadministered with, one or more anti-inflammatory drugs, immunosuppressants, or metabolic or enzymatic inhibitors. Nonlimiting examples of the drugs or inhibitors that can be used in combination with the GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) described herein, include, but are not limited to, one or more of: nonsteroidal anti-inflammatory drug(s) (NSAIDs), e.g., ibuprofen, tenidap (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) 39(9)(supplement):S280)), naproxen (see, e.g., *Neuro. Report* (1996) 7:1209-13), meloxicam, piroxicam, diclofenac, and indomethacin; sulfasalazine (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) 39(9)(supplement):S281); corticosteroids such as prednisolone; cytokine suppressive anti-inflammatory drug(s) (CSAIDs); inhibitors of nucleotide biosynthesis, e.g., inhibitors of purine biosynthesis, folate antagonists (e.g., methotrexate (N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methyl]methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid); and inhibitors of pyrimidine biosynthesis, e.g., dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors (e.g., leflunomide (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131; *Inflammation Research* (1996) 45:103-07). Preferred therapeutic agents for use in combination with GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) include NSAIDs, CSAIDs, (DHODH) inhibitors (e.g., leflunomide), and folate antagonists (e.g., methotrexate).

[0184] Examples of additional inhibitors include one or more of: corticosteroids (oral, inhaled and local injection); immunosuppressants, e.g., cyclosporin, tacrolimus (FK-506); and mTOR inhibitors, e.g., sirolimus (rapamycin) or rapamycin derivatives, e.g., soluble rapamycin derivatives (e.g., ester rapamycin derivatives, e.g., CCI-779 (Elit (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(8):1249-53; Huang et al. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(2):295-304); agents which interfere with signaling by proinflammatory cytokines such as TNF α or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors); COX2 inhibitors, e.g., celecoxib, rofecoxib, and variants thereof, see, e.g., *Arthritis &*

Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81); phosphodiesterase inhibitors, e.g., R973401 (phosphodiesterase Type IV inhibitor; see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282)); phospholipase inhibitors, e.g., inhibitors of cytosolic phospholipase 2 (cPLA2) (e.g., trifluoromethyl ketone analogs (U.S. 6,350,892)); inhibitors of vascular endothelial cell growth factor or growth factor receptor, e.g., VEGF inhibitor and/or VEGF-R inhibitor; and inhibitors of angiogenesis. Preferred therapeutic agents for use in combination with GTR antagonists (e.g., GTRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GTR and/or GTRL) are immunosuppressants, e.g., cyclosporin, tacrolimus (FK-506); mTOR inhibitors, e.g., sirolimus (rapamycin) or rapamycin derivatives, e.g., soluble rapamycin derivatives (e.g., ester rapamycin derivatives, e.g., CCI-779); COX2 inhibitors, e.g., celecoxib and variants thereof; and phospholipase inhibitors, e.g., inhibitors of cytosolic phospholipase 2 (cPLA2), e.g., trifluoromethyl ketone analogs.

[0185] Additional examples of therapeutic agents that can be combined with a GTRL antagonist include one or more of: 6-mercaptopurines (6-MP); azathioprine sulphasalazine; mesalazine; olsalazine chloroquine/hydroxychloroquine; pencillamine; aurothiornalate (intramuscular and oral); azathioprine; cochlincine; beta-2 adrenoreceptor agonists (salbutamol, terbutaline, salmeteral); xanthines (theophylline, aminophylline); cromoglycate; nedocromil; ketotifen; ipratropium and oxitropium; mycophenolate mofetil; adenosine agonists; antithrombotic agents; complement inhibitors; and adrenergic agents.

[0186] The use of the GTR antagonists disclosed herein in combination with other therapeutic agents to treat or prevent specific immune disorders is discussed in further detail below.

[0187] Nonlimiting examples of agents for treating or preventing arthritic disorders (e.g., rheumatoid arthritis, inflammatory arthritis, rheumatoid arthritis, juvenile rheumatoid arthritis, osteoarthritis and psoriatic arthritis), with which a GTR antagonists can be combined include one or more of the following: IL-12 antagonists as described herein, NSAIDs; CSAIDs; TNFs, e.g., TNFa, antagonists as described herein; nondepleting anti-CD4 antibodies as described

herein; IL-2 antagonists as described herein; anti-inflammatory cytokines, e.g., IL-4, IL-10, IL-13 and TGF α , or agonists thereof; IL-1 or IL-1 receptor antagonists as described herein; phosphodiesterase inhibitors as described herein; COX-2 inhibitors as described herein; iloprost (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S82); methotrexate; thalidomide (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282) and thalidomide-related drugs (e.g., Celgen); leflunomide; inhibitor of plasminogen activation, e.g., tranexamic acid; see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284); cytokine inhibitor, e.g., T-614; see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); prostaglandin E1 (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282); azathioprine (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); an inhibitor of interleukin-1 converting enzyme (ICE); zap-70 and/or lck inhibitor (inhibitor of the tyrosine kinase zap-70 or lck); an inhibitor of vascular endothelial cell growth factor or vascular endothelial cell growth factor receptor as described herein; an inhibitor of angiogenesis as described herein; corticosteroid anti-inflammatory drugs (e.g., SB203580); TNF-convertingase inhibitors; IL-11 (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S296); IL-13 (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S308); IL-17 inhibitors (see, e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S120); gold; penicillamine; chloroquine; hydroxychloroquine; chlorambucil; cyclophosphamide; cyclosporine; total lymphoid irradiation; antithymocyte globulin; CD5-toxins; orally administered peptides and collagen; lobenzarit disodium; cytokine regulating agents (CRAs) HP228 and HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); soluble complement receptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisone; orgotein; glycosaminoglycan polysulphate; minocycline; anti-IL2R antibodies; marine and botanical lipids (fish and plant seed fatty acids; see, e.g., DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-77); auranofin; phenylbutazone; meclofenamic acid; flufenamic acid; intravenous immune globulin; zileuton; mycophenolic acid (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamycin); amiprilose (therafectin); cladribine (2-chlorodeoxyadenosine); and azaribine. Preferred combinations include one or

more GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) in combination with methotrexate or leflunomide, and in moderate or severe rheumatoid arthritis cases, cyclosporine.

[0188] Preferred examples of inhibitors to use in combination with GITR antagonists to treat arthritic disorders include TNF antagonists (e.g., chimeric, humanized, human or *in vitro*-generated antibodies, or antigen binding fragments thereof, that bind to TNF; soluble fragments of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, Enbrel™), p55 kD TNF receptor-IgG fusion protein; TNF enzyme antagonists, e.g., TNF α converting enzyme (TACE) inhibitors); antagonists of IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22; T cell and B cell-depleting agents (e.g., anti-CD4 or anti-CD22 antibodies); small molecule inhibitors, e.g., methotrexate and leflunomide; sirolimus (rapamycin) and analogs thereof, e.g., CCI-779; cox-2 and cPLA2 inhibitors; NSAIDs; p38 inhibitors, TPL-2, Mk-2 and NF κ b inhibitors; RAGE or soluble RAGE; P-selectin or PSGL-1 inhibitors (e.g., small molecule inhibitors, antibodies thereto, e.g., antibodies to P-selectin); estrogen receptor beta (ERB) agonists or ERB-NF κ b antagonists. Most preferred additional therapeutic agents that can be coadministered and/or coformulated with one or more GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) include one or more of: a soluble fragment of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, Enbrel™); methotrexate, leflunomide, or a sirolimus (rapamycin) or an analog thereof, e.g., CCI-779.

[0189] Nonlimiting examples of agents for treating or preventing multiple sclerosis with which a GITR antagonist can be combined include the following: interferons, e.g., interferon-alpha1a (e.g., Avonex™; Biogen) and interferon-1b (Betaseron™; Chiron/Berlex); Copolymer 1 (Cop-1; Copaxone™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbaric oxygen; intravenous immunoglobulin; cladribine; TNF antagonists as described herein; corticosteroids; prednisolone; methylprednisolone; azathioprine; cyclophosphamide; cyclosporine; methotrexate; 4-aminopyridine; and tizanidine.

86

Additional antagonists that can be used in combination with GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) include antibodies to or antagonists of human cytokines or growth factors, for example, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF, and PDGF. GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) as described herein can be combined with antibodies to other cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 or their ligands. The GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) may also be combined with agents, such as methotrexate, cyclosporine, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signaling by proinflammatory cytokines as described herein, IL-1b converting enzyme inhibitors (e.g., Vx740), anti-P7s, PSGL, TACE inhibitors, T cell signaling inhibitors such as kinase inhibitors, metal loproteinase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof, as described herein, and anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-13 and TGF).

[0190] Preferred examples of therapeutic agents for multiple sclerosis with which the GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) can be combined include interferon-b, for example, IFNb-1a and IFNb-1b; copaxone, corticosteroids, IL-1 inhibitors, TNF inhibitors, antibodies to CD40 ligand and CD80, and IL-12 antagonists.

[0191] Nonlimiting examples of agents for treating or preventing inflammatory bowel disease (e.g., Crohn's disease, ulcerative colitis) with which a GITR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule, a neutralizing anti-GITR antibody, and/or neutralizing anti-GITRL antibody) can be combined include the following: budenoside; epidermal growth

factor; corticosteroids; cyclosporin, sulfasalazine; aminosalicylates; 6-mercaptopurine; azathioprine; metronidazole; lipoxygenase inhibitors; mesalamine; olsalazine; balsalazide; antioxidants; thromboxane inhibitors; IL-1 receptor antagonists; anti-IL-1 monoclonal antibodies; anti-IL-6 monoclonal antibodies; growth factors; elastase inhibitors; pyridinyl-imidazole compounds; TNF antagonists as described herein; IL-4, IL-10, IL-13 and/or TGFb cytokines or agonists thereof (e.g., agonist antibodies); IL-11; glucuronide- or dextran-conjugated prodrugs of prednisolone, dexamethasone or budesonide; ICAM-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); soluble complement receptor 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); slow-release mesalazine; methotrexate; antagonists of platelet activating factor (PAF); ciprofloxacin; and lignocaine.

[0192] In one embodiment, a GITR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule, a neutralizing anti-GITR antibody, and/or neutralizing anti-GITRL antibody) can be used in combination with one or more antibodies directed at other targets involved in regulating immune responses, e.g., transplant rejection or graft-v-host disease. Nonlimiting examples of agents for treating or preventing immune responses with which a GITR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule, a neutralizing anti-GITR antibody, and/or neutralizing anti-GITRL antibody) of the invention can be combined include the following: antibodies against other cell surface molecules, including but not limited to CD25 (interleukin-2 receptor- α), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7.1) and/or CD86 (B7.2). In yet another embodiment, a GITR antagonist (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule, a neutralizing anti-GITR antibody, and/or neutralizing anti-GITRL antibody) is used in combination with one or more general immunosuppressive agents, such as cyclosporin A or FK506.

[0193] In other embodiments, GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, an antagonistic small molecule and/or neutralizing anti-GITRL antibody) are used as vaccine adjuvants against autoimmune disorders, inflammatory diseases or transplant rejection. The combination of adjuvants for treatment of these types of disorders are suitable for use in combination with a

wide variety of antigens from targeted self-antigens, i.e., autoantigens, involved in autoimmunity, e.g., myelin basic protein; inflammatory self-antigens, e.g., amyloid peptide protein, or transplant antigens, e.g., alloantigens. The antigen may comprise peptides or polypeptides derived from proteins, as well as fragments of any of the following: saccharides, proteins, polynucleotides or oligonucleotides, autoantigens, amyloid peptide protein, transplant antigens, allergens, or other macromolecular components. In some instances, more than one antigen is included in the antigenic composition.

[0194] For example, desirable vaccines for moderating responses to allergens in a vertebrate host, which contain the adjuvant combinations of this invention, include those containing an allergen or fragment thereof. Examples of such allergens are described in U.S. Patent No. 5,830,877 and published International Patent Application No. WO 99/51259, which are hereby incorporated by reference in their entireties, and include pollen, insect venoms, animal dander, fungal spores and drugs (such as penicillin). The vaccines interfere with the production of IgE antibodies, a known cause of allergic reactions. In another example, desirable vaccines for preventing or treating disease characterized by amyloid deposition in a vertebrate host, which contain the adjuvant combinations of this invention, include those containing portions of amyloid peptide protein (APP). This disease is referred to variously as Alzheimer's disease, amyloidosis or amyloidogenic disease. Thus, the vaccines of this invention include the adjuvant combinations of this invention plus A β peptide, as well as fragments of A β peptide and antibodies to A β peptide or fragments thereof.

[0195] Methods of 1) downregulating antigen presenting cell function; and 2) combination therapy for managing immunosuppression are well known in the art (see, e.g., Xiao et al. (2003) Dendritic cell vaccine design: strategies for eliciting peripheral tolerance therapy of autoimmune diseases. *BioDrugs* 17:103-11; Kuwana (2002) Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum. Immunol.* 63:1156-63; Lu et al. (2002) Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 73:S19-S22; Rifle et al. (2002) Dendritic cells and second signal blockade: a step toward allograft

88
89

tolerance. *Transplantation* 73:S1-S2; Mancini et al. (2004) The management of immunosuppression: the art and the science. *Crit. Care. Nurs. Q.* 27:61-64).

[0196] Another aspect of the present invention accordingly relates to kits for carrying out the combined administration of GITR antagonists (e.g., GITRL inhibitory polynucleotides, antagonistic small molecules, and/or neutralizing antibodies to GITR and/or GITRL) with other therapeutic compounds. In one embodiment, the kit comprises one or more binding agents formulated in a pharmaceutical carrier, and at least one agent, e.g., therapeutic agent, formulated as appropriate, in one or more separate pharmaceutical preparations.

[0197] The present invention is illustrated by the following Examples related to a novel mouse cDNA, designated mouse GITRL cDNA, encoding a novel ligand polypeptide designated mouse GITRL, as well as novel antibodies to GITRL. One of skill in the art would understand the teachings of the Examples to be applicable to all homologs of mouse GITRL.

EXAMPLES

[0198] The Examples which follow are set forth to aid in the understanding of the invention but are not intended to, and should not be construed to, limit its scope in any way. The Examples do not include detailed descriptions of conventional methods, such as flow cytometry (e.g., FACS), PCR, Northern and *in situ* hybridization, or those methods employed in the construction of vectors, the insertion of genes encoding the polypeptides into such vectors and plasmids, the introduction of such vectors and plasmids into host cells, and the expression of polypeptides from such vectors and plasmids in host cells. Such methods are well known to those of ordinary skill in the art.

EXAMPLE 1

Identification of GITRL DNA sequences

Example 1.1 Identification of the Mouse GITRL cDNA and Genomic Sequences

[0199] Two approaches were taken to identify the murine GITRL homolog. In one approach, the amino acid sequence of human GITRL (from GenBank Acc.

No. AX077015) was used in a Tblastn search against div1; div2; div3; div4; gbdiv_cu; Celera mouse (cm); and draft_mouse-dna databases. Genomic sequence ga_69772862.cm_4 was identified as one of the possible hits to investigate. Missing amino acid sequences were identified in a Tblastn search with the amino acid sequence of human GITRL (GenBank Acc. No. AX077015) against the unmasked Celera mouse genomic assembly (cm) using expectation value (E) =10 (default), 100 and 1000. Genomic sequence ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 was identified as the genomic sequence containing the missing amino acid sequences.

[0200] In another approach, the amino acid sequence of human GITRL (from GenBank Acc. No. NM_005092) was used in a Tblastn search against the unmasked Celera mouse genomic assembly (cm) using default expectation value (E) =10 and 1000. Genomic sequence ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 was identified as the genomic sequence containing three high scoring pair (HSP) regions.

[0201] A putative mouse cDNA sequence was constructed based on the three HSP regions obtained in the above-described Tblastn search. This cDNA sequence was edited based on the comparison between the alignments of the three human exon sequences with the corresponding human genomic sequence from Celera (ga_x2htbl3vud5_66.ch_r25h_1) and the three derived mouse putative exon sequences with the corresponding mouse genomic sequence from Celera (ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2). This editing took into account the splice junctions for the human sequence. The edited mouse GITRL cDNA sequence contained an open reading frame of 519 bp (coding sequence of 522 bp), corresponding to a protein of 173 amino acids.

[0202] Primers were designed based on the putative exons of mouse GITRL genomic sequence and used to isolate the corresponding physical cDNA clone from a murine thymus cDNA library by PCR. The sequences of the forward (SEQ ID NO:4) and reverse (SEQ ID NO:5) PCR primers were:
5' ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG 3' (forward primer), and
5' GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG 3' (reverse primer).

90
a1

[0203] The resulting fragment was subcloned and the DNA sequence was determined using standard methods. The resulting fragment confirmed the existence of a mouse GITRL cDNA comprising all three predicted exons (see below). This fragment was extended to include the final coding segment (two amino acids) of the cDNA by PCR amplification of this resulting cDNA clone. The sequences of the forward (SEQ ID NO:6) and reverse (SEQ ID NO:7) PCR primers for this step were:

5' TTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG 3' (forward primer), and

5' TTAAAGAATTCTCATTAAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT 3' (reverse primer).

[0204] The forward PCR primer contained a Sall site, a Kozak sequence for translation initiation, and the ATG encoding the initiating methionine. The reverse primer contained an EcoRI site. The Sall and EcoRI sites were used for directional subcloning, and sequence determination of the final cDNA clone was performed.

[0205] The full-length mouse GITRL cDNA sequence and its deduced amino acid sequence are set forth in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, respectively. Alignment of the human GITRL cDNA (SEQ ID NO:8) and mouse GITRL cDNA sequences revealed 69.6% identity. Alignment of the human GITRL amino acid (SEQ ID NO:9) and mouse GITRL amino acid sequences (Figure 1) revealed 54.1% identity and 60.0% similarity. This degree of amino acid identity is similar to that which exists in general between human and mouse homologs of other TNFR ligands (Oshima et al. (1998) *Int. Immunol.* 10:517-26).

[0206] Comparison of the cloned mouse GITRL cDNA sequence (SEQ ID NO:1) with publicly available murine databases revealed a single nucleotide polymorphism (SNP) in the coding region of mouse GITRL (an A/C transversion at nucleotide position 470 of SEQ ID NO:1 in exon 3, which results in an asparagine to threonine change at amino acid position 157 of SEQ ID NO:2).

[0207] Comparison of the mouse GITRL cDNA sequence with the mouse genomic sequence from Celera (ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2) described above revealed that the mouse GITRL locus contains three exons and two introns

9/9/2

(see Table 2 below), with exonic size and position well conserved between mouse and human GITRL. The mouse GITRL genomic DNA sequence is set forth in SEQ ID NO:3.

TABLE 2

Region in SEQ ID NO:3	Sequence Attribute	Length (bp)	Position in SEQ ID NO:1
1-255	5'-sequence	255	-
256-390	Exon#1	135	1-135
391-6010	Intron#1	5620	-
6011-6044	Exon#2	34	136-169
6045-8990	Intron#2	2946	-
8991-9340	Exon#3	350	170-519
9341-9343	Stop	3	520-522
9344-10289	3'-Sequence	946	-

[0208] A comparison of the genomic structure of mouse GTRL (Table 2) with the genomic structure of human GITRL (see Table 3 below) shows that exonic size and intronic position are well conserved between the human and mouse GITRL genomic DNA sequences. The human GITRL genomic DNA sequence is set forth in SEQ ID NO:10.

TABLE 3

Region in SEQ ID NO:10	Sequence Attribute	Length (bp)	Position in SEQ ID NO:8
1-421	5'-sequence	421	-
422-577	Exon#1	156	1-156
578-7348	Intron#1	6771	-
7349-7379	Exon#2	31	157-187
7380-9604	Intron#2	2225	-
9605-9948	Exon#3	344	188-531
9949-9951	Stop	3	532-534
9952-10331	3'-Sequence	380	-

Example 1.2 Hydrophobicity Profile of Mouse GITRL

[0209] The hydrophobicity profile of mouse GITRL was determined by TopPred (Claros and von Heijne (1994) *Comput. Appl. Biosci.* 10:685-6). A plot of the hydrophobicity score against the amino acid residues of mouse GITRL (SEQ ID NO:2) revealed a single putative hydrophobic region located approximately between amino acids 25-50, similar to human GITRL. This hydrophobic segment corresponds to the predicted transmembrane region for type II transmembrane proteins.

EXAMPLE 2

Tissue Expression of Mouse GITRL

[0210] Oligonucleotide probes based on the mouse GITRL cDNA sequence (SEQ ID NO:1) were used to test several murine tissue samples for GITRL expression by Northern hybridization, *in situ* hybridization, and real-time PCR (e.g., Heid et al. (1996) *Genome Res.* 6:986-94; Mullah et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:1026-31; Giulietti et al. (2001) *Methods* 25:386-401).

[0211] Although Northern hybridization revealed barely detectable transcripts in heart, spleen, lung, lymph node, kidney, and liver, subsequent *in situ* hybridization revealed GITRL expression in the heart, spleen, lymph node and thymus. GITRL expression in these tissues was generally limited to the pericardial and endocardial cells of the heart, the white pulp of the spleen, the cortical, paracortical and medullary zones of lymph nodes, and the cortical and medullary zones of the thymus.

[0212] GITRL expression in thymus, spleen and lymph node was further confirmed by real-time PCR analysis. GITRL was expressed at the highest levels in spleen and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated spleen cells, which are primarily B lymphocytes. Vanishingly low levels of GITRL expression were detected in stomach, brain, and kidney. Real-time PCR analysis also revealed GITRL transcripts in liver, activated CD25⁻ cells, activated CD25⁺ cells, and concanavalin A-activated lymph node cells, although to a lesser degree than the spleen and LPS blasts. No GITRL expression was detected in resting CD25⁻ or

CD25⁺ cells. Real-time PCR analysis of immature and LPS-stimulated bone marrow-derived dendritic cells (DC) also demonstrated baseline GITRL expression by immature DC that increased upon stimulation with LPS for 24 hours, but decreased below baseline after 48 hours of LPS stimulation. GITRL expression was also detected to varying degrees in all endothelial cell lines tested (bEND3, C166, EOMA, MSI and SVEC4-10), and was demonstrated to remain relatively unchanged when the cell lines were stimulated with LPS. In contrast, GITRL cDNA was not detected by PCR in the following unstimulated murine cell lines of specified origin: E10 T cell line, T2 fetal thymus line, T10 plasmacytoma, EL4 thymoma, BAF3 and PREB pre-B cell lines, B9 B cell hybridoma, DA1G monocytic, M1 monocytic, FBMD-1 fetal bone marrow, P19 embryonic carcinoma, MDF liver, and E14 embryonic stem cell line.

EXAMPLE 3

Functional Expression of Recombinant Mouse GITRL

Example 3.1 Binding of GITRL to Cell-Surface GTR

[0213] To determine whether the mouse cDNA isolated in Example 1 encoded a functional GTR ligand (GITRL), Cos cells expressing mouse GITRL fused to the FLAG epitope (GITRL-Flag-Cos) or control mouse IL-21 receptor fused to the FLAG epitope (IL-21R-Flag-Cos) were incubated for various lengths of time with 293T cells expressing mouse GTR (GTR-293T). Cell-cell interaction was detected by flow cytometry using phycoerythrin-labeled anti-Flag antibody (PE-FLAG) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-GTR. Even 1 min post cocentrifugation of the GTR-293T and GITRL-Flag-Cos cells, ~90% of GTR-293T cells (as detected by FITC fluorescence) costained for FLAG (as detected by PE fluorescence), indicating that the GTR-293T cells were bound to the GITRL-Flag-Cos cells, and this interaction persisted throughout the entire 60 min of the experiment. In contrast, GTR-293T cells incubated with IL-21R-Flag-Cos cells did not significantly costain for FLAG, even at 60 min post cocentrifugation. These data demonstrate that the mouse cDNA isolated in Example 1 encodes for a functional GITRL capable of binding cell-surface GTR.

28
a5

Example 3.2 Binding of GITRL to Soluble GITR

[0214] The ability of mouse GITRL to bind GITR was confirmed by incubating Cos cells expressing mouse GITRL (GITRL-Cos) or mock-transfected Cos cells with recombinant GITR fused to the Fc portion of human IgG (GITR-Fc) or control human IgG (HIgG). Binding of GITR-Fc to GITRL was determined by flow cytometry using donkey antihuman antibody conjugated to FITC (FITC-Ab). Incubation of GITRL-Cos cells with GITR-Fc resulted in a 3.6-fold increase in FITC-Ab binding (28.8%) compared to incubation of GITRL-Cos cells with control HIgG (7.9%). Unstained GITRL-Cos cells, GITRL-Cos cells incubated with CTLA-4:Fc fusion protein and FITC-Ab, and GITRL-Cos cells incubated with FITC-Ab alone exhibited no fluorescence. Neither treated nor untreated mock-transfected Cos cells exhibited any appreciable fluorescence. These data demonstrate that the mouse cDNA isolated in Example 1 encodes for a functional GITRL capable of binding soluble GITR.

EXAMPLE 4

Binding of Mouse GITRL to GITR Results in Proliferation of CD4⁺CD25⁺ Cells

[0215] The effect of GITRL:GITR binding on cellular proliferation was determined by stimulating ~50,000 murine T cells with ~50,000 irradiated T cell-depleted splenocytes, and 100 IU/ml IL-2 for 65-72 hrs in the absence or presence of varying concentrations of a GITR-binding protein. Two GITR-binding proteins were used in these assays: either an agonistic anti-GITR antibody (see, e.g., McHugh et al. (2002) *Immunity* 16:311-23; see also U.S. Patent Application 10/194,754) or murine GITRL expressed on the surface of modified rat YB2/0 cells (GITRL-YB2/0). Cellular proliferation was assayed by pulsing cells with 1 μ Ci ³H-thymidine for the last 6-12 hr of culture and then measuring ³H-thymidine incorporation via scintillation counting.

[0216] As shown in Figure 2A, CD4⁺CD25⁺ T cells did not respond to any concentration of anti-GITR antibody. In contrast, anti-GITR antibody stimulated the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells at all concentrations tested. For example, culture of CD4⁺CD25⁺ T cells in the presence of the lowest titre of anti-GITR antibody tested (~0.02 μ g/ml) resulted in a ~3-fold increase in ³H-thymidine

incorporation (~15,000 cpm) over cells cultured in the absence of anti-GITR antibody. The ability of anti-GITR antibody to stimulate CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation reached a plateau of ~45,000 cpm at an antibody concentration of ~0.3 µg/ml, corresponding to a ~9-fold increase in ³H-thymidine incorporation over cells cultured in the absence of anti-GITR antibody.

[0217] Similar to the results obtained with the anti-GITR antibody, GITRL-YB2/0 cells did not stimulate proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells (Figure 2B). In contrast, GITRL-YB2/0 cells markedly stimulated the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells. For example, culture of CD4⁺CD25⁺ T cells in the presence of ~10,000 GITRL-YB2/0 cells resulted in a ~4-5-fold increase in ³H-thymidine incorporation over cells cultured in the presence of an equal number of unmodified YB2/0 cells. Increasing the number of YB2/0 cells to ~50,000 resulted in a ~15-fold increase in ³H-thymidine incorporation over cells cultured in the presence of an equal number of unmodified YB2/0 cells (Figure 2B).

EXAMPLE 5

Binding of Mouse GITRL to GITR Reverses CD4⁺CD25⁺ T Cell-Mediated Suppression of CD4⁺CD25⁺ T Cells

[0218] The T cell suppressor assay used in these Examples has been previously described (see, e.g., Thornton and Shevach (2000) *J. Immunol.* 164:183-90; McHugh et al. (2002) *Immunity* 16:311-23; both hereby incorporated by reference). Briefly, ~50,000 CD4⁺CD25⁺ responder T cells were cultured in the presence of ~50,000 irradiated T cell-depleted splenocytes, 0.5 µg/ml anti-CD3 antibody, and various numbers of freshly isolated suppressor CD4⁺CD25⁺ T cells. The ability of ~50,000 irradiated GITRL-YB2/0 cells or 2 µg/ml agonistic anti-GITR antibody to reverse suppression of CD4⁺CD25⁺ proliferation was then assessed by measuring ³H-thymidine incorporation via scintillation counting.

[0219] As shown in Figure 3A, CD4⁺CD25⁺ cells reduced proliferation of CD4⁺CD25⁺ cells in a dose-dependent manner. Both anti-GITR antibody and GITRL-YB2/0 cells were able to completely reverse the suppression of CD4⁺CD25⁺ proliferation over the entire range of number of CD4⁺CD25⁺

95
97

suppressor cells tested. Thus binding of GITRL to its receptor GTR, like binding of agonistic anti-GTR antibody to GTR, blocked the suppressive function of $CD4^+CD25^+$ cells. The ability of GITRL-YB2/0 cells to reverse suppression occurred in a dose-dependent manner, with as few as ~3,000 GITRL-YB2/0 cells at least partially reversing or decreasing suppression in this assay (Figure 3B). Neither unmodified YB2/0 nor YB2/0 cells expressing GTR had an appreciable effect on $CD4^+CD25^+$ T cell-mediated suppression (Figure 3A).

[0220] In contrast to the results obtained with freshly isolated $CD4^+CD25^+$ T cells, GITRL:GTR binding had little-to-no effect on suppression mediated by $CD4^+CD25^+$ T cells activated with anti-CD3 antibody, T cell-depleted splenocytes, and IL-2 (Figure 4). Neither the addition of anti-GTR antibody nor ~50,000 GITRL-YB2/0 cells was able to reverse suppression mediated by ~25,000 activated $CD4^+CD25^+$ T cells. When fewer activated $CD4^+CD25^+$ T cells were added to the assay (e.g., ~1,500-12,500 cells), however, anti-GTR antibody and GITRL-YB2/0 cells were able to partially decrease, but not completely abrogate, suppression.

EXAMPLE 6

Anti-Mouse GITRL Antibody Restores Suppression Mediated by $CD4^+CD25^+$ T cells

Example 6.1 Isolation of Anti-Mouse GITRL Antibodies

[0221] Antibodies specific for mouse GITRL were produced by immunizing rats with rat YB2/0 cells expressing the mouse GITRL cDNA (GITRL-YB2/0). Using methods well known in the art, antibody hybridomas were created and screened against Phoenix cells expressing mouse GITRL using flow cytometry. Two antibodies, 5F1 and 10F12, were identified that bound specifically to GITRL-Phoenix cells and not mock-transfected Phoenix control cells. These antibody hybridomas were deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) on July 22, 2003; ATCC assigned number PTA-5336 to hybridoma 5F1, and number PTA-5337 to hybridoma 10F12.

97-98

Example 6.2 Anti-Mouse GITRL Antibodies Block the Effects of GITRL on Suppressor Activity of CD4⁺CD25⁺ T Cells

[0222] As described in Example 5 above, YB2/0 cells expressing GITRL on their cell surface were able to reverse the suppression of CD4⁺CD25⁺ T cell proliferation mediated by freshly isolated CD4⁺CD25⁺ T cells. To determine whether anti-GITRL antibodies could restore CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression, the T cell suppressor assay as described in Example 5 was performed in the presence or absence of either 5F1 or 10F12 anti-GITRL antibody or control antibodies.

[0223] As seen in Example 5, culture of CD4⁺CD25⁺ responder T cells and freshly isolated CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in the presence of GITRL-YB2/0 cells resulted in complete reversal of suppression of CD4⁺CD25⁺ cell proliferation (Figure 5A and 5B). The addition of 10% hybridoma culture supernatants containing 5F1 anti-GITRL antibody to the assay resulted in partial (Figure 5B) to almost complete (Figure 5A) restoration of CD4⁺CD25⁺-mediated suppression. Addition of 10F12 anti-GITRL antibody gave similar results. As expected, the presence of control antibodies ("control Ig") had no appreciable effect on the ability of GITRL-YB2/0 cells to reverse suppression (Figure 5B). These data demonstrate that anti-GITRL antibodies block the ability of GITRL to turn off the suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ cells.

Example 6.3 Anti-Mouse GITRL Antibodies Suppress T Cell Responses Only in the Presence of CD4⁺CD25⁺ T Cells

[0224] Lymph node cell cultures were stimulated in the presence of varying concentrations of agonistic anti-CD3 antibody prior to (Figure 6A) or after the depletion of (Figure 6B) CD4⁺CD25⁺ T cells, and proliferation was measured by determining ³H-thymidine incorporation via scintillation counting. To determine the effects of anti-GITRL antibody on proliferation, 10% hybridoma culture supernatants containing 5F1 anti-GITRL antibody were added to parallel cultures.

[0225] As shown in Figure 6A, addition of anti-GITRL antibody suppressed proliferation of lymph node cells containing CD4⁺CD25⁺ T cells when the cells

88
99

were stimulated with ~ 0.075 $\mu\text{g/ml}$ to ~ 0.75 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 antibody. Suppression was not seen in the presence of the anti-GITRL antibody when the lymph node cells containing $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells were stimulated with 1.0 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 antibody. In contrast to the results obtained with lymph node cell cultures containing $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells, the addition of anti-GITRL antibody generally had no suppressive effects on lymph node cell cultures that had been depleted of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells (Figure 6B). Taken together, these data suggest that anti-GITRL antibody blocks the interaction between GITR expressed on $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells and GITRL expressed on other cells, and that blockade of this GITR/GITRL interaction enhances the regulatory function of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells to restore immunosuppression.

EXAMPLE 7

Distribution of GITRL-expressing cells in lymphoid tissues

[0226] The agonistic anti-GITRL antibody was used to examine the expression of GITRL in mouse tissues by flow cytometry. Freshly isolated CD11c^+ splenic dendritic cell (DC) subsets expressing CD4 only, CD8 only, or both CD4 and CD8, constitutively expressed low levels of GITRL (Figure 7A). However, surface expression of GITRL was noticeably higher among $\text{CD11c}^{\text{low}}\text{B220}^+$ plasmacytoid dendritic cells (Nakano et al., 2001). In Figure 7B, staining with anti-GITRL mAb or an isotype control was done on the indicated subsets of freshly isolated CD11c^+ splenic DCs from BALB/c mice.

[0227] Similarly, freshly isolated B220^+ splenic B cells constitutively expressed GITRL, as did peritoneal B-1 B cells (perC $\text{CD11b}^+\text{B220}^+$), although at higher levels (Fig. 7C, top). Resting peritoneal macrophages (perC $\text{CD11b}^+\text{B220}^-$) were also found to express this ligand (Fig. 7C, bottom).

[0228] Thymocyte subsets undergoing selection did not express measurable amounts of GITRL (Fig. 7D). In contrast, as shown in Figure 7E, expression of GITRL was detectable on all subsets of $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ thymic precursors, with $\text{CD44}^+\text{CD25}^+$ (R2) and $\text{CD44}^+\text{CD25}^+$ (R3) subsets expressing the highest levels.

79
108

[0229] GITRL was undetectable on unstimulated lymph node cells (Fig. 7F). GITRL was also undetectable on unstimulated splenic T cells (data not shown). These data demonstrate the expression of GITRL by professional antigen presenting cells (DCs, B cells and macrophages; Fig. 7A-7C) and thymic CD4⁺ CD8⁻ precursor cells (Fig. 7E), but not T cells undergoing selection (Fig. 7D) or resting T cells in the periphery (unstimulated lymph node and splenic cells; Fig. 7F, and data not shown). These data correlated with data obtained by Northern hybridization, *in situ* hybridization, and real-time PCR as described in Example 2 (above).

EXAMPLE 8

APCs downregulate GITRL following TLR stimulation

[0230] The effects of B cell activation on GITRL expression were examined following treatment with Toll-like receptor (TLR) ligands, or anti-CD40 and IL-4, or anti-IgM. Stimulation of either splenic B cells (B220⁺ splenocytes) or peritoneal B-1 B cells (B220⁺CD11b⁺ PerC) resulted in a rapid but transient upregulation of GITRL, which was apparent after 4 hours with most of the treatments (Fig. 8A). Following 48-60 hours of stimulation, expression declined to below prestimulation levels where it stabilized. An exception was polyI:C-treated B-1 B cells from the peritoneal cavity, which did not display this downregulation during the time points examined. As expected, levels of CD86 increased over the course of the experiment in all groups, indicating that the observed downregulation of GITRL was not secondary to cell death (data not shown).

[0231] The reduction of GITRL expressed by B cells after treatment with anti-CD40 and IL-4 suggested that expression could be modulated following the provision of T cell help. GITRL expression by B cells among total splenocytes was assessed after culture with anti-CD3 antibody. Under these culture conditions, expression of GITRL on B220⁺ splenocytes was also downregulated after 48 hours (Fig. 8B). Thus, physiological levels of T cell activity also led to a reduction in the expression of GITRL by splenic B cells.

100
101

[0232] Splenic CD11c⁺ DCs were enriched with magnetic beads and examined for expression of GITRL after 12 and 36 hours of culture in the presence of LPS. DCs cultured in either medium or LPS expressed GITRL during the initial 12 hours, with modest upregulation induced by LPS. However, by 36 hours, expression of GITRL was undetectable on both LPS-treated DCs as well as those cultured only in medium. Figure 8C shows expression of GITRL (top histogram panels) and CD86 (B7.2) (bottom histogram panels) by purified CD11c⁺ DCs following culture with or without LPS (0.5µg/ml) at the indicated time points. As shown, CD86 (B7.2) expression was upregulated as expected (Banchereau and Steinman, 1998). The reduction in GITRL expression by splenic DCs cultured in medium suggests that the “spontaneous” DC maturation that occurs during *in vitro* culture (Vremec and Shortman, 1997) is sufficient to downregulate expression of GITRL. For this reason, only results following LPS stimulation are shown, although DCs were subjected to the same treatments shown for B cells. Similar to the results of another published report (Tone et al., 2003), it was found that bone marrow-derived DCs express GITRL constitutively, and that such expression was only marginally reduced after treatment with various TLR ligands (data not shown).

[0233] Both CD4 and CD8 T cells expressed measurable levels of GITRL after a 48-hour culture of splenocytes in the absence (“+Med.”) or presence (“+aCD3”) of soluble anti-CD3 antibody (Fig. 8D), confirming previous real time PCR (see also Example 2).

EXAMPLE 9

Blockade of GITR/GITRL interaction inhibits lymphocyte proliferation

[0234] Because GITRL was constitutively expressed by APCs, and because GITR/GITRL interactions were proposed to abrogate the suppressive functions of CD4⁺CD25⁺ T cells, the ability of anti-GITRL antibody to enhance suppression mediated by the endogenous population of CD4⁺CD25⁺ T cells resident in secondary lymphoid organs was tested. A comparison was made of the proliferative responses of total lymph node cells (LN), total splenocytes (Sp), and LN or Sp depleted of CD25⁺ cells (Δ25), each of which were cultured with the

100
101

anti-GITRL antibody (filled circles) or a control antibody (Rat IgG; open circles). The addition of anti-GITRL antibody reduced the proliferative response of total lymph node cells (Fig. 9A, top left) and to a lesser degree, total splenocytes (Fig. 9A, bottom left). However, the inhibitory effect was also apparent in cultures depleted of CD25⁺ cells (Fig. 9A, top right (LN); bottom right (Sp)), raising the possibility that GITR/GITRL interactions provide costimulatory signals for CD25⁺ T cells.

[0235] To directly test this possibility, the proliferative responses of purified CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells were examined in the presence of APCs and YB2/0 cells expressing GITRL. The proliferation of both CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells was substantially enhanced in the presence of GITRL-expressing cells (Fig. 9B), which was particularly evident at low concentrations of anti-CD3 for CD4⁺CD25⁻ T cells.

[0236] It may appear discrepant that the anti-GITR antibody mediates its effects by acting on CD4⁺CD25⁻ T cells, as resting T cells express only low levels of GITR. However, the discrepancy is resolved by the demonstration that GITR expression is rapidly upregulated following T cell activation (Fig. 9C), reaching maximal levels between 48 and 72 hours after activation. These results support the possibility GITR/GITRL interactions can influence CD4⁺CD25⁻ T cell activation independently of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.

EXAMPLE 10

Reversal of suppression requires GITR expression by CD25⁺ T cells

[0237] Previous studies suggested that ligation of GITR on CD4⁺CD25⁺ T cells inhibited their suppressive capabilities (McHugh et al, 2002; Shimizu et al., 2002). However, because activated T cells also express GITR, we sought to determine the relevant cellular target(s) of GITR engagement resulting in the abrogation of suppression. Proliferation was measured either in the presence or absence of anti-GITR mAb (DTA-1) in cocultures using combinations of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells from *GITR*^{+/+} and *GITR*^{-/-} mice (Fig. 10). As previously reported (Shimizu et al., 2002), when both the CD4⁺CD25⁺ and

CD4⁺CD25⁻ T cells expressed GITR, the addition of anti-GITR mAb to cocultures resulted in an increase in the proliferative response compared to cocultures receiving isotype antibody (Fig. 10A, panel a). When CD4⁺CD25⁻, but not CD4⁺CD25⁺, T cells expressed GITR in cocultures, the addition of the anti-GITR antibody led to an enhancement in T cell proliferation similar to that seen when CD4⁺CD25⁺ T cells expressed GITR (Fig. 10A, panel b). However, in cocultures of CD4⁺CD25⁻*GITR*^{-/-} and CD4⁺CD25⁺*GITR*^{+/+} T cells, addition of the anti-GITR antibody had no effect on proliferation (Fig. 10A, panel c). As expected, the addition of anti-GITR antibody to cocultures of CD4⁺CD25⁻*GITR*^{-/-} and CD4⁺CD25⁺*GITR*^{-/-} T cells also had no effect on T cell proliferation (Fig. 10A, panel d). Results similar to those described above were obtained with a polyclonal anti-mGITR antibody preparation obtained commercially (data not shown).

[0238] Strong evidence in support of the hypothesis that the abrogation of suppression was a consequence of ligation of GITR expressed by CD4⁺CD25⁺ T cells was obtained in a previous study, which used combinations of rat responders and mouse CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (Shimizu et al., 2002). The anti-GITR mAb (DTA-1) used in these studies was generated in a rat, and consequently did not bind to rat cells (id.). Experiments analogous to those described above were performed using cocultures of rat CD4⁺CD25⁻ responders, mouse CD4⁺CD25⁺ suppressors, and irradiated rat APCs (Fig. 10B, panel b). Cocultured mouse CD4⁺CD25⁻ responders, mouse CD4⁺CD25⁺ suppressors, and irradiated rat APCs were included as a control (Fig. 10B, panel a). Similar to the data obtained from *GITR*^{-/-} mice, no abrogation of CD4⁺CD25⁺-mediated suppression occurred (Fig. 10B, panel b), unless GITR could be cross-linked on the responding CD25⁻ population (Fig. 10B, panel a).

[0239] A further analysis of the rat/mouse system was accomplished by examining the dilution of CFSE by cocultured rat CD4⁺CD25⁻ and mouse CD4⁺CD25⁺ T cells by flow cytometry. In the presence of the isotype control antibody, the rat CD4⁺CD25⁻ T cells were only partially suppressed by mouse CD4⁺CD25⁺ T cells when cultured at a 1:8 suppressor to responder ratio (Fig. 10C, left histogram panels). However, the addition of the anti-GITR antibody led to an additional expansion of the mouse CD4⁺CD25⁺ T cells, and a consequent

103
104

increase in the suppression of the rat T cells (Fig. 10C, right histogram panels). The increased CFSE dilution of mouse CD4⁺CD25⁺ T cells following GITR ligation could be partially inhibited by the addition of blocking anti-CD25 antibodies, suggesting that IL-2 initially made by the responder T cells was also required for this expansion (data not shown). Together, these results unequivocally demonstrate that engagement of GITR on responder CD4⁺CD25⁺ T cells is required to overcome CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression.

164
105

EXAMPLE 11

Expression of GITR signals is required to regulate and overcome suppression mediated by endogenous regulatory T cells

[0240] Since both CD28 and GITR appeared to provide costimulatory signals during the activation of T cells, we sought to determine if they played distinct roles during the primary response. We compared the capacity of GITR and CD28 to promote T cell proliferation in the presence or absence of endogenous lymph node CD4⁺CD25⁺ T cells, and in the presence or absence of exogenous IL-2 (Fig. 11). The same samples used for proliferation studies were simultaneously assessed for CFSE dilution following the 72-hour culture period. In the absence of exogenous IL-2, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from both *GITR*^{-/-} and *CD28*^{-/-} animals failed to proliferate (Fig. 11A, panel a). LN cells from *GITR*^{+/-} animals displayed a phenotype intermediate between those from wild type and *GITR*^{-/-} animals (Fig. 11A, panel a). The response of T cells from wild type mice was significantly enhanced following depletion of CD25⁺ T cells, indicating that suppression under these culture conditions was mediated by the CD25⁺ T cells resident in the normal lymph node (Fig. 11A, compare panels a and b). Most importantly, in the absence of CD4⁺CD25⁺ T cells, the responses of CD4⁺ and CD8⁺ lymph node T cells from *GITR*^{-/-} mice were comparable to those of wild type mice as assessed by ³H-thymidine incorporation (Fig. 11A, panel b) and CFSE dilution (Fig. 11B, top set of panels). However, after 72 hours, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *CD28*^{-/-} animals were not proliferating even in the absence of CD4⁺CD25⁺ T cells (Fig. 11A, panel b).

[0241] A very different pattern of response was observed when exogenous IL-2 was added to the cultures of intact lymph node cells. CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation was completely inhibited in the absence of GITR as assayed by ³H-thymidine uptake (Fig. 11A, panel c) or by the lack of CFSE dilution (Fig. 11B, middle set of panels). In contrast, measurable proliferation of T cells from *CD28*^{-/-} animals was detected by ³H-thymidine incorporation (Fig. 11A, panel c), although the CFSE profile demonstrated that CD8⁺ T cells were largely responsible for the proliferation measured (Fig. 11B). In the presence of IL-2 (50U/ml), lymph nodes depleted of CD4⁺CD25⁺ T cells from all animals

displayed similar levels of proliferation as assessed by ^3H -thymidine incorporation (Fig. 11A, panel d) and CFSE dilution (Fig. 11B, bottom set of panels). Taken together, these results indicate that the defects in T cell activation in $\text{GITR}^{-/-}$ and $\text{CD28}^{-/-}$ mice are distinct.

[0242] The inability of total T cells present in lymph nodes of $\text{GITR}^{-/-}$ mice to proliferate in the presence of exogenous IL-2 suggested that the expression of the high affinity IL-2 receptor might be affected in these animals. Since the expression of the IL-2R α chain is primarily induced by its ligand (Depper et al., 1985; Malek and Ashwell, 1985), the ability of anti-CD3-activated $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T cells from $\text{GITR}^{-/-}$ mice to express this chain was examined in the presence or absence of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells, and in the presence or absence of IL-2 (Fig. 11C). In the presence of regulatory T cells, the addition of IL-2 to cocultures resulted in enhanced expression of CD25 by $\text{GITR}^{+/+}$, but not by $\text{GITR}^{-/-}$, $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T cells after 24 hours (Fig. 11C, bottom right histogram panel). However, the ability of $\text{GITR}^{-/-}$ $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T cells to undergo IL-2-induced CD25 expression could be readily restored by removing $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells (Fig. 11C, bottom left histogram panel). Thus, the impairment in IL-2 responsiveness by $\text{GITR}^{-/-}$ T cells in the presence of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells was due, at least in part, to their inability to express the high affinity IL-2 receptor in the presence of concentrations of exogenous IL-2 sufficient to induce CD25 expression on wild type cells.

EXAMPLE 12

CD28-dependent costimulation enhances GITR expression and responsiveness

[0243] Although the data presented above suggested that engagement of either GITR or CD28 on CD25^- T cells provided a signal that allowed the responder T cells to escape suppression, the nature of the signals involved in this process remained unclear. The partial rescue of the proliferative responses of $\text{CD28}^{-/-}$ CD8^+ T cells by IL-2 in the presence of $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cells suggested that CD28/B7 signaling might regulate T cell sensitivity to GITR/GITRL interactions. Furthermore, previous studies have demonstrated that CD28-CD80/CD86 interactions can enhance expression of some TNFR-family members (Gilfillan et

106
107

al., 1998; Rogers et al., 2001). Thus, we examined this possibility with respect to GITR. Purified CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells from *CD28*^{-/-} or wild type mice either remained unstimulated or were activated with low concentrations of plate-bound anti-CD3 antibody in the presence or absence of plate-bound anti-CD28 antibody (Fig. 12A). Although wild type T cells exposed to anti-CD3 alone only slightly upregulated GITR, the expression of GITR by both CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells was greatly enhanced by the inclusion of anti-CD28.

[0244] Similarly, the upregulation of GITR expression on CD4⁺CD25⁻ T cells was markedly inhibited by the addition of anti-CD80/CD86 (anti-B7.1/7.2) (Fig. 12B, left histogram panel). The inhibition of GITR expression in cultures containing anti-CD80/CD86 was not secondary to reduced production of IL-2, as GITR upregulation by CD4⁺CD25⁻ T cells was not prevented in cultures containing anti-IL-2/IL-2R mAbs (Fig. 12B (right histogram panel)).

[0245] The enhanced expression of GITR induced by CD28-derived costimulatory signals was paralleled by an enhanced responsiveness to GITR signaling (Fig. 12C). The addition of the anti-GITR antibody substantially enhanced the proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ effector T cells from wild type mice (Fig. 12C, left panels). However, when anti-CD80/CD86 was added to these cultures, the presence of the anti-GITR antibody only marginally increased the proliferation of *GITR*^{+/+} CD4⁺CD25⁻ T cells (Fig. 12C, *GITR*^{+/+}, top left; *GITR*^{-/-}, top right) and *GITR*^{+/+} CD8⁺ T cells (Fig. 12C, *GITR*^{+/+}, bottom left; *GITR*^{-/-}, bottom right) over the range of anti-CD3 concentrations tested. Treatment with anti-GITR did not affect the responses of purified CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells from *GITR*^{-/-} mice (Fig. 12C, right panels). These data suggest that CD28-mediated signals, distinct from costimulation of IL-2 production, enhance GITR expression and facilitate GITR-mediated signaling.

EXAMPLE 13

GITRL binding to GITR provides a costimulatory signal to effector T cells

[0246] Forty-thousand effector HT-2 T helper cells (*GITR*⁺/TCR⁺) were cultured in the absence or presence of the following reagents: 1) anti-CD3 coated beads at

102
103

a 1:1 or 1:2 ratio, 2) ten-thousand YB/2 cells that were either not modified to express GITRL (YB2/0 parental) or modified to express GITRL (YB2/0 muGITRL), and 3) increasing concentrations of an isotype control antibody or four different anti-GITRL antibodies (5F1, MGTL-10, MGTL-15, or a polyclonal anti-GITRL antibody). Proliferation was measured by ^3H -thymidine incorporation for the last 5 hours of a 44-hour culture period. Fig. 13A demonstrates that GITRL enhances the proliferation of T cells stimulated with anti-CD3. Additionally, GITRL-mediated enhancement of T cell proliferation may be blocked with 5F1 antibody, but not the isotype control antibody (Fig. 13B) and commercially available MGTL-10, MGTL-15 and polyclonal anti-GITRL antibodies (Fig. 13C). These data provide further evidence that GITRL provides a costimulatory signal, and also, that 5F1 is a neutralizing antibody to GITRL.

EXAMPLE 14

Blocking GITR-GITRL binding with an anti-GITRL antibody prevents adoptive transfer of PLP induced experimental autoimmune encephalomyelitis
[0247] Nine-week-old female SJL mice were immunized with 150 μg PLP peptide (amino acids 139-151) [HSLGKWLGHDPDKF (SEQ ID NO:12)] in complete Freund's adjuvant. Ten days after immunization, splenocytes were harvested and restimulated *ex vivo* for 3 days with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLP (amino acids 139-151) in the absence (no treatment) or presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antibody (anti-GITRL antibody or control antibody). After restimulation, 5×10^6 splenocytes were adoptively transferred into 10-week-old naïve SJL mice, and the mice were monitored for 52 days for the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), as measured on a scale from 0 to 5. EAE developed in 40% and 80% of mice that received splenocytes restimulated in the absence of any antibody (no treatment) and mice that received splenocytes restimulated in the presence of control antibody (CK01), respectively (Fig. 14). Additionally, there was no significance difference in disease scale between animals that received splenocytes with no treatment and animals that received splenocytes treated with control antibody. Significantly, none of the mice that received splenocytes that were

108
109

restimulated in the presence of anti-GITRL antibody (5F1) developed EAE ($p = 0.0023$ vs. control antibody treatment) (Fig. 14). These data suggest that blockade of the GTR/GITRL pathway will limit the ability of CD25⁺ T cells to overcome suppression, thereby downmodulating their ability to effect autoimmune responses.

EXAMPLE 15

Experimental Procedures

Example 15.1: Antibodies and reagents

[0248] All antibodies used for flow cytometry or functional studies were from BD-Pharmingen, except: tri-color labeled aCD4 (clone CT-CD4) and aB220 (clone RA3-6B2) which were purchased from Caltag (Burlingame, CA), and MGTL-10, MGTL-15, and polyclonal anti-GITRL antibodies, which were purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Purified F(ab')₂ fragment of goat-anti-IgM μ -chain was purchased from Jackson Immunoresearch (West Grove, PA). Anti-IL-2 (clone S4B6) was used as ascites fluid. Human recombinant IL-2 was obtained from the National Cancer Institute (Frederick, MD). IL-4, IFN- γ , IL-12, and T cell enrichment columns were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Poly I:C and LPS were purchased from Sigma. CpGs were purchased from InvivoGen (San Diego, CA). Anti-GITRL (clone 5F1; also clone 10F12) and anti-GTR (clone DTA-1) and the PLP peptide were produced "in-house." Anti-B220, -CD11c, -CD11b -CD8, -CD4 and -PE magnetic beads were purchased from Miltenyi (Auburn, CA).

Example 15.2: Mice

[0249] BALB/c and C57BL/6 mice (6-8 week old females) were purchased from the NCI Frederick animal facility (Frederick, MD). CD28^{-/-} mice were provided by Dr. Alfred Singer (NIH/NCI). GTR^{+/-} embryos (Sv129 x B6) were provided by C. Ricarrdi (Perugia University Medical School, Italy) (Ronchetti et al., 2002). The rederived GTR^{+/-} mice were backcrossed once with C57BL/6 mice, and the resulting progeny were screened for the mutant allele by PCR. The identified

109
110

GITR^{+/+} progeny were then intercrossed to generate *GITR*^{-/-} mice. All mice were bred and housed at NIH/NIAID facilities under SPF (specific pathogen-free) conditions.

Example 15.3: cDNA cloning and expression

[0250] The amino acid sequence for human GITRL (GenBank Acc. No. NM_005092) was used to search the Celera database for the mGITRL. Genomic sequence ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 contained three high scoring pair (HSP) regions. Based on the assumption that these regions correspond to exons for mouse GITRL, primers were designed for PCR amplification. The forward primer (5'-ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG-3') (SEQ ID NO:4) and reverse primer (5'-GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG-3') (SEQ ID NO:5) amplified a cDNA clone from a mouse thymus library. The resulting fragment was subcloned and the DNA sequence was determined. A subsequent full-length clone was amplified by PCR from the previous construct using 5'-TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG-3' (forward) (SEQ ID NO:6) and 5'-TTTAAAGAATTCTCATTAAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT-3' (reverse) (SEQ ID NO:7) primers. The resulting PCR fragment was subcloned into the GFP-RV retroviral vector (Ouyang et al., 1998), and sequence determination of the final cDNA clone was performed. This vector was then transfected into the Phoenix cell line. Supernatants from the transfected Phoenix cells were used to transduce the YB2/0 cell line. GFP-expressing YB2/0 cells were then FACS sorted and maintained in culture. The predicted mGITRL amino acid sequence is identical to that of another group (Kim et al., 2003), except for the substitution of an alanine for a valine at amino acid position 48 in their sequence.

Example 15.4: Production and purification of monoclonal antibodies

[0251] Lewis rats were immunized once s.q. with 100x10⁶ YB2/0-GITRL cells in CFA. Two weeks later, these rats were immunized s.q. with 100x10⁶ YB2/0-GITRL cells in IFA. Two weeks later, rats were boosted with 50x10⁶ YB2/0-GITRL cells in PBS. Four days later, the spleen was harvested and cell fusion

was performed as previously described (Coligan et al., 2003). The supernatants from the resulting hybridomas were screened by flow cytometry using Phoenix-GITRL and Phoenix cells. Antibodies were purified from cell culture supernatants using protein G-loaded columns, and eluted antibodies were dialyzed against PBS.

Example 15.5: Cell purification

[0252] T cells were purified from peripheral lymph nodes of mice. CD25⁺ T cells were labeled with magnetic beads and purified on an autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) according to the manufacturer's protocol. Purity of the CD25⁺ cells was typically between 97 to 99 percent. Cells remaining in the negative fraction were subsequently labeled with either anti-CD4 or anti-CD8 microbeads and purified using the positive selection procedure on the autoMACS. Purity was routinely 90-95 percent. T cell-depleted spleen suspensions were prepared from erythrocyte-lysed suspensions by depleting Thy1.2⁺ cells using the autoMACS. B220⁺ cells were purified from splenocytes in a similar fashion using anti-B220 microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), and purity of the resulting preparations was routinely greater than 90%. Peritoneal cells were prepared by flushing the peritoneal cavity (PerC) with 10ml of cold HBSS. For splenic DCs, splenocyte suspensions were prepared in a manner similar to that described (Vremec et al., 2000). Splenic DCs were then purified from the suspensions using anti-CD11c microbeads (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). The resulting DC suspensions were routinely 85 to 90 percent pure. Rat CD4⁺CD25⁻ cells were generated by depleting rat splenocytes of CD25⁺ cells using PE-anti-rat CD25 (OX-39) antibodies followed by anti-PE microbeads. After depletion, CD4⁺ cells were then selected from the depleted fraction using anti-rat-CD4 microbeads.

Example 15.6: *In vitro* proliferation assays

[0253] Suppression assays were performed as described (Thornton and Shevach, 1998). Briefly, (5x10⁴) cells were cocultured in FBS-supplemented RPMI 1640 (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) with irradiated (3000R), T cell-depleted splenocytes (5x10⁴) in the presence of 0.5µg/ml anti-CD3 mAb (2C11) in 96-well

flat-bottom plates. To some cultures, antibodies specific for GITR or a Rat Ig isotype were added at a final concentration of 2 µg/ml. Titrated numbers of CD4⁺CD25⁺ cells were added at final suppressor to responder ratios of 0:1, 1:2, 1:4, or 1:8. Cultures were pulsed with 1 µCi of ³H-thymidine for the final 5-8 hours of a 72-hour culture, and were performed in triplicate unless otherwise indicated. Cocultures of rat and mouse T cell subsets were setup in a similar manner except irradiated (3000R) CD4-depleted rat splenocytes were used as APCs, and rat and mouse T cells were stimulated using a cocktail of anti-rat-CD3 (0.25 µg/ml) and anti-mouse-CD3 (0.25 µg/ml) mAbs.

Example 15.7: *In vitro* culture of lymph node cells and CFSE labeling

[0254] CD25⁺-depleted lymph node cell suspensions were prepared on the autoMACS as described above. Cells were labeled with CFSE at a concentration of 2 µM for 8 minutes in a 37°C water bath. Cells were then washed in complete RPMI 1640. Cells (5x10⁴/well) were then cultured in 96-well plates in the presence or absence of rhIL-2 (50U/ml). Duplicate wells were either pulsed with 1 µCi of ³H-thymidine for the final 5-8 hours of a 72-hour culture or used for analysis of CFSE dilution.

EXAMPLE 16

Discussion

[0255] The role of GITR in the function of CD4⁺CD25⁺ T cells was inferred from the demonstration that both polyclonal and monoclonal antibodies to GITR reversed the suppressive effects of CD4⁺CD25⁺ T cells when added to cocultures of CD25⁺ and CD25⁻ T cells (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002). The CD4⁺CD25⁺ T cells appeared to be the likely target for the anti-GITR reagents because freshly explanted CD25⁺ T cells expressed GITR at higher levels than resting CD25⁻ T cells and because anti-GITR antibody together with IL-2 triggered the proliferation of CD25⁺, but not CD25⁻, T cells in the absence of a TCR signal. Furthermore, when Shimizu et al added a rat anti-mGITR mAb, which was nonreactive with rat cells, to cocultures of mouse CD25⁺ suppressors

and rat responder T cells, a reversal of suppression was observed. These studies led to the hypothesis that engagement of GITR by agonistic anti-GITR antibodies and, presumably, by its physiological ligand, generated a signal that both inhibited the suppressor activity of CD4⁺CD25⁺ T cells and reversed the nonresponsiveness of the CD25⁺ T cells to exogenous IL-2.

[0256] Experiments were designed to attempt to extend and confirm these studies by cloning the mouse GITRL, analyzing its tissue distribution, and definitively determining the target for the agonistic anti-GITR antibodies by using mixtures of CD25⁺ and CD25⁻ T cells from wild type and *GITR*^{-/-} mice. Collectively, the studies demonstrate that the anti-GITR antibodies and GITRL abrogate the suppressive effects of CD4⁺CD25⁺ T cells by providing CD25⁻ T cells a unique signal that raises their threshold for suppression by CD4⁺CD25⁺ T cells. The studies indicate that GITRL is selectively expressed on the cell surface of APC, with the highest level of expression on B-1 B lymphocytes; intermediate levels on conventional B-2 B lymphocytes, macrophages, and B220⁺ DCs; and lower levels on B220⁻ DC subsets. GITRL is unique among members of the TNF superfamily in that it is expressed on resting APC, and its expression is downregulated by triggering the B cell receptor, CD40, or different Toll-like receptors. Other members of the TNF superfamily (4-1BB-L, OX40-L, LIGHT, CD70, CD30-L) are not detectable on resting APC, and their expression is upregulated by activation of the APC via Toll-like receptor stimulation (Croft, 2003). The present studies do not address whether the downregulation of GITRL expression from the cell surface is accompanied by secretion of soluble GITRL, but Tone et al. (2003) have reported that LPS stimulation of DC, macrophages and B cells results in downregulation of GITRL mRNA. The expression of GITRL on resting APC strongly suggests that it functions early in the process of T cell activation. Other cell types, including endothelial cells (Gurney et al., 1999; Kwon et al., 1999), activated T cells, and certain subsets of DN thymocytes were also shown to express GITRL, and the function of this molecule on these latter cell types remains to be determined.

[0257] The ability of both the anti-GITR antibodies and the GITRL expressing cells to enhance the activation of CD25⁻ T cells alone, as well as the ability of anti-GITRL to partially inhibit the activation of CD25⁻ T cells in the absence of

CD25⁺ T cells, prompted a careful reexamination of the cellular target(s) of these reagents. The addition of anti-GITR to cocultures of CD25⁺ and CD25⁻ T cells from wild type and *GITR*^{-/-} mice demonstrated that the target for the antibody-mediated reversal of suppression was the CD25⁻ T cell. This was further supported by experiments using rat CD25⁻ responder and mouse CD25⁺ suppressor T cells in cocultures, which conclusively demonstrated GITR ligation on the CD25⁺ T cell subset does not abrogate their suppressive function. In fact, an examination of CFSE dilution demonstrated that GITR ligation promoted the expansion of CD25⁺ T cells in cocultures, which ultimately enhanced the suppression of the rat CD25⁻ responders. Therefore, it is possible that the enhancement in proliferation in anti-GITR-treated rat/mouse cocultures reported by Shimizu et al (2002), which was presumed to be due to rat T cells, actually reflected proliferation of the mouse CD25⁺ suppressor cells. This would not have been apparent by measuring ³H-thymidine incorporation alone.

[0258] One previous report suggested that GITR-deficient T cells are hyperreactive to TCR stimulation (Ronchetti et al., 2002). However the extrapolation of those observations to the present observations are difficult as that report did not analyze the responses of purified CD4⁺, CD8⁺ T lymphocytes, nor did it evaluate the role of CD4⁺CD25⁺ T cells. In the present studies, the responses of highly purified CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ T cells from *GITR*^{-/-} mice were comparable to those of controls. However, in the presence of physiological numbers of regulatory T cells, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *GITR*^{-/-} animals were completely unresponsive to CD3 cross-linking. This result clearly demonstrates that in the absence of GITR/GITRL interactions suppression is dominant. Indeed, the suppression of activation of CD4⁺CD25⁻ T cells from *GITR*^{-/-} mice was so strong that it could not be overcome by the addition of a high concentration of exogenous IL-2, which normally abrogates the suppressive effects of much higher numbers of CD25⁺ T cells on the responses of wild type CD4⁺CD25⁻ T cells (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998). The suppressive effects of the CD4⁺CD25⁺ were mediated by inhibition of both IL-2 production and expression of CD25 by the CD4⁺CD25⁻ *GITR*^{-/-} responder population, which resembles what has been previously described for the effects

115

of CD4⁺CD25⁺ T cells on normal CD8⁺ T cell responses (Piccirillo and Shevach, 2001).

[0259] The costimulatory signals delivered by GITR and CD28 appeared to be distinct, but interrelated. In the absence of regulatory T cells, the responses of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *GITR*^{-/-} mice were identical to those of cells from wild type mice. In contrast, under the culture conditions used in this study, CD4⁺ and CD8⁺ T cells from *CD28*^{-/-} mice were nonresponsive. Conversely, when IL-2 was added to cultures containing regulatory T cells, the responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the *GITR*^{-/-} mice were not restored, while the responses of CD8⁺ cells from the *CD28*^{-/-} mice were partially restored. On the other hand, a potential cooperative relationship and shared signaling hierarchy between CD28 and GITR was supported by the demonstration that (1) CD4⁺CD25⁻ and CD8 T cells failed to upregulate GITR in the absence of CD28 cross-linking and (2) anti-CD80/CD86 antibodies markedly inhibited both the upregulation of GITR expression and responsiveness to anti-GITR antibodies. Thus, the results suggest that an additional important function of the CD28-CD80/CD86 signaling pathway during T cell activation is to license T cell resistance to CD25⁺-mediated suppression by enhancing the expression and function of GITR.

[0260] Similar to the results suggested by other published studies (Shimizu et al., 2002; Tone et al., 2003), these studies indicate that ligation of GITR on CD25⁻ T cells, in the absence of regulatory T cells, did provide some degree of costimulation. However, GITR ligation is not required for costimulating CD25⁻ T cells in the same manner as CD28, as CD4⁺CD25⁻ and CD8 T cells from *GITR*^{-/-} mice respond similar to wild type T cells. We favor the view that engagement of GITR on both CD4⁺CD25⁻ and CD8⁺ effector T cells by GITRL early during the course of an immune response serves primarily to render the effector population resistant, e.g., less susceptible, to the suppressive effects of the CD4⁺CD25⁺ T cells. During the course of the response, inflammatory signals ultimately result in the downregulation of GITRL expression, thereby increasing the susceptibility of the effector cells to CD25⁺-mediated suppression. Although only limited data is available as to when CD25⁺-mediated suppression of immune responses to infectious agents occurs *in vivo*, some studies have suggested that it

operates at the contraction, rather than the initiation, phase of the response to prevent tissue damage secondary to exuberant inflammation (Suvas et al., 2003). It should be pointed out that engagement of GITR on CD25⁺ T cells in the presence of IL-2 induces their expansion (McHugh et al., 2002). It remains possible that *in vivo* engagement of GITR on CD25⁺ T cells by GITRL on resting APC results in the nonspecific expansion of regulatory T cells in the presence of IL-2 secreted by effector T cells early in the course of the immune response. This nonspecific expansion may be critical to the subsequent generation of a pool of antigen-specific suppressor cells that function to inhibit effector cell activity later in the response.

[0261] We have previously proposed that manipulation of GITR/GITRL interactions may prove to be an effective way of manipulating regulatory T cell function *in vivo* (McHugh and Shevach, 2002). Although this concept was based on data suggesting that the CD4⁺CD25⁺ T cell was the target of the anti-GITR antibody, it is still the case that the GITR/GITRL interaction represents an important therapeutic target. Thus, treatment with an agonistic anti-GITR antibody or an agonistic GITRL-Fc should render effector cells resistant, e.g., less susceptible, to the suppressive effects of CD4⁺CD25⁺ T cells and should prove to be effective for treating cancers and infectious diseases, for enhancement of immune responses to cancers (used alone or in combination with other tumor therapies, such as tumor vaccines), and for enhancement of immune responses to infectious pathogens, including viruses, bacteria, etc. (used alone or in combination with other therapies for infectious pathogens, such as a vaccine adjuvant to weak vaccines for infectious agents). Similarly, inhibition of GITR/GITRL interactions with a GITR agonist, e.g., through the use of a neutralizing anti-GITRL antibody or GITR-Fc, should lower the threshold of effector T cells to suppression and thus be useful for the prevention and/or treatment of autoimmune disorders, inflammatory diseases, transplant (or graft) rejection, and graft-versus-host disease.

References

[0262] The following references are full citations for several author/year citations in the specification:

MB
117

Aseffa, A., Gummy, A., Launois, P., MacDonald, H. R., Louis, J. A., and Tacchini-Cotter, F. (2002). The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 169, 3232-3241.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W., eds. (2003). *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc.).

Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620.

Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldmann, T. A., and Greene, W. C. (1985). Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4230-4234.

Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33-41.

Gilfillan, M. C., Noel, P. J., Podack, E. R., Reiner, S. L., and Thompson, C. B. (1998). Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 160, 2180-2187.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.

Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, R. M., Pitti, R. M., Mark, D. T., Baldwin, D. T., Gray, A. M., Dowd, A. D., Brush, A. D., Heldens, A. D., *et al.* (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol* 9, 215-218.

Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., and Yasutomo, K. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29-30.

- Kim, J. D., Choi, B. K., Bae, J. S., Lee, U. H., Han, I. S., Lee, H. W., Youn, B. S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. (2003). Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* 4, 564-569.
- Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196, 1585-1592.
- Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang, I. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., and Kwon, B. S. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056-6061.
- Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A. M., and Lundin, B. S. (2003). *Helicobacter pylori*-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun* 71, 1755-1762.
- Malek, T. R., and Ashwell, J. D. (1985). Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. *J Exp Med* 161, 1575-1580.
- Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J., and Powrie, F. (2003). CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111-119.
- McHugh, R. S., and Shevach, E. M. (2002). The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110, 693-702.
- McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.
- Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755.
- Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.

Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.

Ronchetti, S., Nocentini, G., Riccardi, C., and Pandolfi, P. P. (2002). Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100, 350-352.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198, 889-901.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980.

Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296.

Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059-15064.

Uraushihara, K., Kanai, T., Ko, K., Totsuka, T., Makita, S., Iiyama, R., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2003). Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 708-716.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.

Yu, K. Y., Kim, H. S., Song, S. Y., Min, S. S., Jeong, J. J., and Youn, B. S. (2003). Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 433-438.

121
130

WHAT IS CLAIMED:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.
2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein the nucleic acid molecule is operably linked to at least one expression control sequence.
3. A host cell transformed or transfected with the nucleic acid molecule of claim 2.
4. An isolated nucleic acid molecule that specifically hybridizes under highly stringent conditions to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or the complement thereto.
5. An isolated nucleic acid molecule that encodes a protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or an active fragment of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.
6. The isolated nucleic acid molecule of claim 5, wherein the nucleic acid molecule is operably linked to at least one expression control sequence.
7. A host cell transformed or transfected with the isolated nucleic acid molecule of claim 6.
8. A nonhuman transgenic animal in which the somatic and germ cells contain DNA comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3.
9. An isolated protein comprising the amino acid sequence encoded for by the isolated nucleic acid of claim 4.
10. An isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or an active fragment thereof.

12/122

11. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein expression of the nucleic acid molecule in a cell results in decreased production of GITRL.

12. The isolated nucleic acid molecule of claim 11, wherein the nucleic acid molecule is operably linked to at least one expression control sequence.

13. An antisense oligonucleotide complementary to a mRNA corresponding to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein the oligonucleotide inhibits expression of GITRL.

14. A siRNA molecule corresponding to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3, or a fragment thereof, wherein the siRNA molecule inhibits expression of GITRL.

15. An isolated antibody capable of specifically binding to the protein of claim 10.

16. The antibody of claim 15, wherein the antibody neutralizes GITRL activity.

17. The antibody of claim 16, wherein the antibody is 5F1, having ATCC number PTA-5336, or 10F12, having ATCC number PTA-5337.

18. A method of screening for test compounds capable of inhibiting the interaction of GITRL with GTR comprising the steps of:

contacting a sample containing GITRL and GTR with the compound; and
determining whether the interaction of GITRL with GTR in the sample is decreased relative to the interaction of GITRL with GTR in a sample not contacted with the compound,

whereby a decrease in the interaction of GITRL with GTR in the sample contacted with the compound identifies the compound as one that inhibits the interaction of GITRL with GTR.

19. A method of screening for test compounds capable of enhancing or mimicking the interaction of GITRL with GTR comprising the steps of:
- contacting a sample containing GITRL and GTR with the compound; and
 - determining whether the interaction of GITRL with GTR in the sample is increased relative to the interaction of GITRL with GTR in a sample not contacted with the compound,
- whereby an increase in the interaction of GITRL with GTR in the sample contacted with the compound identifies the compound as one that enhances or mimics the interaction of GITRL with GTR.
20. A method for diagnosing an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection in a subject comprising the steps of:
- detecting a test amount of a GITRL gene product in a sample from the subject; and
 - comparing the test amount with a normal amount of the GITRL gene product in a control sample,
- whereby a test amount significantly above the normal amount provides a positive indication in the diagnosis of an autoimmune disorder, an inflammatory disease, or transplant rejection.
21. A method for diagnosing cancer or an infectious disease in a subject comprising the steps of:
- detecting a test amount of a GITRL gene product in a sample from the subject; and
 - comparing the test amount with a normal amount of the GITRL gene product in a control sample,
- whereby a test amount significantly below the normal amount provides a positive indication in the diagnosis of cancer or an infectious disease.
22. A method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, an autoimmune disorder, inflammatory disease, or transplant rejection comprising administering to the subject a GTR antagonist.

23
124

23. The method of claim 22, wherein the method comprises administering the GITR antagonist such that the susceptibility of the effector T cells in the subject to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is maintained.

24. The method of claim 22, wherein the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule.

25. The method of claim 22, wherein the autoimmune disorder or inflammatory disease is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, encephalomyelitis, osteoarthritis, multiple sclerosis, autoimmune gastritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis and other inflammatory dermatoses, type I diabetes, asthma, allergy, and inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis.

26. The method of claim 22, wherein the autoimmune disorder is multiple sclerosis.

27. A method of treating a subject at risk for, or diagnosed with, cancer or an infectious disease comprising administering to the subject a GITR agonist.

28. The method of claim 27, wherein the method comprises administering the GITR agonist such that the GITR agonist provides a costimulatory signal to effector T cells in the subject and renders them less susceptible to suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the subject.

29. The method of claim 27, wherein the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, and an agonistic GITR antibody.

30. A method of inducing proliferation of a cell population containing effector T cells comprising administering a GITR agonist to the cell population.
31. The method of claim 30, wherein the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, and an agonistic GITR antibody.
32. The method of claim 30, wherein the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.
33. A method of inhibiting proliferation of a cell population containing effector T cells comprising administering a GITR antagonist to the cell population.
34. The method of claim 33, wherein the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule.
35. The method of claim 33, wherein the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.
36. A method of blocking suppression of a cell population including effector T cells in the presence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells comprising administering a GITR agonist to the cell population.
37. The method of claim 36, wherein the method comprises administering the GITR agonist such that the GITR agonist provides a costimulatory signal to the effector T cells and renders them less susceptible to suppression by the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.
38. The method of claim 36, wherein the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein

containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, and an agonistic GITR antibody.

39. The method of claim 36, wherein the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

40. A method of suppressing of a cell population including effector T cells in the presence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells comprising administering a GITR antagonist to the cell population.

41. The method of claim 40, wherein the method comprises administering the GITR antagonist such that the susceptibility of the effector T cells to suppression by the CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is maintained.

42. The method of claim 40, wherein the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule.

43. The method of claim 40, wherein the effector T cells are CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells.

44. A method of treating cancer or an infectious disease in a subject, the method comprising the steps of obtaining a population of effector T cells, treating the population with a GITR agonist, and administering the treated population to the subject afflicted with cancer or an infectious disease.

45. The method of claim 44, wherein the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody.

46. The method of claim 44, wherein the subject is afflicted with cancer, and wherein the treated population is used as a tumor vaccine.
47. A pharmaceutical composition comprising a GITR agonist and a pharmaceutically acceptable carrier.
48. The pharmaceutical composition of claim 47, wherein the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody.
49. A pharmaceutical composition comprising a GITR antagonist and a pharmaceutically acceptable carrier.
50. The pharmaceutical composition of claim 49, wherein the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule.
51. A vaccine adjuvant comprising a GITR agonist and an antigen selected from the group consisting of a viral antigen, a bacterial antigen, a fungal antigen, a parasitic antigen, a cancer antigen, a tumor-associated antigen, and fragments thereof.
52. The vaccine adjuvant of claim 51, wherein the GITR agonist is selected from the group consisting of GITRL, or an active fragment of GITRL, a fusion protein containing GITRL, a fusion protein containing an active fragment of GITRL, an agonistic small molecule, and an agonistic anti-GITR antibody.
53. A vaccine adjuvant comprising a GITR antagonist and an antigen selected from the group consisting of an autoantigen, amyloid peptide protein, an alloantigen, a transplant antigen, an allergen, and fragments thereof.

123
128

54. The vaccine adjuvant of claim 53, wherein the GITR antagonist is selected from the group consisting of a neutralizing anti-GITRL antibody, a neutralizing anti-GITR antibody, a fusion protein containing GITR, a fusion protein containing an active fragment of GITR, an antagonistic small molecule, an antisense GITRL nucleic acid molecule, and a siRNA GITRL nucleic acid molecule.

ABSTRACT

[0263] The present invention provides novel isolated and purified polynucleotides and polypeptides related to a novel ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR). The invention also provides antibodies to the GITR ligand (GITRL). The present invention also is directed to novel methods for diagnosing, prognosing, monitoring the progress of, and treating disorders arising from dysregulation of the immune system (e.g., autoimmune disorders, inflammatory diseases, and transplant rejection, and cancers and infectious diseases) using GITRL and/or modulators of GITRL. The present invention is further directed to novel therapeutics and therapeutic targets and to methods of screening and assessing test compounds for the intervention (treatment) and prevention of said disorders arising from dysregulation of the immune system, as related to GITRL and GITR.

m 1 MEEMPLRESSPQRAERCK.KSWLLCIVALLMLLCSLGLTYTSL 44
 :| ||| | | |:| | ||| : :|| ||| ||: |
h 1 MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKIWLFCFSIVMLL.FLCFSWLIFIFL 49
 .~
m 45 K.PTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGKLKILQSGTYLIYG 93
 . || | || | || | | | .| ||| |||.|||.| |||||
h 50 QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQWASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYG 99

m 94 QVIFVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNVQLQTLMNDFQILPIGGVYELHAGDN 143
 || | . | | || | |:| | |:| | | .| :|| |||| ||
h 100 QVAP.NANY.NDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGD 147

m 144 IYLFNSKDHIQKNNTYWGIIIMPDLPFIS 173
 | | |||. : ||||| |||: . |||
h 148 IDLI FNSEHQVLKNNTYWGII LLANPQFIS 177

FIGURE 1

12/13

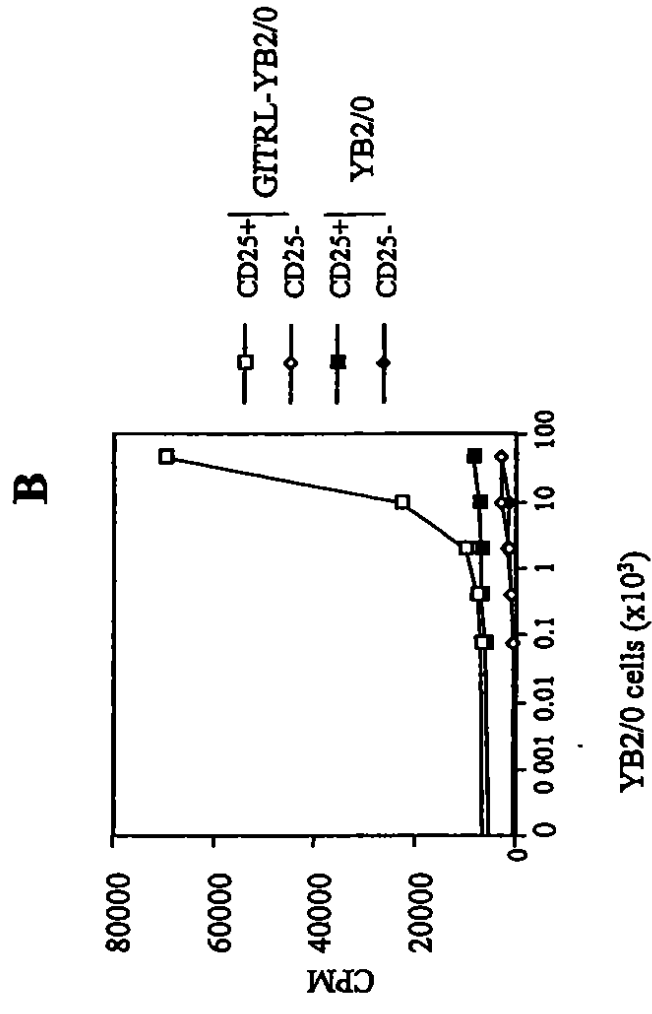
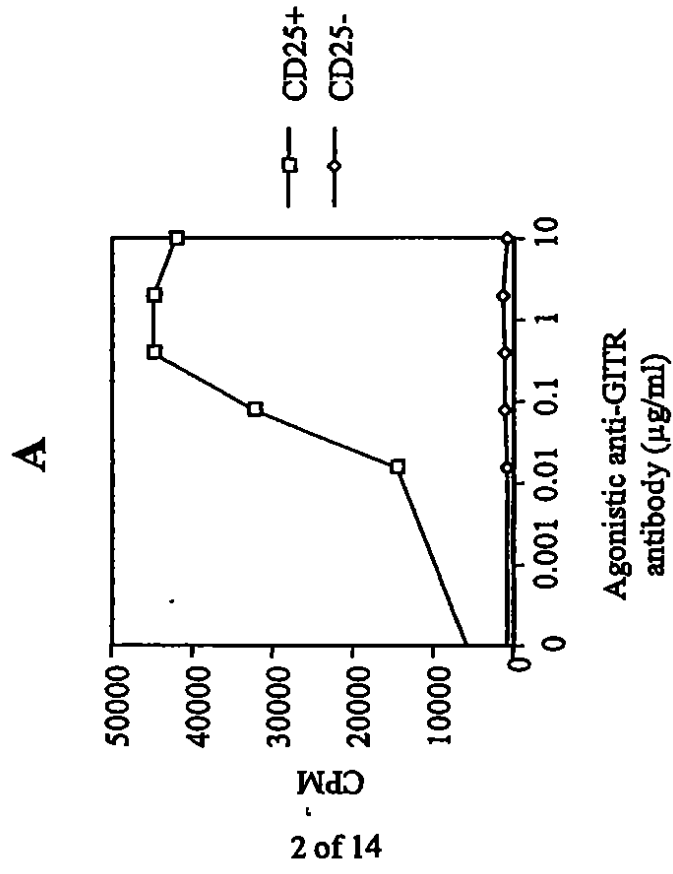


FIGURE 2

12/13

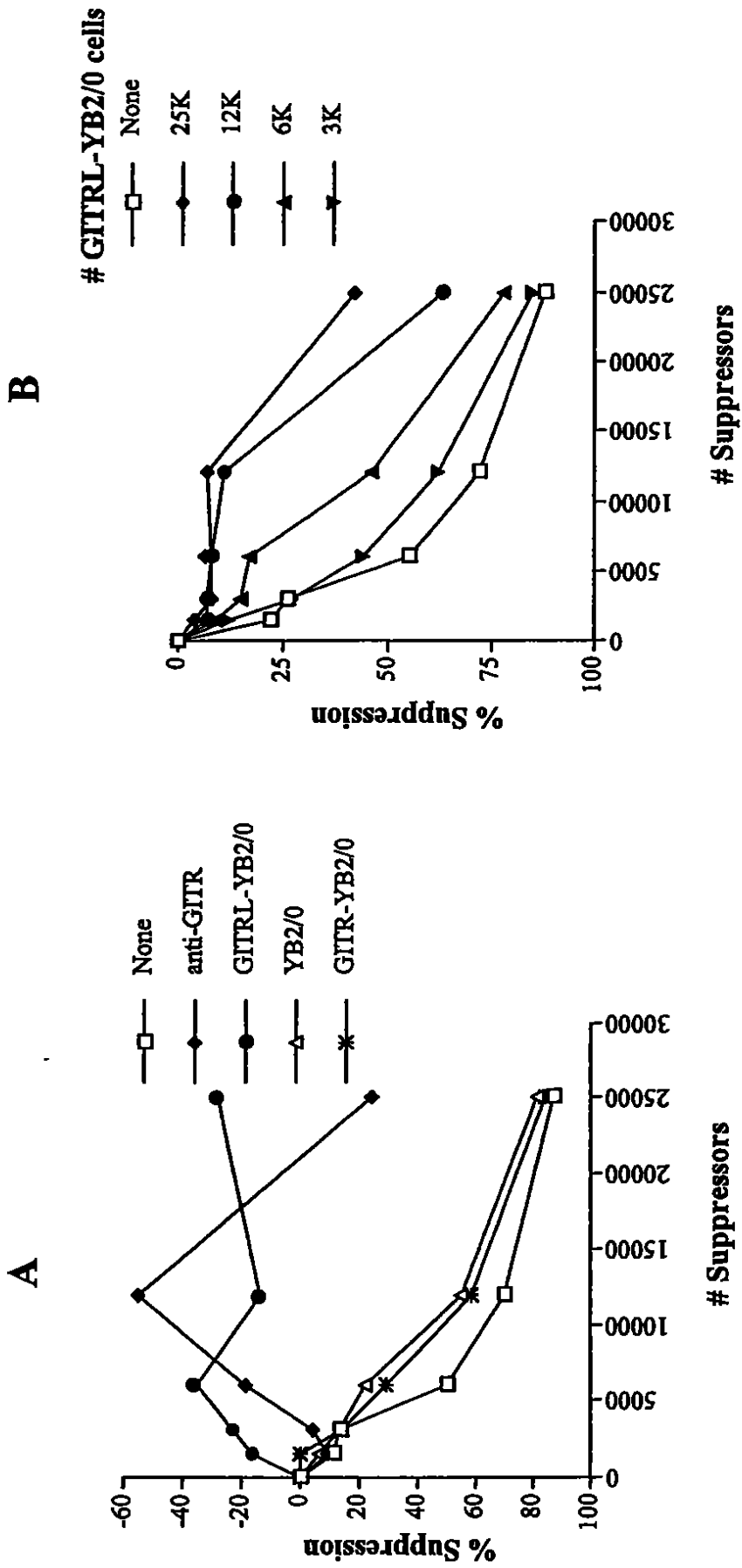


FIGURE 3

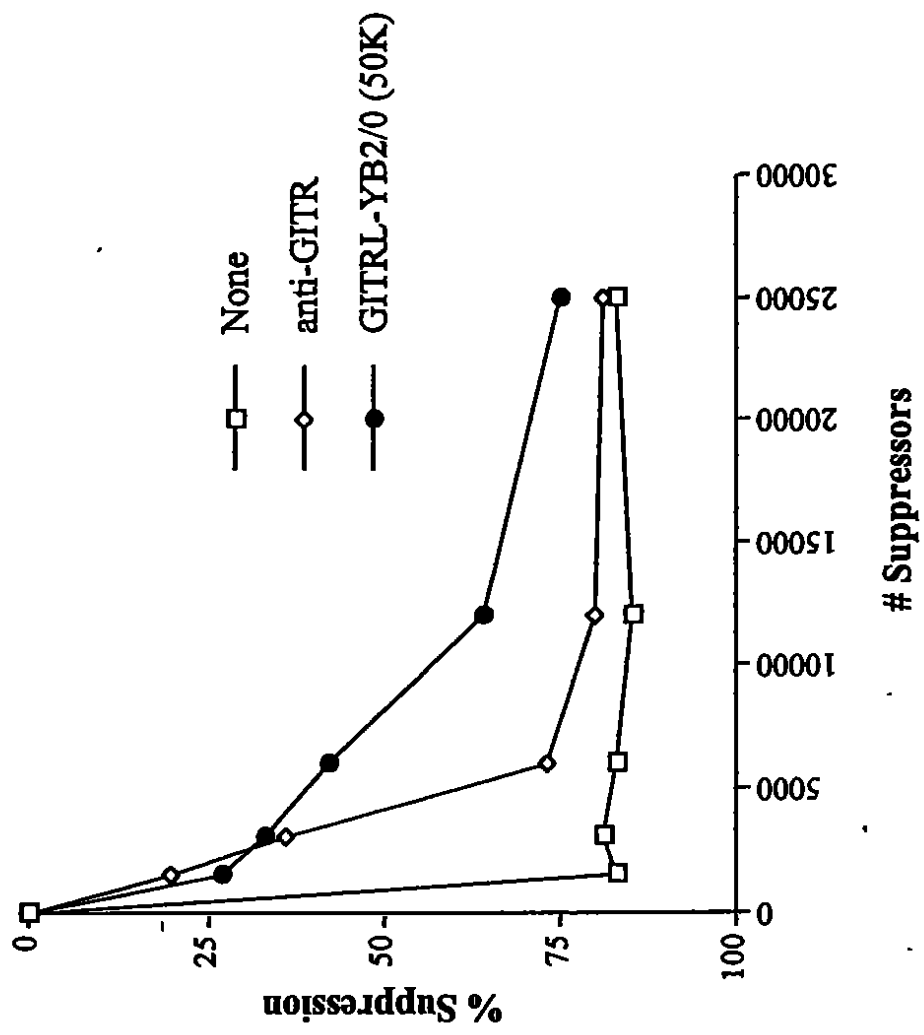


FIGURE 4

134
135

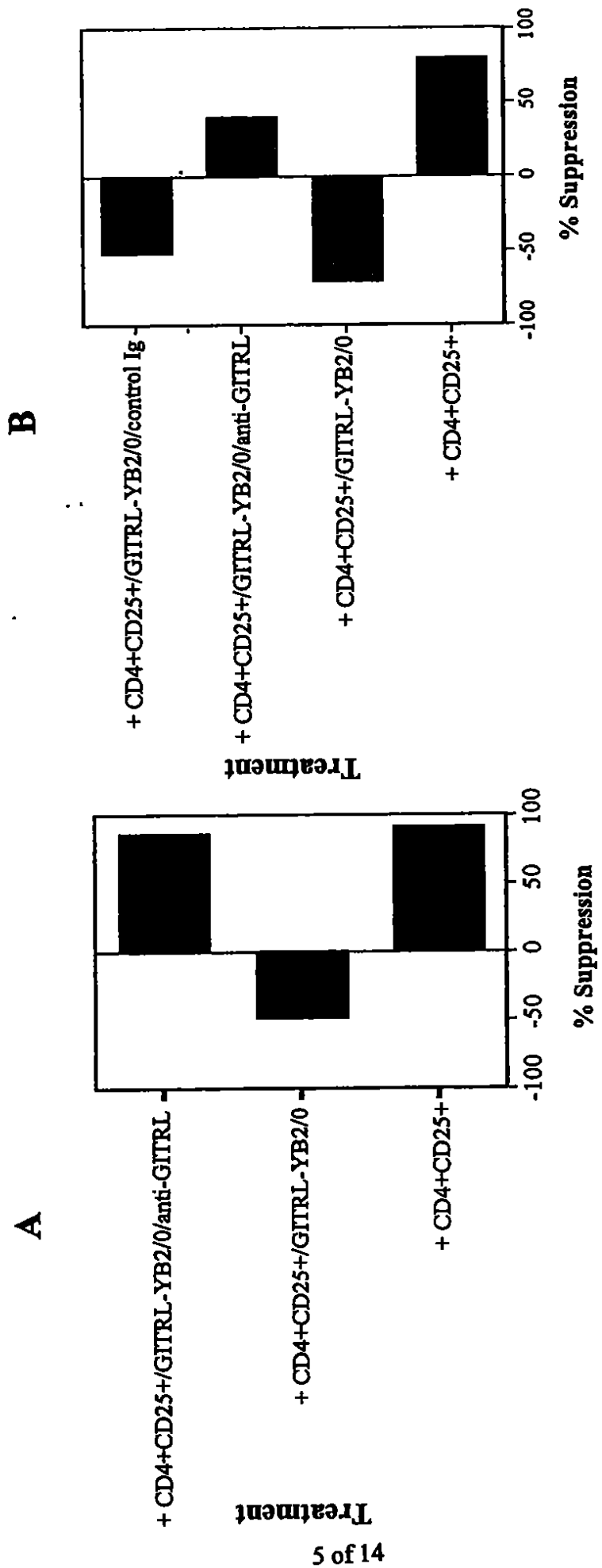


FIGURE 5

133

12.1
135

234

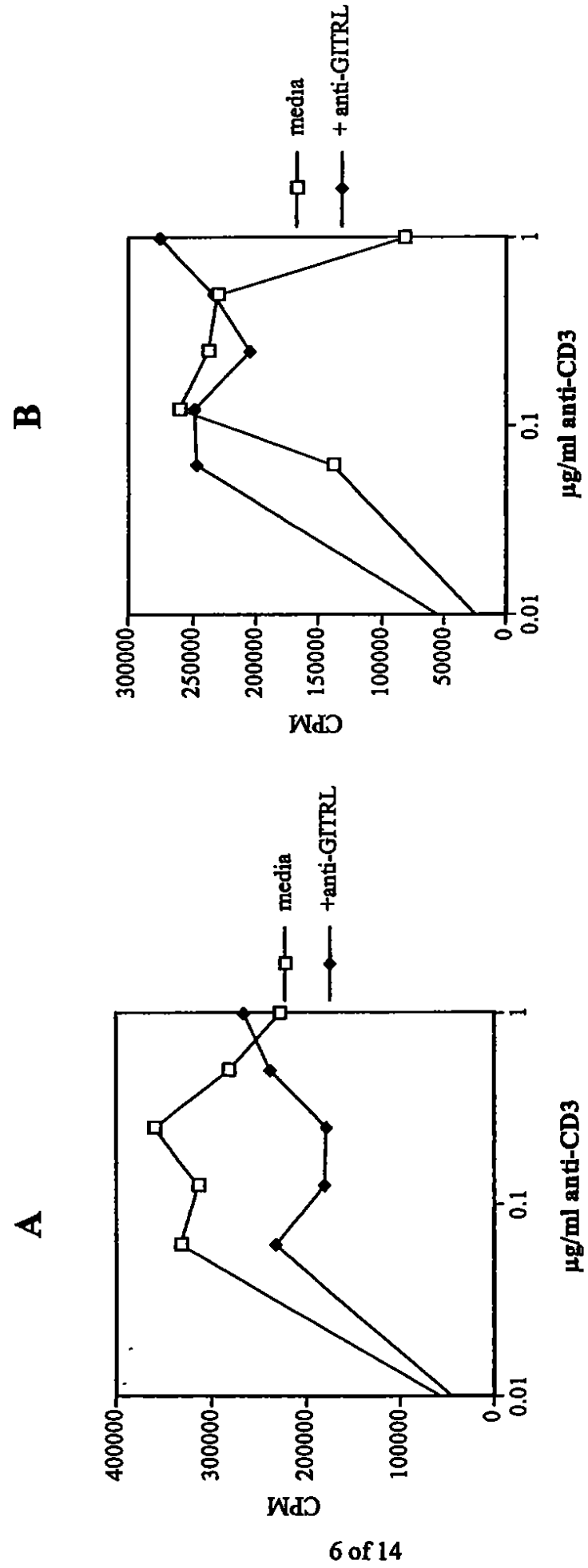


FIGURE 6

135
136

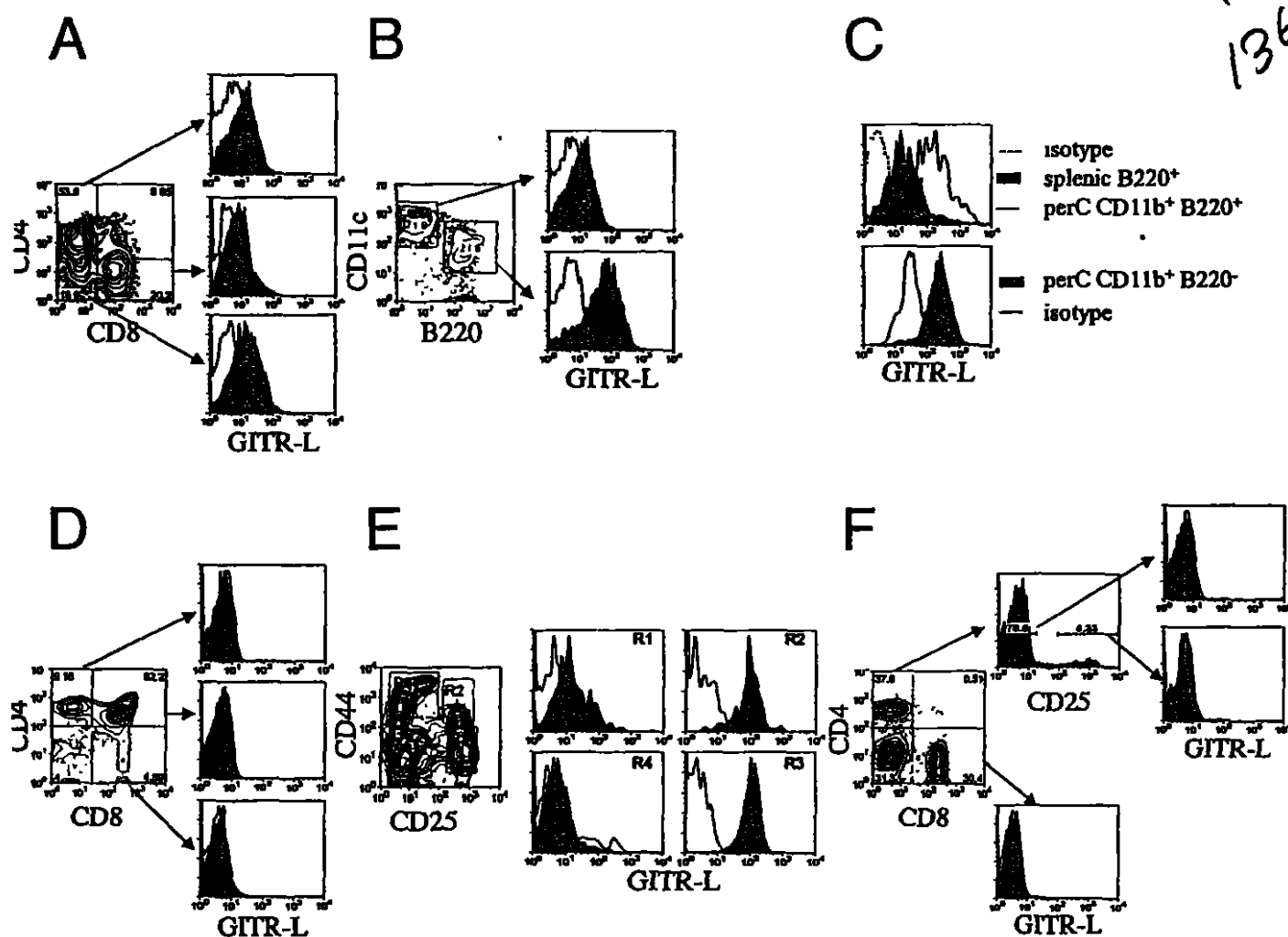
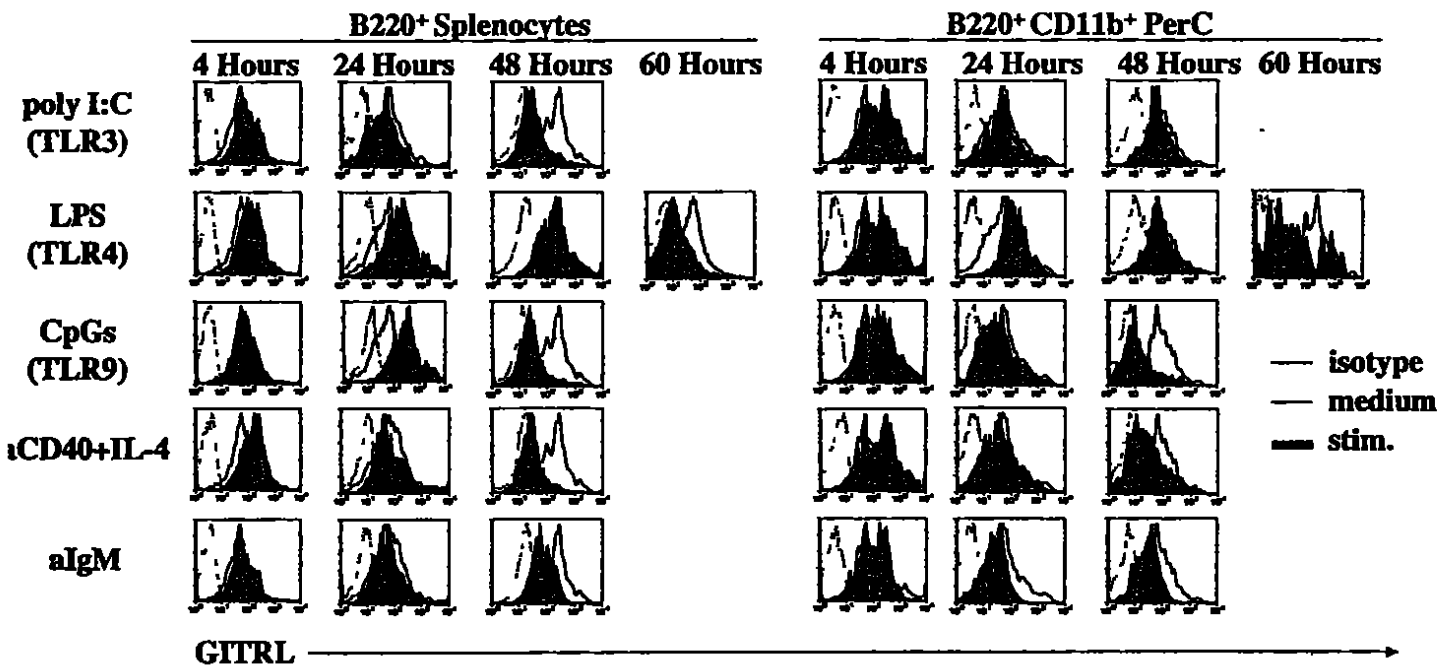


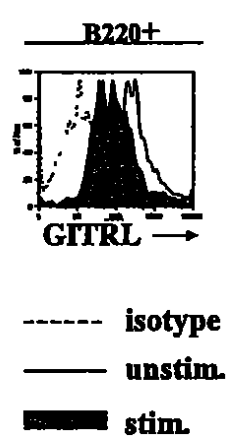
Figure 7

136
137

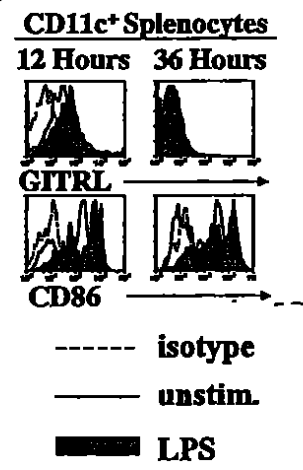
A



B



C



D

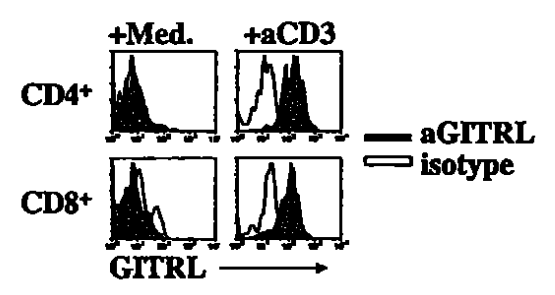


Figure 8

137
138

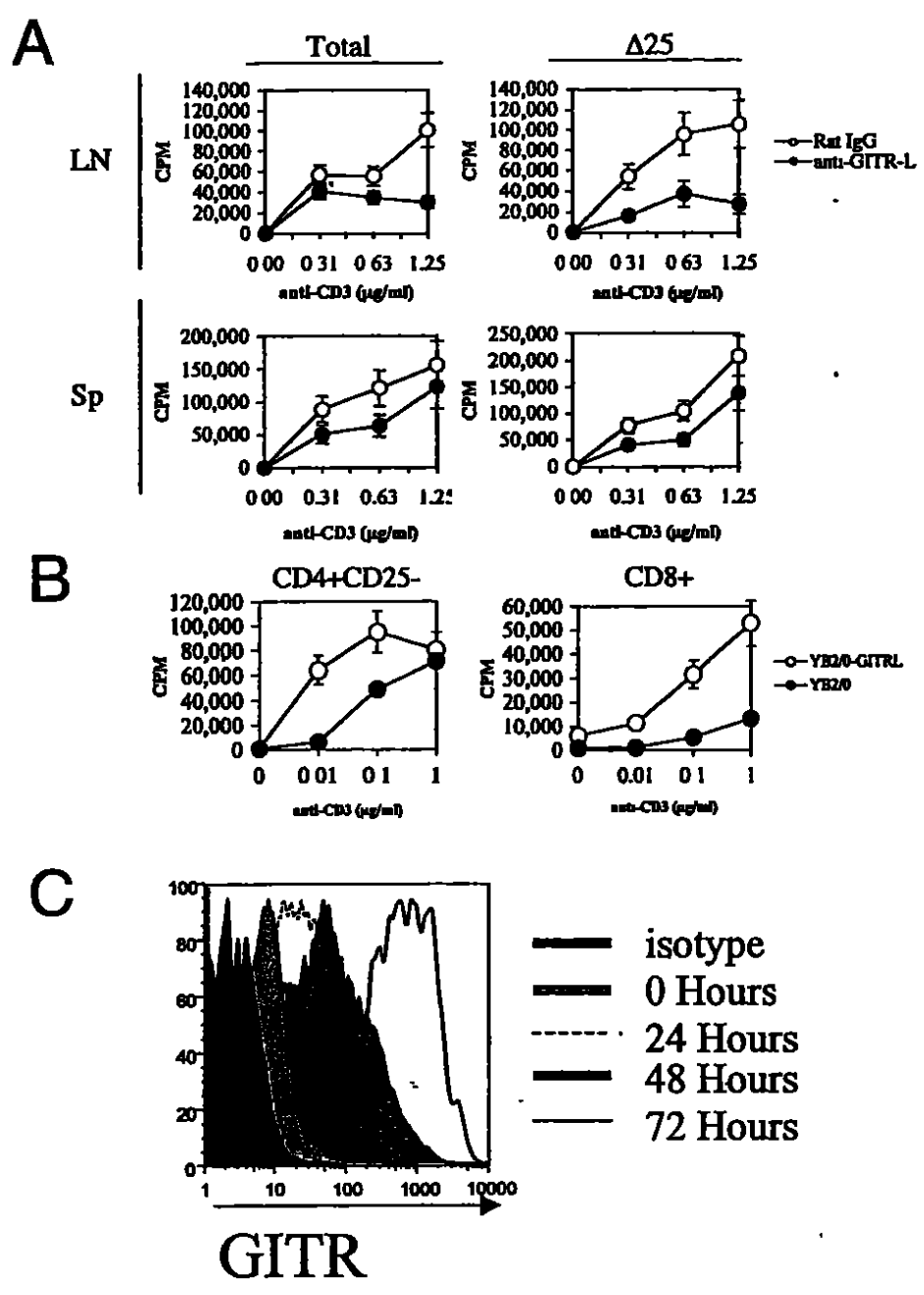


Figure 9

138
139

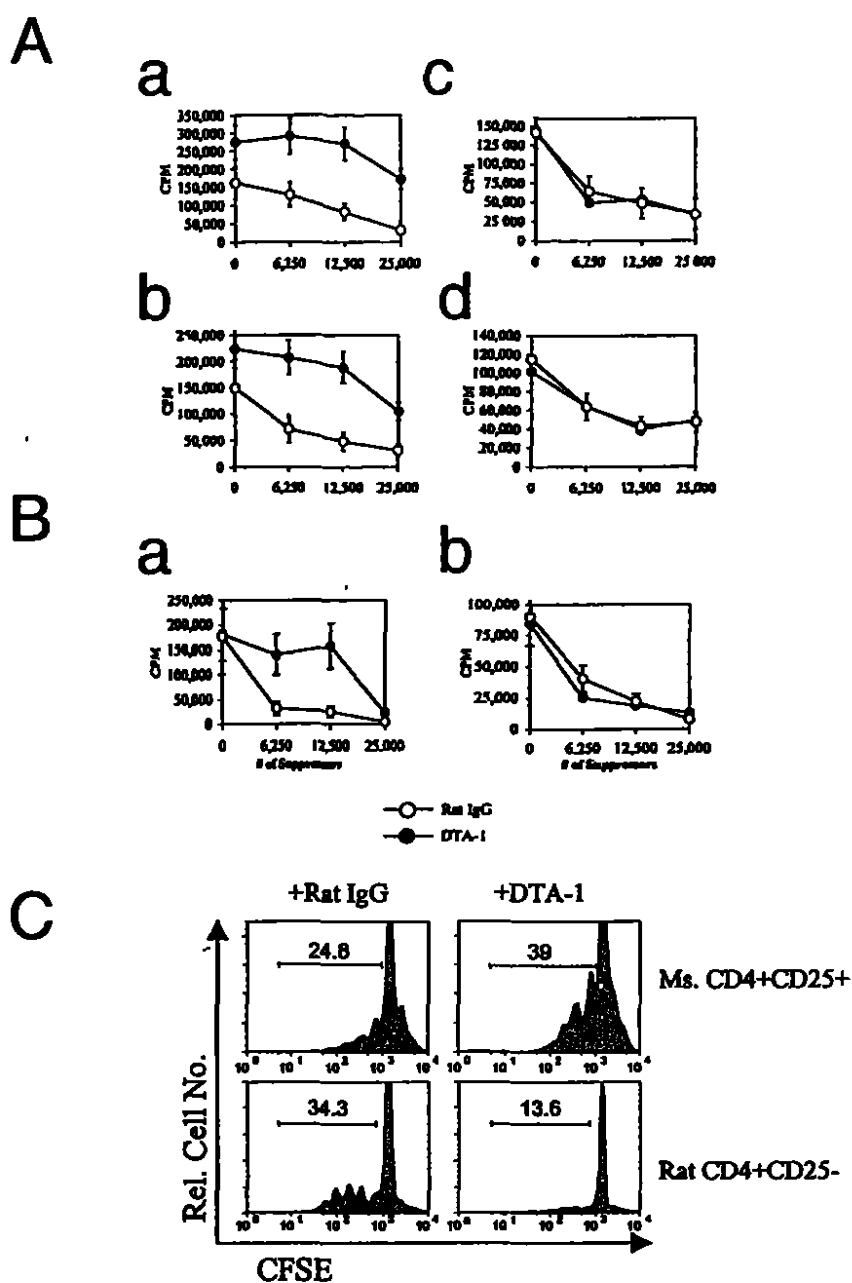


Figure 10

139
149

A

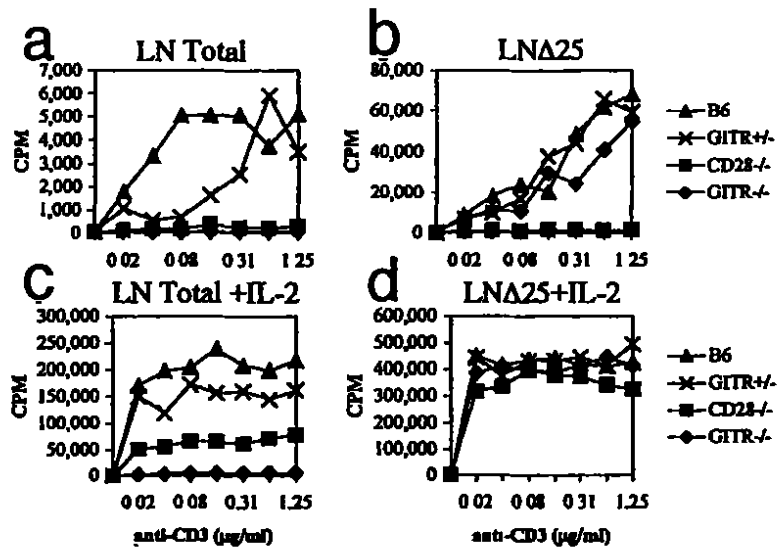
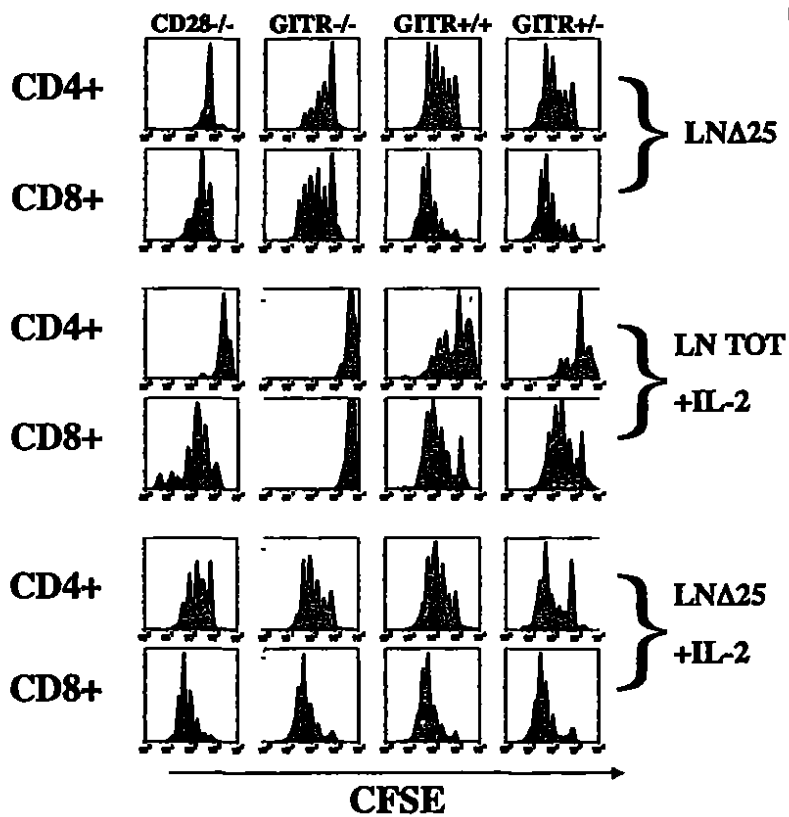
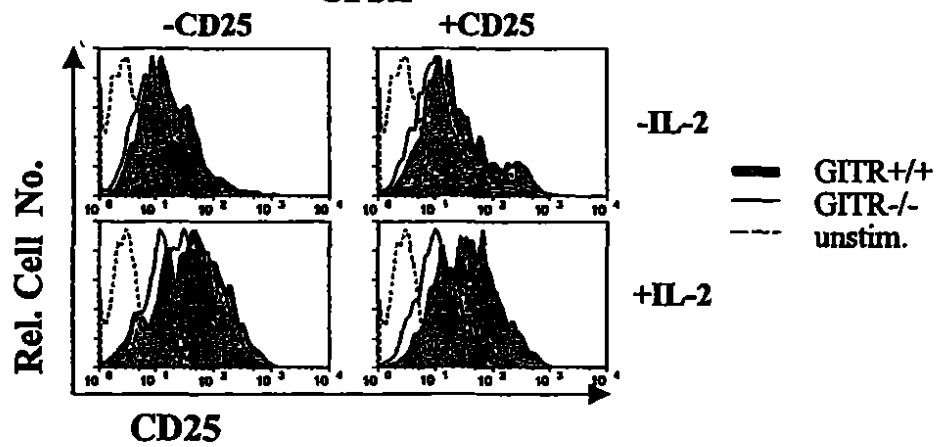


Figure 11

B

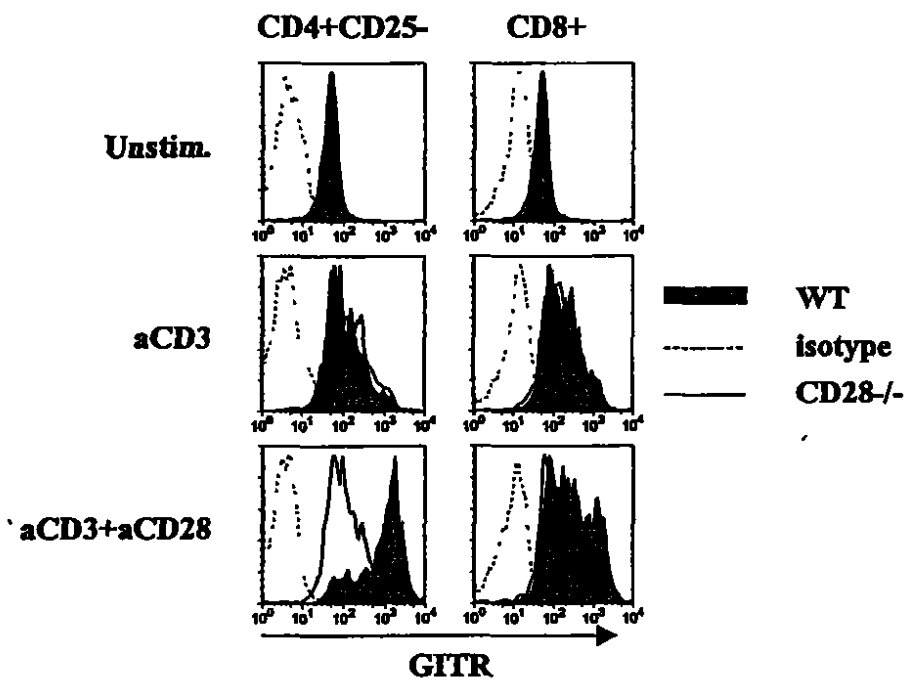


C

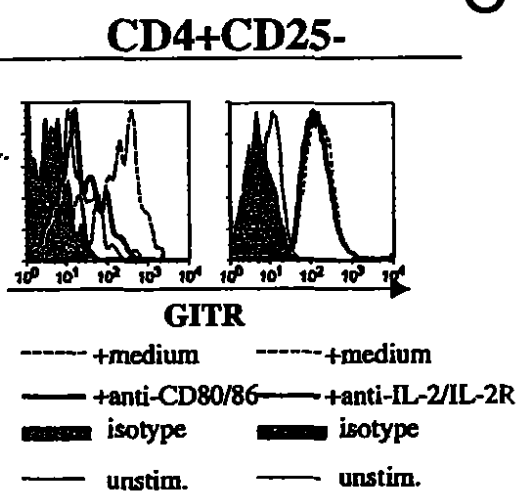


140
141

A



B



C

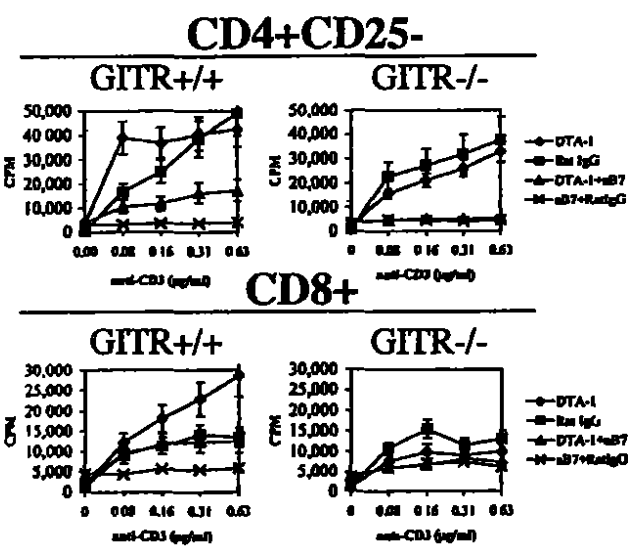
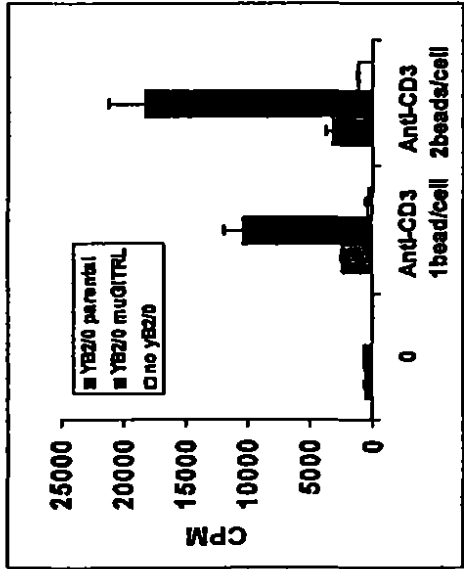
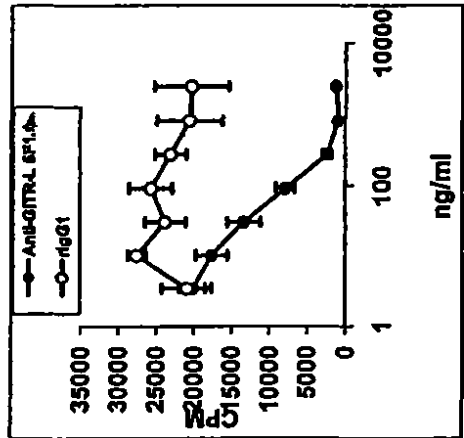


Figure 12

A



B



C

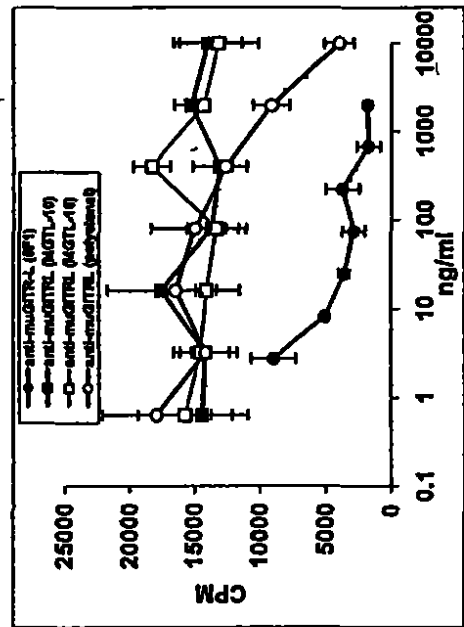


Figure 13

1112 143

14 of 14

142

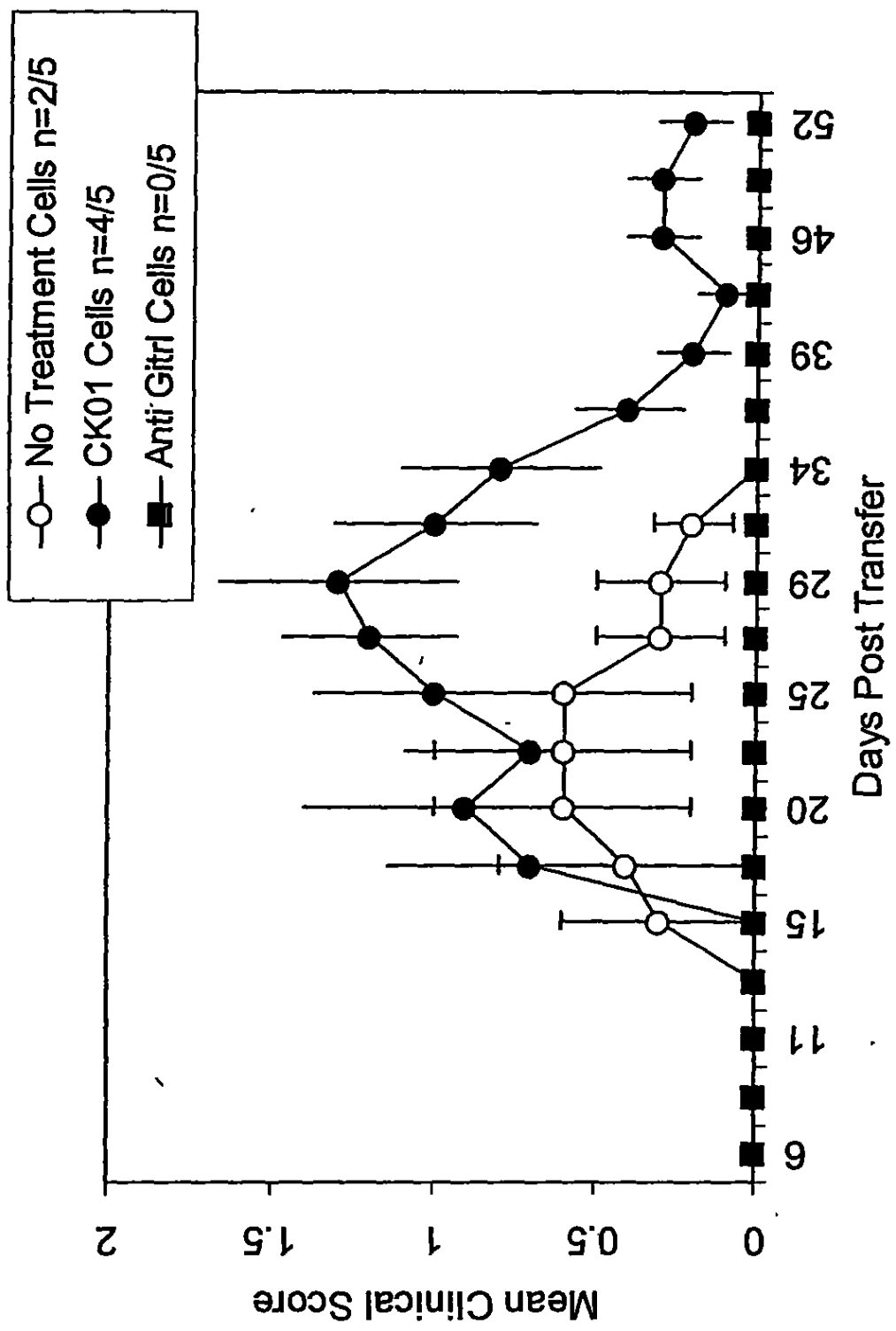


Figure 14

14B
14401997028500pc.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth
The Government of the United States of America as
represented by the Secretary of the Department of Health and Human
Services
Collins, Mary
Shevach, Ethan M.
McHugh, Rebecca S.
Whitters, Matthew J.
Young, Deborah A.
Byrne, Michael C.
Reddy, Padmalatha F.
Stephens, Geoffrey L.
Carreno, Beatriz M.

<120> G1TR LIGAND AND G1TR LIGAND-RELATED MOLECULES AND ANTIBODIES AND
USES THEREOF

<130> 01997.028500

<150> US 60/472,844
<151> 2003-05-23

<150> US 60/547,975
<151> 2004-02-26

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 522
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(522)

<400> 1

atg gag gaa atg cct ttg aga gag tca agt cct caa agg gca gag agg	48
Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg	
1 5 10 15	
tgc aag aag tca tgg ctc ttg tgc ata gtg gct ctg tta ctg atg ctg	96
Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu	
20 25 30	
ctc tgt tct ttg ggt aca ctg atc tat act tca ctc aag cca act gcc	144
Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala	
35 40 45	
atc gag tcc tgc atg gtt aag ttt gaa cta tca tcc tca aaa tgg cac	192
Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His	
50 55 60	
atg aca tct ccc aaa cct cac tgt gtg aat acg aca tct gat ggg aag	240
Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys	
65 70 75 80	
ctg aag ata ctg cag agt ggc aca tat tta atc tac ggc caa gtg att	288

01997028500pc.ST25

Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile
85 90 95

cct gtg gat aag aaa tac ata aaa gac aat gcc ccc ttc gta gta cag 336
Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln
100 105 110

ata tat aaa aag aat gat gtc cta caa act cta atg aat gat ttt caa 384
Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln
115 120 125

atc ttg cct ata gga ggg gtt tat gaa ctg cat gct gga gat aac ata 432
Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile
130 135 140

tat ctg aag ttc aac tct aaa gac cat att cag aaa aat aac aca tac 480
Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr
145 150 155 160

tgg ggg atc atc tta atg cct gat cta cca ttc atc tct taa 522
Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser
165 170

<210> 2
<211> 173
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg
1 5 10 15

Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu
20 25 30

Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala
35 40 45

Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His
50 55 60

Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys
65 70 75 80

Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile
85 90 95

Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln
100 105 110

Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln
115 120 125

44
145

Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr
145 150 155 160

Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser
165 170

<210> 3
<211> 10289
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
tcaggagaca gctataccag gctcctagct gcaagcactc acaaaccaca tgaaactcaa 60
aaagtaagac caaagtgtgg atgcttcaat ccttcctaga aggggtgaaca aaatacccat 120
ggaccaaaagg aaaactccac ctctacacc cacggggcta attactataa aacatgacat 180
tgcattcggtc atccatcact tgtgggtatc tgctttcccc agttctcatt ccatcagaga 240
acgagttcta gcctcatgga ggaaatgcct ttgagagagt caagtcctca aagggcagag 300
aggtgcaaga agtcatggct cttgtgcata gtggctctgt tactgatgct gctctgttct 360
ttgggtacac tgatctatac ttactcaag gtaagggtgg catagagtct acagctgcta 420
attatatcat ataaaggtta tttatttggt agtctgggta ttactactgc cattcagcat 480
tgctagaggt agtgggaagg aagacatttg acagtacaaa cagtgtgaagc aatttaagcc 540
ttgtaatgac atggctcttc aaatgtgttt ttattcatcg aatgttttaa gacaaaagac 600
actagaaaat actatatatt ctctgtaggt gtgagctaga tagaactaca tgtttaaact 660
gagccttttag gtgtctgtgg aagttctttt gtccttcctg ggactctact agaaccttct 720
tgattggcaa agaaaagacc tgaaccatgg tactaatctt cgggtaaccc cagacaagct 780
gtagtctcat tgggggaaga gatacaaac agtaatgggg gacagtgaac ggaagcaact 840
gcatgctgag gaagggcatg gtgtcaaagt agaaaaaag gaaatcctgg gttccagttc 900
tagattagcc tccccataac cagctgtgca aatttgagta agttgtatcg ttgttctgat 960
tctagttttt aggtctgcaa catggtgata agggaatggc tctgtttact tggcatcctg 1020
ctagctgtaa ttatagcgcg cagtaattga cctaggagaa ggataaacca tatagttgtg 1080
gtttatgagg ggaataactt tgggcttggg tgaccagggg aggcttcatg gaggagggag 1140
jagcacatgt ctgtttggga agcccctgat ggttatcagg aatttcccat tgaactctag 1200
tgtaaattgt ggggtctagat gggatatgaa ctggaaatgt atatcaatta ggtttttcta 1260
jaagtgttct ctcatacaga acagccaggg ctgcagagag agagagagag aaaaaaaac 1320
igcaaaaacc aaaccaaacc aaacagacaa aaaaaaaaaa aaacaacaaa acaaaacaaa 1380

01997028500pc.ST25

acaaaaaaaa ccaaaaaaag cattgaccag aaaagccaga aaggaatcaa atattaaata	1440
agacattata taattcaagg gttggcctat ttatattaaa atatactaaa tcttgggcag	1500
aattaaatga cgcatagctg tgtaagaaag ggttgtgatg tgagcccagg aacatttttc	1560
taaagagacc aaccagagat ggtcttaaag gtatggttct atattggcaa gatattgaga	1620
aaagatgcag gaggaagtaa tgcactgttg attcgagggt acttagtatg gtactggcta	1680
aagacttaca taggagccca ttaatctgta gtctgtaact gtacaaatgg atcaaaggca	1740
gagggagttc taaccccagc cccacccttc caaagaatga accaagacac gaactttctg	1800
aagcaatgag tggtgagagg actctcagca ttctcaaggg tttaaaggag gaaggctgag	1860
gatgcattaa gttcacactg aaagggtctt ttcctcaggc aaacttcctc aagtcttatt	1920
aatcagggtg ctctgagcat cagtgagtct aggtgccgct gactcctgct ggtgaggagt	1980
ggccgagggg aatgcctttc cgagtgcacat ctcttccac aatcaaacct tggttaattca	2040
tgattgctga aactttgatt ccagggtggc ctctcaaaag aacacatccc tttcaatgaa	2100
gggttcctct tctaaacgta aaagttatcc caaatttaag gaagtaaaaa gttttggagt	2160
ctcttttctc gtcaggatgc ttggcagcgt agttactatg gaaacgacac tggctttcag	2220
ggttagcttc agtattacac ttcccttatt ggctacaaat aaatgtcttg agcagagaga	2280
tctgagtggc tggcaggtgc tgagttattg tgaggtggtt gcttccacct tttcatactt	2340
aagaacttag aagttttttt tttctttctt ttttgatgca aatctccatt tttaaaagtc	2400
tcttctaaaa aaagaagact tccctctttt tttttttttt ttttataaat aaccctctta	2460
tgtttaaaag taagatatga agcttggttt ctttcagatt tttttttctc tctatctcct	2520
aggagacatc tagttaagag actagactgg agctcaaggc ggttggccaa ctctccatg	2580
<u>aaagcagctc acaaaaagttg tctctgaagc atccaaatag tcaggaaagt ccctttcttc</u>	<u>2640</u>
agtgaggaag ggtggaattc cagaaggga aatggaattt gtacaattgt acttgcaaac	2700
agacggagta gattttcttt ccaaacatat gaggttagga ttagcctgga gtctgccttg	2760
gtcattctga gacaaaacaa gtcaatctgg tcttcaacca aagtgagggt agaagaccaa	2820
ctgatccttc taaataaaaag caaaactaga gttaaactgaa agctttgtat gtagcttttc	2880
gtaacatcaa ttgaattata aatagaaact gcccagtgta gtcgtagggg tgagagagag	2940
agagagagag agagagtttt gaataagagt ctggttgagg atgccagcct ttcttatcag	3000
ccatatgacc ttgggcttat tacttcatca ccgtgctctc atttcctcat ctgcagaagg	3060
aacgtggtaa ttcttacaga gttgccttaa ggaataagga ggcagtaatg tgcctgaccc	3120
tcctgactca tgctaggctc tagatggctg tgattaatat ttatgccacg gttacttata	3180
aggtttacaa tgaatacaaa caacaaggtc atttaaaata tacatggctt gtctgacctc	3240

146

01997028500pc.ST25

ccttcctcag taaaagacct cttctctcaa ccaaaatgat aattttccaa ttatatattta	3300
acttatggca atagttatgg atgaactcag tggcattttc taactctaaa tagatattaa	3360
agccactcga aataggcttt ctggatgctt ttctctgtca gttcatttgt ctattgattt	3420
agattttctg tgtacttctt acacatgggtg atagctggaa caaaatccaa gacatttgta	3480
ttttgctggc tacttaattg cttcctatgt atgatcatgt cagtctagct agattacaaa	3540
cttcctgaga gataacaatt gtacattaaa tgtgtctttc ttgcttagaa tgctagtata	3600
atgttgggac tataggtaat taagttgttt atttaacttg tttttataat cagcatcatt	3660
atcaaaatag ctgatattta ctgagaagct tcaggtagcc tgtctggaga aaccctctcc	3720
aagaatcaga gtggtaaagt aagaacaaac ggttttagtga ttccccgctc ttactccctg	3780
cttaatagat aaggaaattg gaattctgga agccccctgct ataaccttgt cagtctttgt	3840
gctgaactga ctttggacat ctcttttaag aaaacccaaa atgtggatga aataattgca	3900
agagtagagt gggtttcagg aaatccagtg tcttttagtt ttagagtgca tggcttctcc	3960
ccttttttat tgcaccgcct tattgggtata aaatgctctt attataactt ctaacatatg	4020
tatactagat agtatctcac gtctgagtat aaaaccatgt acacaaaaga tgtgtacaca	4080
cacaagatgg aaagtctaaa agtttaatac agattttccc gtctaagctt attttgcttt	4140
agttaagttg ttaagttgtc tataatatat taacattgat gcaaacataa tacagtaatt	4200
gaaatattgt ttctttggtg ctgatctctt agtcacattc agagccctag tgatttgata	4260
ttatttgttt tatttcctta attttagctt aacattttat aatacagtaa cttgagattt	4320
atattctaatt ttatcttgat ttatgatttt gactgtacca attgaaaatt accttcttgg	4380
acttgatgtt cacatataat ttcatgtcta aaagcaatga atcttggcat catatatcta	4440
actacctact tgatatctaa taagcaacac aaaccacac cttcaaaagt tgtcatgggt	4500
~~cccccttac tttctttcta ttagtctttc gaatttgggt aattaaactta attttttca~~	~~4560~~
atgactgcag tcccaaactt tggagttatc tttcttttat tgcattgcct catgctagta	4620
ttcatgtcag gaactccagt tacttcttgc ttccttctcc atatagccta gcttgatctg	4680
aaagtcacag ttctcctgct tcaacctaag tgctattaag acaggcgtgc atctctctgt	4740
tggaccctct gccagcacct tggtcagagc catgtgcttt ccagtttata gactccatcc	4800
agtccatgcc taactgactt cattgctttt accttctggt ctctttgttt ttttttttt	4860
cctagcataa tagctggaaa aatcctttta aaggatcata gatcagcttc catgcttaaa	4920
aaaagtcttt tgagcacttt gctcccagga aaccaatgca ttctcagtac ccaaaacttt	4980
aatgtttggg cttatttttt aaccctgaag catttaacag catttaagtg attgtatttg	5040
taaattagcc ataattaatg ttacctttca gcatgtcgca gacattttga aacacttggt	5100
ctgattctg aaggcattcc atttattata catggccigt gatttttcta tacattaaat	5160

01997028500pc.ST25

atttctggag ctaatgctgt tgttttaagt aaagggaaaa caaagataag cagaggtccc 5220
 attatttttc ccacatgcaa cagatcatct tgggaaatga ttgatgggga tatggagact 5280
 gctgtttgta gtgaactaga gaggaagaac ccagcttcat cacttgcctt gtgtgtcaaa 5340
 ggaaaacgaa caggatgaga caccaaagtc ttggataaaa gacaccctcc aaaaagatct 5400
 gctacctttc ttctcatgat taaatctatc attccatgac accattttta aaattaaaac 5460
 aatgctgctc accaccctta ttcatgcttt ctttcccttt ttaagattta tttattatat 5520
 gtatgtacac tgtagcaatc ttcagacgct ccagaagaag gcgtcagagc tcgttataga 5580
 tggttgtgag ccaccaggta gttgctggga tttgaactca ggaccttgg aagagcattc 5640
 agtgctctta actgctgaac catctttgct gccctctctt catgctttct tttgtctctg 5700
 tatacagcta aattcgtgtg tctaataatac ctctgcccac acatccttat tcacttgctt 5760
 cctcatgtct tcctaaaact ctcatgtaag tcaaagttaa aggacagaac cagtcatctg 5820
 tagagggaaa tgaagaagta tgtcagggtg acagggtgtc gtgtttgtgt gttgggagga 5880
 ggggcatatt ttcgggaggg gtttgggggt tggaaaatag tttgcttcag aaactttaaa 5940
 ctctaagtaa ttagtcaagc atgtagcagt ggtgccatca ttctgaccag ttcttctttt 6000
 ccttcaacag ccaactgcca tcgagtctg catgggttaag tttggtgagt aacctatctc 6060
 ccatggtttc ctttcatttt ctttagattc tgaggcaaga aggccagtgc cagtgccttc 6120
 ggaaagcccg tgcattcttt agttcacttt cagtgattgt ttattacaat tactcacccc 6180
 atacttgctg tctgcccagt gagaactgag gctccagggc tgagcccgat tgacaagccc 6240
 acaccagggtg acactcttgg caggcataga catcccacta acaagagcct tgtggatctg 6300
 catacagcaa tcagctttta gtttggtagt ttattaagga tatttttcag attcctacaa 6360
ccttttgtca gagcatttct tatatttcat acatgtctag tgtctagtag agcatatggg 6420
 aaccattact gctgttagta agtgcagaga agagaaggaa gaagcgcttc ctctttgctt 6480
 ctgagtcact tttcgtgaca gtcacctgat attcgtcag aaaacatgga aaacagtgtc 6540
 gctgagtggt ttagtttcat ttctgttgct tttataagat accctgtcaa aaaacaactt 6600
 ttggagaaaa aggatttggt ttattcacia gtgcaaatta tagtcctca accgtggaga 6660
 aatcatggcc acaggagttt gaagcatcta gtcacattca gtcaagagca gagggaaaacg 6720
 aagtgcactt gcttattgct tgcttttttt taattggata ttttatttat ttacatttca 6780
 aatgttattc cttttcccga ttgcccaca gaaccccccc tttccatctc tctccccctg 6840
 cttctatgag ggtgttcccc caccaccca catactctg cctccctgac ctcacactct 6900
 cctacactga ggcataagagc cttcactgga ccaagggcct cttctcccat tgatgccga 6960
 caaggccatc ctctgctaca tatgtagttg gagccatggg tccctccatg tgtactcctt 7020

14/5
148

01997028500pc.ST25

ggtagtggt ttagaccctg ggagctctgg ttggttcata ctggtgttct tgctatggg 7080
 ttgcaaatcc cttcagctct ctcattactt tctctaactc ctccattggg gacttcatga 7140
 tcagttcaat gggtggcttc gagcatctgt atttgtgtat gtcaggctct ggcagagcct 7200
 ctcaggaggc agttatgtca ggctcctggt agctcagttc cttttctcta cttctttaca 7260
 gttcaggaca tcttgccctag ggaatggcac caaccatagt gggctggatt ttcccatatc 7320
 taataactta attaaaatac tctataagac caacttgata tagacaattc tttcttgggt 7380
 cctcttctct ggtgactata gattgtgtca atttgacaag gaaagctaac taccataccg 7440
 agtctcagaa tatttcttag agcacatgaa aaatatcaag tgtatacatt tgtgattgct 7500
 tgtaccacat tttcatttga cactagacaa tttctttagt tcagtttttc actctcctat 7560
 cttttgctcc agtttttaaa aatactttgg tccccagagg ttaggacagt ttttgaatgt 7620
 gtcccactct gattttgtgt tttgtttttt cagtgaaaac aagagagtat ataatgtgtt 7680
 caaatttctc cttaatgtga taaaaatcaa gtgtttttta aaattccata actggattaa 7740
 ataggaaaaa atagactttc ccatgggtgtg ccaccaagaa aaaaatgcag agttcactgg 7800
 agatgcagcg agtttttgtt ttgcttataa cactccattc ctcttgctca ttcctctatt 7860
 ctcttcagc atctacctcc aagtcttate ctagttattt tatgtgtgaa tgagaatcta 7920
 agtcagtctt acctctttta ggctatgccc tctataacta aagttatgga gaattagaga 7980
 aacattcaga taactttgaa tcaataaaaa cacctgttgg gggccttgaa gttacatagc 8040
 tgtacaaaac cactaacatt agggaaatat ttcaatgtaa tacacaggaa aagaaatgac 8100
 taaatttgta cacatatccc actttccatg tggcaatatt agacttagga tagttacaat 8160
 taaatacata tatattaatt aaattaattt atagcagtaa ataattggaa ataagctaga 8220
 taatgttatg ttaagttgaa agtgacacag agaatcatat tttagataga aagcatcaaa 8280
 atcagaaata cagacctgtc aatcaattta gagctaatta ctgatactga gctgggaaga 8340
 ttatttgaa tcagcaattt gagccagac agcaatacag caagactccc atatcaaaat 8400
 aaaagaaaag tttgttgagc acacacaatt ctgctagctt atttaggtga tgagaatata 8460
 gcaattggaa aaaatggaga atacttatta tcaaagacac cacactcaag tagatgtgag 8520
 acactagaaa aatggccaaa ttaattgata acatacttct tgctaacacc ttacatgaag 8580
 aaaattacag caatgcagag cacggtagtc agaggagaac aatgctgagt gttgattgtc 8640
 tatgtaatgt gttattggca aagcaccata gagtaaacag tatttgaata agaaagatat 8700
 ggggacgcct agattataag cggttcttat tctagtcttg tgtgatttgt ctctccattc 8760
 cactcccttc ctcatccta ttacctgaga tgagatacag agttattaag atctgaagcc 8820
 tctcaaaaac agagagatag tttattctct caatagattc-gaaatatggt ctgggaaaag 8880
 tagtatatat agtcaggta aagaagccac ctgaaggcag taaaacatat agaggatgga 8940

01997028500pc.ST25

atagtcatgg aaacatgatc tttttcttcc tctttttcaa tttcttatag aactatcatc 9000
 ctcaaaatgg cacatgacat ctcccaaacc tcactgtgtg aatacgacat ctgatgggaa 9060
 gctgaagata ctgcagagtg gcacatatct aatctacggc caagtgattc ctgtggataa 9120
 gaaatacata aaagacaatg ccccttcgt agtacagata tataaaaaga atgatgtcct 9180
 acaaactcta atgaatgatt ttcaaactc gcctatagga ggggtttatg aactgcatgc 9240
 tggagataac atatatctga agttcaactc taaagaccat attcagaaaa ctaacacata 9300
 ctgggggatc atcttaatgc ctgatctacc attcatctct tagagattgg gtttggtctc 9360
 ctcatcttct tctttgtatc ccgagatgct ggtgggtggg ttggaggggg atgattgatg 9420
 gcaatgcaca cagtttgtga gggcttaca attgacaca tcagagcctc ttggcatata 9480
 aaatttttagc cctcatatct gtctgaagag gactcagcaa atggggccaat ccctaagtgt 9540
 gggctctgcaa atggacttgt acaatccatg ataaaaagga gtatgggcca cagaagacag 9600
 aaactcttcc aaagaatgtc tttctaacct tgatccctgg gtagaatgag atcctgtttc 9660
 catgggagtc ttacttggct tgcaaaaaag ggtgtagggc agtagcttgg ctttttttcc 9720
 atcataatct ccttgagctg ttttacctta atccctcaa actctcacct tctgagagcc 9780
 tcctaataaa acattgttag actgggtggg tggccaagac atgccaacaa cacccttctt 9840
 tagagggtgt gtttttagag gacagagaac attatgaagc ctagagcagc agagggtcaag 9900
 atgccacgaa atggaattga tctgggaatt tttttttttt ttcattctca ggatgcaggt 9960
 tcattctgaa ctttccccta ggccttcatt gcttttgtgt gtatgtgtgc ataaattctg 10020
 caaatagaaa aatgagaggt tgaccagta ctactagat ttaacaccag aaagtgggtac 10080
 ttttctggct gtattatgcc atgatagcac attttctgtt ggtgttccct aactgacaag 10140
tataacagtt ttcctaaacc acacaacaat gctatgatgt taatggggta gatatttttg 10200
 gaaaaaaatt gcacagtga aacatgggta gatgaaccct aagactctta cctcaattca 10260
 gaactcgcaa ggagtttaagt gagtgggg 10289

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mus musculus GITRL forward PCR primer

<400> 4
 atggaggaaa tgcctttgag ag 22

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA

148

01997028500pc.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Mus musculus GITRL reverse PCR primer

<400> 5

gaatggtaga tcaggcatta agatg

25

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Mus musculus GITRL forward PCR primer containing SalI site

<400> 6

tttaaagtcg acccaccatg gaggaatgc ctttgagag

39

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Mus musculus GITRL reverse PCR primer containing EcoRI site

<400> 7

tttaaagaat tctcattaag agatgaatgg tagatcaggc at

42

<210> 8

<211> 534

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(534)

<400> 8

atg	tgt	ttg	agc	cac	ttg	gaa	aat	atg	cct	tta	agc	cat	tca	aga	act	48
Met	Cys	Leu	Ser	His	Leu	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Ser	His	Ser	Arg	Thr	
1				5					10					15		

caa	gga	gct	cag	aga	tca	tcc	tgg	aag	ctg	tgg	ctc	ttt	tgc	tca	ata	96
Gln	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Ser	Trp	Lys	Leu	Trp	Leu	Phe	Cys	Ser	Ile	
			20					25					30			

gtt	atg	ttg	cta	ttt	ctt	tgc	tcc	ttc	agt	tgg	cta	atc	ttt	att	ttt	144
Val	Met	Leu	Leu	Phe	Leu	Cys	Ser	Phe	Ser	Trp	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	
		35				40						45				

ctc	caa	tta	gag	act	gct	aag	gag	ccc	tgt	atg	gct	aag	ttt	gga	cca	192
Leu	Gln	Leu	Glu	Thr	Ala	Lys	Glu	Pro	Cys	Met	Ala	Lys	Phe	Gly	Pro	
	50					55					60					

tta	ccc	tca	aaa	tgg	caa	atg	gca	tct	tct	gaa	cct	cct	tgc	gtg	aat	240
Leu	Pro	Ser	Lys	Trp	Gln	Met	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Pro	Cys	Val	Asn	
65					70					75				80		

01997028500pc.ST25

aag gtg tct gac tgg aag ctg gag ata ctt cag aat ggc tta tat tta 288
 Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu 95
 att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat gat gta gct cct 336
 Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro 110
 ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca 384
 Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr 125
 aac aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt 432
 Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val 140
 ggg gac acc ata gac ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa 480
 Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys 160
 aat aat aca tac tgg ggt atc att tta cta gca aat ccc caa ttc atc 528
 Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile 175
 tcc tag 534
 Ser

<210> 9
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr
1 5 10 15

Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile ..
20 25 30

Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe
35 40 45

Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro
50 55 60

Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn
65 70 75 80

Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu
85 90 95

Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro
100 105 110

148
149

01997028500pc.ST25

Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr
115 120 125

Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val
130 135 140

Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys
145 150 155 160

Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile
165 170 175

Ser

<210> 10
<211> 10331
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
attaatctca aactttatTT tttcttataa aaagtgattt tcttatctag aaataatctg 60
gaatactttc ttagatgaga gcacaccact ttattctccc aagcctcctc tacacgtgca 120
ctgtactgcc gtttgattta ggaaagaaat ttttttccc tctgaacttc ccttggtgctt 180
ttttttttat gttctgagtt tgtgttggtt ttcagccttc cgttcctttt gttgtatttg 240
atctggtgcc aaatgagagt cagcacttaa gttataagta tcattttcta acacagtgc 300
agaaggaaaa ctccgccttc cacaccact actaattacc atattgctac aaaacatgc 360
attgcatcct tcacccatca cttgtgaatt tttgttttcc acagctctca tttctccaaa 420
aatgtgrrtg agccacttg aaatatgcc ttttaagccat tcaagaactc aaggagctca 480
gagatcatcc tggaagctgt ggctcttttg ctcaatagtt atgttgctat ttctttgctc 540
cttcagrtgg ctaatcttta tttttctcca attagaggta aggaggcaat tgtacctaa 600
gttactatTT gctataatcc tctatttatt tgtttttcta gttgttatca ttgtcactca 660
gtattgttag caatagttgg aaggaagaga tgtgtataca taatgtaaat acaattctaa 720
tattgtcatg acatggcgtt tgaagtttat ctaaaggttt tgagataaaa ggtatcagaa 780
aatgctaaat gtagctgca gaactctgtt agatagagag aactgggtta gccaattgac 840
aggggcctgt ggagtatTT tcttccctc tgctatagct cttggtggaa taaaaaagg 900
aaaaatatga atgaatatca aggaatggga tgcaagctat agtcttattt atggaaaaga 960
cttaaaaaaa tagtgaaaga caggattaag taaatgacag gtggtttgtg tgtctttgag 1020
gaggggaagt gccctgagct aggtgtaaga agatctggat tctggttctg ggtctcctaa 1080

01997028500pc.ST25

taaccagctg tataaatttg ataaagacat ttaatctctc tagtttgag cttctttatc	1140
taaaaaaact ggtggtaggg gaatggattt attatgatgt ttcttctagc tataaaatgt	1200
catgatcaag aatttattta agggtagtat gaagaataaa tgcctaagtc actcaaaagc	1260
agggacaat gacttttagat tgagttgatc aggggaagact tcatggagga atgagaaagc	1320
ccatatctat ttgggaagcc cctgatgctt gtcaggaatt tccattgag atgcaggcca	1380
agctgtgggc ctagagaatg ggatgttaca ctgggaatgg agattagttt tgttctttac	1440
taaaaaatct ttcctcacag ttaactacgt agcactgatc aaaaagaaaa taagaaatgc	1500
tttatttatt tcaggattta gcctatttct ggctaaattt gaagactcta agttttgggg	1560
agaataaagt ggcataatgt catctgagaa agagttgaaa tgtgactgca gaaacacttt	1620
tcttaagggg actgaccagc aaagatttca aagatatagt tctaccactt aagataagta	1680
aaagtaattg agaaaagatg caggaggaag cagtccccta ttgatattaa tttagagtag	1740
gtatagcttt ggccaatttt tccacagtag cccattaatt tgtattccat aactgtatac	1800
aaggcttatg tgcaacagag gcatttctaa ttacaaccct gctctctcaa gaaatgtatg	1860
aagcagaagt gtgaactttc tgggtcagtg aagttgaaag aaagaattgt cagaaattct	1920
tagtgtctag atttctgaag aagaggaagg gtgagaatag caataactta aatttggaag	1980
tgcttctttc ttctaaaaat tataagatta attagccaga taaccctgaa gaacactgaa	2040
tataagcatc atcagttcct acatatgact caggaatgaa tacacagaag ctttcccaa	2100
aggcaccag cagttcttgc aaagggaaag agaaagtcta ataatgccag atcatctggg	2160
acacctctct tcagaatcaa actggattaa tcccatgtgt ttgagctctg attctggttt	2220
ctctctcta gatccagttt ctcaatgaaa tgttctacct cttaaagataa cccagagttt	2280
<u>gtttcaaatt tggggaagta taaaatgttt ttagaatatt gttctgacag gacacttgca</u>	<u>2340</u>
ggatttgttt ctatgggaaa agccagtggc ctggccaacc atacatgata ttagcttctg	2400
catttcactt tccacttacc tgtacttccc tttccctatt ggccacaaat aaatatctct	2460
ggaaaagaag tctgagaggc tggcagatag tgattcatta tgatgtggcc acttccacat	2520
tgtcacaata cccatgaacc gtgaagtttt attttgggtct ccactctagt ttttacatac	2580
aaagtccac tttccagatt gtctagacac tactttaaaa agtgtacact taaaagaaag	2640
tgtaacactt taaaaagtgt tagatgggaa gcttggctcc ttgggtcaat ttttttcttt	2700
ttttctctct tctttgagaa aatatttaac taaaaggata gctgtgagtc caaggagttt	2760
ggtcaatccc tcagtgaaaa taatctcaca ggaattatca ctaagaaatc aaatgttcag	2820
cagagtctga acttcagcaa aatgaaggat actttcagaa ggggaagttg tacttatact	2880
taaaagcaga gcagatttta ttttactga tgatttgatt agggttgggtt tggagagaga	2940

49
159

01997028500pc.ST25

atgattgttt	tggccatttt	gagccgaact	acgtaaatct	agccttaaat	caagaagagg	3000
ttacaaaagc	aactgatcct	tctaagcaaa	aataacgaac	ccatatgtgt	ctttaaaagt	3060
gggtattttac	tactttccaaa	catcagcaga	attataaata	gaaacttacc	ccacagagtg	3120
gtagagggtga	gagtgttgac	ccagacaggc	tgggtgtaga	tctcattctt	gccttttatt	3180
ggctgcatga	ccttaggcta	gttacttaat	ccctctcatc	ctcatttcct	catctgcaaa	3240
atgagcaacc	taatTTTTgt	agagttgtgc	taaggattaa	tgagacagta	gagtatctga	3300
cataaagtag	ctcccagtag	aggggagtg	ttaatatTTg	ccccattact	attaatgaga	3360
taataatggg	caaaaattta	acaagaccat	ttaacaatat	ggatagtctt	tgccctaccta	3420
tatcactctc	tcaatcaaac	actatatctc	agagccaaat	ttatgatttt	gcaattagat	3480
ggatttttag	tggtggcaat	aattagagag	tatcacagt	atggctctctg	tagcgctaaa	3540
tagacataaa	gcagcctgca	gtatattata	cggaatttct	gactctggaa	attagtttgg	3600
acttaggttg	tctatagctt	aggtttctct	gagcacatct	catacatgct	agtagatggt	3660
gcagatacta	tctgtggcac	gtattttggc	actcattcat	atttagattg	ttaccaaatt	3720
gctttgggtg	tgtaatcatg	tctttctaga	aagattataa	acttcttgag	aagcaaggac	3780
caaaaattac	atttgtttct	catgcttaca	atgctgtaca	atgttggaaa	tatggatgct	3840
taaattgtag	ttcaattctt	cattacaatc	accatcatca	cccaaacagc	taatatttat	3900
tgaacaggtc	caggcaggat	atctaggcaa	agcccttatt	aaaaacgacc	tcatttaacc	3960
ccaacaactt	caacaagcta	ggtgctatta	tttctcccat	tttatagatg	aggaaattgg	4020
ggttaaggga	gtctttgtca	cgtccctatc	atgggttgaa	ctaaattgaa	tttcaacatc	4080
tcctccagga	aacaccaaaa	tgaggatgaa	ataattgcaa	gaggccaggc	acagtggctc	4140
acgcctataa	tcccagcact	ttgggaggct	gaggcgggta	gattgcttga	ggtcaagagt	4200
ttgagaccag	cctgggcaac	atggcaaaaac	cctgtctcta	caaaaaaata	caaaaaaaat	4260
agctgggctt	ggtggcatgc	acctgtagtc	ccagctactc	aggggggctga	cgtgggagaa	4320
ttggttgagt	ccaggaggat	gaggctgtag	tgaactgaga	taacaccact	gcactccagc	4380
ctgggcaacg	gaatgagacc	ctgtctcaaa	aaacaacaac	aacaacaaca	acaacaaaaa	4440
aaaacaagt	tagggaatca	aaaaatttat	ttcctagaat	agtggctttc	agacttttta	4500
attgcacctc	cctttcaata	acatattatc	agtataattc	ccaacatttg	tatgctaatt	4560
attatactat	atacaagtac	taataatatg	tacactaaag	agatacacaa	aatatatatt	4620
tataagggtg	agccaaataa	tatattcaat	gtaactctca	caatgcaaaa	ccattttgct	4680
ttcaccaaaa	tggttatatt	tctataatca	ttaatatgtc	ataaacatta	ctaaaataag	4740
taaaatattt	taataacgtg	gtgaatgcat	ttattttatt	ttttaatctg	agcttaacac	4800
tatgtgatac	agcaatttga	agtttgatat	gttaattttac	cttgtttcat	gattttgacc	4860

01997028500pc.ST25

atcatgactg aaaaattacc cgacaaacaa atatagatta aaatggaaga acacatcttt 4920
 ggatattctt atcatgtcat accacttaat tttcaatcca tcattcaatg atggaatgcct 4980
 ctcttttctt ctttccacaa ctaaattcca agatctatag ctttaacacc tccctcgcat 5040
 aaactcactc acttgcttct ctctatcttc attatactct aatgacaaaa gctcgactat 5100
 ggaaaacctc caatgctgat taaatccaac tgctctgtct ctttactgt tgaatatatc 5160
 tgaagaaaaa cataaaattt ttgaaaggt cttactttta attcacagcc actgccttca 5220
 agtggatttc attgttgctc tggaaacagc ccatgtttcc ccagtccatt cactctcctc 5280
 tactggatga tttcatacct ttagcttctc ttcaaaccatc taataactct tccccattct 5340
 cactctccac tgataacgtt gcctccatat ttttaagagaa aatagaagta cggaggaaag 5400
 aagttccaat atcaacaact cattggcatt tgtgtccagg tatactgtta ttctgtcttg 5460
 tcactatgga taaattgtcc atgcatctat ccaagccatc tatgaactaa atcttatcct 5520
 ctcttgccca ctgagggaca ttgctgcaac agttctctcc tcgctcttac atattatgcc 5580
 tcatccattt tacagaaaca tttccatcaa atggaaatag aaaaacgtgt tgtcatttct 5640
 ctcacattaa aacgtaacaa caacaacaac aacaacaaca acaaaaaacc tctttgatct 5700
 ctcatcctca tccaaactcc actcattttt ttctgtctc cctacagcaa aattcctcca 5760
 acttctcttg tcccatttac ccttaaattt attttaacta agcttctgcc ctcttcacat 5820
 atcacagaaa ctaattttgt caagaactcc agtgactacc atgttgctca atctatcagt 5880
 caattcactg tactcttctt acttgatcta tcaacagcat ttgacaccag ctgatcactc 5940
 gtccttcatg aaatactttc ttttcttggc ttccaaacat cagactctcc tagtttcctt 6000
 tcagactcag cttttccttt ctattgtccc ttgcttgctc ttctctattc tccgacctct 6060
aaacatcaca acgccccagt gttcctctcc atctacaccc actaacatga tggcctcata 6120
 caatctcaca gcttaaaaca tcaactatga gcttaagact cttaaagtga tatcaccaga 6180
 gtccttaaaa tttcagcctg cttgacacac ttacttggat ttataataag catcaaaac 6240
 taatatgtcc acaaccaaac tcatcattgt tcccccccc atttattcct ctacatctt 6300
 atccatttta gtgaataaca actttatctt tccaattatg caggcctaaa atactggagt 6360
 catctttgtt tcttctcatt cctacccca tatccatgtc aggaacttct gttggctcta 6420
 ttttccaacc aagtatcacc atctacagag ctagcacctt ggtcagagac accatgctct 6480
 cttgcctaga tgaatgactg taatgatctc ttagctagtc tcactacatt tgccttgcc 6540
 tctgtttaat ttgttcctag catagcagcc agagaaatcc taaaaagga aagtgtgcaa 6600
 cacgtttaag ttcaaaaagt cttttaagca ctttgccatt aggaaaccaa taacctttgg 6660
 gtgatacaaa aaatgtttgt ggttatgcct gaatttacta caacgtattt ttgacattt 6720

FD
151

01997028500pc.S125

agcattaact acttgtgttt gtaaaattaa ccacacactg atggcatctt gtagcatgtg 6780
 aactgccgta cattgcagta gtctgaaact tggaaactgtt ttccagggtta tctcagatac 6840
 tgtaratgac atgtagtatt ctgaatatta tacatgggtg gtttcatcaa tctgagttgt 6900
 aaatatttct agggcttaat ttactgtttt aaataaaata aacataaata gaagcttcac 6960
 tattttcctt tcacatgccca acagatcacc ttgtgcagtc actgggggtgt ggaaactgct 7020
 attttgttga aaaactttta gagcccaagg ttgggggggg ggtccgatat caaatagttg 7080
 tcctgtaggt atagattagg taatggaatg agatcttgac ctttgtctaa aagacctaaa 7140
 aggggaagcta ggtaataaaa ggtaaaggat ggagccactc aactttaaaag ggaggctgag 7200
 agggctgaga catgggtgaag ggaaggattt tttttatggt tatagaacac tagtttgctt 7260
 cagggaattca aagctctaaa taaatcaatc aaaaaaatta atgacactgt catcatccta 7320
 atcaattcat cttttatttc cccaacagac tgctaaggag cctgttatgg ctaagtttgg 7380
 tgagtaacct atcttgcag tcttttactt ttcttagttt ttgatgcaag aaggcagggtg 7440
 tcagtgatct caagaaaacc tgtattttct ttatttcatt tctgagctac tatgtataat 7500
 tacttatcat gtactgggca gttgcccaag agctgaggct ttccagggtta aaccaggcaa 7560
 aagaagccca tgccttgata aagcttatgt tgaaggctgc atctctggcc aggaatgagc 7620
 atctctctta ctggcctatg aatctgagat ccgggaatct ccttttaatt ctgtgtttta 7680
 ataaacacaa caagtttcag atttctacaa cctttcctta aagcttttct catgtttcac 7740
 atattgctaa tgtccaatgg agtatgtgag agagtgccat tgttgtttct aaatgtatag 7800
 aagagcaatg agagtgtgaa aagtggccac ttctctact attttctctt ctaagcttag 7860
 ctcttgagtc attttccctt gtggtcacct gatatttgc tagaaaaacac accagtttac 7920
 agttacactg agccttagat tcttagaata catggaaaat ttccagataaa tacatttttt 7980
 ttaaagttgt ttataggttt caggccaaac atacattttc agttgagaac agaccatttc 8040
 tagagttaac tctgcaaccc ctgtgttctt atatagttta aaccagtagg ttcccttggc 8100
 ttgtgggaat tagaaaatgt ccttttgcct gtctctttct ttgtgttttg tttttgtttt 8160
 gcccataagt ggaatggaat gcatggcatg tgtgaaatta tgccttgatg tggtaaaagt 8220
 tgagaaactc aagtgatgct aagggtgtct ttaaataacc ccttttcaca gaattaaatg 8280
 ggagaaccaa tgacacttct tcttgggtgac ctgcctattg cctattacat gtcaaggaag 8340
 aagaaattta ctgggtccg agctcattgg cgatactggg tggctttgtc ttttgrtcta 8400
 gtgategctc tttcattctc ctccagaatc taccttcaga gtcttatatt agtcattcat 8460
 atgaatgagc attgaagtaa aaatgttacc tcttccaggg tgrttcctca tcaagttttc 8520
 tttttaatta tgggacaaag gacaaaaatt atggagaatt gcagaacaga taagcattct 8580
 ggggtggtaaa agcacctccc ggggtctgtg gatcacactg ctgtgcaaaa ccaagtaatg 8640

01997028500pc.ST25

ttaggcaaac atctaagttt catatgtgct aatgaaaatg aatgattagg tctttacctt 8700
 ttctttacca tttgggacag tattgcacta gggatcctta tatttaaata gtcaagttat 8760
 ttctatttat aaactcataa atttacaatt agctatTTTT gggggattta tttaatgaat 8820
 cctaagtagg tcttaaatga tatataccta caaactgagg agaacagcca taatttagac 8880
 acaaagcacc taattcagga acatggaagt atcattcaat caataaatat ttatggaaca 8940
 tctaccagggt accagggact ttttcagggtg ctgaaaatac aagaatgaac aaaatagaga 9000
 tatatttgtc ctaaaaaatt ttacattcaa agtgatacaa gatggacaat aaacaaatga 9060
 acaatttagt ttataacatc ctagacactg acacacttta tgaagaaaac tcaagcaagg 9120
 taaaatgagg gaatgatagg agaacacttt ttaatatagc ataattaagg aaagccacac 9180
 tgataaagtg ataaacagcc agtgggtattt acaccgaaaa tgcctggaaa ggcattggact 9240
 gccaaccttg gttttcaaaa ttttggcttg tgatttcttt ctccattagt cttttcttct 9300
 cttttctttt tcccacaaat attaatcaac aagagatgcg aagtcactta agtcattttt 9360
 ctattccaaa ttcttttcct tagaattctt gctccaagca agaaatactc tttggatttg 9420
 caatttctct aaaacaagga gtagataggt acttaaaata gaaaaattct gcttgaagag 9480
 aactagtgtg gatcaggtaa agaaacaaca tgtatgtggt aaataattaa ctacaatctg 9540
 gaaaaggatg aaataatgaa ataactatgc ttctatcttt tttatccttg tatatttctt 9600
 ataggaccat taccctcaaa atggcaaatg gcatcttctg aacctccttg cgtgaataag 9660
 gtgtctgact ggaagctgga gatacttcag aatggcttat atttaattta tggccaagtg 9720
 gctcccaatg caaactacaa tgatgtagct ctttttgagg tgcggctgta taaaaacaaa 9780
 gacatgatac aaactctaac aaacaaatct aaaatccaaa atgtaggagg gacttatgaa 9840
~~ttgcatgttg gggacacat agacttgata ttcaactctg agcatcagggt tctaaaaaat~~ ~~9900~~
 aatacatact ggggtatcat ttactagca aatccccaat tcatctccta gagacttgat 9960
 ttgatctcct cattcccttc agcacatgta gaggtgccag tgggtggatt ggagggagaa 10020
 gatattcaat ttctagagtt tgtctgtcta caaaaatcaa cacaaacaga actcctctgc 10080
 acgtgaattt tcatctatca tgcctatctg aaagagactc aggggaagag ccaaagactt 10140
 ttggttgat ctgcagagat acttcattaa tccatgataa aacaaatatg gatgacagag 10200
 gacatgtgct tttcaaagaa tctttatcta attcttgaat tcatgagtgg aaaaatggag 10260
 ttctattccc atggaagatt tacctgggtat gcaaaaagga tctggggcag tagcctggct 10320
 ttgtttctcat a 10331

<210> 11
 <211> 21
 <212> PRT

AF
152

01997028500pc.ST25

<213> Apis mellifera

<400> 11

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> synthesized PLP peptide

<400> 12

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/016381

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHIMIZU JUN ET AL: "Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cell through GITR breaks immunological self-tolerance" NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP,, 6B, vol. 3, no. 2, 20 February 2002 (2002-02-20), pages 135-142, XP002247979 ISSN: 1529-2908 page 136, left-hand column, paragraph 2 - page 141	22-24, 27-50
X	MCHUGH R S ET AL: "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 16, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 311-323, XP002247980 ISSN: 1074-7613 page 320, paragraph 2 - page 321; figures 5,6	1-54
P,X	KIM J D ET AL: "Cloning and characterization of GITR ligand." GENES AND IMMUNITY, vol. 4, no. 8, December 2003 (2003-12), pages 564-569, XP002307882 ISSN: 1466-4879 the whole document	1-54
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307923 retrieved from EBI Database accession no. Q7TNY2 abstract	1-12
P,X	TONE MASAhide ET AL: "Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 25, 9 December 2003 (2003-12-09), pages 15059-15064, XP002307883 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-54
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307924 retrieved from EBI Database accession no. Q80Y62 abstract	1-12
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/016381

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/715 C12N15/11 C07K16/00 A01K67/00 A61K38/00 A61K39/00 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307885 retrieved from EBI Database accession no. AY234223 abstract	1-12
X	GURNEY A L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NEW MEMBER OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR FAMILY AND ITS RECEPTOR, A HUMAN ORTHOLOG OF MOUSE GITR" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, 6B, vol. 9, no. 2, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 215-218, XP000938588 ISSN: 0960-9822 the whole document	1-12
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☐ Patent family members are listed in annex		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 November 2004		16/12/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Strobel, A

154.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 21 and 21 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 20-46 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

153
International application No
PCT/US2004/016381

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/US2004/016381

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P, X	JI HONG-BIN ET AL. "Cutting edge: The natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 172, no. 10, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 5823-5827, XP002307884 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-54

- 56

MOLÉCULAS DE LIGANDO GITR Y RELACIONADAS CON LIGANDO GITR Y

ANTICUERPOS Y USOS DE ESTAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U S Ser. No 60/472,844, presentada en Mayo 23, 2003, y la Solicitud Provisional U.S Ser No. 60/547,975, presentada en Febrero 26, 2004, las cuales se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

[0002] Esta invención fue hecha con la ayuda del Gobierno bajo el Proyecto de Investigación Intramural NIH #Z01-AI-000224. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

[0003] La presente invención está dirigida a métodos novedosos para diagnosticar, pronosticar, monitorear el progreso de, y tratar desórdenes que surgen de la desregulación del sistema inmune (por ejemplo, desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, y rechazo por trasplante, y enfermedades de cáncer e infecciosas) relacionadas con el receptor TNF inducido por glucocorticoide (GITR) y el ligando asociado con GITR (GITRL) y los moduladores relacionados con éste La presente invención está dirigida además a terapéuticos novedosos y objetivos terapéuticos, y a métodos para seleccionar y evaluar compuestos de ensayo para la intervención (tratamiento) y prevención de

desórdenes que surjan de la desregulación del sistema inmune, relacionados con el GITR y el GITRL.

TÉCNICA ANTERIOR RELACIONADA

[0004] De manera general, los linfocitos T son responsables por la inmunidad mediada por célula y juegan un papel regulador al mejorar o suprimir las respuestas de otras células sanguíneas blancas. La noción de que los linfocitos T juegan un papel en la supresión de la respuesta inmune es bien conocida (ver, por ejemplo, Gershon et al., (1970) *Immunology* 18: 723-35). Sin embargo, los antígenos objetivos para estas células supresoras y los mecanismos que controlan su función son aún objeto de estudio.

[0005] Una población de células T reguladoras que es generada en el timo es distinguible de las células T efectoras mediante la expresión de antígenos de membrana única. Estas células T reguladoras forman una subpoblación de células T CD4⁺ (es decir células T que expresan el antígeno CD4) que coexpresa el antígeno CD25. El CD25 es también conocido como cadena α del receptor de interleucina-2 (IL-2R). La cotransferencia de, o la reconstitución con, células T CD25⁺ está asociada con la prevención tanto de lesiones inflamatorias como de autoinmunidad en varios modelos animales (ver Shevach (2000) *Ann. Rev. Immunol.* 18: 423-49, y referencias allí). Las células T CD4⁺CD25⁺ también han sido asociadas con inhibición de la activación de la célula T *in vitro*, y la supresión adoptiva de las células T CD4⁺CD25⁻ en cocultivos (Shevach, *supra*).

[0006] Hace más de dos décadas se demostró que algunas células T auto-reactivas escapan a los mecanismos de tolerancia central y existen en la periferia

bajo el control de células T reguladoras derivadas del timo. En 1995, Sakaguchi y sus colegas demostraron que una población pequeña de células T CD4⁺ que se expresan naturalmente en la cadena α del IL-2R (es decir, CD25) están involucradas en el control de células T auto-reactivas específicas de órgano (Sakaguchi et al. (1995) *J. Immunol.* 155: 1151-64). Específicamente, ellos demostraron que transferir las células T CD4⁺CD25⁻ a huéspedes inmunodeficientes conducía a un espectro de enfermedades autoinmunes, que se podrían prevenir al cotransferir las células T CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi et al., *supra*). Estudios posteriores han implicado las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ en la supresión de respuestas inmunes a infecciones virales, bacteriales y protozoarias (Aseffa et al. (2002) *J. Immunol.* 169: 3232-41; Belkaid et al (2002) *Nature* 420: 502-07; Hisaeda et al. (2004) *Nat. Med.* 10: 29-30; Cursar et al. (2002) *J. Exp. Med.* 196: 1585-92, Lundgren et al (2003) *Infect Immun.* 71: 1755-62, Maloy et al (2003) *J. Exp. Med.* 197: 111-19). Juntos, estos estudios suministran evidencia de que la remoción de las células T CD4⁺CD25⁺ mejora las respuesta inmune. Se han hecho muchos intentos por definir la activación de, y la supresión por, estas células T CD4⁺CD25⁺. Estas células representan un linaje único de células derivadas de timo que suprimen potencialmente tanto la función de la célula T efectora *in vitro* e *in vivo*.

[0007] Varios estudios *in vitro* revelaron que las células CD4⁺CD25⁺ suprimen la proliferación de células T CD4⁺ en respuesta tanto a mitógenos como antígenos al apagar la transcripción de IL-2 (por ejemplo, Thornton y Shevach (1998) *J. Exp. Med.* 188: 287-96, Takahashi et al. (1998) *Int. Immunol.* 10: 1969-80). La cotransferencia de células T CD4⁺CD25⁺ *in vivo* con células T CD4⁺ auto-reactivas es suficiente para suprimir tanto la fase de inducción como la fase efectora de la autoinmunidad específica de órgano (Suri-Payer et al (1999) *Eur. J*

Immunol. 29. 669-77; Suri-Payer et al. (1998) *J. Immunol.* 160. 1212-18). Otras propiedades de las células T CD4⁺CD25⁺ incluyen la hiporespuesta a la estimulación receptora de célula T (TCR) en ausencia de exógenos IL-2, la inmunosupresión por vía de interacción célula-célula, y un requisito para señalizar TCR para inducir su fenotipo supresor (una vez que ellos hayan sido activados, sin embargo, su función supresora es independiente del estímulo antigénico). También se ha demostrado que las simples adquisiciones de la expresión de CD25, como se puede lograr mediante estimulación de células T CD4⁺CD25⁻, no induce el fenotipo supresor. Estas células T CD4⁺CD25⁺ son conocidas por existir en humanos (Shevach (2001) *J. Exp. Med.* 193: F1-F6)

[0008] Un estudio demostró que la selección tímica alterada se requiere para la generación de células T CD4⁺CD25⁺ reguladoras (Jordan et al. (2001) *Nat Immunol.* 2: 301-06). Además, los estudios con ratones mutantes demostró que las moléculas involucradas en la síntesis de IL-2 y la respuesta se requiere para la generación de estas células, los ratones genéticamente deficientes para IL-2 o IL-2R β , o B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), o CD28 tienen todos severa reducción de células CD4⁺CD25⁺, con la resultante linfadenopatía e hiperproliferación en la periferia de algunos de estos ratones (Papiernik et al. (1998) *Int. Immunol.* 10: 371-78; Salomón et al (2000) *Immunity* 12: 431-40; Kumanogoh et al (2001) *J Immunol.* 166. 353-60).

[0009] Hasta hace poco, la técnica había fallado en determinar los mecanismos involucrados en la supresión mediada por CD4⁺CD25⁺ del sistema inmune, por ejemplo, la especificidad de antígeno, las moléculas involucradas en adquisición de supresión, y las moléculas de superficie de célula o las citoquinas de actuación corta involucradas en la fase efectora de la supresión, los objetivos

149/69

moleculares de las células T CD25⁺ en modular autoinmunidad permanecían largamente desconocidos también. Se ha demostrado ahora, al examinar la expresión diferencial de genes a través del uso de análisis "chip" de gen sobre células T CD4⁺CD25⁺ y T CD4⁺CD25⁻, que varios genes diferenciales CD25⁺ existen (McHugh et al (2002) *Immunity* 16: 311-23; ver también Solicitud de Patente U.S. 10/194,754, incorporada aquí como referencia en su totalidad) Estos genes, que determinaron ser preferencialmente expresados sobre las células T CD4⁺CD25⁺, pueden servir como objetivos para intervención terapéutica y seleccionar métodos para desórdenes autoinmunes, de enfermedades inflamatorias y rechazo de transplante, así como también para enfermedades de cáncer e infecciosas.

[0010] Significativamente, uno de los genes determinados a ser diferencialmente expresado en células CD25⁺ es un receptor TNF inducido por glucocorticoide (GITR) (McHugh et al., *supra*). El GITR, un receptor de proteína transmembrana de superficie celular, es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis de tumor (TNFR). El GITR había demostrado estar constitutivamente presente en células T no activadas (Gavin et al. (2002) *Nat. Immunol.* 3: 33-41; McHugh et al., *supra*, Shimizu et al. (2002) *Nat. Immunol.* 3: 135-42). El GITR se une a otra proteína de transmembrana denominada como el ligando GITR (GITRL) Los anticuerpos agonistas al GITR han mostrado abrogarse la actividad supresora de las células T CD4⁺CD25⁺, demostrando un papel funcional para el GITR en regular las actividades de estas células (McHugh et al, *supra*) Otro estudio confirmó que la estimulación del GITR con un anticuerpo monoclonal específico se abrogó la supresión mediada por célula T CD4⁺CD25⁺, induciendo de esta manera autoinmunidad (Shimizu et al, *supra*) Estos estudios habían conducido a la propuesta de que el GITR es un fiel

marcador de células T CD4⁺CD25⁺ (Uraushihara et al (2003) *J Immunol.* 171: 708-16), sin embargo, la expresión GITR sola no distingue exclusivamente este subconjunto, como completador de regulación de GITR también ocurre luego de la activación de las células T CD4⁺CD25⁻ (McHugh et al., *supra*; Shimizu et al., *supra*)

[0011] En razón a que el GITR ha mostrado ser importante en la regulación de la actividad supresora de las células T CD4⁺CD25⁺ sobre las células T CD4⁺CD25⁻, es deseable identificar y caracterizar moléculas novedosas que interactúen con el GITR. Tales moléculas novedosas que interactúan con el GITR se describen aquí. Adicionalmente, se suministran los moduladores de estas moléculas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0012] La presente invención suministra las secuencias de nucleótido y de aminoácido de un homólogo de ratón novedoso de GITRL humano. La presente invención también suministra anticuerpos de GITRL de ratón. La presente invención también suministra métodos tanto de supresión inmune inversa al inducir la unión GITR-GITRL agonista, y reestablecer o mejorar la supresión inmune mediante unión de GITR-GITRL antagonista, por ejemplo, a través del uso de anticuerpos neutralizantes que inhiben la actividad GITRL (por ejemplo, que bloquean la interacción entre GITR y GITRL). Tal reversión, restauración/mejoramiento, de la supresión inmune es benéfica en el tratamiento de desórdenes variados dando como resultado respuestas inmunes desreguladas, tal como desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias y rechazo de transplante, y enfermedades de cáncer e infecciosas. Los métodos de la presente

invención están dirigidos a la manipulación del GITRL y el GITR, que incluye, pero no está limitado a, GITRL y GITR de ratón y sus homólogos, específicamente incluidos entre estos homólogos está el GITRL de humano y el GITR de humano.

[0013] La presente invención suministra polinucleótidos y polipéptidos aislados y purificados relacionados con un ligando novedoso para GITR (GITRL). La invención también suministra anticuerpos para GITRL, así como también métodos para tratar, diagnosticar, pronosticar, y monitorear el progreso de desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, y rechazo de transplante, y enfermedades de cáncer e infecciosas. En una modalidad de la invención, los métodos descritos y las moléculas se pueden utilizar para manipular la consecuencia de una respuesta inmune durante el tratamiento de una enfermedad o desorden, que incluye desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, y rechazo de transplante, así como también enfermedades de cáncer e infecciosas. En otra modalidad, los polinucleótidos y polipéptidos descritos de la invención que bloquean o inhiben la interacción entre GITR y GITRL, por ejemplo al desregular la expresión de la actividad del GITRL o al unirse a GITRL, pero no inducir señalización de GITR, se pueden utilizar para reestablecer o mejorar la supresión del sistema inmune. En otra modalidad, la interacción entre GITR y GITRL se puede bloquear o inhibir mediante una molécula pequeña. Se apreciará por un experto en la técnica que estos tipos de regulación (es decir estas modalidades) serán más benéficas en el tratamiento de desórdenes autoinmunes y algunas enfermedades inflamatorias, y desórdenes similares o relacionados, así como también en el tratamiento de rechazo de transplante. En otra modalidad, los polinucleótidos y los polipéptidos descritos en la invención que inducen señalización GITR, por ejemplo al completar regulación de la expresión o actividad del GITRL o mediante unión agonista al GITR, se pueden utilizar para invertir,

bloquear, o abrogarse supresión del sistema inmune. En otra modalidad, la interacción entre el GITR y el GITRL puede ser mejorada o simulada por una molécula pequeña. Se apreciará por un experto en la técnica que estos tipos de regulación serán más benéficos en el tratamiento de cánceres y enfermedades similares, así como también enfermedades infecciosas. Un experto en la técnica se enteraría de los beneficios probables de combinar estas terapias novedosas con terapias establecidas y otras terapias.

[0014] En una modalidad la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o ID DE SEC NO: 3. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico está operablemente ligada a al menos una secuencia de control de expresión. En otra modalidad, se suministra una célula huésped transformada o transfectada con la molécula de ácido nucleico.

[0015] En otra modalidad, la invención suministra un alelo aislado de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3. En otra modalidad, la invención suministra un gen aislado que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 3.

[0016] En otra modalidad, la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que se hibridiza específicamente bajo condiciones altamente restrictivas a la secuencia de nucleótido establecida en la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3, o al complemento de ésta.

[0017] En otra modalidad, la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 2, a un fragmento de ésta que codifica un

fragmento activo de la proteína. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico, o el fragmento de ésta, está operablemente ligado a al menos una secuencia de control de expresión. En otra modalidad, se suministra una célula huésped transformada o transfectada con la molécula de ácido nucleico aislada, o el fragmento de ésta, operablemente ligado a al menos una secuencia de control de expresión. En otra modalidad, la invención suministra un animal transgénico no humano en el cual en células somáticas y germinales contienen la molécula de ácido nucleico aislada, o un fragmento de ésta. En otra modalidad, la invención suministra un animal transgénico no humano en el cual las células somáticas y germinales contienen ADN que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3.

[0018] En otra modalidad, la invención suministra una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido codificada mediante un ácido nucleico aislado que específicamente se hibridiza bajo condiciones altamente restrictivas a la secuencia de nucleótido establecida en la ID DE SEC NO. 1 o la ID DE SEC NO: 3, a la secuencia de nucleótidos establecida en la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3, o el complemento de ésta. En otra modalidad, la invención suministra una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 2, o un fragmento activo de ésta.

[0019] En otra modalidad, la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO 3, o un fragmento de ésta, en donde la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula da como resultado la disminución de producción del GITRL. En otra modalidad, la molécula de ácido nucleico, o un fragmento de ésta, está

operablemente ligada a al menos una secuencia de control de expresión. En otra modalidad, se suministra una célula huésped transformada o transfectada con la molécula de ácido nucleico aislada, o fragmento de ésta, operablemente ligada a al menos una secuencia de control de expresión. En otra modalidad, la invención suministra un animal transgénico no humano en el cual la célula somática y germinal contiene la molécula de ácido nucleico aislada, o fragmento de ésta.

[0020] En otra modalidad, la invención suministra un oligonucleótido antisentido complementario al mRNA que corresponde a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3, o un fragmento de ésta, en donde el oligonucleótido inhibe la expresión del GITRL. En otra modalidad, la invención suministra una molécula de siARN que corresponde a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3, o un fragmento de ésta, en donde la molécula de siARN inhibe la expresión del GITRL.

[0021] En otra modalidad, la invención suministra un anticuerpo aislado capaz de unirse específicamente a una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido codificada mediante un ácido nucleico aislado que se hibridiza específicamente bajo condiciones altamente restrictivas a la secuencia de nucleótido establecida en la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3; o el complemento a ésta. En otra modalidad, el anticuerpo neutraliza la actividad GITRL. En otra modalidad, el anticuerpo es 5F1, que tiene un número ATCC PTA-5336, o 10F12, que tiene el número ATCC PTA-5337. En otra modalidad, el anticuerpo comprende los fragmentos que se unen a antígeno de la 5F1 o 10F12. En otra modalidad, la invención suministra un anticuerpo aislado capaz de unirse específicamente a una proteína aislada que comprende la secuencia de

165
166

aminoácido de la ID DE SEC NO: 2, o un fragmento activo de ésta. En otra modalidad, el anticuerpo neutraliza la actividad GITRL. En otra modalidad, el anticuerpo es 5F1, que tiene número ATCC PTA-5336, o 10F12, que tiene el número ATCC PTA-5337. En otra modalidad, el anticuerpo comprende los fragmentos que se unen a antígeno del 5F1 y el 10F12.

[0022] En otra modalidad, la invención suministra un método para seleccionar los compuestos de ensayo capaces de inhibir o bloquear la interacción del GITRL con el GTR que comprende las etapas de poner en contacto una muestra que contiene GITRL y GTR con un compuesto de ensayo y determinar si la interacción del GITRL con el GTR en la muestra se disminuye con relación a la interacción del GITRL con GTR en una muestra no contactada con el compuesto, por medio del cual una disminución en la interacción del GITRL con el GTR en la muestra contactada con el compuesto identifica el compuesto como aquel que inhibe o bloquea la interacción del GITRL con el GTR. En otra modalidad, el compuesto identificado se utiliza en un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de trasplante, el método comprende las etapas de aislar las células T del sujeto, tratando las células T aisladas con el compuesto identificado, y transferir las células T tratadas de regreso al sujeto. En otra modalidad, el compuesto identificado se utiliza en un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de trasplante, el método comprende administrar al sujeto el compuesto identificado. En otra modalidad, la invención suministra un método para evaluar la eficacia del compuesto identificado en un sujeto que comprende las etapas de detectar un primer número de células T efectoras del sujeto antes de la administración del compuesto al sujeto, detectar un segundo número de células T

166
167

efectoras del sujeto después de la administración del compuesto al sujeto, y comparar el primer número y el segundo número, por medio de lo cual una disminución significativa en el número de células T efectoras en el segundo número comparado con el primer número indica que el compuesto es eficaz para tratar un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de trasplante en el sujeto. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.

[0023] En otra modalidad, la invención suministra un método para seleccionar los compuestos de ensayo capaces de mejorar o simular la interacción del GITRL con GTR que comprende las etapas de poner en contacto una muestra que contiene GITRL con GTR con un compuesto de ensayo y determinar si la interacción del GITRL con GTR en la muestra se incrementa con relación a la interacción del GITRL con el GTR en una muestra no puesta en contacto con el compuesto, por medio de lo cual un incremento en la interacción del GITRL con el GTR en la muestra puesta en contacto con el compuesto identifica el compuesto como aquel que mejora o simula la interacción del GITRL con el GTR. En otra modalidad, el compuesto identificado se utiliza en un método para tratar a un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, una enfermedad de cáncer o infecciosa, el método comprende las etapas de aislar las células T del sujeto, tratar las células T aisladas con el compuesto identificado, y transferir las células T tratadas de regreso al sujeto. En otra modalidad, el compuesto identificado se utiliza en un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, cáncer o una enfermedad infecciosa, el método comprende administrarle al sujeto el compuesto identificado. En otra modalidad, la invención suministra un método para evaluar la eficacia del compuesto identificado en un sujeto que comprende las etapas de detectar un primer número de células T efectoras del sujeto antes de la

167
169

administración del compuesto al sujeto, detectar un segundo número de células T efectoras del sujeto después de la administración del compuesto al sujeto y comparar el primer número y el segundo número, por medio del cual un incremento significativo en el número de las células T efectoras en el segundo número comparado con el primer número indica que el compuesto es eficaz para tratar cáncer o enfermedad infecciosa en el sujeto. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.

[0024] En otra modalidad, la invención suministra un método para diagnosticar un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de transplante en un sujeto que comprende las etapas de detectar una cantidad de ensayo de un producto de gen GITRL en una muestra del sujeto, y comparar la cantidad de ensayo con una cantidad normal del producto del gen GITRL en una muestra de control, por medio de lo cual una cantidad de ensayo significativamente por encima de la cantidad normal suministra una indicación positiva en el diagnóstico de un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de transplante. En otra modalidad, la invención suministra un método para diagnosticar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende las etapas de detectar una cantidad de ensayo de un producto de gen GITRL en una muestra del sujeto, y comparar la cantidad de ensayo con una cantidad normal del producto del gen GITRL en una muestra de control, por medio de lo cual una cantidad de ensayo significativamente inferior a la cantidad normal suministra una indicación positiva en el diagnóstico de cáncer o enfermedad infecciosa.

[0025] En otra modalidad, la invención suministra un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, un desorden autoinmune, enfermedad

inflamatoria, o un rechazo de trasplante que comprende administrar al sujeto un antagonista GTR. En otra modalidad, el método comprende administrar el antagonista GTR de tal forma que la susceptibilidad de las células T efectoras en el sujeto a supresión mediante células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ se mantenga (por ejemplo, en una cantidad efectiva para mantener tal susceptibilidad). En otra modalidad, el antagonista GTR se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GTR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GTR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL. En otra modalidad, el desorden autoinmune o la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste de artritis reumatoide, encefalomiелitis, osteoartritis, esclerosis múltiple, gastritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis y otras dermatosis inflamatorias, diabetes tipo I, asma, alergia, y enfermedades inflamatorias del intestino, que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

[0026] En otra modalidad, la invención suministra un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, cáncer o una enfermedad infecciosa que comprende administrar al sujeto un agonista GTR. En otra modalidad, el método comprende administrar el agonista GTR tal que el agonista GTR suministre una señal coestimuladora a las células T efectoras en el sujeto y las haga menos susceptibles a supresión mediante células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ en el sujeto (por ejemplo en una cantidad efectiva para suministrar tal señal) En otra modalidad, el agonista GTR se selecciona del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una

168/20

proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, y un anticuerpo GTR agonista

[0027] En otra modalidad, la invención suministra un método para inducir la proliferación de una población de células que contienen células T efectoras que comprende administrar un agonista GTR a la población de células. En otra modalidad, el agonista GTR se selecciona del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, y un anticuerpo GTR agonista. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ y células T CD8⁺.

[0028] En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la proliferación de una población de células que contiene células T efectoras que comprende administrar un antagonista GTR a la población de células. En otra modalidad, el antagonista GTR se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GTR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GTR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺. En otra modalidad, el antagonista GTR es 5F1 o 10F12.

[0029] En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir o bloquear la supresión de una población de células que comprende células T efectoras en la presencia de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ que comprende administrar un agonista GTR a la población de células. En otra modalidad, el

121
AD

método comprende administrar al agonista GITR de tal forma que el agonista GITR suministre una señal coestimuladora a las células T efectoras y las haga menos susceptibles a la supresión mediante células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (por ejemplo en una cantidad efectiva para suministrar tal señal). En otra modalidad, el agonista GITR se selecciona del grupo, que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, o una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, y un anticuerpo GITR agonista. En otra modalidad, las células efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.

[0030] En otra modalidad, la invención suministra un método para suprimir una población de células que comprende células T efectoras en la presencia de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ que comprende administrar un antagonista GITR a la población de células. En otra modalidad, el método comprende administrar el antagonista GITR de tal forma que la susceptibilidad de las células T efectoras a la supresión mediante las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se mantenga (por ejemplo, en una cantidad efectiva para mantener tal susceptibilidad). En otra modalidad, el antagonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GITR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GITR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺. En otra modalidad, el antagonista GITR es 5F1 o 10F12.

2/172

[0031] En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la expresión del GITRL en una población de células que comprende tratar la población de células con una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO. 3, o un fragmento de estos, en donde la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula da como resultado la producción disminuida de GITRL. En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la expresión del GITRL en una población de células que comprende tratar la población de células con un oligonucleótido antisentido complementario a un mRNA que corresponde a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3, o un fragmento de estas, en donde el oligonucleótido inhibe la expresión del GITRL.

[0032] En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la expresión del GITRL en una población celular que comprende tratar la población celular con una molécula de siARN objetivo a un mRNA que corresponde a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO. 1 o la ID DE SEC NO: 3. En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la expresión del GITRL en una población de célula que comprende tratar la población de células con una molécula de siARN objetivo a un mRNA que corresponde a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3.

[0033] En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la expresión del GITRL en una población de células que comprende tratar la

población de células con un oligonucleótido antisentido a una molécula de ácido nucleico que codifica GITRL. En otra modalidad, la invención suministra un método para inhibir la expresión del GITRL en una población de células que comprende tratar la población de células con una molécula de siARN objetivo a un mRNA que codifica el GITRL.

[0034] En otra modalidad, la invención suministra un método para inducir la expresión del GITRL en una población de células que comprende tratar la población de células al transformar o transfectar la población de células con una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o la ID DE SEC NO: 3, o con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO 2, o un fragmento de ésta que codifica un fragmento activo de la proteína, en donde la molécula de ácido nucleico está operablemente ligada a al menos una secuencia de control de expresión

[0035] En otra modalidad, la invención suministra una población de células T efectoras que ha sido contactada *in vitro* o *ex vivo* con un agonista GATR. En otra modalidad, el agonista GATR se selecciona del grupo que consiste de GITRL, o un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GATR agonista. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.

[0036] En otra modalidad, la invención suministra un método para tratar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto, el método comprende las etapas de obtener una población de células T efectoras, tratar la población con un

agonista GITR, y administrar la población tratada al sujeto afligido con cáncer o enfermedad infecciosa. En otra modalidad, el agonista GITR se selecciona del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista. En otra modalidad, el sujeto está afligido con cáncer y la población tratada es utilizada como una vacuna tumoral.

[0037] En otra modalidad, la invención suministra una composición farmacéutica que comprende un GITR agonista y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, el agonista GITR se selecciona del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista.

[0038] En otra modalidad, la invención suministra una composición farmacéutica que comprende un antagonista GITR y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, el antagonista GITR se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GITR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GITR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL. En otra modalidad, el anticuerpo comprende los fragmentos de unión de antígeno del 5F1 o 10F12.

[0039] En otra modalidad, la invención suministra una vacuna adyuvante que comprende un agonista GITR y un antígeno seleccionado del grupo que

consiste de un antígeno viral, un antígeno bacterial, un antígeno fungoso, un antígeno parasitario, un antígeno de cáncer, un antígeno asociado con tumor, y fragmentos de estos. En otra modalidad, el agonista GTR se selecciona del grupo que consiste de GITRL, o un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GITRL agonista.

[0040] En otra modalidad, la invención suministra un adyuvante de vacuna que comprende un antagonista GTR y un antígeno seleccionado del grupo que consiste de un antígeno, una proteína de péptido amiloide, un aloantígeno, un antígeno de trasplante, un alérgeno, y fragmentos de estos. En otra modalidad, el antagonista GTR se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GTR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GTR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL. En otra modalidad, el anticuerpo comprende los fragmentos que se unen a antígeno del 5F1 o 10F12.

[0041] En otra modalidad, la invención suministra el método de seleccionar los compuestos de ensayo capaces de neutralizar la actividad GITRL que comprende las etapas de poner en contacto la muestra que contiene GITRL y neutralizar el anticuerpo con el compuesto, y determinar si la interacción del GITRL con el anticuerpo neutralizante en la muestra se disminuye con relación a la interacción del GITRL con el anticuerpo neutralizante en una muestra no puesta en contacto con el compuesto, por medio de lo cual una disminución en la interacción del GITRL con el anticuerpo de neutralización en la muestra puesta en contacto con el compuesto identifica el compuesto como aquel que inhibe o

bloquea la interacción del GITRL con el anticuerpo neutralizante. En otra modalidad, el anticuerpo es 5F1 o 10F12

[0042] En otra modalidad, la invención suministra un método para proporcionar una señal coestimuladora a una población de células que comprenden células T efectoras, el método comprende administrar un agonista GATR. En otra modalidad, el agonista GATR es una proteína seleccionada del grupo que consiste de GITRL, o un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GATR, y un anticuerpo anti-GATR agonista. En otra modalidad, las células T efectoras son células T CD4⁺ o células CD8⁺.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0043] La Figura 1 muestra una alineación (basada en una matriz de sustitución de aminoácido BLOSUM62; ver Henikoff y Henikoff (1992) *Procesamiento. Natl. Acad. Sci USA* 89. 10915-19) de las secuencias de aminoácido para GITRL humano (h) y de ratón (m)

[0044] La Figura 2 muestra los resultados de los experimentos sobre los efectos de la unión del GITRL.GATR sobre la proliferación de células T CD4⁺CD25⁺. La incorporación de la timidina es medida (CPM) como medios para evaluar la proliferación celular. La Figura 2A muestra que el anticuerpo anti-GATR antagonista estimuló la proliferación de células T CD4⁺CD25⁺, pero no células T CD4⁺CD25⁻. La Figura 2B muestra que las células YB2/O que expresan GITRL estimularon la proliferación de células CD4⁺CD25⁺.

[0045] La Figura 3A muestra un GITRL expresado mediante células YB2/0 (~50,000), así como también un anticuerpo anti-GITR agonista (2 µg/ml), reversada la supresión (es decir, la supresión porcentual negativa) producida mediante células T supresoras CD4⁺CD25⁺ recientemente aisladas (# supresores). La Figura 3B muestra las células GITRL-YB2/0 en números menores de 50.000 (es decir, ~3.000-25.000) fueron capaces de reversar parcialmente la supresión de manera dependiente de dosis.

[0046] La Figura 4 muestra que las células GITRL-YB2/0 (~50 000) no reversaron la supresión cuando las células T CD4⁺CD25⁺ activadas fueron utilizadas en lugar de células T CD4⁺CD25⁺ recientemente aisladas; similares resultados fueron obtenidos con anticuerpo anti-GITR agonista

[0047] Las Figuras 5A y 5B muestran que la reversión inducida por GITRL de la supresión producida por células T CD4⁺CD25⁺ recientemente aisladas puede en sí misma ser reversada (es decir, restauración de la supresión) en la presencia de anticuerpo anti-GITRL ("anti-GITRL"=anticuerpo 5F1). La Figura 5B incluye un experimento adicional que muestra que el anticuerpo de control ("control Ig") no restablece la supresión.

[0048] La Figura 6 muestra que el anticuerpo anti-GITRL puede solo mejorar la supresión en la presencia de células T CD4⁺CD25⁺. La Figura 6A muestra la supresión de la proliferación de células de nodo linfáticas en la presencia de anticuerpo anti-GITRL (5F1). La Figura 6B muestra la falta de actividad supresora del anticuerpo anti-GITRL cuando la población de células de nodo linfáticas fue vaciada de células T CD4⁺CD25⁺

[0049] La Figura 7 muestra la distribución de células que expresan GITRL en tejidos linfoides. Figura 7A: El análisis citométrico de flujo fue desarrollado en células CD11c⁺, enriquecidas del bazo de ratones BALB/c con glóbulos magnéticos, al teñir con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8 y anti-GITRL. La expresión GITRL se determinó al comparar la intensidad de fluorescencia de los subconjuntos con puertas CD4⁺, CD8⁺, y CD4⁻CD8⁻ (paneles de histograma superior, medio, e inferior, respectivamente) teñidos con un anticuerpo anti-GITRL (histogramas llenos) a la intensidad de fluorescencia de estas células teñidas con un anticuerpo de control de isótopo (histogramas no llenos). La Figura 7B: La expresión del GITRL mediante células dendríticas esplénicas (DCs) y células B B-1 se determinó al teñir DCs esplénicas BALB/c CD11c⁺ recientemente aisladas (panel de histograma superior) y DCs de plasmacitoide CD11c^{bajo}B220⁺ (panel de histograma bajo) con mAb anti-GITRL (histogramas llenos) o un anticuerpo de control de isótopo (histogramas no llenos) y desarrollar análisis citométrico de flujo. La Figura 7C (panel de histograma superior): Las intensidades de fluorescencia de las células B B220⁺ entre los esplenocitos totales (histograma lleno), y las células B B-1 peritoneales de puerta CD11b⁺B220⁺ (perC) (histograma no lleno de línea sólida) teñidas con anticuerpo anti-GITRL fueron comparadas con la intensidad de fluorescencia de células teñidas con un control de isótopo (histograma no lleno de línea discontinua). La Figura 7C (panel de histograma de fondo): Se muestra una comparación de la intensidad de fluorescencia de macrófagos perC (células CD11b⁺B220⁻) teñidos por anticuerpo GITRL (histograma lleno) y teñidos por anticuerpo isótopo (histograma no lleno). La Figura 7D. Los timocitos fueron teñidos para expresión de CD4, CD8, y cualquier GITRL o un control isótopo. Las intensidades de fluorescencia de las células CD4⁺CD8⁻ (cuadrante superior izquierdo), CD4⁺CD8⁺ (cuadrante superior derecho) y CD4⁻CD8⁺ (cuadrante inferior derecho) teñidas con un anticuerpo anti-GITRL

(histograma lleno) se comparó con las intensidades de fluorescencia de las células teñidas con un anticuerpo de control isótopo (histograma no lleno). Figura 7E: Expresión de GITRL mediante precursores tímicos $CD44^+CD25^-$ (R1), $CD44^+CD25^+$ (R2), $CD44^-CD25^+$ (R3), $CD44^-CD25^-$ (R4) de puerta se determinó al comparar la fluorescencia de estas células teñidas con un anticuerpo anti-GITRL (histograma lleno) con la fluorescencia de estas células teñidas con un anticuerpo de control de isótopo (histograma no lleno) Figura 7F: Las células de nodo linfático no estimuladas fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 y/o anti-GITRL. Las células $CD4^+CD8^-$ (cuadrante superior izquierdo) y las células $CD4^-CD8^+$ (cuadrante inferior derecho), se delinearon adicionalmente con respecto a la expresión de CD25 mediante estas células. La expresión de GITRL mediante células de nodo linfático de puerta $CD4^+CD8^-CD25^-$ (panel de histograma superior derecho), $CD4^+CD8^-CD25^+$ (panel de histograma inferior derecho) o $CD4^-CD8^+$ (panel de histograma inferior (medio)) se determinó al comparar la intensidad de fluorescencia de estas células teñidas con anticuerpo anti-GITRL (histogramas llenos) con la fluorescencia de estas células teñidas con un anticuerpo de control de isótopo (histogramas no llenos). Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

[0050] La Figura 8 muestra subregulación mediante APCs de GITRL luego de estimulación. Figura 8A La expresión de GITRL mediante células B B220⁺ esplénicas purificadas o células B B220⁺CD11b⁺ B-1 peritoneales totales (perC) se determinó para diferentes puntos de tiempo luego de tratamientos con fragmentos poli I:C (10 µg/ml), LPS (0,5 µg/ml), CPPS (OND 1826, 1 µM), anti-CD40 e IL-4 (10 µg/ml y 20 ng/ml, respectivamente) y anti-IgM (fragmento F(ab')₂ de cadena-µ de anti-IgM de cabra, 1 µg/ml). Son presentadas las intensidades de fluorescencia de las células estimuladas teñidas con anti-GITRL (histogramas llenos), células no

estimuladas teñidas anti-GITRL (medio) (histogramas no llenos con línea sólida) y células teñidas de anticuerpo de control isótopo (histogramas no llenos línea punteada). Figura 8B: La expresión de GITRL mediante células B B220⁺ (histogramas llenos) presenta entre los esplenocitos totales tratados con anti-CD3 mAb (0,5µg/ml) después de un periodo de cultivo de 48 horas comparado con la expresión de GITRL mediante células B B220⁺ no estimuladas (histograma no lleno línea sólida) y células B B220⁺ teñidas con un anticuerpo de control de isótopo (histograma no lleno línea punteada). Figura 8C: La expresión de GITRL (paneles de histograma superiores) y B7.2 (es decir, CD86) (paneles de histograma inferiores) mediante DCs CD11c⁺ purificado luego de cultivo con o sin LPS (0,5µg/ml) en los puntos de tiempo indicados. Figura 8D. La expresión de GITRL mediante esplenocitos totales con puerta sobre células que expresan CD4⁺ o CD8⁺ después de un periodo de cultivo de 48 horas en ausencia o presencia de anti-CD3 mAb soluble (0,5 µg/ml). Las gráficas son representativas de dos a cuatro experimentos independientes; todos los experimentos fueron llevados a cabo con tejidos aislados de ratones BALB/c.

[0051] La Figura 9 demuestra los efectos de bloqueo de las interacciones GITR/GITRL sobre la inhibición de proliferación de linfocito. Para las Figuras 9A y 9B, las barras indican los valores s.d. Figura 9A: Proliferación (eje y) de nodo linfático (LN; 1×10^5) y células de bazo (Sp; $0,5 \times 10^5$) con o sin células CD25⁺ (Total o $\Delta 25$, respectivamente) se determinó después de un cultivo de 72 horas con diferentes concentraciones de anti-CD3 (eje x) soluble. Las células fueron incubadas en la presencia de anti-GITRL purificado mAb (10µg/ml; círculos cerrados) o un control isótopo IgG2_a de rata (10 µg/ml, círculos abiertos). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Figura 9B Las células T CD4⁺CD25⁻ o CD8⁺ fueron cultivadas en la presencia de 5×10^4 APCs

T-vaciados irradiados (3 000R) y 5×10^4 células YB2/0-GITRL (8000R) irradiadas (círculos abiertos) o células YB2/0 de control (círculos cerrados). Los cultivos fueron activados con diferentes concentraciones de anti-CD3 mAb soluble (eje x), y proliferación (eje y) medidos después de un periodo de cultivo de 72 horas. Figura 9C. Fluorescencia media (eje x) de células T $CD4^+CD25^-$ purificadas teñidas con anticuerpo anti-GITR determinadas en puntos de tiempo diferentes luego de la activación con anti-CD3 soluble (0,5 $\mu\text{g/ml}$) en la presencia de esplenocitos vaciados de T irradiados (3.000R). Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes

[0052] La Figura 10 demuestra que la expresión GITR mediante células T $CD25^-$ se requiere para supresión inversa. Figura 10A: Proliferación de cocultivos de células T $CD4^+CD25^-$ (5×10^4) de varios ratones mutantes, y miembros variables de células T $CD4^+CD25^+$ (eje x) de varios ratones mutantes [(Aa) $CD4^+CD25^-$: $GITR^{+/+}$, $CD4^+CD25^+$: $GITR^{+/+}$; (Ab) $CD4^+CD25^-$: $GITR^{+/+}$, $CD4^+CD25^+$: $GITR^{-/-}$, (Ac) $CD4^+CD25^-$: $GITR^{-/-}$, $CD4^+CD25^+$: $GITR^{+/+}$, y (Ad) $CD4^+CD25^-$: $GITR^{-/-}$, $CD4^+CD25^+$: $GITR^{-/-}$], incubados con APC irradiados de ratones tipo silvestre (5×10^4) y con anti-CD3 soluble (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-GITR (círculos llenos) o un anticuerpo de control isótopo (círculos abiertos) se determinó al medir la toma ^3H -timidina (cpm, eje y). Figura 10B. La proliferación de los cocultivos se desarrolló como en la parte anterior (Fig. 10A) con números variables de células T $CD4^+CD25^+$ de ratón (eje x) y células T $CD4^+CD25^-$ de ratón (Ba) o células T $CD4^+CD25^-$ de rata (Bb) en la presencia de APCs de rata irradiada (3.000R) Los cultivos fueron estimulados con un cóctel de anticuerpos tanto contra anti-CD3 de rata y ratón (0,25 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno), y se trataron con 2 $\mu\text{g/ml}$ de cualquiera de un control de isótopo (IgG de rata; círculos abiertos) o anticuerpo anti-GITR (DTA-1; círculos llenos). Las barras indicaron que los valores s.d.

72182

calculados de la proliferación en cultivos triplicados. Figura 10C: Se describe fluorescencia (eje x) de células T $CD4^+CD25^+$ de ratón (paneles superiores) y $CD4^+CD25^-$ de rata (paneles inferiores) teñidas con CFSE cocultivadas en una proporción 1:8 de supresor a respondedor con control de isótopo (IgG de rata, paneles izquierdos) o anticuerpo anti-GITR (DTA-1, paneles derechos) Los subconjuntos de célula T de ratón y de rata se distinguieron al teñir con anticuerpos anti-CD4 específicos. Los resultados son representativos de dos a cuatro experimentos independientes.

[0053] La Figura 11 demuestra que las señales GITR se requieren para solucionar la supresión mediada mediante células T reguladoras endógenas. Figura 11A: Células de nodo linfático (LN) marcado CFSE (5×10^4) de ratones B6 (tipo silvestre), $GITR^{+/+}$, $CD28^{-/-}$ y $GITR^{-/-}$ se cultivaron durante 72 horas con diferente concentración de anti-CD3 mAb (eje x) soluble. Las células LN totales se cultivaron sin (Aa) o con (Ac) exógeno de IL-2 (50 U/ml). Las células LN vaciadas de células $CD25^+$ ($LN\Delta 25$) se cultivaron sin (Ab) o con (Ad) exógeno de IL-2 (50U/ml). Las barras que indican los valores s.d. se omitieron por claridad. Figura 11B: Evaluación citométrica de flujo de la dilución CFSE mediante células T de nodo linfático con puerta $CD4^+$ y $CD8^+$ aisladas de animales $CD28^{-/-}$, $GITR^{-/-}$, $GITR^{+/+}$ o $GITR^{+/-}$ desarrolladas después de un cultivo de 72 horas. Los resultados corresponden a la concentración de $0,63 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 soluble (como en la Fig. 11A). Figura 11C. Análisis citométrico de flujo de expresión CD25 se desarrolló sobre células $CD4^+CD25^-$ positivas H-2D^b que permanecieron no estimuladas (histogramas no llenos línea discontinua), se obtuvieron de ratones $GITR^{-/-}$ (histogramas no llenos línea sólida), o se obtuvieron de ratones $GITR^{+/+}$ (histogramas llenos). La expresión CD25 mediante las células $CD4^+CD25^-$ se obtuvieron de ratones $GITR^{-/-}$ o $GITR^{+/+}$ se determinaron después de un cultivo de

24 horas con APCs LN provenientes de ratones tipo silvestre, en la presencia de anti-CD3 (0,5µg/ml), y en la ausencia (paneles de histograma izquierdo) o presencia (paneles de histograma derecho) de células CD4⁺CD25⁺ de ratones BALB/c con una proporción 1:2 de supresor a respondedor. La expresión de CD25 también se determinó en la ausencia (paneles histograma superior) o presencia (paneles histograma inferior) de 50U/ml de rhIL-2. Los resultados anteriores son representativos de tres experimentos independientes.

[0054] La Figura 12 demuestra que la coestimulación dependiente de CD28 mejora la expresión GITR y la respuesta. Figura 12A: Análisis citométrico de flujo de la expresión GITR mediante células T CD4⁺CD25⁻ o CD8⁺ purificadas ($2,5 \times 10^4$) después de un cultivo de 72 horas con un anti-CD3 unido a placa y 2µg/ml de cualquier isótopo hámster unido a placa ("aCD3") o anti-CD28 unido a placa ("aCD3+aCD28"). Figura 12B (panel de histograma izquierdo). Anti-GITR que tiñe las células T CD4⁺CD25⁻ cultivadas en la presencia de esplenocitos vaciados de células T irradiadas y anti-CD3 soluble (0,5µg/ml) con o sin un cóctel de anticuerpos anti-CD80/86 (10 µg/ml de cada uno) (es decir, anticuerpos anti-B7.1/7.2) durante 72 horas. Figura 12B (panel de histograma derecho): Anti-GITR que tiñe las células T CD4⁺CD25⁻ cultivadas en la presencia de esplenocitos vaciados de células T irradiadas y anti-CD3 soluble (0,5µg/ml) con o sin un cóctel de anticuerpos contra IL-2 e IL-2Rα. Figura 12C: La proliferación fue evaluada en la presencia o ausencia de anti-CD80/86 mAbs (10 µg/ml de cada uno, "aB7") con la adición de anti-GITR mAb (2 µg/ml; "DTA-1") o un anticuerpo de control isótopo (2µg/ml, "IgG de rata"). Las barras indicaron los valores s.d. Los resultados son representativos de dos a tres experimentos independientes.

[0055] La Figura 13 demuestra que el GITRL que se une a GITR suministra una señal de coestimulación para las células T efectoras. Figura 13A: Proliferación de las células T GITR⁺/TCR⁺ HT-2 efectoras (4×10^4) solas (barras blancas) o cocultivadas con 1×10^4 células YB2/0 de control (barras sombreadas cruzadas) o células YB2/0 que expresan GITRL (barras llenas), en ausencia o presencia de uno o dos glóbulos anti-CD3 por células HT-2, se determinó al medir la toma de ^3H -timidina (cpm; eje y). Figura 13B: Proliferación de células 4×10^4 HT-2 cocultivadas con dos glóbulos anti-CD3 por célula, 1×10^4 células YB2/0 que expresan GITRL, y concentraciones crecientes (ng/ml; eje x) de un anticuerpo anti-GITRL (5F1.1; círculos llenos) o un anticuerpo de control isótopo (rlgG1; círculos abiertos) se determinó al medir la toma de ^3H -timidina (cpm, eje y). Figura 13C: Proliferación de 4×10^4 células HT-2 cocultivadas con dos glóbulos anti-CD3 por célula, 1×10^4 células YB2/0 que expresan GITRL, y concentraciones crecientes (ng/ml; eje x) de cuatro diferentes anticuerpos anti-GITRL: 5F1.1 (círculos llenos), MGLT-10 (cuadrados llenos), MGTL-15 (cuadrados abiertos) o un anticuerpo policlonal (círculos abiertos) se determinó al medir la toma de ^3H -timidina (cpm, eje y).

[0056] La Figura 14 demuestra que bloquear la unión GITR-GITRL con un anticuerpo anti-GITRL evita la transferencia adoptiva de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) inducida por PLP. La incidencia del EAE en ratones se evaluó. Los ratones se inyectaron con 5×10^6 esplenocitos que fueron aislados de ratones SLJ hembras inmunizadas con 150 μg de péptido PLP y reestimuladas *ex vivo* durante 3 días en tres diferentes condiciones: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PLP solo (círculos abiertos), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PLP y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un anticuerpo de control isótopo (CKO1; círculos llenos), o 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PLP y un anticuerpo anti-GITRL (5F1.1; cuadrados llenos). La incidencia del EAE se monitoreó durante 52 días (eje x) y se calificó sobre una escala de 0 a 5 (eje y).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0057] Como los anticuerpos del GITR que producen una inversión de la actividad supresora parecen producir una señal agonista, se predijo que el acoplamiento del GITR por el GITRL también debe inhibir la actividad supresora de las células T reguladoras. La falta de reactivos adecuados previamente precluyó un análisis funcional detallado de las interacciones GITR/GITRL bajo más condiciones fisiológicas. Aquí, el ortólogo de ratón de GITRL ha sido identificado, y los anticuerpos antagonistas que se unen específicamente al ortólogo de ratón de GITRL, es decir, sin reacción cruzada con GITRL humano, han sido generados.

[0058] Utilizando este reactivo, se examinó la distribución de tejido y la regulación del GITRL. Además, la capacidad de las interacciones GITR/GITRL para regular la supresión de células T se investigó utilizando ratones *GITR*^{-/-}. Ambas células T CD25⁻ y CD25⁺ expresan GITR, no obstante variar grados, los estudios previos que demuestran una inhibición de la función supresora luego de tratamiento de cocultivo con un anticuerpo anti-GITR agonista produjeron resultados equívocos con relación al objetivo celular del acoplamiento de GITR. Aquí, utilizando combinaciones de células T CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ del tipo silvestre con ratones *GITR*^{-/-} en experimentos de cocultivo, se encontró que la ligación del GITR sobre las células T respondedoras CD4⁺CD25⁻, no las células T supresoras CD4⁺CD25⁺, se requerían para abrogar supresión. En la presencia de células T CD4⁺CD25⁺, las células *GITR*^{-/-} montaron respuestas proliferativas similares a aquellas de animales tipo silvestre, aunque ellas fueron totalmente suprimidas en la presencia de números fisiológicos de células T CD4⁺CD25⁺. Estos resultados sugirieron, por primera vez, que el acoplamiento GITR/GITRL

suministra una señal previamente indefinida que hace que las células T efectoras resistan los efectos inhibitorios de las células T CD4⁺CD25⁺. Así, la subregulación de la expresión del GITRL posterior a las señales inflamatorias secundarias puede facilitar la supresión mediada por CD4⁺CD25⁺ y evitar las consecuencias de deletéreas de una respuesta celular efectora exuberante.

[0059] Esta investigación arrojó nueva luz sobre el mecanismo subyacente de la interacción del GITR y su ligando, GITRL, especialmente con relación a los efectos sobre las células T CD4⁺CD25⁻, las células adicionalmente entendidas por ser objetivo de actividad supresora. En resumen, utilizando ratones *GITR*^{-/-}, la capacidad de mAb anti-GITR (el anticuerpo de ratón agonista al GITR) de abrogar supresión se demostró por ser mediada por su acción sobre células T CD4⁺CD25⁻, no CD4⁺CD25⁺ (como se ha propuesto previamente en varios estudios). Los APC (células que presentan antígeno) expresan constitutivamente GITRL, que es subregulado luego de señalización del receptor similar a Toll. Aunque las células T CD4⁺CD25⁻ de ratón *GITR*^{-/-} fueron capaces de montar respuestas proliferativas, ellas fueron incapaces de proliferación en la presencia de números fisiológicos de células T CD4⁺CD25⁺. Así, el GITRL suministra una señal importante para células T CD4⁺CD25⁻, y otras células T efectoras (por ejemplo, células T CD8⁺), las hace resistentes a regulación mediada por CD4⁺CD25⁺ en la iniciación de la respuesta inmune. La subregulación del GITRL mediante estímulos inflamatorios puede mejorar la susceptibilidad de las células T efectoras (por ejemplo, células T CD4⁺CD25⁻) a actividad supresora durante el curso de, por ejemplo, cáncer o un ataque infeccioso.

[0060] Para este fin, la presente invención suministra secuencias de nucleótido y aminoácido de un homólogo de ratón novedoso de GITRL humano. El

GITRL humano ha sido identificado (Kwon et al (1999) *J Biol. Chem.* 274: 6056-61, Gurney et al. (1999) *Curr. Biol.* 9: 215-18); además, varios grupos muy recientemente también reportaron la clonación del ligando GATR de murino (Kim et al., 2003; Tone et al., 2003; Yu et al., 2003).

[0061] En un aspecto, la presente invención suministra secuencias de nucleótido, y secuencias de aminoácido, y fragmentos activos y/o proteínas de fusión de estos, de un homólogo de ratón novedoso de GITRL de humano. Los polinucleótidos GITRL de la invención incluyen polinucleótidos que modulan la expresión de GITRL, por ejemplo, vectores de expresión que comprenden polinucleótidos GITRL que pueden completar la regulación de expresión de polinucleótidos GITRL, y/o antisentido y/o ARNi GITRL que subregulan la expresión de GITRL. El uso de tales polinucleótidos para modular la expresión de GITRL en células y/o animales también se suministra. Además de los polipéptidos GITRL, la invención también suministra otros polipéptidos agonistas, por ejemplo, fragmentos activos de GITRL y/o proteínas de fusión GITRL que son capaces de simular GITRL, es decir, inducir actividad GATR en células T efectoras. Las células huésped transformadas y los animales transgénicos que contienen polinucleótidos GITRL también están dentro del alcance de la invención

[0062] En otro aspecto, se suministran anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos GITRL de murino novedoso de la invención (es decir, no se unen al GITRL humano). En particular, se suministran anticuerpos neutralizantes que inhiben la actividad del GITRL (por ejemplo, anticuerpos que evitan al GITRL unirse al GATR); estos anticuerpos se dice que neutralizan la actividad del GITRL (es decir, hacen el GITRL inefectivo). Los anticuerpos neutralizantes de la invención incluyen anticuerpos no humanos y humanos al

182
183

GITRL que inhiben la actividad del GITRL, así como también versiones quimerizadas y/o humanizadas de anticuerpos no humanos de la invención que inhiben la actividad GITRL. También incluidos dentro del alcance de la invención están los anticuerpos antagonistas que pueden tener una o más mutaciones, que pueden funcionar para incrementar la vida media, estabilidad o afinidad del anticuerpo, o pueden funcionar para modificar la función efectora del anticuerpo.

[0063] Otro aspecto de la invención suministra ensayos de selección en los cuales los polinucleótidos y polipéptidos GITRL, que incluyen pero no están limitados a los homólogos de humano de estos, son utilizados para identificar compuestos capaces de modular la actividad del GTR en células, organismos o sujetos. La invención también suministra métodos para evaluar la eficacia de compuestos identificados por medio de los cuales el número de células T en un paciente se determina antes y después de la administración del compuesto identificado. Adicionalmente, la invención suministra métodos para tratar pacientes o sujetos que utilizan los compuestos identificados

[0064] Además de suministrar métodos para seleccionar compuestos de ensayo capaces de modular actividad GTR, por ejemplo, agonistas GTR o antagonistas GTR, la invención suministra métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso de desórdenes relacionados con desregulación del sistema inmune, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias y rechazo de transplante, y cáncer y enfermedades infecciosas

[0065] Los métodos para utilizar el GITRL y las moléculas relacionadas de la invención también son descritas aquí, incluyendo moléculas GTR agonistas (por ejemplo, polinucleótidos GITRL, polipéptidos GITRL, fragmentos activos de

estos y/o proteínas de fusión de estos, moléculas pequeñas agonistas, y anticuerpos GITR agonistas), y moléculas GITR antagonistas (es decir, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, anticuerpos GITR neutralizantes, anticuerpos GITRL neutralizantes, moléculas pequeñas antagonistas, y proteínas de fusión GITR), para el tratamiento terapéutico de desórdenes relacionados con la desregulación del sistema inmune. Por ejemplo, se suministran los métodos para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, un desorden autoinmune, rechazo de transplante, y/o enfermedades inflamatorias que comprenden administrar antagonistas GITR, por ejemplo, un anticuerpo anti-GITRL neutralizante al sujeto; también se suministran, los métodos para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, cáncer o enfermedades infecciosas que comprende administrar agonistas GITR, por ejemplo, GITRL, o una proteína de fusión agonista de ésta,. Alternativamente, se suministran métodos para inducir o inhibir la proliferación de células T por vía de la administración de agonistas GITR, por ejemplo, GITRL (que incluye proteínas de fusión agonistas de estos), o antagonistas GITR, por ejemplo, neutralizar anticuerpos anti-GITRL o proteínas de fusión GITR antagonistas, respectivamente. Similarmemente, se suministran métodos para bloquear o mejorar la supresión de células T en la presencia de células T $CD4^+CD25^+$ que comprende la administración de agonistas GITR, por ejemplo, GITRL (que incluye proteínas de fusión agonistas de estos), o antagonistas GITR, por ejemplo, anticuerpos anti-GITRL neutralizantes, respectivamente. Las poblaciones de células T tratadas con polipéptidos GITRL y moléculas relacionadas (que incluyen proteínas de fusión agonistas de estos) están dentro del alcance de la invención, y se pueden administrar a un sujeto en un método para tratar cáncer o una enfermedad infecciosa. Se suministran otros métodos de tratamiento, que incluyen un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, un

rechazo de transplante con un compuesto antagonista que disminuye la actividad GTR, y métodos para tratar el sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, cáncer o enfermedad infecciosa con un compuesto agonista que incrementa la actividad GTR. Las composiciones farmacéuticas, por ejemplo adyuvantes de vacuna, que comprenden polinucleótidos GITRL, polipéptidos y moléculas relacionadas (que incluyen proteínas de fusión GITRL y anticuerpos anti-GITRL antagonistas) de la invención también están dentro del alcance de la invención. Los métodos de la presente invención están dirigidos a GITRL y GTR, que incluyen pero no están limitados a, GITRL y GTR de ratón y sus homólogos, específicamente incluidos entre estos homólogos están el GITRL y el GTR.

Polipéptidos y Polinucleótidos GITRL

[0066] La presente invención suministra polinucleótidos y polipéptidos aislados y purificados relacionados con ligandos novedosos para GTR (GITRL). Los genes, polinucleótidos, proteínas y polipéptidos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, GITRL de ratón y sus homólogos

[0067] Por ejemplo, la invención suministra polinucleótidos purificados y aislados que codifican GITRL de murino. Las secuencias de ADN preferidas de la invención incluyen cADN genómico, y secuencias de ADN químicamente sintetizadas.

[0068] La secuencia de nucleótido del cADN que codifica este cADN GITRL de ratón designado, ligando novedoso, se establece en la ID DE SEC NO: 1. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen polinucleótidos que hibridizan bajo condiciones de restricción a la ID DE SEC NO: 1, o su

complemento, y/o codifican polipéptidos que retienen actividad biológica sustancial (es decir, fragmentos activos) de GITRL de ratón de longitud completa. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen porciones continuas de la secuencia establecida en la ID DE SEC NO: 1 que comprende al menos 21 nucleótidos consecutivos.

[0069] La secuencia de nucleótido de un ADN genómico que codifica este ligando novedoso, ADN genómico de GITRL de ratón designado, se establece en la ID DE SEC NO: 3. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de restricción a la ID DE SEC NO 3, o su complemento, y/o codifica polipéptidos para retener actividad biológica sustancial de GITRL de ratón de longitud completa. Los polinucleótidos de la presente invención también incluyen porciones continuas de la secuencia establecida en la ID DE SEC NO: 3 que comprende al menos 21 nucleótidos consecutivos

[0070] La secuencia de aminoácido del GITRL de ratón se establece en la ID DE SEC NO: 2. Los polipéptidos de la presente invención también incluyen porciones continuas de la secuencia establecida en la ID DE SEC NO: 2 que comprende al menos 7 aminoácidos consecutivos. Un polipéptido preferido de la presente invención incluye una porción continua de la secuencia establecida en la ID DE SEC NO: 2 que retiene actividad biológica sustancial del GITRL de ratón de longitud completa. Los nucleótidos de la presente invención también incluyen, además de aquellos polinucleótidos de origen murino descritos anteriormente, polinucleótidos que codifican la secuencia de aminoácido establecida en la ID DE SEC NO: 2 o una porción continua de estos, y que difieren de los polinucleótidos

187
192

descritos anteriormente solo debido a la degeneración bien conocida del código genético

[0071] Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden utilizar como sondas de hibridización e iniciadores para identificar y aislar ácidos nucleicos que tienen secuencias idénticas a o similares a aquellas que codifican los polinucleótidos descritos. Los métodos de hibridización para identificar y aislar los ácidos nucleicos incluyen reacción en cadena de polimerasa (PCR), hibridaciones Southern, hibridización *in situ* e hibridización Northern, y son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

[0072] Las reacciones de hibridización se pueden desarrollar bajo condiciones de diferente restricción. La restricción de una reacción de hibridización incluye la dificultad con dos cualesquier moléculas de ácido nucleico que se hibridarán una a la otra. Preferiblemente, cada polinucleótido hibridizante hibridiza a su polinucleótido correspondiente bajo condiciones de restricción reducidas, más preferiblemente condiciones de restricción, y más preferiblemente condiciones altamente restrictivas. Ejemplos de condiciones de restricción son mostradas en la Tabla 1 de adelante: condiciones altamente restrictivas son aquellas que son al menos tan restrictivas como, por ejemplo, las condiciones A-F; condiciones restrictivas son al menos tan restrictivas como, por ejemplo, las condiciones G-L; y condiciones de restricción reducida son al menos tan restrictivas como, por ejemplo, las condiciones M-R.

TABLA I

Condición de Restricción	Híbrido de Polinucleótido	Longitud de Híbrido (bp) ¹	Temperatura De Hibridización y Amortiguador ²	Temperatura de Lavado y Amortiguador ²
A	ADN ADN	>50	65°C, 1xSSC-o- 42°C, 1xSSC, 50% formamida	65°C, 0,3xSSC
B	ADN ADN	<50	T _R , 1xSSC	T _R , 1xSSC
C	ADN ARN	>50	67°C, 1xSSC-o- 45°C, 1xSSC, 50% Formamida	67°C, 0,3xSSC
D	ADN ARN	<50	T _D , 1xSSC	T _D , 1xSSC
E	ARN.ARN	>50	70°C, 1xSSC-o- 50°C, 1xSSC, 50% Formamida	70°C, 0,3xSSC
F	ARN.ARN	<50	T _F , 1xSSC	T _F , 1xSSC
G	ADN ADN	>50	65°C, 4xSSC-o- 42°C, 4xSSC, 50% Formamida	65°C, 1xSSC
H	ADN ADN	<50	T _H , 4xSSC	T _H , 4xSSC
I	ADN ARN	>50	67°C, 4xSSC-o- 45°C, 4xSSC, 50% Formamida	67°C, 1xSSC
J	ADN ARN	<50	T _J , 4xSSC	T _J , 4xSSC
K	ARN ARN	>50	70°C, 4xSSC-o- 50°C, 4xSSC, 50% Formamida	67°C, 1xSSC
L	ARN ARN	<50	T _L , 2xSSC	T _L , 2xSSC
M	ADN ADN	>50	50°C, 4xSSC-o- 40°C, 6xSSC, 50% Formamida	50°C, 2xSSC
N	ADN ADN	<50	T _N , 6xSSC	T _N , 6xSSC
O	ADN ARN	>50	55°C, 4xSSC-o- 42°C, 6xSSC, 50% Formamida	55°C, 2xSSC
P	ADN ARN	<50	T _P , 6xSSC	T _P , 6xSSC
Q	ARN ARN	>50	60°C, 4xSSC-o- 45°C, 6xSSC, 50% Formamida	60°C, 2xSSC
R	ARN ARN	<50	T _R , 4xSSC	T _R , 4xSSC

¹La longitud del híbrido es aquella anticipada por la o las regiones hibridizadas de los polinucleótidos hibridizantes. Cuando se hibridiza un polinucleótido a un polinucleótido objetivo de una secuencia no conocida, la longitud de híbrido se asume por ser aquella del polinucleótido hibridizante. Cuando los polinucleótidos de secuencia conocida son hibridizados, la longitud del

híbrido se puede determinar al alinear las secuencias de los polinucleótidos e identificar la o las regiones de complementariedad de secuencia óptima

²SSPE (1xSSPE es 0,15M de NaCl, 10 mM de NaH₂PO₄, y 1,25mM de EDTA, pH7,4) se puede sustituir por SSC (1xSSC es 0,15M de NaCl y 15 mM de citrato de sodio) en la hibridización y los amortiguadores de lavado, los lavados fueron desarrollados durante 15 minutos después de que se completó la hibridización

$T_B^* - T_R^*$ La temperatura de hibridización para híbridos anticipados por ser menores de 50 pares base de longitud deben ser 5-10° C menos que la temperatura de fusión (T_m) del híbrido, donde T_m se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos menores de 18 pares base de longitud, $T_m(^{\circ}C) = 2(\# \text{ de bases } + T) + 4(\# \text{ de bases } G + C)$. Para los híbridos entre 18 y 49 pares base de longitud, $T_m(^{\circ}C) = 81,5 + 16,6(\log_{10}Na^+) + 0,41(\%G + C) - (800/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido, y Na^+ es la concentración de iones sodio en el amortiguador de hibridización (Na^+ para 1XSSC=0,165 M)

Ejemplos adicionales de condiciones de restricción para hibridización de polinucleótido se suministran en Sambrook et al, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Chs 9 & 11, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y Ausubel et al, eds, Current Protocols in Molecular Biology, Sects 2.10 & 6.3-6.4, John Wiley & Sons, Inc (1995), incorporadas aquí como referencia

[0073] Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden utilizar como sondas de hibridización e iniciadores para identificar el ADN aislado que tiene secuencias que codifican variantes alélicas de los polinucleótidos descritos. Las variantes alélicas son formas alternativas de ocurrencia natural de los polinucleótidos descritos que codifican polipéptidos que son idénticos a o que tienen semejanza significativa a los polipéptidos codificados por los polinucleótidos descritos. Preferiblemente, las variantes alélicas tienen al menos 90% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos 95% de identidad, más preferiblemente, al menos 99% de identidad) con los polinucleótidos descritos

[0074] Los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden utilizar como sondas e iniciadores de hibridización para identificar los ADN aislados que tienen secuencias que codifican polipéptidos homólogos a los polinucleótidos descritos. Estos homólogos son polinucleótidos y polipéptidos aislados de diferentes especies de aquellas de los polipéptidos y polinucleótidos descritos, o dentro de las mismas especies, pero con una similitud de secuencias significativa a los polinucleótidos y polipéptidos descritos. Preferiblemente, los

124
195

homólogos de polinucleótidos tienen al menos 50% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos 75% de identidad; más preferiblemente, al menos 90% de identidad) con los polinucleótidos descritos, mientras que los homólogos de polipéptido tienen al menos 30% de identidad de secuencia (más preferiblemente, al menos 45% de identidad, más preferiblemente, al menos 60% de identidad) con los polipéptidos descritos. Preferiblemente, los homólogos de los polinucleótidos y polipéptidos descritos son aquellos aislados de especies de mamíferos.

[0075] Los polinucleótidos aislados de la presente invención también se pueden utilizar como iniciadores y sondas de hibridización para identificar células y tejidos que expresan los polipéptidos de la presente invención y condiciones bajo las cuales ellos se expresan.

[0076] Adicionalmente, los polinucleótidos aislados de la presente invención se pueden utilizar para alterar (es decir, mejorar, reducir, o modificar) la expresión de los genes que corresponden a los polinucleótidos de la presente invención en una célula u organismo. Estos genes correspondientes son secuencias de ADN genómico de la presente invención (por ejemplo, ID DE SEC NO: 3) que son transcritos para producir los mRNA de los cuales se derivan los polinucleótidos de cADN de la presente invención (por ejemplo, ID DE SEC NO: 1).

[0077] La expresión alterada de los genes de la presente invención, que incluye pero no está limitada al GITRL de ratón y sus homólogos, se puede lograr en una célula o un organismo a través del uso de varios polinucleótidos inhibitorios, tales como los polinucleótidos antisentido (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico GITRL antisentido) y ribozimas que se unen y/o clivan el mRNA

transcrito de los genes de la invención (ver, por ejemplo, Galderisi et al (1999) *J. Cell Physiol.* 181: 251-57; Sioud (2001) *Curr. Mol. Med.* 1: 575-88). Tales polinucleótidos inhibitorios se pueden utilizar para evitar o tratar desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazo por transplante, y desórdenes similares o relacionados.

[0078] Las ribozimas o polinucleótidos antisentido de la invención pueden ser complementarios a una hebra codificante completa o un gen de la invención, o a solamente una porción de ésta. Alternativamente, las ribozimas o polinucleótidos antisentido pueden ser complementarios a una región no codificante de la hebra codificante de un gen de la invención. Las ribozimas o polinucleótidos antisentido se pueden construir utilizando síntesis química y reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los enlaces nucleósido de polinucleótidos químicamente sintetizados se pueden modificar para mejorar su capacidad para resistir degradación mediada por nucleasa, así como también incrementar su especificidad de secuencia. Tales modificaciones de enlace incluyen, pero no están limitados a, fosforotioato, metilfosfonato, fosforoamidato, boranofosfato, morfolino, y enlaces de ácido nucleico péptido (PNA) (Galderisi et al., *supra*; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243: 209-14, Micklefield (2001) *Curr. Med. Chem.* 8: 1157-79). Alternativamente, estas moléculas se pueden producir biológicamente utilizando un vector de expresión en el cual un polinucleótido de la presente invención ha sido subclonado en una orientación antisentido (es decir, inversa).

[0079] Los polinucleótidos inhibitorios de la presente invención también incluyen oligonucleótidos formadores de triples (TFO) que se unen a la ranura mayor del ADN dúplex con alta especificidad y afinidad (Knauert y Glazer (2001)

H26
197

Hum. Mol. Genet. 10: 2243-51). La expresión de los genes de la presente invención puede ser inhibida al apuntar objetivos TFO complementarios a las regiones reguladoras de los genes (es decir, la secuencia promotora y/o mejoradora) para formar estructuras helicoidales triples que evitan la transcripción de los genes.

[0080] En una modalidad de la invención, los polinucleótidos inhibitorios de la presente invención son moléculas de ARN interferentes cortas (siARN) (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico siARN GITRL). Estas moléculas siARN son cortas (preferiblemente 19-25 nucleótidos; más preferiblemente 19 o 21 nucleótidos), moléculas ARN de doble hebra que originan degradación específica de secuencia al mRNA objetivo. Esta degradación es conocida como interferencia ARN (ARNi) (por ejemplo, Bass (2001) *Nature* 411: 428-29). Originalmente identificados en organismos inferiores, los ARNi se han aplicado efectivamente en células de mamífero y recientemente han mostrado evitar hepatitis fulminante en ratones tratados con moléculas siARN apuntadas a un objetivo Fas mRNA (Song et al. (2003) *Nature Med.* 9: 347-51). Además, el siARN intratecalmente suministrado ha sido reportado recientemente por bloquear respuestas de dolor en dos modelos (modelo de dolor inducido por agonista y modelo de dolor neuropático) en la rata (Dorn et al (2004) *Nucleic Acids Res* 32(5):e49)

[0081] Las moléculas siARN de la presente invención pueden ser generadas al recocer dos moléculas de ARN de hebra sencilla complementarias juntas (una de las cuales coincide con una porción del mRNA objetivo) (FIRE et al., Patente U.S. No. 6,506,559) o a través del uso de una molécula de ARN horquilla simple que se desdobra sobre sí misma para producir la porción de doble hebra de requisito (Yu et al. (2002) *Procesamiento. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6047-52). Las

49/198

moléculas siARN pueden ser químicamente sintetizadas (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411: 494-98) o producidas mediante transcripción *in vitro* utilizando moldes de ADN de hebra simple (Yu et al., *supra*) Alternativamente, las moléculas de siARN se pueden producir biológicamente, o transitoriamente (Yu et al., *supra*; Sui et al. (2002) *Procesamiento. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 5515-20) o establemente (Paddison et al. (2002) *Procesamiento. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 1443-48), utilizando un o unos vectores de expresión que contienen unas secuencias de siARN sentido o antisentido Recientemente, la reducción de los niveles del mRNA objetivo en células humanas primarias, de una manera eficiente y específica de secuencia, se demostró utilizando vectores adenovirales que expresan ARN horquilla, que son adicionalmente procesados en siARN (arts et al. (2003) *Genome Res.* 13: 2325-32).

[0082] Las moléculas de siARN objetivo a los polinucleótidos de la presente invención se pueden diseñar con base en criterios bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Elbashir et al (2001) *EMBO J* 20: 6877-88). Por ejemplo, el segmento objetivo del mRNA objetivo preferiblemente debe iniciar con AA (más preferido), TA, GA, o CA; la proporción GC de la molécula siARN preferiblemente debe ser 45-55%, la molécula siARN preferiblemente no debe contener tres de los mismos nucleótidos en una fila; la molécula siARN preferiblemente no debe contener siete G/C mezclados en una fila; y el segmento objetivo preferiblemente debe estar en la región ORF del mRNA objetivo y preferiblemente tener al menos 75 bp después de iniciación ATG y al menos 75 bp antes del codón de parada. Con base en estos criterios, o con otros criterios conocidos (por ejemplo, Reynolds et al. (2004) *Nature Biotechnol.* 22: 326-30), las moléculas de siARN de la presente invención, objetivos a los polinucleótidos de mRNA de la presente invención, se pueden diseñar por un experto en la técnica.

198
199

[0083] La expresión alterada de los genes de la presente invención en un organismo también se puede lograr a través de la creación de animales transgénicos no humanos en cuyos genomas han sido introducidos los polinucleótidos de la presente invención. Tales animales transgénicos incluyen animales que tienen múltiples copias de un gen (es decir el transgen) de la presente invención. Una o unas secuencias reguladoras específicas de tejido pueden estar operablemente ligadas al transgen para dirigir la expresión de un polipéptido de la presente invención a células particulares o a una etapa de desarrollo particular. Los métodos para generar animales transgénicos por vía de manipulación de embrión y microinyección, particularmente animales tales como el ratón, se han vuelto convencionales para aquellos expertos en la técnica (por ejemplo, Bockamp et al., *Physiol. Genomics*, 11: 115-32 (2002))

[0084] La expresión alterada de los genes de la presente invención en un organismo también se puede lograr a través de la creación de animales cuyos genes endógenos que corresponden a los polinucleótidos de la presente invención han sido rotas a través de la inserción de secuencias de polinucleótido extrañas (es decir un animal knockout). La región codificante del gen endógeno puede ser rota, generando de esta manera una proteína no funcional. Alternativamente, la región reguladora corriente arriba del gen endógeno se puede romper o reemplazar con diferentes elementos reguladores, dando como resultado la expresión alterada de la proteína aún funcional. Los métodos para generar animales knockout incluyen recombinación homóloga y son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Wolfer et al., *Trends Neurosci*, 25: 336-40 (2002)).

[0085] Los polinucleótidos aislados de la presente invención pueden estar operablemente ligados a la secuencia de control de expresión y/o ligada a un vector de expresión para producción recombinante de los polipéptidos de la presente invención. Los métodos generales de expresar proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Tales proteínas recombinantes se pueden expresar en forma soluble para uso en el tratamiento de desórdenes que resultan de la desregulación del sistema inmune; tales desórdenes incluyen, por ejemplo, cánceres y enfermedades infecciosas, y desórdenes autoinmunes y enfermedades inflamatorias, y rechazo de transplante. Los desórdenes autoinmunes y las enfermedades inflamatorias incluyen, pero no están limitados a, artritis reumatoide, encefalomiелitis, osteoartritis, esclerosis múltiple, gastritis autoinmune, lupus sistémico eritematoso, soriasis y otras dermatosis inflamatorias, diabetes tipo I, asma, alergia, enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.

[0086] Un vector de expresión, como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual este ha sido ligado. Un tipo de vector es un plásmido, que se refiere a un aro de ADN circular de doble hebra al cual pueden ser ligados segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales pueden estar ligados en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la cual ellos son introducidos (por ejemplo, vectores bacteriales que tienen un origen bacterial de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped luego de la introducción en la célula huésped, y de esta manera son replicados junto con el genoma huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la

expresión de los genes a los cuales ellos están operablemente ligados. Tales vectores son denominados aquí como vectores de expresión recombinante (o simplemente, vectores de expresión) En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en la forma de plásmidos En la presente especificación, se puede utilizar plásmido y vector intercambiablemente en la medida en que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuoso de replicación, adenovirus y adenovirus asociados) que sirven a funciones equivalentes.

[0087] En una modalidad, los polinucleótidos de la presente invención son utilizados para crear agonistas GITR, por ejemplo, polipéptidos GITRL, que incluyen fragmentos activos y/o polipéptidos de fusión de estos, que también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un polipéptido GITRL o fragmentos activos de estos se pueden fusionar a una segunda porción, por ejemplo, una inmunoglobulina o fragmento de ésta (por ejemplo, un fragmento de unión Fc de éste). En algunas modalidades, el primer polipéptido incluye un polipéptido GITRL de longitud completa Alternativamente, el primer polipéptido puede comprender menos de un polipéptido GITRL de longitud completa. Adicionalmente, las formas solubles de GITRL se pueden fusionar a través de secuencias "ligadoras" a la porción Fc de una inmunoglobulina También se pueden utilizar otras proteínas de fusión, tales como aquellas con glutathione-S-transferasa (GST), Lex-A, tioredoxina (TRX) o proteína que se une a maltosa (MBP).

20/2
292

[0088] Las proteínas de fusión pueden incluir adicionalmente una secuencia ligadora que se une al GITRL o al fragmento GITRL a la segunda porción. El uso de tales secuencias ligadoras es bien conocido en la técnica. Por ejemplo. La proteína de fusión puede incluir un ligador péptido, por ejemplo, un ligador péptido de aproximadamente 2 a 20, más preferiblemente menos de 10, aminoácidos de longitud. En una modalidad, el ligador péptido puede ser de 2 aminoácidos de longitud.

[0089] En otra modalidad, la proteína de fusión incluye una secuencia de señal heteróloga (es decir, una secuencia de polipéptido que no está presente en un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico GITRL) en su terminal N. Por ejemplo, una secuencia de señal de otra proteína se puede fusionar a un polipéptido GITRL, incluyendo fragmentos activos y/o proteínas de fusión de ésta. En ciertas células huéspedes (por ejemplo, células huéspedes de mamíferos), la expresión y/o secreción del GITRL se puede incrementar a través del uso de una secuencia de señal heteróloga

[0090] Un péptido de señal que se puede incluir en la proteína de fusión es MKFLVNVALVFMVYISYIYA (ID DE SEC NO: 11). Si se desea, se pueden insertar adicionalmente uno o más aminoácidos entre la primera porción de polipéptido que comprende la porción GITRL y la segunda porción de polipéptido. El segundo polipéptido es preferiblemente soluble. En algunas modalidades, el segundo polipéptido mejora la vida media (por ejemplo, la vida media del suero) del polipéptido ligado. En algunas modalidades, el segundo polipéptido incluye una secuencia que facilita asociación del polipéptido de fusión con un segundo polipéptido GITRL. En modalidades preferidas, el segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. Los polipéptidos de

202
203

fusión de inmunoglobulina son conocidos en la técnica y se describen en por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 5,516,964; 5,225,538, 5,428,130, 5,514,582; 5,714,147, y 5,455,165, todas las cuales se incorporan aquí como referencia

[0091] Una proteína quimérica o de fusión de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican para las secuencias de polipéptido diferentes están ligados juntos en estructura de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, al emplear terminales finalizados como o finalizados vacilantes para ligación, restricción de digestión de enzima para suministrar a terminales apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables, y ligación enzimática. En otra modalidad, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación PCR de los fragmentos de gen se puede llevar a cabo utilizando iniciadores de ancla que dan origen a sobrecambios complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden posteriormente ser recocidos y reamplificados para generar una secuencia de gen quimérico (ver, por ejemplo, Ausubel et al. (Eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992) Más aún, muchos vectores de expresión están comercialmente disponibles los que codifican una porción de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Un ácido nucleico que codifica GITRL se puede clonar en tal vector de expresión de tal forma que la porción de fusión está ligada en estructura a la proteína de inmunoglobulina. En algunas modalidades, los polipéptidos de fusión GITRL existen como oligómeros, tal como dímeros o trímeros

[0092] Un número de líneas celulares puede actuar como células huéspedes adecuadas para expresión recombinante de los polipéptidos de la presente invención. Las líneas celulares de huéspedes mamíferos incluyen, por ejemplo, células COS, células CHO, células 293T, células A431, células 3T3, células CV-1, células HeLa, células L, células BHK21, células HL-60, células U937, células HaK, células Jurkat, así como también cepas de células derivadas de cultivo *in vitro* de tejido primario y explantes primarios.

[0093] Alternativamente, puede ser posible producir recombinantemente los polipéptidos de la presente invención en eucariotes inferiores tales como levaduras o en procariotes. Las cepas de levadura potencialmente adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, y cepas de *Candida*. Las cepas bacteriales potencialmente adecuadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y *Salmonella typhimurium*. Si los polipéptidos de la presente invención son hechos en levaduras o bacterias, puede ser necesario modificarlos mediante, por ejemplo, fosforilación o glicosilación de los sitios apropiados, con el fin de obtener funcionalidad. Tales uniones covalentes se pueden lograr utilizando métodos químicos o enzimáticos bien conocidos.

La expresión en bacterias puede resultar en la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Así, el redoblar la proteína recombinante se puede requerir con el fin de producir material activo o más activo. Varios métodos para obtener proteínas heterólogas correctamente dobladas de cuerpos de inclusión bacterial son conocidos en la técnica. Estos métodos generalmente involucran solubilizar la proteína de cuerpos de inclusión, luego desnaturalizar la proteína completamente utilizando un agente caotrópico. Cuando los residuos de

cisteína están presentes en la secuencia de aminoácido primaria de la proteína, es a menudo necesario lograr el redoblamiento en un ambiente que permita la formación correcta de uniones disulfuro (un sistema redox). Los métodos generales de redoblamiento se describen en Cono (1990) *Meth. Enzymol.* 185: 187-95. La EP 0433225, y la solicitud de patente U.S. Ser. No. 08/163,877 describen otros métodos apropiados.

[0095] Los polipéptidos de la presente invención también se pueden producir recombinantemente al ligar operablemente los polinucleótidos aislados de la presente invención a secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insecto, tal como los vectores de baculovirus, y emplear un sistema de expresión de célula de insecto. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/Sf9 están comercialmente disponibles en la forma de kit (por ejemplo, el kit MaxBac®, Invitrogen, Carlsbad, CA).

[0096] Los agonistas GPCR, por ejemplo, la proteína GPCR, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, se pueden preparar al hacer crecer un cultivo de células huésped transformadas bajo condiciones de cultivo necesarias para expresar la proteína deseada. Luego de la expresión recombinante en las células huésped apropiadas, los polipéptidos de la presente invención pueden entonces ser purificados desde el medio de cultivo o los extractos de célula utilizando procesos de purificación conocidos, tales como filtración de gel o cromatografía de intercambio de iones. Las formas solubles de los agonistas GPCR, por ejemplo, la proteína GPCR, fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, se puede purificar de los medios acondicionados. Las formas unidas a membrana de, por ejemplo, una proteína GPCR de la invención se puede purificar al preparar una fracción de membrana total de la célula de expresión y extraer las

membranas con un detergente no iónico tal como Triton X-100. La purificación también puede incluir cromatografía de afinidad con agentes conocidos por unir los polipéptidos de la presente invención. Estos procesos de purificación también se pueden utilizar para purificar los polipéptidos de la presente invención de otras fuentes, que incluyen fuentes naturales. Como se describió previamente, los agonistas G1TR, por ejemplo, la proteína G1TRL, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, también se puede expresar como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de leche de vacas, cabras, cerdos, u ovejas transgénicas, que están caracterizados por células somáticas o germinales que contienen la secuencia de polinucleótido que codifica los agonistas G1TR.

[0097] Los métodos que se pueden utilizar para purificar los agonistas G1TR, por ejemplo, la proteína G1TRL, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, la proteína G1TRL de la invención se puede concentrar utilizando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Luego de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación tal como un medio de filtración. Alternativamente, una resina de intercambio de iones se puede emplear, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetil (DEAE) o polietilenoimina (PEI) pendientes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextran, celulosa, y otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio de catión. Los intercambiadores de catión adecuados incluyen varias matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo (por ejemplo, columnas de S-Sepharose®). La purificación de

los agonistas GATR, por ejemplo, la proteína GATRL, los fragmentos activos y la proteína de fusión de estos, del supernadante del cultivo también puede incluir una o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad como concanavalin A-agarosa, heparin-toyopearl® o Cibacrom azul 3GA Sepharose®; o por cromatografía de interacción hidrófoba utilizando tales resinas como fenil éter, butil éter, o propil éter; o mediante cromatografía de inmunoafinidad. Finalmente, una o más de las etapas de cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa (RP-HPLC) que emplean medio RP-HPLC hidrófobo, por ejemplo, sílica gel que tiene grupos metilo u otros alifáticos pendientes, se puede emplear para purificar adicionalmente la proteína GATRL. Las columnas de afinidad que incluyen anticuerpos a la proteína GATRL también se pueden utilizar en purificación de acuerdo con métodos conocidos. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en varias combinaciones o con otros métodos conocidos, también se pueden emplear para suministrar una proteína recombinante sustancialmente purificada aislada. Preferiblemente, la proteína GATRL aislada se purifica de tal forma que es sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero.

[0098] Alternativamente, los agonistas GATR, por ejemplo, la proteína GATRL, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, también puede ser recombinantemente expresada en una forma que facilite la purificación. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser expresados como fusiones con proteínas tales como proteína que se une a maltosa (MBP), glutathione-S-transferasa (GST), o tioredoxina (TRX). Los kits para la expresión y purificación de tales proteínas de fusión están comercialmente disponibles de New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), e Invitrogen, respectivamente. Los agonistas GATR, por ejemplo, la proteína GATRL, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, también se puede marcar con un epítipo pequeño y posteriormente

207
/208

identificar o purificar utilizando un anticuerpo específico al epítipo. El epítipo preferido es el epítipo FLAG, que se encuentra comercialmente disponible de Eastman Kodak (New Haven, CT).

[0099] Los agonistas GTR, por ejemplo, la proteína GITRL, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, también se puede producir mediante síntesis química convencional conocida. Los métodos para sintetizar químicamente tales polipéptidos son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales polipéptidos químicamente sintéticos pueden poseer propiedades biológicas en común con polipéptidos naturales, purificados, y así se pueden emplear como sustitutos biológicamente activos o inmunológicos para los polipéptidos naturales.

[0100] Los agonistas GTR, por ejemplo, la proteína GITRL, los fragmentos activos y/o la proteína de fusión de estos, también comprende moléculas que son estructuralmente diferentes de los polipéptidos descritos (por ejemplo, que tienen una ligera secuencia alterada), pero que tiene sustancialmente las mismas propiedades bioquímicas como los polipéptidos descritos (por ejemplo, son cambiados solamente en residuos de aminoácido funcionalmente no esenciales). Tales moléculas incluyen variantes alélicas de ocurrencia natural y variantes deliberadamente trabajadas con ingeniería que contienen alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones, o supresiones. Las técnicas para tales alteraciones, sustituciones, reemplazos, inserciones, o supresiones son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. En algunas modalidades, la porción de polipéptido GITRL se suministra como una variante de polipéptido GITRL que tiene mutaciones en la secuencia GITRL de ocurrencia natural (tipo silvestre) que

da como resultado una secuencia GITRL más resistente a proteólisis (con relación a una secuencia no mutada).

[0101] Los métodos descritos aquí para la generación de agonistas GTR, por ejemplo, GITRL, los fragmentos activos y/o las proteínas de fusión de estos, se pueden utilizar para generar antagonistas GTR, especialmente proteínas GTR solubles, fragmentos activos de estos y/o proteínas de fusión de estos. Un experto en la técnica reconocerá que para generar antagonistas GTR, por ejemplo, GTR soluble, fragmentos activos de estos, y/o las proteínas de fusión de estos, todo lo que se requeriría es la secuencia de ácido nucleico o la secuencia de aminoácido del GTR, las cuales son conocidas. Utilizando estas secuencias, los antagonistas GTR, por ejemplo, el GTR soluble, los fragmentos activos de estos, y/o las proteínas de fusión de estos, se pueden generar utilizando técnicas de ADN recombinante y/o síntesis química, como se describió anteriormente.

Anticuerpos Anti-GITRL

[0102] En otras modalidades, la invención suministra antagonistas GTR como anticuerpos, o fragmentos de estos que se unen a antígeno, que específicamente se unen al GITRL, preferiblemente, GITRL de mamífero (por ejemplo, murino), y neutralizar la actividad GTR.

[0103] Un experto en la técnica reconocerá que como se utiliza aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende al menos una y preferiblemente dos, regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas aquí como VH), y al menos una y preferiblemente dos regiones variables de cadena ligera (L) (abreviadas aquí como VL). Las regiones VH y VL adicionalmente se

22/9

pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones que determinan complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas "regiones de estructura" ("FR"). La proporción de los FR y CDR ha sido precisamente definida (ver, Rabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917, que se incorporan aquí como referencia). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el terminal amino a los terminales carboxi en el siguiente orden. FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0104] El anticuerpo puede incluir adicionalmente una región constante de cadena pesada y ligera para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada y ligera, respectivamente. En una modalidad, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en donde las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están interconectadas mediante, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2, y CH3. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos típicamente median la unión del anticuerpo a los tejidos huéspedes o factores, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

[0105] La inmunoglobulina se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados mediante genes de

inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humana reconocida incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, así como también los miles de genes de región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd, o 214 aminoácidos) son codificados mediante un gen de región variable en el terminal NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el terminal COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd, o 446 aminoácidos), son similarmente codificados por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante anteriormente mencionados, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Los genes de región constante de cadena pesada de inmunoglobulina codificados para la clase de anticuerpo, es decir, isótopo (por ejemplo, IgM o IgG1). El fragmento de unión de antígeno del anticuerpo (o simplemente "la porción de anticuerpo", o "fragmento"), como se utiliza aquí, se refiere a uno o más fragmentos del anticuerpo de longitud completa que retiene la capacidad a unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD3). Ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro del término "fragmento que se une a antígeno" de un anticuerpo incluye (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH₁, (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos ligados mediante un puente disulfuro en una región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH₁; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo simple de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-46), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región que determina complementariedad aislada (CDR). Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, ellos

se pueden unir utilizando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les posibilita hacer una cadena de proteína simple en la cual el par de regiones VL y VH forma moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv), ver por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-26; y Huston et al. (1988) *Procesamiento Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-83). Tales anticuerpos de cadena simple también están destinados a estar comprendidos dentro del término "fragmento de unión de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo son obtenidos utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la técnica, y los fragmentos son seleccionados para utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos

[0106] Un experto en la técnica reconocerá que los métodos descritos aquí para la generación de moléculas de anticuerpo a los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo GITRL de murino, también se pueden utilizar para generar moléculas de anticuerpo a otras proteínas, por ejemplo, el GATR o GITRL de humano. Consecuentemente, los métodos para generar moléculas de anticuerpo aplican no solo a los polipéptidos de la presente invención como se describieron, sino también a, por ejemplo, GATR o GITRL de humano.

[0107] Las moléculas de anticuerpo de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos neutralizantes al GITRL de murino, que incluye pero no está limitado al GITRL de ratón y sus homólogos, se pueden utilizar para prevenir o tratar desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazos de transplante, y desórdenes similares o relacionados. Otras moléculas de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpos GATR agonistas, se pueden utilizar en los métodos de la invención para tratar cáncer, enfermedades infecciosas, y desórdenes similares y relacionados. Tales moléculas de anticuerpo

se pueden producir mediante métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante la generación de hibridomas de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas formados de esta manera son entonces seleccionados utilizando métodos estándar, tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), para identificar uno o más hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente con los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas GITRL de la invención se pueden utilizar para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen específicamente con la proteína GITRL y que puedan inhibir la unión de los ligandos al receptor, es decir, GTR. Similarmente, las proteínas GTR también se pueden utilizar para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con GTR. Los inmunógenos de péptido pueden adicionalmente contener un residuo de cisteína en el terminal carboxilo, y son conjugados a un hapteno tal como hemocianina de lapa de cerradura (KLH). Los inmunógenos de péptido adicionales se pueden generar al reemplazar residuos de tirosina con residuos de tirosina sulfatados. Los métodos para sintetizar tales péptidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, como en Merrifield (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-54; Krstenansky et al (1987) *FEBS Lett.* 211: 10. Un polipéptido de longitud completa de la presente invención se puede utilizar como inmunógeno, o, alternativamente, se pueden utilizar fragmentos de péptido antigénico de los polipéptidos. El péptido antigénico del polipéptido de la presente invención comprende al menos 7 residuos de aminoácido contiguos y comprende un epítopo de tal forma que un anticuerpo levantado contra el péptido forma un complejo inmune específico con el polipéptido. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácido, más preferiblemente al menos 15 residuos de

aminoácido, aún más preferiblemente al menos 20 residuos de aminoácido, y más preferiblemente al menos 30 residuos de aminoácido.

[0108] Los anticuerpos monoclonales se pueden generar por otros métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante. Como una alternativa para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal a un polipéptido de la presente invención se puede identificar y aislar al seleccionar una librería de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una librería de despliegue de fago de anticuerpo) con un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, GITRL) o con GITR, para aislar de esta manera miembros de librería de inmunoglobulina que se unen a los polipéptidos de la presente invención, o un GITR, respectivamente. Las técnicas y los kits comercialmente disponibles para generar y seleccionar librerías de despliegue de fago son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Adicionalmente, ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para uso en generar y seleccionar librerías de despliegue de anticuerpo se pueden encontrar en la literatura. Por ejemplo, el método de "despliegue de anticuerpo combinatorio" se ha desarrollado para identificar y aislar fragmentos de anticuerpo que tienen una especificidad de antígeno particular, y se pueden utilizar para producir anticuerpos monoclonales (para descripciones de despliegue de anticuerpo combinatorio, ver, por ejemplo, Sastry et al. (1989) *Procesamiento. Natl. Acad. Sci USA* 86: 5728; Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275; Orlando et al. 1989 *Procesamiento. Natl. Acad. Sci USA* 86: 3833). Después de inmunizar un animal con un inmunógeno como se describió anteriormente, se clona el repertorio de anticuerpos del grupo de célula B resultante. Los métodos son generalmente conocidos para obtener la secuencia de ADN de las regiones variables de una población diversa de moléculas de

EX
215

inmunoglobulina al utilizar una mezcla de iniciadores de oligómero y PCR. Por ejemplo, los iniciadores de oligonucleótido mezclados que corresponden a las secuencias líder 5' (péptido de señal) y/o las secuencias de estructura 1 (FR1), así como también los iniciadores a una región constante 3' conservada se pueden utilizar para amplificación PCR de regiones variables de cadena pesada y ligera de un número de anticuerpos de murino (Larica et al. (1991) *Biotechniques* 11: 152-56). Una estrategia similar se puede utilizar para amplificar regiones variables de cadena pesada y ligera de humano proveniente de anticuerpos de humano (Larrick et al. (1991) *Methods. Companion to Methods in Enzymology* 2: 106-10)

[0109] El suero policlonal y los anticuerpos se pueden producir al inmunizar un sujeto adecuado con un polipéptido de la presente invención. El título del anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede monitorear durante el tiempo mediante técnicas estándar, tal como ELISA utilizando proteína marcadora inmovilizada. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra un polipéptido de la presente invención se pueden aislar del sujeto o medio de cultivo y purificar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tal como cromatografía de proteína A, para obtener la fracción de IgG.

[0110] Los fragmentos de anticuerpos a los polipéptidos de la presente invención se pueden producir mediante clivaje de los anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ inmunológicamente activos se pueden generar al tratar los anticuerpos con una enzima tal como pepsina.

[0111] Adicionalmente, los anticuerpos quiméricos, humanizados, y de cadena simple a los polipéptidos de la presente invención que comprenden tanto

las porciones humana como no humana, se pueden producir utilizando técnicas de ADN recombinante estándar y/o librerías de inmunoglobulina combinatorial recombinante. Los anticuerpos humanizados también se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos (mAbs) dirigidos contra el GITRL se pueden generar utilizando ratones transgénicos que llevan los genes de inmunoglobulina humanos en lugar de los genes de inmunoglobulina de murino. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés pueden entonces ser utilizados para producir hibridomas que secretan mAbs humano con afinidades específicas para epítopos de una proteína humana (ver, por ejemplo, Wood et al., WO 91/00906, Kucherlapati et al., WO 91/10741; Lonberg et al. WO 92/03918; Kay et al., WO 92/03917; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856-59; Green et al. (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21; Morrison et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-55; Bruggeman (1993) *Year Immunol* 7:33-40; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-24; Bruggeman et al. (1991) *Eur. J. Immunol* 21:1323-26).

[0112] Los anticuerpos quiméricos, que incluyen las cadenas de inmunoglobulina quimérica, se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el arte. Por ejemplo, un gen que codifica una región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal de murino (u otras especies) se digiere con enzimas de restricción para remover la región que codifica el Fc de murino, y se sustituye la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana (ver Robinson et al., Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira, et al., Solicitud de Patente Europea

216
217

184,187; Taniguchi, Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison et al., Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger et al., WO 86/01533, Cabilly et al., Pat. U.S. No. 4,816,567; Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 125,023, Better et al. (1988) *Science* 240:1041-43; Liu et al. (1987) *Proc Natl Acad. Sci. USA* 84:3439-43; Liu et al. (1987) *J. Immunol* 139:3521-26; Sun et al. (1987) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84:214-18; Nishimura et al (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005, Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-49; y Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59).

[0113] Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina se puede humanizar mediante métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados, que incluyen cadenas de inmunoglobulina humanizadas, se pueden generar al reemplazar secuencias de la región variable Fv que no están directamente involucradas en la unión de antígeno con secuencias equivalentes provenientes de regiones variables Fv de humano. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados son suministrados por Morrison (1985) *Science* 229:1202-07, Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214, Queen et al., Pat. U.S. Nos 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762, y cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. Aquellos métodos incluyen aislar, manipular, y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de al menos una cadena pesada o ligera. Las fuentes de tales secuencias de ácido nucleico son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y, por ejemplo, se pueden obtener de hibridoma que produce un anticuerpo contra un objetivo predeterminado. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o un fragmento de éste, se puede clonar en un vector de expresión apropiado.

2/2
218

[0114] Las moléculas de anticuerpo humanizadas o injertadas con CDR o inmunoglobulinas se pueden producir mediante injerto con CDR o sustitución de CDR, en donde uno, dos, o todos los CDR de una cadena de inmunoglobulina se pueden reemplazar. Ver, por ejemplo, Patente U.S. No. 5,225,539; Jones et al (1986) *Nature* 321. 552-25; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239. 1534; Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141. 4053-60; Winter, Patente U.S. No. 5,225,539, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. Winter describe un método para injertar CDR que se puede utilizar para preparar anticuerpos humanizados de la presente invención (Solicitud de Patente UK GB 2188638A, Winter, Patente U.S. No. 5,225,539), cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia. Todos los CDR de un anticuerpo humano particular se pueden reemplazar con al menos una porción de CDR no humano, o solamente algunos de los CDR se pueden reemplazar con CDR no humano. Es solo necesario reemplazar el número de CDR requerido para unir el anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

[0115] Los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados que han sido modificados por, por ejemplo, supresión, adición, o sustitución de otras porciones del anticuerpo, por ejemplo, la región constante, también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un anticuerpo se puede modificar como sigue: (i) al suprimir la región constante; (ii) al reemplazar la región constante con otra región constante, por ejemplo, una región constante significa incrementar la vida media, estabilidad, o afinidad del anticuerpo, o una región constante de otras especies o clases de anticuerpo; o (iii) al modificar uno o más aminoácidos en la región constante para alterar, por ejemplo, el número de sitios de glicosilación, la función de célula efectora, la unión al receptor Fc (FcR), la fijación de complemento, etc.

[0116] Los métodos para alterar una región constante de anticuerpo son conocidos en la técnica. Los anticuerpos con función alterada, por ejemplo, afinidad alterada para un ligando causador, tal como FcR sobre una célula, o el componente C1 de complemento, se puede producir al reemplazar al menos un residuo de aminoácido en la poción constante del anticuerpo con un residuo diferente (ver, por ejemplo, EP 388,151 A1, U.S. 5,624,821 y U.S. 5,648,260, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia). Los tipos similares de alteraciones de inmunoglobulina de murino (u otras especies) se pueden aplicar para reducir o eliminar estas funciones. Tales alteraciones son conocidas en la técnica.

[0117] Por ejemplo, es posible alterar la afinidad de una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un IgG, tal como un IgG humano) para un FcR (por ejemplo, Fc gamma R1), o para unir C1q al reemplazar el o los residuos especificados con un o unos residuos que tienen una funcionalidad apropiada sobre su cadena lateral, o al introducir un grupo funcional cargado, tal como glutamato o aspartato, o un residuo no polar aromático tal como fenilalanina, tirosina, triptofano o alanita (ver, por ejemplo, U.S. 5,624,821).

[0118] Los anticuerpos anti-GITRL de la invención se pueden utilizar para aislar, purificar, y/o detectar polipéptidos GITRL en supernadante, lisato celular, o sobre la superficie celular. Los anticuerpos descritos en esta invención también se pueden utilizar diagnósticamente para monitorear los niveles de proteína GITRL como parte de procedimientos de ensayo clínico, o clínicamente para apuntar un modulador terapéutico a una célula o un tejido que comprende los antígenos del anticuerpo GITRL. Por ejemplo, un terapéutico tal como una molécula pequeña u otro terapéutico de la invención se puede ligar al anticuerpo GITRL con el fin de

219
220

apuntar el terapéutico a la célula o tejido que expresa GITRL. Los anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes (preferiblemente los anticuerpos monoclonales) que se unen a la proteína GITRL también pueden ser útiles en el tratamiento de condiciones que involucran la desregulación del sistema inmune, por ejemplo, enfermedades autoinmunes. Estos anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden ser capaces de bloquear el GITRL que se une a GATR. La presente invención proporciona además composiciones que comprenden un anticuerpo que reacciona específicamente con el GITRL. Similarmente, los anticuerpos anti-GATR se pueden utilizar para aislar, purificar y/o detectar GATR, monitorear diagnósticamente niveles de GATR, o apuntar clínicamente un modulador terapéutico a una célula o tejido que comprende GATR. Los anticuerpos agonistas a GATR (preferiblemente los anticuerpos monoclonales) pueden ser útiles en el tratamiento de condiciones que involucran la desregulación del sistema inmune, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Estos anticuerpos agonistas pueden ser capaces de inducir actividad GATR. Así la presente invención suministra adicionalmente composiciones que comprenden un anticuerpo al GATR.

Ensayos de Selección GITRL

[0119] Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar para seleccionar ensayos para identificar agentes farmacológicos o conducir compuestos para agentes que sean capaces de modular la actividad GITRL, y por lo tanto GATR, en una célula u organismo, y son de esta manera reguladores potenciales de las respuestas inmunes. Por ejemplo, muestras que contienen GITRL (bien sea naturales o recombinantes) se pueden poner en contacto con una de una pluralidad de compuestos de ensayo (o agentes biológicos o moléculas orgánicas pequeñas), y la actividad del GITRL en cada una

de las muestras tratadas se puede comparar con la actividad del GITRL en muestras no tratadas o en muestras puestas en contacto con diferentes compuestos de ensayo. Tales comparaciones determinarán si cualquiera de los compuestos de ensayo da como resultado 1) un nivel sustancialmente disminuido de expresión o actividad del GITRL, indicando de esta manera un inhibidor del GITRL (un compuesto que reestablece o mejora la supresión inmune), o 2) un nivel sustancialmente incrementado de expresión o actividad del GITRL, indicando de esta manera un activador del GITRL (por ejemplo, un compuesto que reversa la supresión inmune). En una modalidad, la identificación de los compuestos de ensayo capaces de modular la actividad GITRL se desarrolla utilizando ensayos de selección completos altos, tales como ensayos BIACORE®, (Biacore International AB, Uppsala, Suecia), BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia), y FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), así como también ensayos ELISA y basados en célula.

Moléculas Pequeñas

[0120] La actividad GATR disminuida en un organismo (o sujeto) afligido con (o en riesgo de) desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, o rechazo de transplante, o en una célula de tal organismo (o sujeto) involucrada en tales desórdenes, también se puede lograr a través del uso de moléculas pequeñas (usualmente moléculas pequeñas orgánicas) que antagonizan, es decir, inhiben la actividad del, GATR. Las moléculas pequeñas antagonistas novedosas se pueden identificar al seleccionar los métodos descritos anteriormente y se pueden utilizar en los métodos de tratamiento de la presente invención descritos adelante. Por el contrario, la actividad GATR incrementada en un organismo (o sujeto) afligido con (o en riesgo de) cáncer o enfermedad infecciosa, o en una célula de tal organismo

(o sujeto) involucrado en tales desórdenes, se puede lograr a través del uso de moléculas pequeñas (usualmente moléculas pequeñas orgánicas) que agonizan, es decir, mejoran la actividad de, GITR. Las moléculas pequeñas de agonistas novedosos se pueden identificar al seleccionar los métodos descritos anteriormente y se pueden utilizar en los métodos para tratar cáncer y/o enfermedades infecciosas como se describe adelante.

Métodos para Diagnosticar, Pronosticar, y Monitorear el Progreso de Desórdenes Autoinmunes y Cánceres

[0121] Es bien conocido en la técnica que los mecanismos inmunológicos estudiados en modelos animales, particularmente modelos de murino, pueden ser y a menudo son, trasladados al sistema inmune humano. Como tales, aunque los ejemplos descritos aquí demuestran el papel del GITR en la supresión inmune mediante células reguladoras CD4⁺CD25⁺ en un modelo de murino, los métodos descritos para diagnosticar, pronosticar y monitorear desórdenes relacionados con la desregulación del sistema inmune, por ejemplo, los desórdenes autoinmunes, los desórdenes inflamatorios y el rechazo de trasplante, y cáncer y enfermedad infecciosa, serán particularmente útiles para diagnosticar, pronosticar y monitorear tales desórdenes en humanos. Para practicar los métodos descritos, el experto reconocerá que los homólogos de humano de GITR y GITRL, así como también los agonistas y antagonistas GITR de humano, se pueden utilizar en los métodos reivindicados para diagnosticar, pronosticar, y monitorear tales desórdenes en humanos.

[0122] La presente invención suministra métodos para diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso de enfermedades autoinmunes en un sujeto

ZZZ
vab

(por ejemplo, que involucra directamente o indirectamente incremento en los niveles del GITRL) al detectar una sobrerregulación en la actividad GTR, por ejemplo, al detectar una sobrerregulación del GITRL, que incluye pero no está limitado al uso de tales métodos en sujetos humanos. Un experto en la técnica reconocerá que estos métodos se pueden aplicar a enfermedades inflamatorias y a rechazos de transplante también. Estos métodos pueden ser desarrollados al utilizar kits de diagnóstico preempacados que comprenden al menos uno de los grupos que comprenden el polinucleótido GITRL o fragmentos de éste, el polipéptido GITRL o porciones de éste (que incluyen las proteínas de fusión de éste), o anticuerpos a los polipéptidos GITRL o derivados de estos, o moduladores de los polinucleótidos GITRL y/o polipéptidos como se descubrió aquí que pueden ser convenientemente utilizados, por ejemplo, en una disposición clínica. Además, un experto en la técnica reconocería que el incremento de la regulación del GITRL también se puede detectar mediante métodos indirectos, tal como conteo del número de células inmunes

[0123] "Diagnóstico" o "diagnosticar" significa identificar la presencia o ausencia de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico incluyen detectar el incremento de regulación del GITRL al determinar una cantidad de ensayo del producto de gen GITRL (por ejemplo, mRNA, cADN, o polipéptido, que incluyendo fragmentos de éste) en una muestra biológica de un sujeto (humano o mamífero no humano), comparando la cantidad de ensayo con una cantidad o rango normal (es decir, una cantidad o rango del o los individuos conocidos por no sufrir de los desórdenes autoinmunes) para el producto de gen GITRL. Aunque un método de diagnóstico particular puede no suministrar un diagnóstico definitivo de los desórdenes autoinmunes, es suficiente si el método suministra una indicación positiva que ayude en el diagnóstico

[0124] La presente invención también suministra métodos para pronosticar tales desórdenes autoinmunes al detectar la sobrerregulación en la actividad GTR, por ejemplo, al detectar incremento de regulación del GTRL. "Pronóstico" o "pronosticar" significan predecir el desarrollo probable y/o la severidad de una condición patológica. Los métodos de pronóstico incluyen determinar la cantidad de ensayo de un producto de gen GTRL en una muestra biológica de un sujeto, y comparar la cantidad de ensayo a una cantidad o rango de pronóstico (es decir, una cantidad o rango de individuos con severidades variantes de desórdenes autoinmunes) para el producto del gen GTRL. Varias cantidades de producto de gen GTRL en la muestra de ensayos son consistentes con ciertos pronósticos para desórdenes autoinmunes. La detección de una cantidad del producto de gen GTRL a un nivel de pronóstico particular suministra un pronóstico para el sujeto

[0125] La presente invención también suministra métodos para monitorear el progreso o curso de tales desórdenes autoinmunes al detectar la sobrerregulación de la actividad GTR, por ejemplo, al detectar la sobrerregulación del GTRL. Los métodos de monitoreo incluyen determinar los compuestos de ensayo del producto de gen GTRL en muestras biológicas tomadas de un sujeto en un primer y segundo momento, y comparar las cantidades. Un cambio en la cantidad del producto de gen GTRL entre el primer y segundo momentos indica un cambio en el curso de los desórdenes autoinmunes, con una disminución en la cantidad que indica remisión de los desórdenes autoinmunes, y un incremento en la cantidad que indica progresión en los desórdenes autoinmunes. Tales ensayos de monitoreo también son útiles para evaluar la eficacia de una intervención terapéutica particular en pacientes que son tratados por desórdenes autoinmunes.

[0126] La expresión incrementada del GITRL en los métodos subrayados anteriormente se puede detectar en una variedad de muestras biológicas, que incluyen fluidos corporales (por ejemplo, sangre total, plasma, y orina), células (por ejemplo, células completas, fracciones de células, y extractos de células), y tejidos. Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejido, tal como biopsias y secciones congeladas tomadas con propósitos histológicos. Las muestras biológicas preferidas incluyen sangre, plasma, linfa, biopsias de tejido, orina, CSF (fluido cerebroespinal), fluido sinovial, y BAL (irrigación broncoalveolar). Se apreciará que el análisis de una muestra biológica no necesita necesariamente requerir la remoción de células o tejido del sujeto. Por ejemplo, los agentes marcadores apropiados que se unen a los productos de gen GITRL (por ejemplo, anticuerpos, ácidos nucleicos) se pueden administrar a un sujeto y se visualizan (cuando se unen al objetivo) utilizando tecnología de imágenes estándar (por ejemplo, CAT, NMR (MRI), y PET)

[0127] En los ensayos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención, el producto del gen GITRL se detecta y cuantifica para producir una cantidad de ensayo. La cantidad de ensayo es luego comparada con la cantidad o rango normal. Una cantidad significativamente superior a la cantidad normal o rango es un signo positivo en los diagnósticos de desórdenes autoinmunes. Los métodos particulares de detección y cuantificación de los productos del gen GITRL se describen adelante.

[0128] Las cantidades normales o líneas base de los productos de gen GITRL se pueden determinar mediante cualquier tipo y población de muestra particular. De manera general, los niveles de línea base (normal) de la proteína GITRL o mRNA se determinan al medir la cantidad de proteína GITRL o mRNA en

un tipo de muestra biológica de sujetos normales (es decir, saludables). Alternativamente, los valores normales del producto del gen GITRL se pueden determinar al medir la cantidad en las células o tejidos normales tomados del mismo sujeto de los cuales fueron tomadas las células o tejidos de ensayos enfermos (o posiblemente enfermos). La cantidad del producto de gen GITRL (o la cantidad normal de la cantidad de ensayo) se puede determinar o expresar sobre la base por célula, por proteína total, o por volumen. Para determinar la cantidad de células de una muestra, uno puede medir el nivel de un producto de gen constitutivamente expresado u otro producto de gen expresado a niveles conocidos en las células del tipo del cual fue tomada la muestra biológica.

[0129] Se apreciará que los métodos de ensayo de la presente invención no necesariamente requieren medición de valores absolutos del producto del gen GITRL en razón a que los valores relativos son suficientes para muchas aplicaciones de estos métodos. Se apreciará además la cantidad y abundancia de los productos de gen GITRL, los productos de gen GITRL variantes o anormales o sus patrones de expresión (por ejemplos, transcritos mutados, polipéptidos truncados) se pueden identificar mediante comparación con los productos de gen normal y los patrones de expresión.

[0130] Los ensayos de diagnóstico, pronóstico, y monitoreo de la presente invención involucran detectar y cuantificar los productos de gen GITRL en muestras biológicas. Los productos de gen GITRL incluyen mRNA de GITRL y polipéptido GITRL, y ambos se pueden medir utilizando métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

[0131] Por ejemplo, el mRNA de GITRL puede ser directamente detectado y cuantificado utilizando ensayos basados en hibridización, tales como la hibridización Northern, hibridización *in situ*, manchas de ranura y punto, y disposiciones de oligonucleótido. Los ensayos basados en hibridización se refieren a ensayos en los cuales un ácido nucleico sonda se hibridiza a un ácido nucleico objetivo. En algunos formatos, el objetivo, la sonda, y ambos son inmovilizados. El ácido nucleico inmovilizado puede ser ADN, ARN, u otro oligonucleótido o polinucleótido, y puede comprender nucleótidos de ocurrencia natural o no natural, análogos de nucleótido, o estructuras. Los métodos para seleccionar secuencias de sonda de ácido nucleico para uso en la presente invención están basados en la secuencia de ácido nucleico del GITRL y son bien conocidos en la técnica.

[0132] Alternativamente, el mRNA de GITRL se puede amplificar antes de la detección y cuantificación. Tales ensayos basados en amplificación son bien conocidos en la técnica e incluyen reacción de cadena de polimerasa (PCR), PCR de transcripción inversa (RT-PCR), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima PCR (PCR-ELISA), y reacción en cadena de ligasa (LCR). Los iniciadores y las sondas para producir y detectar los productos de gen de GITRL amplificados (por ejemplo, mRNA o cADN) pueden ser fácilmente diseñados y producidos sin experimentación indebida por aquellos expertos en la técnica con base en la secuencia de ácido nucleico del GITRL. Los productos de gen de GITRL amplificados se pueden analizar directamente, por ejemplo, mediante electroforesis de gen; mediante hibridización a un ácido nucleico sonda, secuenciación; mediante detección de una señal fluorescente, fosforescente o radioactiva; o mediante cualquier variedad de métodos bien conocidos. Además, los métodos son conocidos por aquellos expertos en la técnica por incrementar la señal producida por la amplificación de las secuencias de ácido nucleico. Un

227
228

experto en la técnica reconocerá que cualquiera sea el método de amplificación utilizado, se pueden utilizar una variedad de métodos cuantitativos conocidos en la técnica (por ejemplo, PCR cuantitativo) si se desea la cuantificación de los productos de gen GITRL.

[0133] El polipéptido GITRL (o fragmentos de éste) se pueden detectar utilizando varios ensayos inmunológicos bien conocidos que emplean los anticuerpos anti-GITRL descritos anteriormente. Los ensayos inmunológicos se refieren a ensayos que utilizan un anticuerpo (por ejemplo, policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, scFv, y fragmentos de estos) que se unen específicamente al polipéptido GITRL (o fragmentos de éste). Tales ensayos inmunológicos bien conocidos adecuados para la práctica de la presente invención incluyen ELISA, radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, escogencia de célula activada con fluorescencia (FACS), y Westernblot. El polipéptido GITRL también se puede detectar utilizando GITR marcado.

[0134] Un experto en la técnica entenderá que los métodos anteriormente mencionados se pueden aplicar a desórdenes autoinmunes y a otros desórdenes (tal como enfermedades inflamatorias), que incluyen, pero no están limitados a, artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis múltiple, gastritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis y otras dermatosis inflamatorias, diabetes tipo I, asma, alergia, y enfermedades inflamatorias del intestino, que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.

[0135] Un experto en la técnica también reconocerá que los métodos anteriormente mencionados o las variaciones a estos se pueden utilizar para

diagnosticar, pronosticar y monitorear el progreso de varios cánceres y enfermedades infecciosas en un sujeto (por ejemplo, que involucre directa o indirectamente disminuciones en los niveles de GITRL) al detectar una subregulación de la actividad GTR, por ejemplo, al detectar la subregulación del GITRL, que incluye pero no está limitado al uso de tales métodos en sujetos humanos.

Uso del GITRL y Moléculas Relacionadas en Terapia

[0136] Los solicitantes consideran que ellos son los primeros en reconocer que la unión del GTR sobre las células T efectoras por el GITRL, u otros agonistas GTR, suministran una señal coestimuladora a las células T efectoras, en donde tal señal hace las células T efectoras menos susceptibles a la supresión mediante células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ e incrementa la capacidad de las células T efectoras a proliferar en respuesta al anti-CD3 u otras señales activadoras. Aunque el modelo de murino se utilizó para descubrir el mecanismo, es bien conocido en la técnica que los mecanismos inmunológicos estudiados en modelos de murino, pueden ser y a menudo son, trasladables al sistema inmune humano. Como tal, los métodos descritos para utilizar GITRL y moléculas relacionadas, es decir, agonistas GTR o antagonistas GTR, para tratar desórdenes relacionados con la desregulación del sistema inmune, por ejemplo, desórdenes autoinmunes, desórdenes inflamatorios y rechazo de transplante, y cáncer y enfermedad infecciosa, serán particularmente útiles para tratar tales desórdenes en humanos. En la práctica de los métodos descritos, una persona medianamente versada reconocerá que los homólogos de humano del GTR y GITRL, así como también los agonistas y antagonistas de GTR humano, se pueden utilizar en los métodos reivindicados de utilizar GITRL y proteínas

relacionadas con GITRL, es decir, agonistas y antagonistas GTR, para tratar desórdenes autoinmunes, desórdenes inflamatorios y rechazo de trasplante, y cáncer y enfermedades infecciosas en humanos.

[0137] Las moléculas relacionadas con GITRL descritas aquí, es decir, los agonistas y antagonistas GTR, que incluyen moduladores del polinucleótido GITRL y/o actividad de polipéptido identificada utilizando los métodos descritos anteriormente, se pueden utilizar *in vitro*, *ex vivo*, o ser incorporadas a composiciones farmacéuticas y administradas a individuos *in vivo* para tratar, por ejemplo, desórdenes autoinmunes mediante la administración de un antagonista GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, anticuerpo anti-GTR neutralizantes, y/o anticuerpos anti-GITRL neutralizantes), o, por ejemplo, cánceres mediante la administración de un agonista GTR (por ejemplo, polinucleótidos GITRL, polipéptidos GITRL, o proteínas de fusión de estos, moléculas pequeñas agonistas y/o anticuerpos anti-GTR agonistas). Tales GITRL y/o moléculas relacionadas (que incluyen moduladores) incluyen, pero no están limitados a, GITRL de ratón y sus homólogos (y anticuerpos a tales moléculas), y tales homólogos incluyen, pero no están limitados a, GITRL humano. Varias aproximaciones farmacogenómicas a ser consideradas para determinar si el GITRL administrador y/o las moléculas relacionadas con GITRL son bien conocidas por un experto en la técnica e incluyen asociación amplia de genoma, aproximación a gen candidato, y perfil de expresión de gen. Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta pretendida de administración (por ejemplo, las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible). Otros ejemplos no limitantes de rutas de administración incluyen administración parenteral (por ejemplo, intravenosa), intradérmica, subcutánea,

oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa, y rectal. Las composiciones farmacéuticas compatibles con cada ruta pretendida son bien conocidas en la técnica.

[0138] Los agonistas y antagonistas GTR se pueden utilizar como composiciones farmacéuticas cuando se combina con un portador farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede contener en adición a los agonistas o antagonistas GTR y al portador, varios diluyentes, llenadores, sales, amortiguadores, estabilizadores, solubilizadores, y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico y no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del o los ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la ruta de administración.

[0139] La composición farmacéutica de la invención también puede contener citoquinas, linfocinas, y otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, G-CSF, factor de célula madre, y eritropoyetina. La composición farmacéutica también puede incluir anticuerpos anticitoquina como se describen con más detalle adelante. La composición farmacéutica puede contener factores trombolíticos o antitrombóticos tales como activador de plasminógeno y Factor VIII. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes antiinflamatorios como se describe con más detalle adelante. Tales factores adicionales y/o agentes se pueden incluir en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con los agonistas y antagonistas GTR, o minimizar los efectos colaterales causados por los agonistas o antagonistas GTR. Por el contrario los agonistas o antagonistas GTR se pueden incluir en formulaciones de

la citoquina particular, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico, o agente antiinflamatorio para minimizar los efectos colaterales de la citoquina, linfocina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o antitrombótico, o agente antiinflamatorio.

[0140] La composición farmacéutica de la invención puede estar en la forma de un liposoma en la cual los agonistas y antagonistas G1TR se combinan, además de otros portadores farmacéuticamente aceptables, con agentes antipáticos tal como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas lamelares en solución acuosa. Los lípidos adecuados para formulación liposomal incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, etc. La preparación de tales formulaciones liposomales está dentro del nivel del experto en la técnica, como se describió, por ejemplo, en la Patente U S No. 4,235,871; Patente U.S. No. 4,501,728; Patente U.S. No. 4,837,028, y Patente U.S. No. 4,737,323, todas las cuales se incorporan aquí como referencia.

[0141] Como se utiliza aquí, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o el método que es suficiente para mostrar los beneficios significativos al paciente, por ejemplo, mejoramiento de los síntomas de, curación de, o incremento en la rata de curación de tales condiciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que resultan en el efecto terapéutico, si se administran en combinación, serialmente o simultáneamente.

[0142] En la práctica del método de tratamiento o uso de la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista GTR (por ejemplo, un polinucleótido GTRL o un polipéptido GTRL expresado de éste) o un antagonista GTR (por ejemplo, un anticuerpo anti-GTRL neutralizante o un anticuerpo anti-GTR neutralizante) se administra a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un humano) El agonista o antagonista GTR se puede administrar de acuerdo con el método de la invención bien sea solo o en combinación con otras terapias, tales como tratamientos que emplean citoquinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos, o agentes antiinflamatorios. Cuando se coadministra con uno o más agentes, el agonista o antagonista GTR se puede administrar bien sea simultáneamente con el segundo agente, o secuencialmente Si se administran secuencialmente, el médico que atiende decidirá sobre la secuencia apropiada de administración, por ejemplo, un polipéptido GTRL (o una proteína de fusión de éste) o un anticuerpo anti-GTRL neutralizante en combinación con otros agentes.

[0143] Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista o antagonista GTR se administra oralmente, el agente de unión estará en la forma de una tableta, cápsula, polvo, solución, o elixir. Cuando se administra en forma de tableta, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. La tableta, cápsula, o polvo contiene desde aproximadamente 5 a 95% de agente de unión, y preferiblemente desde aproximadamente 25 a 90% de agente de unión Cuando se administra en forma líquida, se puede agregar un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites de animales o de origen vegetal tal como aceite de maní, aceite mineral, aceite de soja, o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede adicionalmente contener solución

salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles tal como etilenglicol, propilenglicol, o polietilenglicol. Cuando se administra en la forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde aproximadamente 0,5 a 90% en peso del agente de unión, y preferiblemente desde aproximadamente 1 a 50% en peso del agente de unión

[0144] Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista o antagonista G1TR se administra mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agonista o antagonista G1TR estará en la forma de solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógeno. La preparación de tales soluciones de proteína parenteralmente aceptables, que tienen debida relación con el pH, isotonicidad, estabilidad, y similares, está dentro del alcance de aquel experto en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener, además del agonista y antagonista G1TR, un vehículo isotónico tal como una Inyección de Cloruro de Sodio, una Inyección de Ringer, Inyección de Dextrosa, Inyección de Dextrosa y Cloruro de Sodio, Inyección de Ringer Lactada, u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizadores, preservativos, amortiguadores, antioxidantes, y otros aditivos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

[0145] La cantidad del agonista y antagonista G1TR en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y severidad de la condición a ser tratada, y de la naturaleza de los anteriores tratamientos que el paciente haya soportado. Finalmente, el médico que atiende decidirá la cantidad de agonista o antagonista G1TR con la cual tratar cada paciente individual. Inicialmente, el médico que atiende administrará dosis bajas de agonista o

235

antagonista GTR y observará la respuesta del paciente. Dosis mayores de agonista o antagonista GTR se pueden administrar hasta que el efecto terapéutico óptimo se obtenga para el paciente, y ese punto de dosis generalmente no se incrementa más. Se contempla que varias composiciones farmacéuticas utilizadas para practicar el método de la presente invención deben contener aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 100 mg de por ejemplo, polipéptido GITRL o anticuerpo anti-GITRL neutralizante por kg de peso corporal.

[0146] La duración de la terapia intravenosa (i.v.) que utiliza una composición farmacéutica de la presente invención variará, dependiendo de la severidad de la enfermedad que esté siendo tratada y la condición y la respuesta idiosincrática potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación del agonista o antagonista GTR pueda estar en el rango de 12 a 24 horas de administración i.v. continua. También se contempla terapia subcutánea (s.c) utilizando una composición farmacéutica de la presente invención. Estas terapias se pueden administrar diariamente, semanalmente, o, más preferiblemente, bisemanalmente, o mensualmente. También se contempla que donde el agonista o antagonista GTR es una molécula pequeña, las terapias se pueden administrar diariamente, dos veces al día, tres veces al día, etc. Finalmente el médico que atiende decidirá sobre la duración apropiada de la terapia i.v. o s.c., o la terapia con una molécula pequeña, y el tiempo de administración de la terapia, utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

[0147] Los polinucleótidos y proteínas de la presente invención se espera que exhiban uno o más de los usos o actividades biológicas (que incluyen aquellas asociadas con los ensayos citados aquí) identificados adelante. Los usos o

actividades descritos para las proteínas de la presente invención se pueden suministrar mediante administración o uso de tales proteínas, o mediante la administración o uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas (tal como, por ejemplo, en terapias génicas o vectores adecuados para introducción de ADN).

Usos de GITRL y Otros Agonistas GTR para Mejorar una Respuesta Inmune

[0148] En un aspecto, la presente invención suministra métodos para incrementar la célula inmune, por ejemplo, proliferación de células T (por ejemplo, una célula T efectora) al contactar una célula inmune o una población de células inmunes con un agonista GTR, por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido GITRL de la invención (por ejemplo, una proteína de fusión de estos) y/o un anticuerpo anti-GTR agonista, que potencia o mejora la actividad del GTR. Estos métodos están basados, al menos en parte, en el hallazgo de que la supresión mediada por célula T $CD4^+CD25^+$ reversada por anticuerpo anti-GTR agonista de proliferación de célula T $CD4^+CD25^-$ (Ejemplo 5). Los métodos también están basados, en parte, en el hallazgo de que la unión GTR mediante, por ejemplo, GITRL o un anticuerpo anti-GTR agonista, induce proliferación de las células T efectoras (por ejemplo, células T $CD4^+CD25^-$ y $CD8^+$) (Ejemplo 9 y Ejemplo 13). Los solicitantes también mostraron que el GTR que se une al GITRL suministra una señal coestimuladora a las células T efectoras (por ejemplo, células T $CD4^+$ y $CD8^+$), incrementando de esta manera las capacidades de las células T efectoras para solucionar la supresión mediada por células T reguladoras $CD4^+CD25^+$ y proliferan en respuesta a anti-CD3 (Ejemplos 11 y 13); es decir, la unión de GTR expresado sobre células T efectoras mediante agonistas GTR (por ejemplo, polipéptido GITRL, fragmentos activos de éste, y/o anticuerpos anti-GTR agonistas) hace las

236
237

células T efectoras menos susceptibles a la supresión de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. De acuerdo con esto, los agonistas GITR que estimulan la actividad GITR en las células T efectoras se pueden utilizar por ellas mismas o en combinación con un antígeno, por ejemplo, como un adyuvante (por ejemplo, un adyuvante de vacuna), para sobrerregular una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo, para uso en el tratamiento de cáncer y desórdenes infecciosos

[0149] En una modalidad, los agonistas GITR (por ejemplo, los polinucleótidos GITRL, los polipéptidos, y fragmentos activos y/o las proteínas de fusión de estos, las moléculas pequeñas agonistas y/o los anticuerpos anti-GITR agonistas) puede ser útiles en el tratamiento de varias deficiencias y desórdenes inmunes (que incluyen inmunodeficiencia combinada severa (SCID)), por ejemplo, al incrementar regulación de crecimiento y proliferación de células T. Estas deficiencias inmunes pueden ser genéticas o ser causadas por infecciones virales (por ejemplo, VIH) así como también bacteriales o fungosas, o pueden ser el resultado de desórdenes autoinmunes. Más específicamente, las enfermedades infecciosas causadas mediante infección viral, bacterial, fungosa u otra infección pueden ser tratables utilizando una proteína de la presente invención, que incluye infecciones por VIH, virus de la hepatitis, virus del herpes, micobacteria, *Leishmania* spp., *malaria* spp y varias infecciones fungosas tales como candidiasis. Por supuesto, a este respecto, una proteína de la presente invención puede ser útil donde se desee de manera general un refuerzo del sistema inmune, es decir, en el tratamiento del cáncer.

[0150] Incremento de regulación de los antígenos celulares que presentan antígeno (APC) (por ejemplo, incremento de regulación de B7 1, B7.2, y B7 3), como medios de incrementar regulación de respuestas inmunes, también pueden

237
238

ser útiles en terapia. La sobrerregulación de respuestas inmunes puede ser en la forma de mejorar una respuesta inmune existente o elicitarse una respuesta inmune inicial. Por ejemplo, mejorar una respuesta inmune a través de estimular el antígeno celular dendrítico que presenta funciones puede ser útil en casos de infección viral. Además, las enfermedades virales sistémicas tales como la influenza, el resfriado común, y la encefalitis se pueden aliviar mediante la administración de moléculas que presentan antígeno de formas estimuladoras, por ejemplo, antígenos de célula dendrítica, sistémicamente.

[0151] Alternativamente, las respuestas inmunes antivirales se pueden mejorar en un paciente infectado al remover las células T del paciente, coestimulando las células T *ex vivo* con los APC profesionales pulsados con antígeno viral (por ejemplo, células B, macrófagos y/o células dendríticas) y los agonistas GITR (por ejemplo, polinucleótidos GITRL, polipéptidos, fragmentos activos y/o proteínas de fusión de estos, moléculas pequeñas agonistas y/o anticuerpos anti-GITR agonistas). Los agonistas GITR (por ejemplo, los polinucleótidos GITRL, los polipéptidos, los fragmentos activos y/o las proteínas de fusión de estos, y/o los anticuerpos anti-GITR agonistas) se pueden suministrar bien sea como proteína soluble o como expresados por los APC. Otro método para mejorar las respuestas inmunes antivirales sería aislar las células infectadas de un paciente, transfectarlas con un ácido nucleico que codifica una proteína GITRL de la presente invención como se describió aquí, de tal forma que las células expresen todo o una porción de la proteína sobre su superficie, y reintroducir las células transfectadas en el paciente. Las células infectadas serían ahora capaces de suministrar una señal coestimuladora a las células T efectoras *in vivo*, es decir, la expresión de la proteína GITRL, o un ingrediente activo de ésta, mediante la célula infectada, y unir tal proteína GITRL al GITR sobre células

T efectoras podría hacer a las células T efectoras menos susceptibles a la supresión mediante células T reguladoras CD4⁺CD25⁺.

[0152] En otra aplicación, la sobrerregulación o el mejoramiento de una función de antígeno APC puede ser útil en la inducción de inmunidad tumoral. Las células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, y carcinoma) transfectadas con un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de la presente invención se puede administrar a un sujeto para solucionar tolerancia específica a tumor en el sujeto. Si se desea, la célula tumoral se puede transfectar para expresar una combinación de péptidos. Por ejemplo, las células tumorales obtenidas de un paciente pueden ser transfectadas *ex vivo* con un vector de expresión que dirige la expresión del agonista GITR (por ejemplo, polipéptidos GITR, fragmentos activos y/o proteínas de fusión de estos, y/o anticuerpos anti-GITR agonistas), solas o en combinación con un péptido que tiene actividad similar a B7.2 sola, o en conjunto con un péptido que tiene actividad similar a B7.1, etc. Las células tumorales transfectadas son regresadas al paciente para dar como resultado la expresión de los péptidos sobre la superficie de la célula transfectada. Alternativamente, las técnicas de terapia génica se pueden utilizar para apuntar a una célula tumoral para transfección *in vivo*.

[0153] La presencia de un agonista GITR (por ejemplo, un polipéptido GITRL, fragmentos activos y/o proteínas de fusión del mismo, una molécula pequeña agonista y/o un anticuerpo anti-GITR agonista), en combinación con un péptido que tiene la actividad de un antígeno APC (por ejemplo B7.1, B7.2, etc.) sobre la superficie de la célula tumoral suministra las señales coestimulatorias necesarias para que las células T induzcan una respuesta inmune mediada por célula T

contra las células tumorales transfectadas. Adicionalmente, las células tumorales, que carecen de moléculas MHC clase I o MHC clase II o que caen para reexpresar cantidades suficientes de moléculas MHC clase I o MHC clase II, pueden ser transfectadas con ácidos nucleicos que codifican toda o una porción (por ejemplo, una porción truncada del dominio citoplásmico) de una proteína de cadena MHC clase I α y proteína $\beta 2$ de microglobulina o una proteína de cadena MHC clase II α y una proteína de cadena β MHC clase II (o ácidos nucleicos HLA humanos correspondientes) para expresar así proteínas MHC clase I o MHC clase II (o moléculas HLA correspondientes) sobre la superficie celular. La expresión del MHC de clase I o clase II apropiados en conjunto con agonista GITR (por ejemplo, un polipéptido GITRL, fragmentos activos y/o proteínas de fusión del mismo, y/o una anticuerpo anti-GITR agonista), y/o un péptido que tiene la actividad de un antígeno APC (por ejemplo, B7.1, B7.2, etc.) induce una respuesta inmune mediadas por células T contra la célula T transfectada. Opcionalmente, un gen que codifica una construcción antisentido que bloquea la expresión de una proteína asociada MHC clase II, tal como la cadena invariable, también puede ser cootransfectada con un ADN que codifica un agonista GITR (por ejemplo, un polipéptido GITRL, fragmento activo del mismo, una proteína de fusión del mismo, y/o un anticuerpo anti-GITR agonista) y/o un péptido que tiene la actividad de un antígeno APC para promover la presentación de antígenos asociados con el tumor e induce inmunidad específica en el tumor. Así, la inducción de una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto humano puede ser suficiente para sobre ponerse a la tolerancia específica al tumor en el sujeto

[0154] En otras modalidades, los agonista GITR, (por ejemplo, un polipéptido GITRL, fragmentos activos y/o proteínas de fusión del mismo, una molécula pequeña agonística y/o un anticuerpo anti-GITR agonista) de la invención pueden

ser usados como ayudantes de vacunas. Los adyuvantes son compuestos moduladores inmunes que tiene la habilidad de promover y/o dirigir el desarrollo y perfil de las respuestas inmune contra diversos antígenos que ellos mismos son pobremente inmunogénicos. Las citoquinas y/o linfocinas pueden ser usadas como adyuvantes. La selección adecuada de los adyuvantes puede inducir buenas respuestas inmune y celulares que no se desarrollarían en la ausencia del adyuvante. En particular los adyuvantes tienen efectos significativos en la promoción de la respuesta inmune a subunidades y antígenos de péptidos en vacunas. Su actividad estimuladora es también benéfica al desarrollo de la respuesta inmune específicas de antígeno dirigidas contra antígenos de proteína. Para una variedad de antígenos que requieren fuertes respuestas de mucosa, títulos altos de suero, inducción de CTL (linfocitos T citotóxicos) y respuestas celulares vigorosas, las combinaciones de adyuvantes citoquinas/linfocina suministran los estímulos que no son provistos por la mayoría de las preparaciones de antígeno.

[0155] Como se usa aquí la frase "adyuvante de vacunas" o "terapia de vacunas" tiene propósito de significar el uso de un agonista GITR (por ejemplo, un polinucleótido, GITRL, polipéptido GITRL, un fragmento activo del mismo, una proteína de fusión del mismo, y/o un anticuerpo anti-GITR agonista), en combinación con un antígeno (por ejemplo, polipéptidos virales, parasíticos o bacteriales, proteínas o péptidos), u otros antígenos (por ejemplo, polipéptidos de células tumorales o cancerosas, proteínas o péptidos) o polinucleótidos que codifican el antígeno para promover, suprimir o de otra manera modular una respuesta inmune al antígeno. Para el propósito de esta definición, "combinación" debe significar el uso en conjunto con, simultáneamente con (combinados o no combinados) o secuencialmente con un antígeno

24/242

[0156] El termino "composición adyuvante de vacunas" se refiere a un adyuvante de vacuna que adicionalmente incluye diluyentes inmunológicamente aceptables o portadores inmunológicamente aceptables de una manera convencional para preparar soluciones o suspensiones líquidas inyectables. La composición adyuvante de vacuna puede adicionalmente incluir agentes que promueven adicionalmente una respuesta inmune producidos por un agonista GITR. Por ejemplo, la composición adyuvante de vacuna puede adicionalmente incluir el lípido 3-O desacilado de monofosforilo a (MPL®; Corixa Corporation, Seattle, Wash.) o el lípido de monofosforilo A y derivados y análogos del mismo. MPL® pueden ser usados en un rango entre 1 a 100 micro/ por dosis.

[0157] Los antígenos utilizados para la terapia de vacuna incluyen proteínas, péptidos o polipéptidos derivados de proteínas inmunogénicas y no inmunogénicas, lo mismo que cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, polinucleótidos u oligonucleótidos, u otros componentes macromoleculares, o fragmentos de los mismos. Como se usa en esta sección, un "péptido" comprende una serie de por lo menos de 6 aminoácidos y contiene por lo menos un determinante antigénico, mientras que un "polipéptido" es una molécula más larga que un péptido, pero no constituye una proteína de longitud completa. Como se usa aquí, un "fragmento" comprende una porción, pero menos de todo de un sacárido, proteína, polinucleótidos u oligonucleótidos, u otros componentes macromoleculares.

[0158] Como se usa aquí el término "cantidad adyuvante efectiva" significa una dosis de la combinación de adyuvantes descritas aquí, la cual es adecuada para producir una respuesta inmune incrementada en un anfitrión vertebrado. La

242
243

dosificación particular dependerá en parte de la edad, peso y condición médica del anfitrión, lo mismo que el método de administración y el antígeno.

[0159] La composición adyuvante de vacuna de la invención puede ser administrada a un humano o a un vertebrado no humano por medio de una variedad de vías, incluyendo, pero sin limitarse a, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, transdérmica (ver, por ejemplo, la solicitud internacional WO 98/20734, que se incorpora aquí como referencia), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial. La cantidad del componente de antígeno o componente de antígeno de la composición antigénica variará dependiendo en parte de la identidad del antígeno, lo mismo que de la edad, peso y condición médica del sujeto, lo mismo que el método de administración. Nuevamente, las dosis adecuadas son determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica. Es preferible, aunque no es requerido, que el antígeno y la combinación de adyuvantes sean administrados al mismo tiempo. El número de dosis y el régimen de dosificación para la composición antigénica también son determinados fácilmente por personas versadas en la técnica. En algunas instancias en las propiedades adyuvantes de la combinación de adyuvantes puede reducir el número de dosis necesaria o el tiempo de curso del régimen de dosificación.

[0160] Las combinaciones de adyuvantes de esta invención son adecuadas para uso en combinación con una amplia de variedad de antígenos a partir de una amplia variedad de microorganismos patogénicos, incluyendo pero sin limitarse a aquellos de virus, bacterias, hongos o microorganismos parasíticos que infectan a los humanos y a los vertebrados no humanos, o a partir de células cancerosas o células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia,

neuroblastoma, y carcinoma). El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, lo mismo que fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, polinucleótidos u oligonucleótidos, células cancerosas o tumorales, u otros componentes macromoleculares. En algunos casos más de un antígeno es incluido en la composición antigénica

[0161] Las vacunas virales deseables que contiene combinaciones de adyuvante de esta invención incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas, sin limitación, virus de inmunodeficiencia humana, virus de inmunodeficiencia de simios, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza tipo I-III, virus de influenza, virus de herpes simples, citomegalovirus humano, virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis C, papilomavirus humano, poliovirus, rotavirus, calicivirus, virus de cistisarcosis, virus de parotiditis infecciosa, virus de rubéola, adenovirus, virus de la rabia, virus del moquillo canino, virus de la peste bovina, coronavirus, parvovirus, virus de rinotraqueitis infecciosa, virus de leucemia felina, virus de peritonitis infecciosa felina, virus de enfermedad bursal infecciosa aviar, virus de la enfermedad Newcastle, virus de la enfermedad Marek's, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de arteritis equina y varios virus de encefalitis.

[0162] Las vacunas bacteriales deseables contienen las combinaciones de adyuvante de esta invención que incluyen aquellas diluidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas por, sin limitación, *Haemophilus influenzae* (tanto tipificable como no tipificable) *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*,

274
245

Bordetella pertussis, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Salmonella choleraesuis, Escherichia coli, Shigella, Vibrio cholerae, Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare complex, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Clostridium tetani, Leptospira interrogans, Borrelia burgdorferi, Pasteurella haemolytica, Pasteurella multocida, Actinobacillus pleuropneumoniae and Mycoplasma gallisepticum.

[0163] las vacunas deseables contra patógenos fungales que contiene las combinaciones de adyuvantes de esta invención incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas por, sin limitación, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*

[0164] Las vacunas deseables contra parásitos que contienen las combinaciones adyuvantes de esta invención incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o de tratamientos de enfermedades causadas, sin limitación, *Leishmania major*, *Ascaris*, *Trichuris*, *Giardia*, *Schistosoma*, *Cryptosporidium*, *Trichomonas*, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis carinii*

[0165] Las vacunas deseables para producir un efecto anti cáncer terapéutico o profiláctico en un anfitrión vertebrado, que contiene las combinaciones de adyuvantes de esta invención, incluye aquellos que utilizan un antígeno canceroso o antígeno asociado a tumores que incluye, sin limitación, el antígeno específico de próstata (PSA), el antígeno de membrana específica de próstata (PSMA), antígeno carcino-embriónico (CEA), MUC-1, Her2, CA-125, MAGE-3, EGFR, HELP, GCC, CD66-c, prostasina, TMPRSS3, TADG 12 y TADG 15.

[0166] En el caso de HIV y de SIV, las composiciones antigénicas comprenden por lo menos una proteína, polipéptido, péptido, o fragmento derivado de dicho virus. En algunos casos, las proteínas de HIV o SIV múltiples, polipéptidos, péptidos y/o fragmentos son incluidos en la composición antigénica.

[0167] Las formulaciones de la combinación de adyuvantes de esta invención son también adecuadas para incluir como un adyuvante en vacunas de polinucleótidos (también conocidas como vacunas de ADN). Tales vacunas pueden influir adicionalmente agentes de facilitación tales como bupivacaína (ver la patente estadounidense # 5,593,972, la cual se incorpora aquí como referencia).

[0168] Los métodos de 1) estimular agentes que presentan función celular, por ejemplo, funciones de células dendríticas; 2) remover las células T del paciente, o estimularlas ex vivo, y reintroducirlas en el sujeto; 3) trasfectar células tumorales para inducir la inmunidad del tumor; 4) usar adyuvantes de vacuna que son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Cerundolo et al. (2004) Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol.* 5(1) 7-10; Ko et al. (2003) Immunotherapy of malignant diseases. *Int Arch. Allergy Immunol.* 132:294-309; Valmori et al. (1999) An antigen-targeted approach to adoptive transfer therapy of cancer. *Cancer Res* 59:2167-73) Usos de antagonistas GITR para disminuir la actividad celular inmune.

[0169] Todavía otros aspectos, los rasgos de la invención caracteriza un método para mantener la susceptibilidad de células T efectoras, por ejemplo CD4⁺ y CD8⁺, o una población de las misma para la supresión por células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. El método puede comprender o poner en contacto una población de células T con un antagonista GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de

GITRL, una molécula pequeña antagonista, un anticuerpo anti- GITR neutralizante, y/o un anticuerpo anti-GITRL neutralizante) en una cantidad suficiente para inhibir a actividad de la célula inmune o la población. Los antagonistas de GITR pueden también ser administrados a sujetos para quienes la supresión de una respuesta inmune se desea. Estas condiciones, influyen, por ejemplo, desórdenes autoinmunes (por ejemplo, desórdenes artríticos), enfermedades inflamatorias, o trasplantes de órganos.

[0170] Estos métodos están basados, por lo menos en parte, en encontrar que la reducción de la actividad GITR, por ejemplo por medio de usar un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, restaurará la supresión mediada por $CD4^+CD25^+$ (ejemplo 13), es decir, anticuerpo, anti-GITRL neutralizante mantiene la susceptibilidad de la células T efectoras, por ejemplo, células T $CD4^+$ y $CD8^+$, para la supresión por células T reguladoras $CD4^+ CD25^+$. Adicionalmente, los solicitantes han demostrado que la incubación de las células T efectoras con anticuerpo anti-CTRL neutralizante mejora la enfermedad en encefalitis auto inmune experimental de murina (EAE) (ejemplo 14). De acuerdo con lo anterior, los antagonistas GITR, es decir, moléculas que inhiben la actividad GITR (por ejemplo anticuerpo anti-GITRL) pueden ser usados para mantener la susceptibilidad de las células T efectoras para supresión por células T $CD4^+ CD25^+$ *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir patologías asociadas con células inmunes, incluyen rechazos de trasplantes, enfermedades inflamatorias, y desórdenes auto inmunes.

[0171] Lo métodos para usar antagonistas GITR pueden ser también usados para inhibir la actividad (por ejemplo, proliferación, diferenciación, supervivencia) de una célula T efectora, y así, pueden ser usados para tratar o impedir una variedad de desórdenes inmunes. Ejemplos no limitativos de los desórdenes que pueden

ser tratados o impedidos incluyen, sin limitarse a, rechazos de trasplantes. Enfermedades autoinmunes (incluyendo, por ejemplo. Diabetes Mellitus, artritis, (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis soriática), esclerosis múltiple, encefalomiелitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis auto inmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), soriasis, síndrome de Sjörge, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerativa, espondiloartropatías, espondilitis anquilozante, asma intrínseca, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones de droga reacciones inversas de lepra, entema nodular de lepra, uveitis autoinmune, encefalomiелitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva sensoneural progresiva bilateral ideopática, anemia aplásica, anemia de células roja pura, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegner, hepatitis activa crónica, síndrome de Steven's Jonson, planus liquen, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveitis posterior y fibrosis pulmonar intersticial), enfermedad de huésped versus injerto, y alergias tales como. Alergia atópica. Los desórdenes preferidos que pueden ser tratados usando los métodos que comprenden la administración de antagonistas GITR, por ejemplo, un anticuerpo de GITRL neutralizante, incluyen desórdenes artríticos, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis soriática, y espondilitis anquilozante (preferiblemente artritis reumatoide), esclerosis múltiple, diabetes tipo I lupus. (SLE), IBD, enfermedad de Crohn, asma, vasculitis, alergia, esclerodermia y soriasis.

[0172] En otra modalidad, los antagonistas GITR, solos o en combinación con, otros agentes terapéuticos como se describe aquí (por ejemplo, antagonistas de

TNF) pueden ser usados para tratar el mieloma múltiple y enfermedades linfocíticas relacionadas (Brenne, A et Al. (2002) Blood 99 (10):3756-62)

[0173] Usando antagonistas de GITR (por ejemplo, polinucleótidos de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para el GITR y/o GITRL), es posible modular las respuestas inmunes de varias maneras. La regulación baja puede estar en la forma de inhibición o bloqueo de la respuesta inmune ya en progreso, o puede involucra impedir la inducción de una respuesta inmune. Las funciones de las células T activadas pueden ser inhibidas por medio de promover la supresión de la respuesta de células T, o por medio de inducir tolerancia específica en células T o en ambos. La inmunosupresión de las respuestas de células T es generalmente un proceso activo específico de no antígeno que requiere exposición continua de las células T a agentes supresores. La tolerancia, que involucra inducir la no respuesta o energía en células T, es distinguible de la inmunosupresión en que es generalmente específica para antígeno y persiste después de la exposición a los agentes de tolerancia que han cesado. Operacionalmente, la tolerancia puede ser demostrada por la carencia de una respuesta de carencia de células T luego de la exposición al antígeno específico en la ausencia de agentes de tolerancia.

[0174] La regulación baja o impedimento de una o más funciones de un antígeno que presenta un antígeno celular (por ejemplo B7.1), y por lo tanto impide la síntesis de linfocina de alto nivel por células T activadas será útil en situaciones de tejidos, piel y trasplante de órganos y en enfermedades de injerto versus anfitrión (GVHD). Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células T debería resultar en destrucción del trasplante del tejido. Típicamente, en trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante se inicia a través de su reconocimiento como extraños por

las células T, seguido por una reacción inmune que destruye el trasplante. La administración de un antagonista GITR, (por ejemplo), polinucleótidos inhibitorios del GITRL, una molécula pequeña antagonista, un anticuerpo anti-GITR neutralizante y/o anticuerpo anti-GITRL neutralizante), en combinación con una molécula que inhibe o bloquea la interacción de un antígeno de linfocito B7 con su *ligando natural sobre células inmune* (tales como una forma monomérica soluble de un péptido que tiene actividad B7 2 o solamente en conjunto con una forma monomérica de un péptido que tiene una actividad de otro antígeno de linfocito B (por ejemplo B7.1) o de anticuerpo de bloqueo), antes del trasplante puede llevar al ligando de la molécula a los ligandos naturales sobre las células inmunes sin la transmisión de la señal coestimuladora correspondiente. La función de bloqueo del antígeno del linfocito B7 de esta manera impide la síntesis de citoquina efectora, y así actúa como un inmunosupresor. Más aun la carencia de coestimulación puede también ser suficiente para energizar las células T, induciendo así tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia de largo plazo por los reactivos de bloqueo de antígeno de linfocito B7 puede evitar la necesidad de la administración repetida de estos reactivos de bloqueo. Para lograr suficiente inmunosupresión o tolerancia en un sujeto, puede ser también necesario bloquear la función de una combinación de antígenos de linfocitos B.

[0175] La eficacia de un reactivo de bloqueo particular en impedir el rechazo del trasplante de órgano o GVHD puede ser logrado usando modelos animales que son predicciones de la eficacia en humanos. Ejemplos de sistemas apropiados que pueden ser usados incluyen los injertos cardiacos alogénicos en ratas e injertos de células islet pancreáticas xenogénicas en ratones, ambos de los cuales han sido utilizados para examinar los efectos inmunosupresores de las proteínas de fusión CTLA4Ig in vivo como se describió en Lenschow et al. (1992) Science 257.789-92

y Turka et al. (1992) Proc Natl. Acad. Sci. USA 89:11102-05 En adición los modelos de, murina de GVHD (ver por ejemplo, Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-47) pueden ser usados para determinar el efecto de bloquear la función de antígeno del linfocito B *in vivo* sobre el desarrollo de esa enfermedad.

[0176] Bloquear la fusión de una antígeno APC puede también ser útil terapéuticamente para tratar enfermedades autoinmunes Muchos desórdenes autoinmunes son el resultado de una activación inapropiada de las células T que reaccionan contra autotegidos contra tejidos de ellos mismos y que promueven la producción de citoquinas y de autoanticuerpos involucrados en la patología de estas enfermedades Impedir la activación de las células T autoreactivas puede reducir o eliminar síntomas de la enfermedad. La administración de antagonistas GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para el GITR y/o GITRL) en combinación con reactivos que bloquean la coestimulación de las células T por medio de romper las interacciones receptor.ligando de los antígenos APC pueden ser usados para inhibir la activación de las células T e impedir la producción de anticuerpos o citoquinas derivas de células T que puedan estar involucradas en el proceso de la enfermedad. Adicionalmente, los antagonistas GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GITR y/o GITRL) en combinación con reactivos de bloqueo pueden inducir tolerancia específica al antígeno de las células T autoreactivas, lo que podría llevar a un alivio a largo plazo para la enfermedad. La eficacia de estos agentes al impedir o al aliviar desórdenes autoinmunes puede ser determinada usando un número de modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunes humanas. Ejemplos incluyen la encefalitis autoinmune

35/
252

experimental de murina (EAE), lupus eritematoso sistémico en MRL/lpr/lpr ratones o ratones NZB híbridos, artritis de colágeno autoinmune de murina, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y miastenia gravis experimental en murina (ver, por ejemplo, Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-56).

[0177] En una modalidad, los antagonistas de GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GTRL, moléculas pequeñas antagonistas y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GTRL), incluyen composiciones farmacéuticas de los mismos, son administrados en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos que son útiles para tratar condiciones patológicas o de desórdenes patológicos tales como desórdenes inmunes y enfermedades inflamatorias. El termino "combinación" en este contexto que los agentes se dan sustancialmente de manera contemporánea, sea simultáneamente o secuencialmente. Si se dan secuencialmente, en el establecimiento de la administración del segundo compuesto, el primer de los dos compuestos es preferiblemente detectable a concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

[0178] Por ejemplo, la terapia de combinación que incluye uno o más antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GTRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GTRL), formulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos, por ejemplo, uno o más citoquinas e inhibitorios de factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibitorios metabólicos, inhibitorios de enzimas y/o agentes citotóxicos o citoestáticos, según se describe en más detalle más adelante. Adicionalmente uno o más antagonistas GTR (por ejemplo,

polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas de proteínas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GITRL) descritos aquí se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos descritos aquí. Tales terapias de combinación pueden ventajosamente utilizar menor dosificación de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades y complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Más aún, los agentes terapéuticos descritos aquí actúan sobre caminos que difieren del camino del receptor GITRL, y por lo tanto se espera que promuevan y/o sinergicen con los efectos de los antagonistas GTR, es decir en donde las células T efectoras mantienen susceptibilidad a la supresión por las células T reguladoras $CD4^+CD25^+$.

[0179] Los agentes terapéuticos preferidos usados en combinación con un antagonistas GITRL son aquellos agentes que interfieren etapas en la respuesta autoinmune e inflamatoria posterior. En una modalidad, uno o más antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas y/o anticuerpos netutralizantes para el GTR y/o GITRL) descritos aquí pueden ser formulados con, y/o administrados con un o más agentes adicionales tales como otras citoquinas o antagonistas del factor de crecimiento (por ejemplo, receptores solubles, inhibitorios de péptidos, moléculas pequeñas o anticuerpos o antígenos que se ligan a otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que se ligan a otras citoquinas o factores de crecimiento, sus receptores, u otras moléculas superficiales, de células), y citoquinas antiinflamatorias o agonistas de ellos. Los ejemplos no limitativos de los agentes que pueden ser usados en combinación con los antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes parel GTR y/o GITRL) descritos aquí incluyen pero no se limitan a antagonistas de uno

o más interleucinas (IL) o sus receptores, por ejemplo, antagonistas de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, y IL-22; antagonistas de citoquinas o factores de crecimiento o sus receptores, tales como factor de necrosis tumoral (TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GTRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GTRL) también pueden ser combinadas con inhibidores, por ejemplo, anticuerpos, para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7 1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L), o LFA-1/ICAM-1 y VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al (2002) Med Res. Rev. 22.146-67). Los antagonistas preferidos que pueden ser usados en combinación con antagonistas GTR (por ejemplo. Polinucleótidos inhibitorios GTRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GTRL) descritos aquí incluyen antagonistas de IL-1, IL-12, TNFa, IL-15, IL-17, IL-18, y IL-22.

[0180] Ejemplos de aquellos incluyen antagonistas IL-12, tales como anticuerpos generados in Vitro o humanos, humanizados o quiméricos (o fragmentos que ligan a los antígenos de los mismo) que ligan al IL-12 (preferiblemente IL-12 humano), por ejemplo, el anticuerpo descrito en la WO 00/56772; inhibidores del receptor de IL-12, por ejemplo, anticuerpos para el receptor IL-12 humano; y fragmentos solubles del receptor IL-12 por ejemplo, receptor IL-12 humano. Ejemplos de antagonistas de IL-15 influyen anticuerpos (o fragmentos que ligan al antígeno del mismo), contra IL-15 o su receptor, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados in Vitro para IL-15 humano o su receptor, fragmentos solubles del receptor IL-15, y proteínas que ligan el IL-15 Ejemplos de antagonistas de IL-18 influyen anticuerpos, es decir, anticuerpos quiméricos,

humanizados, humanos o generados in Vitro (o fragmentos que ligan al antígeno del mismo), para el IL-18 humano, fragmentos solubles del receptor IL-18, y proteínas que ligan el IL-18 (IL-18 BP, Mallet et al (2001) Circ Res 28) Ejemplos de antagonistas de IL-1 que influyen la enzima convertidora interleuquina-1 (inhibidores de ella (ICE), tal como Vx740, antagonistas de IL-1, por ejemplo, IL-1RA (Anakinra, Amgen), sIL1RII (immunex), y anticuerpos del receptor anti- IL-1 (o fragmentos que ligan al antígeno del mismo).

[0181] Ejemplos de antagonistas TNF incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados in Vitro (o fragmentos que ligan al antígeno del mismo) para TNF (por ejemplo, TNFa humanos) tal como D2E7, (anticuerpos TNFa humanos o U.S. 6,258,562), CDP-571/CDP-870/ BAY-103356 (anticuerpo anti-TNFa humanizado; Celltech/Pharmaci), cA2 (anticuerpos anti-TNFa quimérico, Remicade TM, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti- TNF (por ejemplo, CPD 870); fragmentos solubles de los receptores TNF, por ejemplo, p55 o p75 receptores del TNF humanos o derivados de ellos, por ejemplo, 75 KdTNFR-IgG (proteína de fusión IgG- receptor TNF75 Kd, Embrel™ Inmunes, ver, por ejemplo Arthritis & Rheumatism (1994) 37:S295 J. Invest. Med. (1996) 44 235A), p55 kdTNFR-IgG receptor TNF 55 kD – proteína de fusión IgG (Lenercept)), antagonistas de enzimas, por ejemplo enzima convertidora de TNFa (TACE) inhibitorios de ellos (por ejemplo, un derivado de ácido alfa- sulfonil hidroxámico, WO 01/55112, y el inhibidor TACE de N-hidroxiformamida GW 3333, -005, o -022), y TNFR (proteína que liga al TNF soluble; ver por ejemplo, Arthritis & Rheumatism (1996) (39)(suplemento)) S284; Amer. J. Physiol-Heart and Circulatory Physiology (1995) 268:37-42). Los antagonistas de TNF preferidos son fragmentos solubles de los receptores TNF, por ejemplo, receptores TNF humanos

25F
256

por ejemplo, p55 o p75 o derivados de ellos, por ejemplo, 75 kDTNFR-IgG, e inhibidores de enzima convertidora de TNFa (TACE).

[0182] En otras modalidades, los antagonistas GITR descritos aquí pueden ser administrados en combinación con uno o más de los siguientes: antagonistas IL-13, por ejemplo, receptores de IL-13 solubles (sIL-13) y/o anticuerpos contra IL-13, antagonistas de IL-2, por ejemplo, DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión IL-2; Seragen, ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1993) 36:1223), y/o anticuerpos para IL-2R, por ejemplo, anti-Tac (anti-IL-2R humanizado; Protein Design Labs, *Cancer Res.* (1990) 50(5):1495-502). Aún otra combinación incluye antagonistas de GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagónicas, y/o anticuerpos neutralizantes para el GITR y/o GITRL) en combinación con inhibidores anti-CD4 sin vacío (IDEC-CE9.1/SB 210396; anticuerpo anti-CD4 primatizado no debilitante; IDEC/SmithKline). Todavía otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas de la vía coestimuladora CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2), que incluye anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas; como también ligandos de glicoproteína p-selectiva (PSGL), citoquinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; DNAX/Schering IL-10 recombinante), IL-13 y TGF- β , y agonistas de ellos (por ejemplo, anticuerpos agonistas).

[0183] En otras modalidades, uno o más antagonistas GITR pueden ser coformuladas con, y/o coadministrados con, una o más drogas antiinflamatorias, inmunosupresores, o inhibidores metabólicos o enzimáticos. Ejemplos no limitativos de las drogas o inhibidores que pueden ser usados en combinación con los antagonistas GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GITR y/o

248
257

GITRL) descritos aquí, incluyen, pero no se limitan a, uno o más entre. drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs), por ejemplo, ibuprofeno, tenidap (ver, por ejemplo, Arthritis & Rheumatism (1996) 39(9)(supplement):S280)), naproxeno ver, por ejemplo, Neuro. Report (1996) 7:1209-13), meloxicam, piroxicam, diclofenac, e indometacina; sulfasalazina (ver, por ejemplo, Arthritis & Rheumatism (1996) 39(9)(supplement):S281), corticosteroides tales como prednisolona; citoquina supresora antiinflamatoria (CSAIDs); inhibidores de biosíntesis de nucleótido, por ejemplo, inhibidores de biosíntesis de purina, antagonistas de folato (por ejemplo, ácido (N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]-benzoi]-L-glutámico metotrexato); e inhibidores de biosíntesis de pirimidina, por ejemplo, inhibidores de dihidroorodato deshidrogenada (DHODH) (por ejemplo, leflunomida (ver, por ejemplo, Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S131; Inflammation Research (1996) 45:103-07). Agentes terapéuticos preferidos para uso en combinación con antagonistas GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes para GITR y/o GITRL) incluye inhibidores de NSAID, CSAID, (DHODH) (por ejemplo leflunomida), y antagonistas de folato (por ejemplo, metotrexato).

[0184] Ejemplos de inhibidores adicionales incluyen uno o más entre: corticosteroides (oral, inhalado o por inyección local), inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); e inhibidores de mTOR, por ejemplo, sirolimus, (rapamicina) o derivados de rapamicina, por ejemplo, derivados de rapamicina soluble (por ejemplo, derivados de éster de rapamicina, por ejemplo, CCI-779 (Elit (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3(8):1249-53; Huang et al (2002) Current Opinion Investig. Drugs 3(2):295-304); agentes que interfieren con la señalización mediante citoquinas proinflamatorias tales como TNFa o IL-1 (por

257
258

ejemplo IRAK, NIK, IKK, p38 o inhibidores de quinasa MAP); inhibidores de COX2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, y variantes de ellos, ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S81); inhibidores de fosfodiesterasa, por ejemplo, R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV; ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282)), inhibidores de fosfolipasa, por ejemplo, inhibidores de fosfolipasa 2 citosólica (cPLA2) (por ejemplo, análogos de trifluorometil cetona (Pat. U.S. No. 6,350,892)); inhibidores de factor de crecimiento celular endotelial vascular o receptor de factor de crecimiento de ellos, por ejemplo, inhibidor VEGF y/o VEGF-R; e inhibidores de angiogénesis. Agentes terapéuticos preferidos para uso en combinación con antagonistas GPCR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GPCR, moléculas antagónicas pequeñas, y/o anticuerpos neutralizantes para GPCR y/o GPCR) son inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporin, tacrolimus (FK-506); inhibidores mTOR, por ejemplo, sirolimus (rapamicina) o derivados de rapamicina, por ejemplo, derivados de rapamicina soluble (por ejemplo, derivados de éster de rapamicina, por ejemplo, CCI-779); inhibidores COX2, por ejemplo, celecoxib y variantes de él; e inhibidores de fosfolipasa, por ejemplo, inhibidores de fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2), por ejemplo, análogos de trifluorometil cetona.

[0185] Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden ser combinados con un antagonista de GPCR incluyen uno o más de: 6-mercaptopurinas (6-MP); sulfasalazina de azatioprina; mesalazina; olsalazina cloroquinina/hydroxycloquinina; pencilamina; aurotiomalato (intramuscular y oral), azatioprina; cohicina, agonistas de adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral); xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato; nedocromil; ketotifen; ipratropium y oxitropium; micofenolato de mofetilo, agonistas de

adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores de complemento; y agentes adrenérgicos.

[0186] El uso de antagonistas de GTR descritos aquí en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar o impedir desórdenes inmunológicos específicos se discuten en mayor detalle enseguida.

[0187] Ejemplos no limitativos de agentes para tratar o impedir desórdenes artríticos (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis inflamatoria, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis soriática), con la cual unos antagonistas GTR pueden ser combinados incluyendo uno o más de los siguientes. antagonistas de IL-12 como se describen aquí, NSAIDs, CSAIDs; TNFs, por ejemplo, antagonistas de TNFa, según se describió aquí; anticuerpos anti-CD4 no debilitantes como se describió aquí, antagonistas IL-2 como se describió aquí; citoquinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFa, o agonistas de ellos; antagonistas de receptor IL-1 o IL-1 como se describió aquí; inhibidores de fosfodiesterasa como se describió aquí; inhibidores de COX-2 como se describió aquí; iloprost (ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282); y drogas relacionadas con talidomida (por ejemplo, Celgen), inhibidores de activación de plasminogen, por ejemplo, ácido tranexamico; ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S284); inhibidores de citoquina, por ejemplo, T-614, ver, por ejemplo *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282), prostaglandina E1 (ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282); azatioprina (ver, por ejemplo, *Arthrtis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S281), un inhibidor de enzima convertidora de interleucina-1 (ICE); zap-70 y/o inhibidor 1ck (inhibidor de la quinasa de tirosina zap-70 o 1ck); un

inhibidor del factor de crecimiento celular endotelial vascular o receptor de factor de crecimiento celular endotelial vascular como se describió aquí, un inhibidor de angiogénesis como se describió aquí; drogas antiinflamatorias de corticosteroide (por ejemplo, SB203580); inhibidores de TNF-convertasa; IL-11(ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S296); IL-13 (ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S308); inhibidores IL-17 (ver, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S120), oro; penicilamina; cloroquina; hidroxiclороquina; clorambucil; ciclofosfamida, ciclosporina, irradiación linfóide total; globulina antitimocita; toxinas CD5, péptidos y colágeno administrados oralmente; disodio lobenzarit; agentes reguladores de citoquina (CRAs) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.), oligodesoxinucleótidos antisentido fosforotioato ICAM-1 antisentido (ISIS 2302, Isis Pharmaceuticals, Inc.), receptor 1 complemento soluble (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona, orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de semillas de plantas y de pescado; ver, por ejemplo, DeLuca et al (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-77); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico, globulina inmune intravenosa; ácido zileuton, ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); y azaribina. Preferible combinaciones que incluyen uno o más antagonistas de G1TR (por ejemplo, inhibidores polinucleótidos de G1TRL , moléculas antagonistas pequeñas y/o anticuerpos neutralizantes G1TR y/o G1TRL) en combinación con metotrexato o leflunomida, y en casos de artritis reumatoide moderada o severa, ciclosporina.

[0188] Ejemplos preferidos de inhibidores para usar en combinación con antagonistas de G1TR para tratar desórdenes artríticos incluyen antagonistas de

TNF (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados in Vitro, o fragmentos de ligado de antígeno de los mismos, que ligan al TNF, fragmentos solubles de un receptor TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, 75 kDTNFR-IgG (receptor de TNF 75 kD – proteína de fusión IgG, Enbrel (TM)); p55 kD receptor de TNF – proteína de fusión IgG; antagonistas de enzima TNF, por ejemplo, enzima convertidora de TNFa, inhibidores de ella (TACE); antagonistas de IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22; agentes debilitantes de células T y B (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 o anti-CD22), inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, metotrexato y leflunomida; sirolimus (rapamicina) y análogos de ellos, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de cox-2 y Cpla2; NSAIDs; inhibidores p38, TPL-2, inhibidores Mk-2 y NFkb; RAGE o soluble RAGE; inhibidores P-selectina o PSGL-1 (por ejemplo, inhibidores de pequeñas moléculas, anticuerpos de ellos, por ejemplo, anticuerpos P-selectina); agonistas de beta receptor estrógeno (ERB) o antagonistas de ERB-NFkb. Los agentes terapéuticos adicionales mas preferidos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más antagonistas de GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores de GITRL, moléculas pequeñas antagonistas, y/o anticuerpos neutralizantes de GITR y/o GITRL) incluye uno o mas de: un fragmento soluble de un receptor TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados de ellos, por ejemplo, 75kdTNFR-IgG (receptor de TNF de 75kD-proteína de fusión IgG, Enbrel TM); metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, por ejemplo, CCI-779.

[0189] Ejemplos no limitativos de agentes para tratar o prevenir esclerosis múltiple con la cual un antagonista de GITR pueden ser combinados incluye los siguientes: interferones, por ejemplo, interferón-alfa 1a (por ejemplo, AbonesTM; Biogen) e interferon-1b (Betaseron TM; Chiron/Berlex); CopollmerO 1 (Cop-1; Copaxone, TM,

261
262

Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico, inmunoglobina intravenosa, cladribina; antagonistas de TNF como se describió aquí; corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida, ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; y tizanidina. Antagonistas adicionales que pueden ser usados en combinación con antagonistas de GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores de GTRL, moléculas pequeñas inhibitorias antagónicas, y/o anticuerpos neutralizantes de GTR y/o GTRL) incluyen anticuerpos para antagonistas de citoquinas o factores de crecimiento humano, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF, y PDGF. Antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores GTRL, moléculas pequeñas antagónicas, y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GTRL) como se describen aquí pueden ser combinados con anticuerpos u otras moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los antagonistas de GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GTRL, moléculas pequeñas antagónicas, y/o anticuerpos neutralizantes para GTR y/o GTRL) pueden también ser combinados con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, NSAIDs, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citosina proinflamatorias como se describió aquí, inhibidores de enzima que convierte IL-1b (por ejemplo, Vx740), anti-P7s, PSGL, inhibidores TACE, inhibidores de señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de la proteasa metálica, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidoras de enzimas convertidoras de angiotensina, receptores de citosina solubles y derivados de ellos, como se

describió aquí, y citoquinas anti-inflamatorias (por ejemplo. IL-4, IL-10, IL-13 y TGF)

[0190] Ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para esclerosis múltiple con los cuales los antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores GITRL, moléculas antagonistas pequeñas, y/o anticuerpos neutralizantes de GITRL y/o GITRL) pueden ser combinados incluyen el interferón- β , por ejemplo, IFN β -1a y IFN β -1b, copaxona, corticosteroides, inhibidores IL-1, inhibidores TNF, anticuerpos para ligandos CD40 y CD80, y antagonistas IL-12.

[0191] Ejemplos no limitativos de agentes para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias del intestino (por ejemplo, la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa) con las cuales un antagonista de GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores de GITRL, y una molécula pequeña antagónica, un anticuerpo neutralizante anti-GTR, y/o anticuerpo neutralizante anti-GITRL) puede ser combinado incluyendo lo siguiente: budenosina, factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides, ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas receptor IL-1, anticuerpos monoclonal anti-IL-1; anticuerpos monoclonal anti-IL-6, factores de crecimiento, inhibidores de elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; antagonistas de TNF como se describió aquí y IL-4, IL-10, IL-13 y/o citoquinas TGF β o agonistas de ellos (por ejemplo, anticuerpo agonista); IL-11; glucoranida- o conjugados de dextran- prodrugs de prednisolona, dexametasona o budesonida; oligodesoxinucleótidos fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento soluble (TP10; T Cell

Sciences, Inc); mesalazina de liberación lenta; metotrexato; antagonistas de factor activador de plaquetas (PAF), ciprofloxacina; y lignocaina.

[0192] En una modalidad, un antagonista GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, una molécula pequeña antagónica, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, y/o un anticuerpo anti-GITRL neutralizante) pueden ser usados en combinación con uno o más anticuerpos dirigidos a otros objetivos involucrados en la regulación de respuestas inmunes, por ejemplo, en rechazos de trasplantes o enfermedades de injerto versus anfitrión. Ejemplos no limitativos de agentes para tratar o impedir las respuestas inmunes con las cuales un antagonista GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, una molécula pequeña antagónica, un anticuerpo anti-GITRL neutralizante y/o un anticuerpo anti-GITRL neutralizante) de la invención puede ser combinada e incluye los siguientes: anticuerpos contra otras moléculas de superficie celular, incluyendo pero sin limitarse a CD25 (interleucina-2 receptor- α), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7.1) y/o CD86 (B7.2). Todavía otras modalidades, un antagonista de GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, una molécula pequeña antagónica, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, y/o un anticuerpo anti-GITRL neutralizante) es usado en combinación con uno o más agentes inmunosupresores tales como ciclosporina A o FK506.

[0193] En otras modalidades, los antagonistas GTR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, una molécula pequeña antagónica, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, y/o un anticuerpo anti-GITRL neutralizante) son usados como adyuvantes de vacunas contra desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias o rechazo de trasplantes. La combinación de adyuvantes para el tratamiento para este tipo de desórdenes son adecuados para usar en

264
265

combinación con una amplia variedad de antígenos de autoantígenos objetivados, es decir, autoantígenos, que se involucran en autoinmunidad, por ejemplo, la proteína básica de mielina; autoantígenos inflamatorios, por ejemplo, la proteína péptido de amiloide o antígenos de transplante, por ejemplo, aloantígenos. El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de las proteínas, lo mismo que fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, polinucleótidos u oligonucleótidos, autoantígenos, proteína de péptido amiloide, antígenos de transplante, alergénicos, u otros compuestos macromoleculares. En algunos casos, más de un antígeno es incluido en la composición antigénica.

[0194] Por ejemplo, vacunas deseables para mejorar las respuestas a alergénicos en un anfitrión vertebrado, que contiene las combinaciones de adyuvantes de esta invención, incluyen aquellas que contienen un alergénico o un fragmento del mismo. Ejemplo de tales alergénicos son descritos en la patente estadounidense No. 5,830,877 y la solicitud de patente publicado internacionalmente No. WO 99/51259, que se incorporan aquí como referencia en sus totalidades, e incluyen polen, venenos de insectos, caspa animal, esporas de hongos y drogas (tales como penicilina). Las vacunas interfieren con la producción de anticuerpos de IgE, una causa conocida de reacciones alérgicas. En otro ejemplo, las vacunas deseables para prevenir o tratar enfermedades caracterizadas por la deposición amiloide en un anfitrión vertebrado, que contenga las combinaciones adyuvantes de esta invención, impiden aquellas que contienen porciones de proteínas de péptido amiloide (APP). Esta enfermedad se ha llamado variablemente como enfermedad de Alzheimer, amiloidosis o enfermedad amiloidogénica. Así, las vacunas de esta invención incluyen las combinaciones adyuvantes de esta invención más el péptido A β , así como los fragmentos de péptido A β y anticuerpos para el péptido A β o fragmentos del mismo

[0195] Métodos de 1) regular bajo el antígeno presente en la función celular; y 2) terapia de combinación para el manejo de la inmunosupresión son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Xiao et al. (2003) diseño de vacunas en células dendríticas. estrategias para producir terapia de tolerancia periférica de enfermedades autoinmunes. *BioDrugs* 17:103-11; Kuwana (2002) Inducción de células T anérgicas y reguladoras por células dendríticas plasmacitoides y otros subconjuntos celulares dendríticos. *Hum. Immunol* 63:1156-63; Lu et al. (2002) Manipulación de células dendríticas para inducción de tolerancia en trasplantes y enfermedad autoinmune. *Transplantation* 73.S19-S22, Rife et al. (2002) células dendríticas y bloqueamiento de segunda señal: un paso hacia la tolerancia a los injertos. *Transplantation* 73.S1-S2, Mancini et al. (2004) la administración de la inmunosupresión: el arte y la ciencia. *Crit. Care. Nurs. Q.* 27:61-64).

[0196] Otro aspecto de la presente invención de acuerdo con la anterior se relaciona con estuches para llevar a cabo la administración combinada de antagonistas de GITR (por ejemplo, polinucleótidos inhibitorios de GITRL, moléculas pequeñas antagónicas, y/o anticuerpos neutralizantes de GITR y/o GITRL) con otros compuestos terapéuticos. En una modalidad, el estuche comprende uno o más agentes de ligado formulados en un transportador farmacéutico, y por lo menos un agente, por ejemplo, agente terapéutico, formulado apropiadamente, en uno o más preparaciones farmacéuticas separadas.

[0197] La presente invención se ilustra por los siguientes ejemplos relacionados con cDNA de ratón novedoso, GITRL cADN de ratón diseñado, polipéptido ligando novedoso que codifica en un ratón GITRL diseñado, como también anticuerpos

novedosos de GITRL. Una persona versada en la técnica comprendería la enseñanza de los ejemplos para ser aplicada a todos los homólogos de ratón GITRL

EJEMPLOS

[0198] Los ejemplos que siguen se establecen para ayudar en el entendimiento de la invención pero no tienen el propósito, y no deben ser considerados como, indicativos de su alcance de ninguna manera. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales, tales como citometría de flujo (por ejemplo, FACS), PCR, Northern e hibridización in situ, u otros métodos empleados en la construcción de vectores, la inserción de genes que codifican los polipéptidos en tales vectores y plásmidos, la introducción de tales vectores y plásmidos en células anfitrionas, y la expresión de polipéptidos tales como vectores y plásmidos en las células anfitrionas. Tales métodos son bien conocidos por aquellos medianamente basados en la técnica.

EJEMPLO 1

Identificación de secuencias de ADN de GITRL

Ejemplo 1.1 Identificación del cADN de GITRL de ratón y secuencias genómicas.

[0199] Dos enseñanzas fueron tomadas para identificar el homólogo de la murina GITRL. En cada enseñanza, la secuencia de aminoácido de humano GITRL (del No de acceso AX077015 del GenBank) fue usado en la búsqueda de Tblastn contra div1; div2; div3; div4; gbdiv_cu; ratón celera (cm), y bases de datos de

267
268

draft_mouse-dna. La secuencia genómica ga_69772862 cm_4 fue identificada como uno de los encuentros posibles para investigar. Las secuencias de aminoácido saltante fueron identificadas en una búsqueda de Tblastn con la secuencia de aminoácido humana de GITRL (GenBank No de acceso AX077015) contra el conjunto genómico celera no enmascarado (cm) usando el valor de expectativa (E)=10 (por defecto), 100 y 1000. La secuencia genómica ga_x5j8b7w7wj5.sub.--041.cm_aa su- b.13 2 fue identificada como la secuencia genómica que contiene las secuencias de aminoácidos faltantes.

[0200] En otra enseñanza, la secuencia de aminoácido del GITRL humano (del GenBank No de acceso AX005092) fue usada en una búsqueda Tblastn contra el conjunto genómico de ratón Celera no enmascarado (cm) usando el valor de explicación por defecto (E)= 10 y 1000 La secuencia genómica ga_x5j8b7w7wj5-041 cm_aa_2 fue identificada como la secuencia genómica que contiene tres regiones de pares de alta marcación (HSP).

[0201] Una secuencia cADN de ratón putativo fue construida en base a las tres regiones HSP obtenidas en la anterior búsqueda Tblastn. Esta secuencia de cADN fue editada en base a la comparación entre las alineaciones de las tres secuencias de exón humano con la secuencia humana genómica correspondiente del Celera (ga_x2htbl3vud5.sub.--66.ch_r25h.sub.--1) y las tres secuencias exón de ratón putativo derivadas con la secuencia genómica de ratón correspondiente del Celera (ga_x5j8b7w7wj5.sub.--041.cm_aa.sub.--2) Esta edición tomó en cuenta las uniones rotas o divididas para la secuencia humana La secuencia del cADN del GITRL de ratón editada contenía un cuadro de lectura abierto de 519 bp (secuencia de codificación de 522 bp), correspondiente a una proteína de 173 aminoácidos

[0202] Los iniciadores fueron diseñados con base a los exones putativos de la secuencia genómica de GITRL de ratón y usados para aislar el clon del cDNA físico correspondiente a partir de una librería de cADN timus de murina por PCR. Las secuencias de los iniciadores hacia delante (ID DE SEC. NO: 4) y reversa (ID DE SEC. NO: 5) PCR fueron:

5' ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG 3', (iniciador delantero) y 5' GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG 3'. (iniciador inverso) .

[0203] El fragmento resultante fue subclonado y la secuencia de AND fue determinada usando métodos estándar. El fragmento resultante confirmó la existencia de un cADN de GITRL de ratón que comprende todos los exones predichos (ver más adelante) Este fragmento fue extendido para incluir el segmento de codificación final (dos aminoácidos) del cADN por amplificación PCR del clon de cADN resultante. Las secuencias de los iniciadores delanteros (ID DE SEC. NO. 6) e inverso (ID DE SEC. NO 7) PCR para esta etapa fueron:

5' ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG 3', (iniciador delantero) y 5' GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG 3'. (iniciador inverso)

[0204] El iniciador delantero PCR contenía un sitio Sall, una secuencia Kozak para iniciación de transducción y el ATG que codifica la metionina de iniciación. El iniciador inverso contenía un sitio EcoRI. Los sitios EcoRI fueron usados para la subclonación direccional, y la determinación de secuencia del clon de cADN fue llevado a cabo

[0205] La secuencia de cADN de GITRL de ratón de longitud completa y su secuencia de aminoácido deducida se establece en la ID DE SEC. NO: 1 Y ID DE SEC. NO: 2, respectivamente. El alineamiento de la cADN GITRL de humano (ID DE SEC. NO: 8) y las secuencias del cADN GITRL de ratón revelaron 69.6% de identidad. El alineamiento del aminoácido de GITRL humano (ID DE SEC. NO. 9) y secuencias de aminoácidos de GITRL de ratón (Figura 1) revelaron 54.1% de identidad y 60.0% de similitud. Este grado de identidad del aminoácido es similar a la que existe en general entre homólogos de otros ligandos de TNFR de ratón (Oshima et al. (1998) Int. Immunol. 10 517-26)

[0206] La comparación de las secuencias clonadas de cADN de GITRL (ID DE SEC. NO: 1) con las bases de datos de murina disponibles públicamente revelaron un polimorfismo de nucleótido (SNP) en la región de codificación del GITRL de ratón (una transversión A/C de la posición del nucleótido posición 470 de ID DE SEC. NO: 1 en exón 3, lo que resulta en un cambio de asparagina a triptófano en una posición de aminoácido 157 de ID DE SEC. NO: 2).

[0207] La comparación de la secuencia de cADN GITRL de ratón con la secuencia genómica del ratón Celera (ga_x5j8b7w7wj5.sub.--041 cm aa.sub.--2) descrita anteriormente reveló que el locus del GITRL de ratón contiene tres exones y dos intrones (ver Tabla 2 mas adelante), con el tamaño exónico y la posición bien conservada entre el GITRL de ratón y el humano. La secuencia del ADN genómico del GITRL de ratón se establece en la ID DE SEC. NO. 3

270
281

TABLA 2

Región en ID DE SEC NO· 3	Atributo de secuencia	Longitud (bp)	Posición en ID DE SEC. NO: 1
1-255	5'-secuencia	255	-
256-390	Exón #1	135	1-135
391-6010	Intrón #1	5620	-
6011-6044	Exón #2	34	136-169
6045-8990	Intrón#2	2946	-
8991-9340	Exón #3	350	170-519
9341-9343	Parada	3	520-522
9344-10289	3'-secuencia	946	-

[0208] Una comparación de la estructura genómica del GTRL de ratón (tabla 2) con la estructura genómica del GITRL humano (ver tabla 3 más adelante) muestra que el tamaño exónico y la posición intrónica está bien conservada entre las secuencias de ADN genómicas del GITRL de humano y de ratón. Las secuencias de ADN genómica del GITRL humano se establecen en la ID DE SEC. NO. 10

24
21
22

TABLA 3

Región en ID DE SEC. NO: 10	Atributo de secuencia	Longitud (bp)	Posición en ID DE SEC. NO. 8
1-421	5'-secuencia	421	-
422-577	Exón #1	156	1-156
578-7348	Intrón #1	6771	-
7349-7379	Exón #2	31	157-187
7380-9604	Intrón#2	2225	-
9605-9948	Exón #3	344	188-531
9949-9951	Parada	3	532-534
9952-10331	3'-secuencia	380	-

Ejemplo 1.2 Perfil de hidrofobicidad de Ratón GITRL

[0209] El perfil de hidrofobicidad de GITRL de ratón se determinó por TopPred (Claros and von Heijne (1994) *Comput.Appl. Biosci.* 10.685-6). Un gráfico de la clasificación de hidrofobicidad contra los residuos de aminoácido de ratón GITRL (ID DE SEC NO.: 2) reveló una región hidrófoba putativa ubicada aproximadamente entre los aminoácidos 25-50, similares a GITRL humano. Este segmento hidrófobo corresponde a la región de transmembrana predicha del tipo de proteínas de transmembrana tipo II.

EJEMPLO 2

Expresión de tejido de GITRL de ratón

[0210] Las sondas de Oligonucleótido con base en la secuencia de cDNA de GITRL de ratón (ID DE SEQ NO .1) se utilizaron para ensayar diversas muestras de tejido de murina para la expresión de GITRL por hibridización Northern, hibridización in situ, y PCR en tiempo real (por ejemplo, Heid et al. (1996) Genome Res. 6:986-94; Mullah et al (1998) Nucleic Acids Res. 26.1026-31, Giulietti et al. (2001) Methods 25:386-401).

[0211] Aunque la hibridización Northern reveló algunos transcritos detectables en corazón, riñones, pulmón, nodo linfático, baso, e hígado, una hibridización in situ posterior reveló la expresión de GITRL en el corazón, baso, nodo linfático y timo. La expresión GITRL en estos tejidos se limitó generalmente a las células pericardiales y endocardiales del corazón, la pulpa blanca del baso, las zonas corticales, paracorticales y medulares de los nodos linfáticos, y las zonas corticales y medulares del timo.

[0212] La expresión de GITRL en el timo, baso y nodo linfático se confirmó adicionalmente por análisis PCR en tiempo real. El GITRL se expresó en los niveles más altos en el baso y las células de baso estimuladas por el lipopolisacárido (LPS), que principalmente son linfocitos B. Niveles bajos con tendencia a desaparición de expresión de GITRL se detectaron en el estómago, cerebro y riñón. El análisis PCR en tiempo real también reveló transcritos GITRL en hígado, células CD25⁻ activadas, células CD25⁺, y células del nodo linfático activado por concanavalina A, aunque a un grado menor que el baso y los blastos LPS. Ninguna expresión de GITRL se detectó en las células CD25⁻ o CD25⁺ restantes. El análisis PCR en tiempo real de células dendríticas derivadas de la médula ósea estimuladas por LPS e inmaduras (DC) también demostraron

273
284

expresión en la línea de base del GITRL por DC inmaduro que se incrementó luego de la estimulación con LPS durante 24 horas, pero disminuyó por debajo de la línea base después de 48 horas de estimulación con LPS. La expresión GITRL también se detectó en grados variables en todas las líneas de células endoteliales ensayadas (bEND3, C166, EOMA, MSI y SVEC4-10), y se demostró que permanecía relativamente sin cambio cuando las líneas celulares se estimularon con LPS. En contraste, el cDNA del GITRL no se detectó por PCR en las siguientes líneas celulares de murina no estimuladas de origen específico: línea de células T E10, línea de timo fetal T2, plasmacitoma T10, timoma EL4, líneas de célula pre-BAF3 y pre-B PREB, hibridoma de célula B B9, monocítico DAIG, monocítico M1, médula de hueso fetal FBMD-1, carcinoma embrionario P19, hígado MDF, y línea celular del tronco embrionario E14.

EJEMPLO 3

Expresión funcional de GITRL de ratón recombinante

Ejemplo 3.1 Ligado del GITRL a la superficie celular del GTR

[0213] Para determinar si el cDNA de ratón aislado en el Ejemplo 1 codificó un ligando de GTR funcional (GITRL), células Cos que expresan el GITRL de ratón fundidas con el epítipo FLAG (GITRL-Flag-Cos) o receptor IL-21 de ratón de control fundido al epítipo FLAG (IL-21R-Flag-Cos) se incubaron en varias longitudes de tiempo con 293 células T que expresan el GTR de ratón (GTR-293T). La interacción célula – célula se detectó por citometría de flujo utilizando anticuerpo anti-Flag marcado con ficoeritrina (PE-FLAG) y anti-GTR marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Aún 1 minuto después de la cocentrifugación

27x
285

de las células GITR-293T y GITRL-Flag-Cos, aproximadamente 90% de las células GITR-293T (según se detectó por fluorescencia por FITC) comarcado para FLAG (según se detectó por fluorescencia PE), lo que indica que las células GITR-293T se unieron a las células GITRL-Flag-Cos, y esta interacción persistió por todos los 60 min del experimento. En contraste, las células GITR-293T incubadas con las células IL-21 R-Flag-Cos no comarcaron significativamente para FLAG, aún en la postcentrifugación de 60 min. Estos datos demuestran que el cDNA de ratón aislado en el Ejemplo 1 codifica para el GITRL funcional capaz de libar con el GITR de superficie celular.

Ejemplo 3.2

Ligado de GITRL a GITR soluble

[0214] La habilidad del GITRL de ratón para ligarse al GITR se confirmó por medio de incubar células Cos que expresan GITRL de ratón (GITRL-Cos) o células Cos transfectadas por mimica con GITR recombinante fusionado con la porción Fc del IgG humano (GITR-Fc) o IgG human de control (HlgG). El ligado del GITR-Fc al GITRL se determinó por citometría de flujo utilizando anticuerpo antihumano de burro conjugado al FITC (FITC-Ab). La incubación de las células GITRL-Cos con GITR-Fc resultó en un incremento de 3.6-veces en el ligado FITC-Ab (28.8%) comparado con la incubación de células GITRL-Cos con HlgG de control (7.9%). Las células GITRL-Cos no marcadas, las células GITRL-Cos incubadas con la proteína de fusión CTLA-4:Fc y FITC-Ab, y las células GITRL-Cos incubadas con FITC-Ab sola no exhibieron ninguna fluorescencia. Tampoco las células Cos transfectadas por mimica, tratadas o no tratadas exhibieron ninguna fluorescencia

apreciable. Estos datos demuestran que el cADN de ratón aislado en el ejemplo 12 codifica para un GITRL funcional capaz de ligar el GITR soluble.

EJEMPLO 4

Ligado del GITRL de ratón al GITR Resulta en Proliferación de Células CD4⁺ CD25⁺

[0215] El efecto del Ligado de GITRL.GITR sobre la proliferación celular fue determinado por estimulación aproximadamente 50.000 células T murina con aproximadamente 50 000 células T irradiadas con splenocitos debilitados, y 100 and 100 IU/ml de IL-2 durante 65-72 horas en ausencia o presencia de concentraciones variables de una proteína que liga con el GITR. Dos proteínas que ligan GITR se utilizaron en estos ensayos: sea un anticuerpo anti-GITR agonístico (ver, por ejemplo, McHugh et al. (2002) Immunity 16:311-23; ver también la solicitud de Patente Estadounidense No. 10/194,754) o GITRL de murina expresado sobre la superficie de células YB2/0 de rata modificada (GITRL-YB2/0). Se ensayó proliferación celular por células pulsantes con 1 μ Ci ³H-timidina para las últimas 6-12 horas de cultivo y luego se midió ³H-timidina por incorporación por vía de un contador de centelleo.

[0216] Como se muestra en la Figura 2A, las células CD4⁺ CD25⁻ no respondieron a ninguna concentración del anticuerpo anti-GITR. En contraste, el anticuerpo anti-GITR estimuló la proliferación de células T CD4⁺CD25⁺ en todas las concentraciones ensayadas. Por ejemplo, el cultivo de células T CD4⁺CD25⁺ en la presencia de un título muy bajo de anticuerpo anti-GITR ensayado (aproximadamente 0.02 μ g/ml) resultó en un incremento de veces en la

276
277

incorporación de ^3H -timidina (aproximadamente 15,000 cpm) sobre células cultivadas en ausencia del anticuerpo anti-GITR. La habilidad del anticuerpo anti-GITR para estimular la proliferación de células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ alcanzó un nivel plano de aproximadamente 45,000 cpm a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0.3 $\mu\text{g/ml}$, correspondiente a un incremento de aproximadamente 9 veces en la incorporación de ^3H -timidina sobre células cultivadas en ausencia del anticuerpo anti-GITR.

[0217] Similar a los resultados obtenidos con el anticuerpo anti-GITR, las células GITRL-YB2/0 no estimularon la proliferación de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ (FIG. 2B). En contraste, las células GITRL-YB2/0 estimularon marcadamente la proliferación de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$. Por ejemplo, el cultivo de células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ en la presencia de aproximadamente 10.000 células GITRL-YB2/0 resultó en un incremento de aproximadamente 4 a 5 veces en la incorporación de ^3H -timidina sobre células cultivadas en la presencia de un número igual de células YB2/0 no modificadas. Al incrementar el número de células YB2/0 a aproximadamente 50.000 resultó en un incremento de aproximadamente 15 veces en la incorporación de ^3H -timidina sobre células cultivadas en la presencia de un número igual de células YB2/0 no modificadas (FIG. 2B).

EJEMPLO 5

Ligado del GITRL de ratón al GITR invierte la supresión mediada por células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$.

[0218] El ensayo supresor de células T usado en estos ejemplos han sido descritos previamente (ver, por ejemplo, Thornton and Shevach (2000) J.

Immunol. 164:183-90; McHugh et al. (2002) Immunity 16:311-23; incorporados ambos aquí como referencia). Brevemente, aproximadamente 50.000 células T respondedoras $CD4^+CD25^-$ fueron cultivadas en la presencia de aproximadamente 50.000 esplenocitos vaciados de células T irradiadas, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-CD3, y diversos números de células T $CD4^+CD25^+$ supresoras frescamente aisladas. La habilidad de las 50.000 células GITRL-YB2/0 irradiadas o 2 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-GITR agonista para invertir la supresión de la proliferación de $CD4^+CD25^-$ se logró entonces por medio de medir la incorporación de ^3H -timidina por medio de conteo de centelleo.

[0219] Como se muestra en la figura 3A, las células $CD4^+CD25^+$ redujeron la proliferación de las células $CD4^+CD25^-$ de una manera dependiente de dosis. Ambos el anticuerpo anti-GITR y las células GITRL-YB2/0 fueron capaces de invertir completamente la supresión de la proliferación de $CD4^+CD25^-$ en todo el rango de número de células supresoras $CD4^+CD25^+$ ensayadas. Así el ligado de GITRL a su receptor GITR, como el ligado del anticuerpo anti-GITR agonista al GITR, bloquea la función supresiva de las células $CD4^+CD25^+$. La habilidad de las células GITRL-YB2/0 para invertir la supresión ocurrió en una forma dependiente de dosis, con tan poco como aproximadamente 3.000 células GITRL-YB2/0 por lo menos invirtieron parcialmente o disminuyeron la supresión en este ensayo (FIG. 3B). Ni las células YB2/0 no modificadas ni las células YB2/0 que expresan GITR tenían un efecto apreciable sobre la supresión mediada por células T $CD4^+CD25^+$ (FIG. 3A).

[0220] En contraste los resultados obtenidos son células T $CD4^+CD25^+$ aisladas frescamente, el ligado GITRL:GITR tuvo muy poco efecto en la supresión mediada por células T $CD4^+CD25^+$ activadas con el anticuerpo anti-CD3, esplenocitos

vaciados de células T, y IL-2 (FIG. 4) Tampoco la adición del anticuerpo anti-GITR ni aproximadamente 50 000 células GITRL-YB2/0 fueron capaces de invertir la supresión mediada por aproximadamente 25.000 células T CD4⁺CD25⁺ activadas. Cuando más pocas células T CD4⁺CD25⁺ fueron agregadas al ensayo (por ejemplo, aproximadamente 1.500-12.500 células), sin embargo, el anticuerpo anti-GITR y las células GITRL-YB2/0 fueron capaces de disminuir parcialmente, pero no completamente abrogar, la supresión

EJEMPLO 6

Anticuerpo GITRL Anti-ratón restaura la supresión mediada por las células CD4⁺CD25⁺

Ejemplo 6.1

Aislamiento de anticuerpos GITRL Anti-ratón.

[0221] Anticuerpos específicos para el GITRL de ratón fueron producidos por medio de inmunizar ratas con células YB2/0 de rata que expresan el cADN del GITRL de ratón (GITRL-YB2/0). Al utilizar los métodos bien conocidos en la técnica, los hibridomas y anticuerpo fueron creados y seleccionados contra células Fénix que expresan GITRL al utilizar citometría de flujo. Dos anticuerpos, 5F1 y 10F12, fueron identificados que ligan específicamente con células GITRL-Fénix y no con células de control Fénix transfectadas por mimica. Estos hibridomas de anticuerpos fueron depositados con el American Type Culture Collection (ATCC) en Jul. 22, 2003; número ATCC asignado PTA-5336 para el hibridoma 5F1, y el número PTA-5337 al hibridoma 10F12.

279
980

Ejemplo 6 2

Anticuerpos GITRL Anti-ratón bloquean los efectos del GITRL sobre la actividad supresora de las células T CD4⁺CD25⁺

[0222] Como se describe en el Ejemplo 5 anterior, las células YB2/0 que expresan GITRL sobre su superficie celular fueron capaces de revertir la proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ mediadas por células T CD4⁺CD25⁺ frescamente aisladas. Para determinar si los anticuerpos anti-GITRL podrían restaurar la supresión mediada por células T CD4⁺CD25⁺, el ensayo supresor de células T como se describió en el Ejemplo 5 se llevó a cabo en la presencia o ausencia de anticuerpo anti-GITRL 5F1 o 10F12 o anticuerpos de control.

[0223] Como se ve en el Ejemplo 5, el cultivo de células T CD4⁺CD25⁻ respondedoras y las células T supresoras CD4⁺CD25⁺ frescamente aisladas en la presencia de células T GITRL-YB2/0 resultó en una inversión completa de la supresión de la proliferación de células CD4⁺CD25⁻ (FIG. 5A y 5B). La adición de 10% de sobrenadantes de cultivo de hibridoma que contenían anticuerpo anti-GITRL 5F1 al ensayo resultó en una restauración parcial (FIG. 5B) hasta que completa (FIG. 5A) de la supresión mediada por CD4⁺CD25⁺. La adición del anticuerpo anti-GITRL 10F12 dio resultados similares. Como se esperaba, la presencia de anticuerpos de control ("Ig de control") no tuvo efecto apreciable sobre la habilidad de las células GITRL-YB2/0 para invertir la supresión (FIG. 5B). Estos datos muestran que los anticuerpos anti-GITRL bloquean la habilidad del GITRL para apagar la actividad supresora de las células CD4⁺CD25⁺.

Ejemplo 6.3

Los anticuerpos Anti- GITRL de ratón suprimen las respuestas de las células T solamente en la presencia de células T CD4⁺CD25⁺

[0224] cultivos de células de nodo linfático fueron estimuladas en la presencia de concentraciones variables de anticuerpo anti-CD3 agonista antes de (FIG. 6A) o después del vaciado de (FIG. 6B) las células T CD4⁺CD25⁺, y la proliferación se midió por medio de determinar la incorporación de ³H-timidina por medio del conteo de centelleo. Para determinar los efectos del anticuerpo anti-GITRL sobre la proliferación, 10% de sobrenadantes del cultivo de hibridoma que contenían anticuerpo anti-GITRL 5F1 se agregaron a cultivos paralelos.

[0225] Como se muestra en la FIG. 6A, la adición de anticuerpo anti-GITRL suprimió la proliferación de células de nodo linfático que contienen células T CD4⁺CD25⁺ cuando las células se estimularon con aproximadamente 0,075 µg/ml a aproximadamente 0,75 µg/ml de anticuerpo anti-CD3. No se observó supresión en la presencia del anticuerpo anti-GITRL cuando las células del nodo linfático contenían células T CD4⁺CD25⁺ las células se estimularon con 10 µg/ml de anticuerpo anti-CD3. En contraste con los resultados obtenidos con los cultivos de células de nodo linfático que contenían células T CD4⁺CD25⁺, la adición de anticuerpo anti-GITRL generalmente no tuvo efectos supresores sobre los cultivos de las células de nodo linfático que hayan sido vaciadas de las células T CD4⁺CD25⁺ (FIG. 6B). Tomado en conjunto, estos datos sugieren que el anticuerpo anti-GITRL bloquean la interacción entre el GITR expresado sobre células T CD4⁺CD25⁺ y el GITRL expresado sobre otras células, y que el bloqueo

de esta interacción GITR/GITRL promueve la función reguladora de las células T $CD4^+CD25^+$ para restaurar la inmunosupresión

EJEMPLO 7

Distribución de las células que expresan GITRL en tejidos linfoides

[0226] El anticuerpo anti-GITRL agonístico se utilizó para examinar la expresión de GITRL en tejidos de ratón por medio de citometría de flujo. Células dendríticas esplénicas $CD11c^+$ aisladas frescamente (DC) como subconjuntos que expresan $CD4$ solamente, $CD8$ solamente, o ambos $CD4$ y $CD8$, constitutivamente, expresaron bajos niveles de GITRL (FIGURA 7A). Sin embargo, la expresión de superficie de GITRL fue notablemente mayor entre células dendríticas plasmacitoides $CD11c^{bajo} B220^+$ (Nakano et al., 2001). En la FIGURA 7B, el marcado con mAb anti-GITRL o un isotipo de control fue hecho sobre los subconjuntos indicados de DCs esplénicas $CD11c^+$ frescamente infladas a partir de BALB/c de ratón

[0227] similarmente, células B esplénicas de $B220^+$ frescamente aisladas constitutivamente expresaron GITRL, como lo hicieron las células B-1 B peritoneales ($perC CD11B^+B220^+$), aunque a mayores niveles (FIGURA 7C, superior). Macrófagos peritoneales restantes ($perC CD11B^+B220^-$) también se encontró que expresaban este ligando (FIGURA 7C, inferior)

[0228] Subconjuntos de timocitos que sufrieron selección no expresaron cantidades medibles de GITRL (FIGURA 7D) En contraste, como se ha mostrado en la FIGURA 7E, la expresión de GITRL fue detectable en todos los subconjuntos

de precursores tímicos $CD4^+CD8^-$, con los subconjuntos $CD44^+CD25^+$ (R2) y $CD44^+CD25^+$ (R3) expresando los niveles más altos.

[0229] El GITRL fue indetectable sobre células del nodo linfático no estimuladas (FIGURA 7F). El GITRL también fue indetectable sobre células T esplénicas no estimuladas (datos no mostrados). Estos datos demuestran la expresión de GITRL por células que presentan antígenos profesional (DC, células B y macrófagos; FIGURA 7A-7C) y células precursoras tímicas $CD4^+CD8^-$ (FIGURA 7E), pero no las células T que sufren selección (FIGURA 7D) o el resto de células T en la periferia (nodo linfático no estimulado y células esplénicas no estimuladas, FIGURA 7F, y datos no mostrados). Estos datos correlacionados con los datos obtenidos por la hibridización Northern, hibridización in situ, y PCR en tiempo real como se describió en el ejemplo 2 (anterior).

EJEMPLO 8

Los APCs subregulan GITRL luego de estimulación TLR

[0230] Los efectos de la activación de las células B sobre la expresión de GITRL fueron examinadas luego de tratamiento con el ligando de receptor similar a Toll (TLR) o anti-CD40 y IL-4, o anti-IgM. La estimulación de células B esplénicas B (esplenocitos B220⁺) o células B B-1 peritoneales (B220⁺CD11b⁺ PerC) resultó en una sobrerregulación rápida pero transiente de GITRL, lo que fue evidente después de 4 horas con la mayoría de los tratamientos (FIGURA 8A). Luego de 48 a 60 horas de estimulación, la expresión declinó hasta por debajo de los niveles de preestimulación en donde ésta se estabilizó. Una excepción fueron las células de B-1 tratadas con polil: C a partir de la cavidad peritoneal, en donde éstas no

mostraron esta subregulación durante los puntos de tiempo examinados. Como se esperó, los niveles de CD86 se incrementaron durante el curso del experimento en todos los grupos, indicando que la subregulación observada de GITRL no era secundaria para la muerte celular (datos no mostrados).

[0231] La reducción de GITRL expresada por las células B después del tratamiento anti-CD40 y IL-4 sugirió que la expresión podría modular luego la provisión de ayuda de Células T. La expresión de GITRL por células B entre el total de esplenocitos fue lograda después de cultivo con anticuerpo anti-CD3. Bajo estas condiciones de cultivo, la expresión de GITRL en esplenocitos B220⁺ fue también subregulada después de 48 horas (FIGURA 8B). Así, los niveles fisiológicos de la actividad de las células T también condujo a una reducción en la expresión de GITRL por las células B esplénicas.

[0232] Las DC CD11c⁺ esplénicas fueron enriquecidas con granos magnéticos y examinadas para la expresión de GITRL después de 12 a 36 horas de cultivo en la presencia de LPS. Los DC cultivados tanto en el medio o en el LPS expresaron GITRL durante las 12 horas iniciales, con una modesta sobrerregulación inducida por LPS. Sin embargo, a las 36 horas, la expresión de GITRL fue indetectable tanto en los DC tratados con LPS lo mismo que en aquellos cultivos solamente en medio. La FIGURA 8C muestra la expresión de GITRL (paneles superiores del histograma) y CD86 (B7.2) (paneles inferiores del histograma) por DC CD11c⁺ purificados seguido por cultivo con o sin LPS (0,5 µg/ml) como se indicó en los puntos de tiempo. Como se muestra, la expresión de CD86 (B7.2) fue sobrerregulada como se esperó (Banchereau y Steinman, 1998). La reducción en la expresión GITRL por la DC esplénicas cultivadas en medio sugieren que la maduración DC "Espontánea" que ocurre durante el cultivo in Vitro (Vremec y

28X
285

Shortman, 1997) es suficiente para subregular la expresión de GITRL. Por esta razón, solamente se muestran los resultados que siguen a la estimulación LPS, aunque la DC fue sometida a los mismos tratamientos mostrados para la células B. Similar a los resultados de otro reporte publicado (Tone et al., 2003), se encontró que las DC derivadas de medula expresan GITRL constitutivamente, y que tal expresión fue solamente reducida marginalmente después de tratamiento con diversos ligandos TLR (datos no mostrados)

[0233] Tanto las células T CD4 como CD8 expresaron niveles medibles de GITRL después de un cultivo de 48 horas de esplenocitos en ausencia ("+Med.") o presencia ("+aCD3") de anticuerpo anti-CD3 soluble (FIGURA 8D), confirmando el PCR en tiempo real anterior (ver también ejemplo 2)

EJEMPLO 9

El bloqueo de la interacción GITR/GITRL inhibe la proliferación de linfocitos

[0234] Debido a que el GITRL expresado constitutivamente por los APC, y debido a que las interacciones GITR/GITRL fueron propuestas para abrogar las funciones supresoras de las células T CD4⁺CD25⁺, la habilidad del anticuerpo anti-GITRL para promover la supresión mediada por la población endovenosa de las células T CD4⁺CD25⁺ residentes en los órganos linfoides secundarios fueron ensayados. Se hizo una comparación de las respuestas proliferativas de las células del nodo linfático totales (LN), esplenocitos totales (Sp), y LN o Sp debilitados de las células CD25⁺ (DELTA.25), cada una de las cuales fueron cultivadas con el anticuerpo anti-GITRL (círculos llenos) o un anticuerpo de control (Rat IgG; círculos abiertos). La adición del anticuerpo anti-GITRL redujo la respuesta proliferativa del total de

las células de nodo linfático (FIGURA 9A, superior izquierdo) y a un grado menor, el total de esplenocitos (FIGURA 9A, inferior izquierdo). Sin embargo, el efecto inhibitorio también fue evidente en cultivos debilitados de células CD25⁺ (FIGURA 9A, superior derecho (LN); inferior derecho (Sp)), elevando la posibilidad de que las interacciones GITR/GITRL suministren señales coestimuladoras para las células T CD25⁻

[0235] Para ensayar directamente esta posibilidad, las respuestas proliferativas de CD4⁺CD25⁻ y células T CD8⁺ purificadas fueron examinadas en la presencia de los APC y las células YB2/0 que expresan el GITRL. La proliferación de ambas las células T CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺ fue promovida sustancialmente en la presencia de células que expresa GITRL (FIGURA 9B), las cuales fueron particularmente evidentes a bajas concentraciones de anti-CD3 para células T CD4⁺CD25⁻.

[0236] puede aparecer discrepante que el anticuerpo anti-GITR medie sus efectos por actuar sobre células T CD4⁺CD25⁻, a medida que las células T restantes expresan solamente bajo niveles de GITR. Sin embargo, la discrepancia se resuelve por la demostración de que la expresión de GITR es sobrerregulada rápidamente luego de la activación de las células T (FIGURA 9C), alcanzando niveles máximos entre 48 y 72 horas después de la activación. Estos resultados soportan la posibilidad de que las interacciones GITR/GITRL pueden influenciar la activación de las células CD4⁺CD25⁻ independientemente de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺.

EJEMPLO 10

Inversión de la supresión requiere la expresión de GITR por las células CD25⁻

[0237] Estudios previos sugirieron que la ligación de GITR sobre células T CD4⁺CD25⁺ inhibieron sus capacidades supresoras (McHugh et al, 2002; Shimizu et al., 2002) Sin embargo, debido a que las células T activadas también expresan GITR, nosotros buscamos determinar el objetivo celular relevante del compromiso de GITR resultante en la abrogación de la supresión. La proliferación fue medida sea en la presencia o ausencia de anti-GITR mAb (DTA-1) en cocultivos utilizando combinaciones de células T CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ a partir de ratones GITR^{+/+} y GITR^{-/-} (FIGURA 10). Como se reportó previamente (Shimizu et al., 2002), cuando ambas células T CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ expresaron GITR, la adición del anti-GITR mAb a los cocultivos resultó en un incremento en la respuesta proliferativa comparada con los cultivos que reciben anticuerpo de isotipo (FIGURA 10A, panel a). Cuando las células T CD4⁺CD25⁻, pero no la CD4⁺CD25⁺, expresaron GITR en cocultivos, la adición del anticuerpo anti-GITR condujo a un mejoramiento en la proliferación de células T similar a la vista cuando las células T CD4⁺CD25⁺ expresaron GITR (FIGURA 10A, panel b) Sin embargo, en cocultivos de CD4⁺CD25⁻GITR^{-/-} y células T CD4⁺CD25⁺ GITR^{+/+}, la adición del anticuerpo anti-GITR no tuvo efecto en la proliferación (FIGURA 10A, panel c). Como se espera, la adición del anticuerpo anti-GITR a los cocultivos de las células T CD4⁺CD25⁻GITR^{-/-} y CD4⁺CD25⁺GITR^{-/-} tampoco tuvo efecto en la proliferación de células T (FIGURA 10A, panel d). Resultados similares a aquellos descritos anteriormente fueron obtenidos con una preparación de anticuerpo anti-mGITR policlonal obtenida comercialmente (datos no mostrados).

[0238] Fuerte evidencia en soporte de la hipótesis de que la abrogación de la supresión fue una consecuencia de la ligación del GITR expresado por las células T CD4⁺CD25⁺ se obtuvo en un estudio previo, el cual utiliza combinaciones de

282
283

respondedores de rata y células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ de ratón (Shimizu et al., 2002). El mAb anti-GITR (DTA-1) utilizado en estos estudios se generó en una rata, y consecuentemente no se ligó a las células de rata (id.) Experimentos análogos a aquellos descritos anteriormente se llevaron a cabo utilizando cocultivos de respondedores CD4⁺CD25⁻ de rata, supresores CD4⁺CD25⁺ de ratón, y APC de rata irradiado (FIGURA 10B, panel b). Los respondedores CD4⁺CD25⁻ de ratón, los supresores CD4⁺CD25⁺ de ratón, y los APC de rata irradiados se incluyeron como un control (FIGURA 10B, panel a). Similar a los datos obtenidos a partir de ratones GITR^{-/-}, ninguna abrogación de supresión mediada por CD4⁺CD25⁺ ocurrió (FIGURA 10B, panel b), a menos que el GITR pudiera ser reticulado sobre la población de respuesta CD25⁻ (FIGURA 10B, panel a).

[0239] Un análisis adicional del sistema rata/ratón se llevó a cabo por medio de examinar la dilución de CFSE por las células T CD4⁺CD25⁻ de rata y CD4⁺CD25⁺ de ratón cocultivadas por citometría de flujo. En la presencia del anticuerpo de control isotipo, las células T las células CD4⁺CD25⁻ de rata se suprimieron solo parcialmente por las células T CD4⁺CD25⁺ de ratón cuando se cultivaron a una proporción de supresor a respondedor 1:8 (FIGURA 10C, paneles izquierdos del histograma). Sin embargo, la adición del anticuerpo anti-GITR condujo a una expansión adicional de las células T CD4⁺CD25⁺ de ratón, y un incremento consecuente en la supresión de las células T de rata (FIGURA 10C, paneles derechos del histograma). La dilución de CFSE incrementada de las células CD4⁺CD25⁺ de ratón seguido por la ligación de GITR podría ser inhibida parcialmente por la adición de anticuerpos anti-CD25 de bloqueo, lo que sugiere que el IL-2 hecho inicialmente por las células T respondedoras puede también ser requerido para esta expansión (datos no mostrados). Juntos, estos resultados

288
289

demuestran inequívocamente que el compromiso de GITR sobre las células respondedoras $CD4^+CD25^-$ se requiere para sobreponerse a la supresión mediada por las células T $CD4^+CD25^+$ T.

EJEMPLO 11

Se requiere expresión de las señales de GITR para regular y solucionar la supresión mediada por las células T reguladoras endógenas.

[0240] En razón a que el CD28 y GITR parecen suministrar señales coestimulatorias durante la activación de las células T, nosotros buscamos determinar si ellas juegan papeles distintivos durante las respuestas primarias. Comparamos la capacidad de GITR y CD28 para promover la proliferación de células T en la presencia o ausencia de células T $CD4^+CD25^+$ de nodo linfático endógeno, y en la presencia o ausencia de IL-2 exógeno (FIGURA 11) Las mismas muestras utilizadas de los estudios de proliferación fueron simultáneamente obtenidas para la dilución CFSE luego de 72 horas de periodo de cultivo En la ausencia de IL-2 exógeno, células $CD4^+$ y $CD8^+$ a partir de tanto animales $GITR^{-/-}$ y $CD28^{-/-}$ fallaron en la al proliferar (FIGURA 11A, panel a). Las células LN de los animales $GITR^{+/-}$ mostraron un fenotipo intermedio entre aquellos a partir del tipo silvestre y los animales $GITR^{-/-}$ (FIGURA 11A, panel a). La respuesta de las células T a partir de ratones tipo silvestre se promovieron significativamente luego de la vaciado de las células T $CD25^+$, lo que indica que la supresión bajo estas condiciones de cultivo se medió por las células T $CD25^+$ residentes en el nodo linfático normal (FIGURA 11A, compare los paneles a y b). De manera más importante en la ausencia de células T $CD4^+CD25^+$, las respuestas de las células T de nodo linfático $CD4^+$ y $CD8^+$ a partir de ratones

289
290

GITR^{-/-} fue comparable con aquellos de los ratones tipo silvestre como se logró mediante la incorporación de ³H-timidina (FIGURA 11A, panel b) y la dilución CFSE (FIGURA 11B, conjunto superior de paneles). Sin embargo, después de 72 horas, las células T CD4⁺ y CD8⁺ a partir de animales CD28^{-/-} no fueron proliferadas aún en la ausencia de células T CD4⁺CD25⁺ (FIGURA 11A, panel b).

[0241] Un patrón muy diferente de respuesta se observó cuando se agregaron IL-2 exógeno a los cultivos de las células de nodo linfático intactas. La proliferación de células T. CD4⁺ y CD8⁺ fue completamente inhibida en la ausencia de GITR según se ensayó por la toma de ³H-timidina (FIGURA 11A, panel c) o por la ausencia de dilución de CFSE (FIGURA 11B, conjunto intermedio de paneles). En contraste, la proliferación medible de células T a partir de animales CD28^{-/-} se detectó por la incorporación de ³H-timidina (FIGURA 11A, panel c), aunque el perfil CFSE demostró que las células CD8⁺ fueron responsables grandemente de la proliferación medida (FIGURA 11B). En la presencia de IL-2 (50 U/ml), los nodos linfáticos se debilitaron en las células T CD4⁺CD25⁺ a partir de todos los animales que mostraron niveles similares de proliferación según se logró por la incorporación de ³H-timidina (FIGURA 11A, panel d) y la dilución CFSE (FIGURA 11B, conjunto inferior de paneles). Tomados en conjunto, estos resultados indican que los defectos en la activación de células T GITR^{-/-} y CD28^{-/-} en ratones es distinta.

[0242] La inhabilidad del total de células T presentes en los nodos linfáticos de ratones GITR^{-/-} para proliferar en la presencia de IL-2 exógeno sugieren que la expresión del receptor IL-2 de alta afinidad puede ser afectado en estos animales. Ya que la expresión de la cadena IL-2R α es inducida principalmente por su ligando (Depper et al., 1985; Malek y Ashwell, 1985), la habilidad de las células T

290
291

CD4⁺CD25⁻ activadas por el anti-CD3 a partir de ratones GITR^{-/-} para expresar esta cadena fueron examinadas en la presencia o ausencia de células T CD4⁺CD25⁺ y en la presencia o ausencia de IL-2 (FIGURA 11C). En la presencia de células T reguladoras, la adición de IL-2 a los cocultivos resultó en la expresión mejorada de CD25 por GITR^{+/+}, pero no por los GITR^{-/-}, las células CD4⁺CD25⁻ después de 24 horas, (FIGURA 11C, panel inferior derecho del histograma). Sin embargo, la habilidad de las células T GITR^{-/-} CD4⁺CD25⁻ para experimentar expresión de CD25 inducidas por IL-2 podría ser restaurada fácilmente removiendo las células T CD4⁺CD25⁺ (FIGURA 11C, panel fondo izquierdo del histograma). Así, el deterioro en la respuesta de IL-2 por las células GITR^{-/-} en la presencia de células T CD4⁺CD25⁺ se debió al menos en parte a su inhabilidad para expresar el receptor IL-2 de alta afinidad en la presencia de concentraciones de IL-2 exógeno suficiente para inducir la expresión de CD25 en células tipo silvestre

EJEMPLO 12

La coestimulación dependiente de CD-28 promueve la expresión de GITR y la respuesta

[0243] Aunque los datos presentados anteriormente sugirieron que el compromiso de cualquiera GITR O CD28 sobre las células CD25⁻ suministraron una señal que permitió a las células T escapar de la supresión, la naturaleza de las señales involucradas en este proceso permaneció no muy clara. El rescate parcial de las respuestas proliferativas de las células CD28^{-/-} CD8⁺ T por IL-2 en la presencia de células CD4⁺CD25⁺ T sugirió que la señalización CD28/B7 podría regular la sensibilidad de las células T para las interacciones GITR/GITRL. Más aún,

29/292

estudios previos han demostrado que las interacciones CD28-80/CD86 pueden promover la expresión de algunos miembros de la familia TNFR (Gilfillan et al., 1998; Rogers et al., 2001) Así, examinamos esta posibilidad con respecto al GTR. Células T $CD4^+CD25^-$ y $CD8^+$ purificadas a partir de ratones $CD28^{+/+}$ o tipo Silvestre permaneció cualquiera de ellos sin estimulación o fueron activadas con bajas concentraciones de anticuerpo anti-CD3 ligado por placa en la presencia o ausencia de anticuerpo anti-CD28 ligado por placa (FIG. 12A) Aunque las células T tipo silvestre se expusieron al anti-CD3 solamente solo un GTR sobrerregulado ligeramente, la expresión de GTR por las células T $CD4^+CD25^-CD8^+$ fue mejorada grandemente por la inclusión del anti-CD28.

[0244] De manera similar, la sobrerregulación del GTR sobre células T $CD4^+CD25^-$ fue inhibida marcadamente por la adición del anti-CD80/CD86 (anti-B7.1/7.2) (FIG. 12B, panel izquierdo del histograma). La inhibición de la expresión GTR en cultivos que contenían anti-CD80/CD86 no fue secundaria al reducir la producción de IL-2, como la sobrerregulación del GTR por células T $CD4^+CD25^-$ no se pudo impedir en cultivos que contenían anti-IL-2/IL-2R mAbs (FIG 12B (panel derecho del histograma)).

[0245] La expresión mejorada del GTR inducido por señales coestimuladoras derivadas del CD28 fue puesta en paralelo por una respuesta mejorada a la señalización de GTR (FIG 12C). La adición del anticuerpo anti-GTR mejoró sustancialmente la proliferación de tanto las células efector T $CD4^+$ y $CD8^+$ (FIG 12C, paneles izquierdos). Sin embargo, cuando se agregó anti-CD80/CD86 a estos cultivos, la presencia del anticuerpo anti-GTR solamente incrementó marginalmente la proliferación de células T de $GTR^{+/+}CD4^+CD25^-$ (FIG. 12C, $GTR^{+/+}$, arriba izquierda; $GTR^{-/-}$, arriba derecha) y las células T

292
293

GITR^{+/+}CD8⁺ (FIG. 12C, GITR^{+/+}, inferior izquierdo, GITR^{-/-}, inferior derecho) por el rango de concentraciones anti-CD3 ensayada. El tratamiento con anti-GITR no afecta las respuestas de las células T CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺ publicadas a partir de ratones GITR^{-/-} (FIG. 12C, paneles derechos). Estos datos sugieren que los datos del CD28, distintas de la coestimulación de la producción de IL-2 promueve la expresión de GITR y facilita la señalización mediada por GITR.

EJEMPLO 13

Ligados de GITRL al GITR suministra una señal coestimuladora para las células T efectoras.

[0246] Cuarenta mil células ayudadoras efectoras T HT-2 (GITR⁺/TCR⁺) fueron cultivadas en la ausencia o presencia de los siguientes reactivos: 1) granos recubiertos con anti-CD3 en una proporción de 1:1 o 1:2, 2) diez mil células YB/2 que fueron o no modificadas para expresar GITRL (YB2/0 parental) o modificadas para expresar GITRL (YB2/0 muGITRL), y 3) incrementar las concentraciones de un anticuerpo de control isotipo o 4 diferentes anticuerpos anti-GITRL (5F1, MGTL-10, MGTL-15, o un anticuerpo policlonal anti-GITRL). La proliferación fue mediada por la incorporación de ³H-timidina durante las cinco últimas horas de un periodo de 44-horas. La FIG. 13A muestra que GITRL promueve la proliferación de células T estimuladas con anti-CD3. Adicionalmente, la promoción mediada por GITRL de la proliferación de células T puede ser bloqueada con anticuerpos 5F1, pero no con el anticuerpo de control isotipo (FIG. 13B) y comercialmente disponible con MGTL-10, MGTL-15 y anticuerpos policlones anti-GITRL (FIG. 13C). Estos datos suministran mayor evidencia de que el GITRL suministra una

283
294

señal coestimuladora, y también, el 5F1 es un anticuerpo neutralizante para el GITRL.

EJEMPLO 14

El bloqueo del GTR-GITRL que liga con un anticuerpo anti-GITRL en la transferencia de encefalomiелitis autoinmune experimental inducida por PLP.

[0247] Ratones SJL hembra de nueve semanas fueron inmunizados con 150 μ g del péptido PLP (aminoácidos 139-151) [HSLGKWLGHDPKF (ID DE SEC NO. 12)] en adyuvante completo de Freund. Diez días después de la inmunización, los esplenocitos fueron cosechados y reestimulados in vivo durante 3 días con 10 μ g/ml de PLP (aminoácidos 139-151) en la ausencia (sin tratamiento) o presencia de 10 μ g/ml anticuerpo (anti-GITRL anticuerpo o anticuerpo control). Después de la reestimulación, 5×10^6 esplenocitos fueron transferidos adoptivamente dentro de ratones SJL tímidos y de diez semanas, y los ratones fueron monitoreados por 52 días en cuanto a la encefalomiелitis autoinmune experimental(EAE), como se midió sobre una escala entre 0 a 5. El EAE se desarrolló en un 40% y 80% de ratones que recibieron esplenocitos reestimulados en la ausencia de anticuerpos (sin tratamiento) y los ratones que recibieron esplenocitos reestimulados en la presencia del anticuerpo control (CKO), respectivamente (FIG 14) Adicionalmente, no hubo diferencias significativas en la escala de enfermedad entre animales que recibieron esplenocitos sin ningún tratamiento y animales que recibieron esplenocitos tratados con anticuerpo de control. Significativamente, ninguno de los ratones que recibió esplenocitos que fueron reestimulados en la presencia de anticuerpo anti-GITRL (5F1) desarrolló el EAE ($p=0.0023$ vs. Tratamiento anticuerpo de control)

29X
295

(FIG. 14). Estos datos sugieren que el bloqueo del camino GITR/GITRL limitará la habilidad de las células CD25⁺ para sobreponerse a la supresión, submodulando por lo tanto su habilidad para efectuar respuestas autoinmune.

EJEMPLO 15

Procedimientos experimentales

Ejemplo 15.1:

Anticuerpos y reactivos

[0248] Todos los anticuerpos usados para citometría de flujo o estudios funcionales fueron BD-Pharmingen, excepto aCD4 marcado con tricolor (clon CT-CD4) y aB220 (clon RA3-6B2) los cuales fueron comprados de Caltag (Burlingame, Calif.), y MGTL-10, MGTL-15, y anticuerpos anti-GITRL policlonales, que fueron comprados de Alexis Biochemicals (San Diego, Calif). El fragmento F(ab')₂ purificado de la cadena anti-IgM μ de cadena fue comprada de Jackson Immunoresearch (West Grove, Pa.). El Anti-IL-2 (clon S4B6) fue usado como fluido de agite El IL-2 recombinante Humano fue obtenido del Instituto Nacional de Cáncer (Frederick, Md.). Las columnas enriquecidas de IL-4, IFN- γ , IL-12, y células T fueron compradas de R&D Systems (Minneapolis, Minn.). Las Poly I:C y LPS fueron compradas de Sigma. CpGs fue comprador de InvivoGen (San Diego, Calif.). Anti-GITRL (clon 5F1; también clon 10F12) y anti-GITR (clon DTA-1) y el péptido PLP fueron producidos "en casa". Los granos magnéticos Anti-B220, -CD11c, -CD11b-CD8, -CD4 y -PE fueron comprados de Miltenyi (Auburn, Calif.)

Ejemplo 15.2.

Ratones

[0249] Los ratones BALB/c y C57Bl/6 (hembras de 6-8 semanas de nacidas) fueron comprados de las instalaciones NCI Frederick animal facility (Frederick, Md) Los ratones CD28^{-/-} fueron provistos por el Dr. Alfred Singer (NIH/NCI) Los embriones GITR^{+/-} (Sv129 x B6) fueron provistos por C. Ricarrdi (Perugia University Medical School, Italy) (Ronchetti et al., 2002). Los ratones GITR^{+/-} derivados fueron cruzados de Nuevo con ratones C57BL/6, y la progenie resultante fue escogida y tamizada por el alelo mutante PCR. Las progenies identificadas GITR^{+/-} fueron entonces intercruzadas para generar ratones GITR^{+/-} Todos los ratones fueron alimentados y encerrados en las instalaciones NIH/NIAID bajo condiciones SPF (libre de patógenos específicos)

Ejemplo 15.3:

La clonación y expresión de cADN

[0250] La secuencia de aminoácidos para el GITRL humano (GenBank Acc No. NM.sub.-005092) fue usado para buscar en la base de datos celera el mGITRL. La secuencia genómica ga_x5j8b7w7wj5_041 cm_aa_2 contenía tres regiones de alta marcación (HSP). Con base en la presunción de que estas regiones corresponden a exones para GITR de ratón, los iniciadores fueron primero diseñados para amplificación PCR. El iniciador delantero (5'-ATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG-3') (ID DE SEC NO.:4) y iniciador inverso (5'-GAATGGTAGATCAGGCATTAAGATG-3') (ID DE SEC NO.:5) amplificó un clon de cADN a partir de una librería de timo de ratón. El fragmento resultante fue subclonado y la secuencia de ADN fue determinada. Un clon de longitud completa subsiguiente fue amplificado por el PCR de la construcción anterior usando 5'-TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAAATGCCTTTGAGAG-3' (delantero) (ID DE

SEC NO.:6) y 5'-TTTAAAGAATTCTCATTAAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT-3' (reversa) (ID DE SEC NO :7) iniciadores. El fragmento PCR fue subclonado dentro del vector retroviral GFP-RV (Ouyang et al , 1998), y la determinación de la secuencia del clon final de cADN fue llevado a cabo. Este vector fue luego transfectado dentro de la línea celular Phoenix. Los sobrenadantes de las células transfectadas Phoenix fueron usadas para traducir la línea celular YB2/0. Las células YB2/0 que expresan GFP-fueron entonces clasificadas FACS y mantenidas en el cultivo. La secuencia del aminoácido mGITRL predicha es idéntica a aquella de otro grupo (Kim et al., 2003), excepto por la sustitución de una alanita por una valina en la posición de aminoácido 48 en su secuencia.

Ejemplo 15.4:

Producción y purificación de anticuerpos monoclonales

[0251] Las ratas Lewis fueron inmunizadas una vez s.q. con 100×10^6 células YB2/0-GITRL en CFA. Dos semanas después, estas ratas fueron inmunizadas s q con 100×10^6 células YB2/0-GITRL en IFA. Dos semanas después, las ratas fueron incrustadas con 50×10^6 células YB2/0-GITRL en PBS. Cuatro días después, el bazo fue cosechado y la fusión celular fue llevada a cabo como se describió previamente (Coligan et al., 2003). Los supernadantes de los hibridomas resultantes fueron seleccionados por citometría de flujo usando Phoenix-GITRL y células Phoenix. Los anticuerpos fueron purificados a partir de sobrenadantes del cultivo celular usando las columnas cargadas con proteína G, y los anticuerpos hervidos fueron dializados contra PBS

Ejemplo 15.5

Purificación celular

[0252] Las células T fueron purificadas a partir de nódulos linfáticos periféricos de ratón. Las células T CD25⁺ fueron marcados con granos magnéticos y purificados sobre un autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.) de acuerdo con el protocolo de fábricas. La pureza de las células CD25⁺ estuvo típicamente entre 97 a 99 por ciento. Las células restantes en la fracción negativa fueron subsecuentemente marcadas sea con microgranos de anti-CD4 o anti-CD8 y purificados usando el procedimiento de selección positiva sobre autoMACS. La pureza fue rutinariamente 90-95 por ciento. Las suspensiones de bazo debilitado por células T fueron preparados de suspensiones divididas de eritrocitos por medio de células Thy1.2⁺ usando el autoMACS. Las células B220⁺ fueron purificadas a partir de esplenocitos de una manera similar usando microgránulos anti-B220 (Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.), y la pureza de las fracciones resultantes fue rutinariamente mayor al 90%. Células peritoneales fueron preparadas por medio de enjuagar la cavidad peritoneal (PerC) con 10 ml de frío HBSS. Para los DCs esplénicos, las suspensiones de los esplenocitos fueron preparados en manera similar a la descrita (Vremec et al, 2000). Los DCs esplénicos fueron luego purificados a partir de las suspensiones que usan microgránulos anti-CD11c (Miltenyi Biotech, Auburn, Calif.). Las suspensiones DC resultantes fueron rutinariamente 85 a 90 por ciento puras. Las células CD4⁺CD25⁺ de ratas fueron generados por esplenocitos debilitados de ratas de células CD25⁺ usando anticuerpos PE-anti-rat CD25 (1OX-39) seguido por microgránulos anti-PE. Después de la debilitación, las células CD4⁺ fueron luego seleccionadas a partir de fracción debilitada usando microgránulos anti-rata-CD4.

Ejemplo 15.6

Ensayos de proliferación in Vitro

288
299

[0253] Los ensayos de supresión fueron llevados a cabo como se describió en (Thornton and Shevach, 1998). Brevemente, (5×10^4) las células fueron concultivadas en RPMI suplementada con FBS 1640 (Atlanta Biologicals, Atlanta, Ga.) con (3000R), esplenocitos de células T irradiados (5×10^4) en la presencia de $0.5 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 mAb (2C11) en guacas de fondo plano de 96 pozos. Para algunos cultivos, los anticuerpos específicos GITR o un isotipo Ig de rata fueron agregados al final de la concentración de $2 \mu\text{g/ml}$. Los números titulados de células $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ fueron agregados al supresor final para proporciones de respuesta de 0:1, 1:2, 1:4, o 1:8. Los cultivos fueron pulsados con $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina en las 5-8 horas finales de un cultivo de 72 horas, y fueron llevados a cabo en replicado al menos que se indique lo contrario. Los cocultivos de subconjuntos de células T de rata y ratón fueron establecidos de manera similar excepto que fueron irradiados con esplenocitos de rata debilitado por CD-4 (3000R) que fueron cursados como APCs, y las células T de rata y ratón fueron estimuladas usando un cóctel de anti-rata-CD3 ($0.25 \mu\text{g/ml}$) y anti-ratón-CD3 ($0.25 \mu\text{g/ml}$) mAbs.

Ejemplo 15.7:

Cultivo in vitro de células de nódulos linfático y marcado CFSE

[0254] suspensiones de células de nódulos linfáticos debilitadas por CD25^+ fueron preparadas en el autoMACS como se describió anteriormente. Las células fueron marcadas con CFSE a una concentración de 2 M por 8 minutos en un baño de agua a 37°C . Las células fueron lavadas en RPMI 1640 completo. Las células ($5 \times 10^4/\text{pozo}$) fueron entonces cultivadas en placas de 96 pozos en la presencia o ausencia de rhIL-2 (50 U/ml). Los pozos duplicados fueron pulsados con $1 \mu\text{Ci}$

de ^3H -timidina para las 5-8 horas finales de un cultivo de 72-horas o pulsados para análisis de dilución CFSE

EJEMPLO 16

Discusión

[0255] El papel del GITR en la función de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ fue inferido a partir de la demostración de que ambos anticuerpos policlonal y monoclonal para el GITR invirtieron los efectos supresores de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cuando se agregó a los cocultivos de la célula CD25^+ y CD25^- (McHugh et al., 2002, Shimizu et al., 2002). Las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ aparecieron como objetivos posibles para los reactivos anti-GITR porque las células T CD25^+ explantadas frescamente expresaron GITR en mayores niveles que el resto de células T CD25^- y porque el anticuerpo anti-GITR junto con el IL-2 dispararon la proliferación del CD25^+ , pero no del CD25^- , en la ausencia de una señal TCR. Más aún, cuando Shimizu et al. agregó un anti-mGITR mAb de rata que no fue reactivo con las células de rata, a cocultivos de células T supresoras CD25^+ de ratón y respondedoras de rata, se observó una inversión de la supresión. Estos estudios conducen la hipótesis de que el compromiso del GITR por los anticuerpos anti-GITR agonistas y, presumiblemente, por su ligando fisiológico, generó una señal que inhibió tanto la actividad supresora de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ e invirtió la no respuesta de las células T CD25^+ al IL-2 exógeno.

[0256] Los experimentos fueron diseñados para intentar extender y confirmar estos estudios por la clonación del GITRL de ratón, analizar su distribución de

tejido, y definitivamente determinar el objetivo para los anticuerpo anti-GITR agonísticos por medio de usar mezclas de células T CD25⁺ y CD25⁻ a partir del tipo silvestre y de ratones GITR^{-/-}. Colectivamente, los estudios demostraron que los anticuerpos anti-GITR y el GITRL abrogaron los efectos supresores de las células T CD4⁺CD25⁺ por medio de suministrar células T CD25⁻ una señal única que eleva su umbral para la supresión por medio de células T CD4⁺CD25⁺. Los estudios indican que el GITRL se expresa selectivamente sobre la superficie celular del APC, con su nivel más alto de sujeción sobre linfocitos B B-1; los niveles intermedios sobre linfocitos B B-2 convencionales, macrófagos y DC B220⁺; niveles inferiores sobre subconjuntos de B220 - DC. El GITRL es único entre los miembros de la superfamilia TNF en que este expresa sobre el resto de APC, y su expresión es subregulada por medio de disparar el receptor de célula B, CD40, o receptores diferentes similares Toll. Otros miembros de la superfamilia TNF (4-1BB-L, OX40-L, LIGHT, CD70, CD30-L) no son detectables sobre APC restante, y su expresión es sobrerregulada por la activación del APC por medio de la estimulación del receptor similar a Toll (Croft, 2003). Los presentes estudios no se dirigen a si la subregulación de la expresión del GITRL de la superficie celular se acompaña por la secreción del GITRL soluble, pero Tone et al. (2003) ha reportado que la estimulación LPS de los DC, macrófagos y células B resulta en la subregulación del mRNA GITRL. La expresión del GITRL sobre el APC restante sugiere fuertemente que esta funciona tempranamente en el proceso de la activación de las células T. otros tipos de células, incluyendo las células endoteliales (Gurney et al, 1999; Kwon et al., 1999), activó células T, y ciertos subconjuntos de timocitos DN también mostraron expresar el GITRL, y la función de esta molécula sobre estos últimos tipos de células permanece para ser determinada.

30
302

[0257] La habilidad de los anticuerpos anti-GITR y las células que expresan el GITRL para promover la activación de las células T CD25⁻ solas, lo mismo que la habilidad del anti-GITRL para inhibir parcialmente la activación de las células T CD25⁻ en la ausencia de células T CD25⁺, impulsó un reexamen cuidadoso de los objetivos celulares de estos reactivos. La adición de anti-GITR a cocultivos de células T CD25⁺ y CD25⁻ a partir de ratones de tipo silvestre y *GITR*^{-/-} demostró que el objetivo para la inversión de la supresión mediada por anticuerpo fue la célula T CD25⁻. Esto fue soportado adicionalmente por experimentos usando células T respondedoras CD25⁻ de rata y supresoras CD25⁺ de ratón en cocultivos, que demostraron en forma concluyente que la ligación del GITR sobre el subconjunto de células CD25⁺ no abroga subfunción supresita. De hecho, un examen de la dilución CFSE demostró que la ligación GITR promovió la expansión de las células T CD25⁺ en cocultivos, que promovieron últimamente la supresión de los respondedores CD25⁻ de rata. Por lo tanto, es posible que la promoción en la proliferación en cocultivos de rata tratada con anti-GITR de rata/ratón reportado por Shimizu et al (2002), que presumiblemente fueron debidos a las células T de rata, actualmente reflejaron proliferación de las células supresoras CD25⁺ de ratón, esto no había sido evidente por medio de medir la incorporación ³H-timidina sola.

[0258] Un reporte previo sugirió que las células T deficientes de GITR son hiperreactivas a la estimulación TCR (Ronchetti et al., 2002). Sin embargo la extrapolación de aquellas observaciones a las observaciones presentes son difíciles ya que ese reporte no analizó las respuestas de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ purificados, ni tampoco evaluó el papel de las células T CD4⁺CD25⁺. En los presentes estudios, las respuestas de las células T CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺ altamente purificadas a partir de ratones *GITR*^{-/-} fueron comparables a aquellos de los

302
393

controles. Sin embargo, en la presencia de números fisiológicos de células T reguladoras, tanto las células T CD4⁺ y CD8⁺ de animales *GITR*^{-/-} fueron completamente sin respuesta a la reticulación CD3. Este resultado claramente demuestra que en la ausencia de interacciones GITR/GITRL la supresión es dominante. Por supuesto, la supresión de la activación de células T CD4⁺CD25⁻ de ratones *GITR*^{-/-} fue tan fuerte que no pudo solucionarse por la adición de una alta concentración de IL-2 exógeno, lo que normalmente abroga los efectos supresores de números mucho mayores de células T CD25⁺ sobre las respuestas de las células T CD4⁺CD25⁻ del tipo silvestre (Takahashi et al, 1998, Thornton y Shevach, 1998) Los efectos supresores del CD4⁺CD25⁺ fueron mediados por la inhibición tanto de la producción de IL-2 y la expresión de CD25 por la población respondedora CD4⁺CD25⁻ del *GITR*^{-/-}, lo que se parece a lo que se había descrito anteriormente para los efectos de las células T CD4⁺CD25⁺ sobre respuestas de células T CD8⁺ normales (Piccirillo y Shevach, 2001).

[0259] Las señales coestimuladoras suministradas por GITR y CD28 parecieron ser distintas, pero interrelacionadas. En la ausencia de células T reguladoras, las respuestas de tanto las células T CD4⁺ y CD8⁺ de ratones *GITR*^{-/-} fueron idénticas a aquellas de las células de ratones tipo silvestre. En contraste, bajo condiciones de cultivo usadas en este estudio, las células T CD4⁺ y CD8⁺ de ratones *CD28*^{-/-} no tuvieron respuesta. Alternativamente, cuando se agregó IL-2 a cultivos que contenían células T reguladoras, las respuestas de las células T CD4⁺ y CD8⁺ de ratones *GITR*^{-/-} no fueron restauradas, mientras que las respuestas de las células CD8⁺ de los ratones *CD28*^{-/-} fueron restauradas parcialmente. De otro lado, una relación cooperativa potencial y una jerarquía de señalización compartida entre CD28 y GITR fue soportada por la demostración de que (1) las células T CD4⁺CD25⁻ y CD8 fallaron en incrementar la regulación del GITR en la

ausencia de CD28 reticulado y (2) los anticuerpos anti-CD80/CD86 inhibieron marcadamente tanto el incremento en la regulación de la expresión GITR y la respuesta a los anticuerpos anti-GITR. Así, los resultados sugieren que una función importante adicional del trayecto de señalización CD28-CD80/CD86 durante la activación de las células T es el de licenciar la resistencia de la célula T a la supresión mediada por CD25⁺ por medio de promover la expresión y función del GITR.

[0260] Similar a los resultados sugeridos por otros estudios publicados (Shimizu et al , 2002; Tone et al , 2003), estos estudios indican que la ligación de GITR sobre células T CD25⁻, en la ausencia de células T reguladoras, suministró algún grado de coestimulación. Sin embargo, la ligación de GITR no es requerida para coestimular las células T CD25⁻ en la misma manera como las células T CD28, como las células T CD4⁺CD25⁻ y CD8 de ratones *GITR*^{-/-} responden similar a las células T tipo silvestre. Nosotros nos inclinamos por el punto de vista en que el compromiso del GITR tanto en las células T efectoras CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺ por GITRL tempranamente durante el curso de una respuesta inmune sirve principalmente para convertir la población efectora resistente, por ejemplo, menos susceptible, a los efectos supresores de las células T CD4⁺CD25⁺. Durante el curso de la respuesta, las señales inflamatorias resultan últimamente en la subregulación de la expresión GITRL, incrementando así la susceptibilidad de las células efectoras para la supresión mediada por CD25⁺. Aunque solamente datos limitados están disponibles en cuando la supresión mediada por CD25⁺ de respuestas inmunes a agentes infecciosos ocurre *in vivo*, algunos estudios han sugerido que esto opera en la contracción, en lugar de la iniciación, de la fase de la respuesta para impedir el daño secundario del tejido por la inflamación exuberante (Suvas et al., 2003) Debería destacarse que el compromiso de GITR

304
305

sobre las células T CD25⁺ en la presencia de IL-2 induce su expansión (McHugh et al., 2002). Permanece posible que el compromiso *in vivo* de GITR sobre células T CD25⁺ por GITRL sobre el APC restante resulta en la expansión no específica de células T reguladoras en la presencia del IL-2 secretado por las células T efectoras tempranamente en el curso de la respuesta inmune. Esta expansión no específica puede ser crítica a la generación posterior de una acumulación de células supresoras específicas a antígeno que funcionan para inhibir la actividad de las células efectoras más tarde en la respuesta

[0261] Hemos propuesto previamente que la manipulación de las interacciones GITR/GITRL pueden probar ser una manera efectiva para manipular la función de las células T reguladoras *in vivo* (McHugh y Shevach, 2002). Aunque este concepto fue basado sobre datos que sugieren que las células T CD4⁺CD25⁺ eran el objetivo del anticuerpo anti-GITR, todavía el caso en que la interacción GITR/GITRL representa un objetivo terapéutico importante. Así, el tratamiento con un anticuerpo anti-GITR agonista o un GITRL-Fc agonista debería convertir la resistencia de las células efectoras, por ejemplo, menos susceptible, a los efectos supresores de las células T CD4⁺CD25⁺ y debería probar ser efectivo para tratar cánceres y enfermedades infecciosas, para promover las respuestas inmunes a los cánceres (usados solos o en combinación con otras terapias de tumor, tales como vacunas de tumor), y para promover las respuestas inmunes a patógenos infecciosos, incluyendo virus, bacterias, etc (usados solos o en combinación con otras terapias para patógenos infecciosos, tales como un adyuvante de vacuna para vacunas débiles para agentes infecciosos) Similarmente, la inhibición de las interacciones GITR/GITRL con un agonista GITR, por ejemplo, por medio del uso de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante o un GITR-Fc, debería bajar el nivel de las células T efectoras para la supresión y por lo tanto ser útiles en la prevención

305
306

y/o tratamiento de desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, rechazos de transplantes (o injertos), y enfermedad de injerto versus huésped.

REFERENCIAS

[0262] Las siguientes referencias son citaciones completas para varias citaciones de autor/año en la divulgación:

Aseffa, A., Gummy, A., Launois, P., MacDonald, H. R., Louis, J. A., and Tacchini-Cottier, F (2002). The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4^{sup} + CD25^{sup} + T cells. *J. Immunol* 169, 3232-3241.

Banchereau, J., and Steinman, R. M (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4^{sup} + CD25^{sup} + regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W., eds. (2003) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc.)

Croft, M (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620.

Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldmann, T. A., and Greene, W. C. (1985). Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4230-4234.

Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33-41.

Gilfillan, M. C., Noel, P. J., Podack, E. R., Reiner, S. L., and Thompson, C. B. (1998). Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J. Immunol* 160, 2180-2187.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol* 150, 4244-4252.

Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, R. M., Pitti, R. M., Mark, D. T., Baldwin, D. T., Gray, A. M., Dowd, A. D., Brush, A. D., Heldens, A. D., et al. (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol* 9, 215-218.

Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., and Yasutomo, K. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29-30.

37
38

Kim, J. D., Choi, B. K., Bae, J. S., Lee, U. H., Han, I. S., Lee, H. W., Youn, B. S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. (2003). Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* 4, 564-569.

Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002). Regulatory CD4^{sup}+CD25^{sup} + T cells restrict memory CD8^{sup}+ T cell responses. *J Exp Med* 196, 1585-1592

Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang, I. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., and Kwon, B. S. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056-6061.

Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A. M., and Lundin, B. S. (2003). *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun* 71, 1755-1762.

Malek, T. R., and Ashwell, J. D. (1985). Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. *J Exp Med* 161, 1575-1580

Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J., and Powrie, F. (2003). CD4⁺CD25⁺ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111-119

McHugh, R. S., and Shevach, E. M. (2002). The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110, 693-702

McHugh, R. S , Whitters, M. J., Piccirillo, C. A , Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M , and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells. gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323

Nakano, H , Yanagita, M , and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells *J Exp Med* 194, 1171-1178.

Ouyang, W , Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755

Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001) Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.

Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells *Immunity* 15, 445-455.

Ronchetti, S., Nocentini, G., Riccardi, C., and Pandolfi, P. P (2002). Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100, 350-352.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M , Itoh, M , and Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2

receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1 164.

Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T (2003) CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses *J Exp Med* 198, 889-901.

Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980

Thornton, A M, and Shevach, E. M. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production *J Exp Med* 188, 287-296

Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S F., Frewin, M R., Cobbold, S. P, and Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059-15064

Uraushihara, K., Kanai, T., Ko, K., Totsuka, T, Makita, S., Iiyama, R., Nakamura, T., and Watanabe, M (2003). Regulation of murine inflammatory bowel disease by

370
311

CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 708-716.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortnan, K (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen *J Immunol* 164, 2978-2986.

Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.

Yu, K Y., Kim, H. S., Song, S. Y., Min, S. S., Jeong, J. J., and Youn, B. S. (2003) Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 433-438.

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o ID DE SEC NO: 3
2. Una molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico está ligada operativamente a por lo menos una secuencia de control de expresión.
3. Una célula huésped transformada o transfectada con la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2.
4. Una molécula de ácido nucleico aislada que hibridiza específicamente bajo condiciones altamente restrictivas a la secuencia de nucleótido establecida en la ID DE SEC NO: 1 o ID DE SEC NO: 3, o el complemento de ellas.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 2 o un fragmento activo de la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 2.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 5, en donde la molécula de ácido nucleico está ligada operativamente a por lo menos una secuencia de control de expresión.

7. Una célula huésped transformada o transfectada con la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 6
8. Un animal transgénico no humano en el cual las células somáticas y de germen contienen ADN que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o ID DE SEC NO: 3.
9. Una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico aislado de la reivindicación 4.
10. Una proteína aislada que comprende la secuencia de aminoácido de la ID DE SEC NO: 2, o un fragmento activo de ellos.
11. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótido complementaria a la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o ID DE SEC NO: 3, o un fragmento de ellas, en donde la expresión de la molécula de ácido nucleico en una célula resulta en una producción disminuida de GITRL.
12. Una molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 11, en donde la molécula de ácido nucleico está ligada operativamente a por lo menos una secuencia de control de expresión.
13. Un oligonucleótido antisentido complementario a un mRNA correspondiente a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO: 1 o ID DE SEC NO: 3, o

313
314

un fragmento de ellas, en donde el oligonucleótido inhibe la expresión de GITRL.

14. Una molécula siARN que corresponde a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótido de la ID DE SEC NO 1 o ID DE SEC NO: 3, o un fragmento de ellas, en donde la molécula siARN inhibe la expresión de GITRL.
15. Un anticuerpo aislado capaz de ligar específicamente a la proteína de la reivindicación 10.
16. El anticuerpo de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo neutraliza la actividad GITRL
17. El anticuerpo de la reivindicación 16, en donde el anticuerpo es 5F1, que tiene un número ATCC PTA-5336, o 10F12, que tiene un número ATCC PTA-5337
18. Un método para seleccionar para compuestos de ensayo capaces de inhibir la interacción de GITRL con GTR comprende las etapas de:
 - poner en contacto una muestra que contiene GITRL y GTR con el compuesto, y
 - determinar si la interacción de GITRL con GTR en la muestra está disminuida en relación con la interacción de GITRL con GTR en una muestra que no está en contacto con el compuesto,

en donde una disminución en la interacción de GITRL con GTR en la muestra en contacto con el compuesto identifica el compuesto como uno que inhibe la interacción de GITRL con GTR.

19 Un método para seleccionar compuestos de ensayo, capaces de mejorar o imitar la interacción de GITRL con GTR que comprende las etapas de:

- poner en contacto una muestra que contiene GITRL y GTR con el compuesto; y
- determinar si la interacción de GITRL con GTR en la muestra es incrementada en relación con la interacción de GITRL con GTR en una muestra que no fue puesta en contacto con el compuesto,

en donde un incremento en la interacción de GITRL con GTR en la muestra que está en contacto con el compuesto identifica al compuesto como uno que mejora o imita la interacción de GITRL con GTR

20. Un método para diagnosticar un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de trasplante en un sujeto que comprende las etapas de.

- detectar una cantidad de ensayo de un producto de gen de GITRL en una muestra del sujeto, y

3/5
3/6

- comparar la cantidad de ensayo con una cantidad normal de producto de gen de GITRL en una muestra de control,

en donde una cantidad de ensayo significativamente superior a la cantidad normal suministra una indicación positiva en el diagnóstico de un desorden autoinmune, una enfermedad inflamatoria, o un rechazo de trasplante.

21. Un método para diagnosticar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto comprende las etapas de:

- detectar una cantidad de ensayo de un producto de gen de GITRL en una muestra del sujeto, y
- comparar la cantidad de ensayo con una cantidad normal de producto de gen de GITRL en una muestra de control,

en donde una cantidad de ensayo significativamente por debajo de la cantidad normal suministra una indicación positiva en el diagnóstico de cáncer o de una enfermedad infecciosa.

22. Un método para tratar un sujeto en riesgo para, o diagnosticado con, un desorden autoinmune, enfermedad inflamatoria o rechazo de trasplante que comprende administrar al sujeto un antagonista de GATR.

23. El método de la reivindicación 22, en donde el método comprende administrar el antagonista de GATR de modo que la susceptibilidad de

3/6
317

las células T efectoras en el sujeto para la supresión de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se mantiene.

24. El método de la reivindicación 22, en donde el antagonista de GITR es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GITR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GITR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico de GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN de GITRL
25. El método de la reivindicación 22, en donde el desorden autoinmune o la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste artritis reumatoide, encefalomiелitis, osteoartritis, esclerosis múltiple, gastritis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, soriasis y otras dermatosis inflamatorias, diabetes tipo I, asma, alergia, y enfermedades inflamatorias del intestino, que incluye la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa.
26. El método de la reivindicación 22, en donde el desorden autoinmune es esclerosis múltiple.
27. Un método para tratar un sujeto en riesgo de, o diagnosticado con, cáncer o una enfermedad infecciosa que comprende administrar al sujeto un agonista GITR.

3/2
318

28. El método de la reivindicación 27, en donde el método comprende administrar el agonista GITR tal que el agonista GITR suministra una señal coestimuladora para las células T efectoras en el sujeto y las convierte menos susceptibles a supresión por medio de las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ en el sujeto.
29. El método de la reivindicación 27, en donde el agonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, y un anticuerpo GITR agonista.
30. Un método para inducir la proliferación de una población celular que contiene células T efectoras que comprende administrar un agonista GITR a la población celular.
31. El método de la reivindicación 30, en donde el agonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, y un anticuerpo GITR agonista.
32. El método de la reivindicación 30, en donde las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.

33. Un método para inhibir la proliferación de una población celular que contiene células T efectoras que comprende administrar un antagonista de GITR a la población celular
34. El método de la reivindicación 33, en donde el antagonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GITR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GITR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico de GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL.
35. El método de la reivindicación 33, en donde las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺
36. Un método para bloquear la supresión de una población celular que incluye células T efectoras en la presencia de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ comprende administrar un agonista GITR a la población celular.
37. El método de la reivindicación 36, en donde el método comprende administrar el agonista GITR de modo que el agonista GITR suministra una señal coestimuladora a las células T efectoras y las convierte en menos susceptibles a la supresión por las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺.

319
320

38. El método de la reivindicación 36, en donde el agonista GTR es seleccionado del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, y un anticuerpo GTR agonista
39. El método de la reivindicación 36, en donde las células efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.
40. Un método para suprimir una población celular que incluye células T efectoras en la presencia de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ comprende administrar un antagonista GTR a la población celular
41. El método de la reivindicación 40, en donde el método comprende administrar el antagonista GTR de modo que la susceptibilidad de las células T efectoras a la supresión por las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ se mantiene.
42. El método de la reivindicación 40, en donde el antagonista GTR es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GTR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GTR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GTR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico de GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL.

320
321

- 43 El método de la reivindicación 40, en donde las células T efectoras son células T CD4⁺ o células T CD8⁺.
44. Un método para tratar cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto, el método comprende las etapas de obtener una población de células T efectoras, tratar la población con un agonista GITR, y administrar la población tratada al sujeto afligido con cáncer o una enfermedad infecciosa
- 45 El método de la reivindicación 44, en donde el agonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista.
46. El método de la reivindicación 44, en donde el sujeto es afligido con cáncer, y en donde la población tratada es usada como una vacuna de tumor.
- 47 Una composición farmacéutica que comprende un agonista de GITR y un portador farmacéuticamente aceptable.
48. La composición farmacéutica de la reivindicación 47, en donde el agonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de GITRL, un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista.

49. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista GITR y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
50. La composición farmacéutica de la reivindicación 49, en donde el antagonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GITR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GITR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico de GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL
51. Un adyuvante de vacuna que comprende un agonista de GITR y un antígeno seleccionado del grupo que consiste de un antígeno viral, un antígeno bacterial, un antígeno fungoso, un antígeno parasítico, un antígeno de cáncer, un antígeno asociado con tumor, y fragmentos de estos.
52. El adyuvante de vacuna de la reivindicación 51, en donde el agonista de GITR es seleccionado del grupo que consiste de GITRL, o un fragmento activo de GITRL, una proteína de fusión que contiene GITRL, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITRL, una molécula pequeña agonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista
53. Un adyuvante de vacuna que comprende un antagonista GITR y un antígeno seleccionado del grupo que consiste de un autoantígeno, una

proteína de péptido amiloide, un aloantígeno, un antígeno de transplante, un alérgeno, y fragmentos de estos.

- 54 El adyuvante de vacuna de la reivindicación 53, en donde el antagonista GITR es seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo anti-GITRL neutralizante, un anticuerpo anti-GITR neutralizante, una proteína de fusión que contiene GITR, una proteína de fusión que contiene un fragmento activo de GITR, una molécula pequeña antagonista, una molécula de ácido nucleico de GITRL antisentido, y una molécula de ácido nucleico siARN GITRL

RESUMEN

[0263] La presente invención suministra polinucleótidos y polipéptidos novedosos aislados y purificados relacionados con un ligando novedoso para el receptor de TNF inducido por glucocorticoide (GITR). La invención también suministra anticuerpos para el ligando GITR (GITRL). La presente invención también está dirigida a métodos novedosos para diagnóstico, pronóstico, monitoreo del progreso de, y tratamiento de desórdenes que surgen de la desregulación del sistema inmune (por ejemplo, desórdenes autoinmunes, enfermedades inflamatorias, y rechazos de trasplantes, y cánceres y enfermedades infecciosas) utilizando GITRL y/o moduladores de GITRL. La presente invención está dirigida adicionalmente a terapéuticas novedosas y objetivos terapéuticos y a métodos de selección y evaluación de compuestos de ensayo para la intervención (tratamiento) y prevención de dichos desórdenes que surgen de la desregulación del sistema inmune, como relacionados al GITRL y GITR.

m 1 MEEMPLRESSPQRAERCK.KSWLLCTIVALLMLLCSLGTLIYTSL 44
 :| ||| | | |:| | || | : :|| ||| ||: |
h 1 MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSI VMLL.FLCSF SWLIFIFL 49

m 45 K.PTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGK LKILQSGTYLIYG 93
 . || | || || ||| | | .| ||| | | |||.|||. | |||||
h 50 QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYG 99

m 94 QVIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNDVLQ TLMNDFQILPIGGVYELHAGDN 143
 || | . | | ||| |.:|| |.:||| | .| :|| |||| |
h 100 QVAP.NANY.NDVAPFEVRLYK NKM IQTLTNKSKI QNVGGTYELHV GDT 147

m 144 IYLFNSKDHIQKNNTYWGII LMPDLPFIS 173
 | | |||. : ||||| |||||: . |||
h 148 IDLIFNSEHQVLKNNTYWGII LLANPQFIS 177

FIGURA 1

326

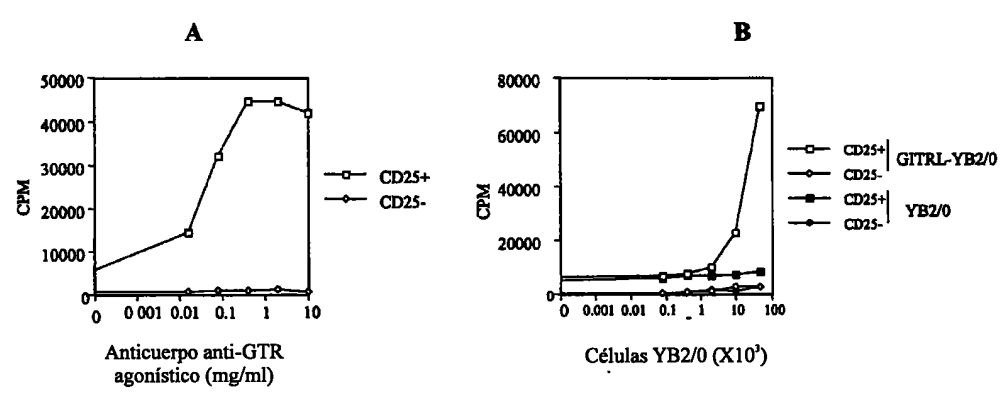


FIGURA 2

326

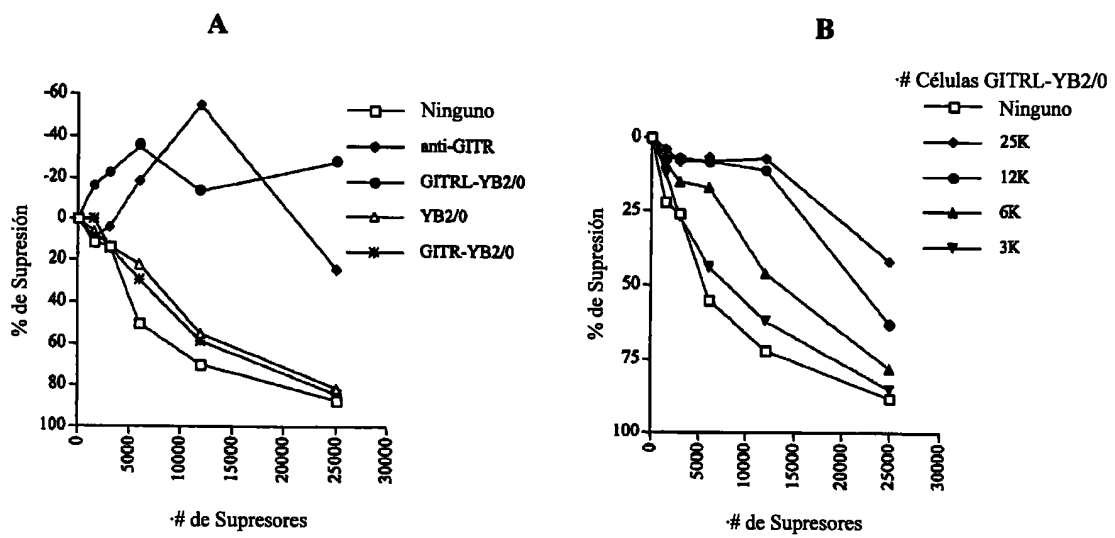


FIGURA 3

228

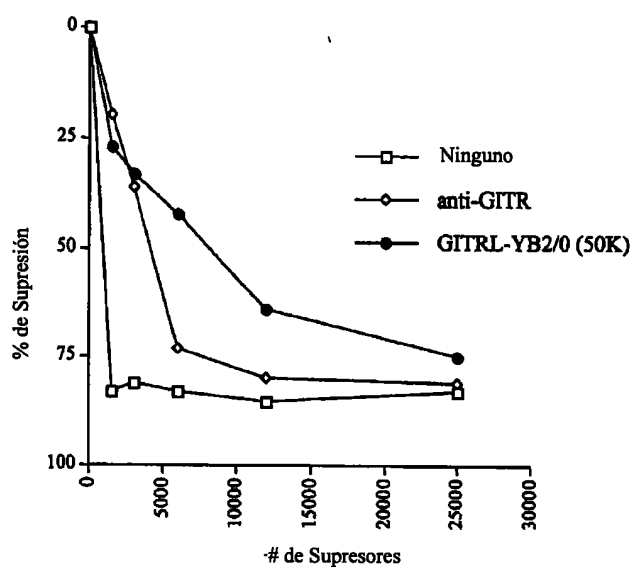


FIGURA 4

224

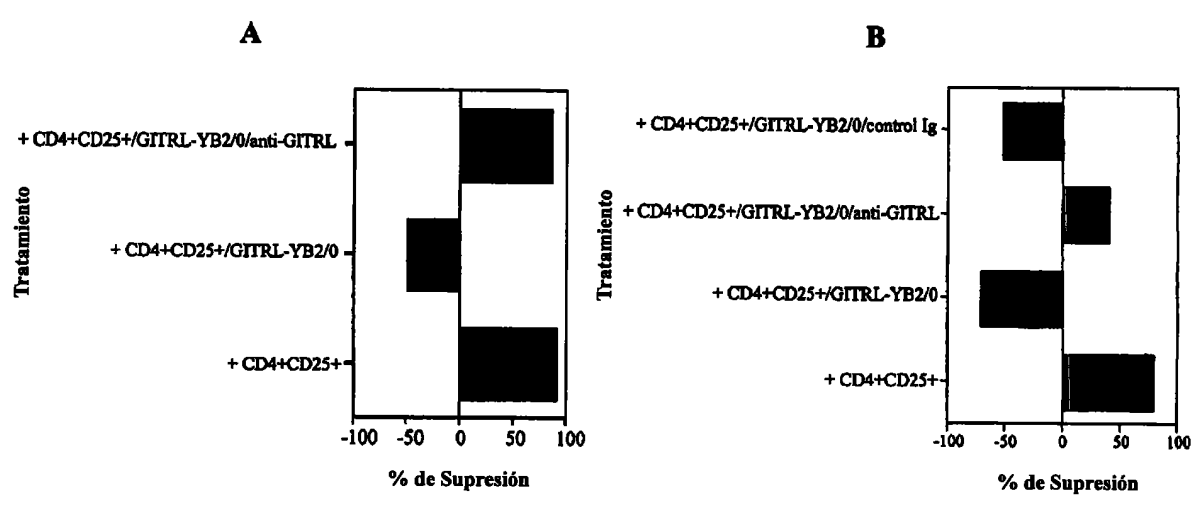


FIGURA 5

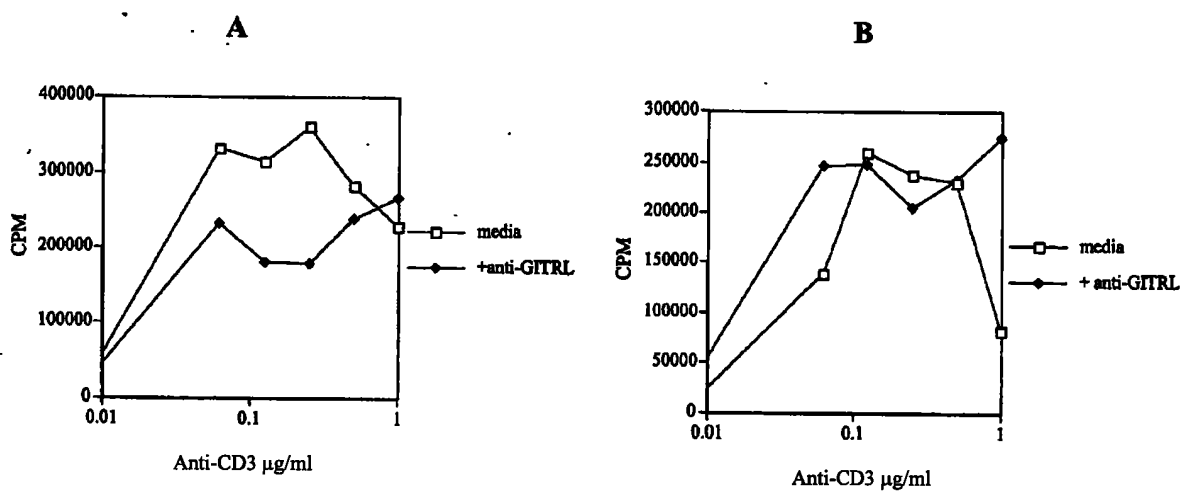


FIGURA 6

330

330
33)

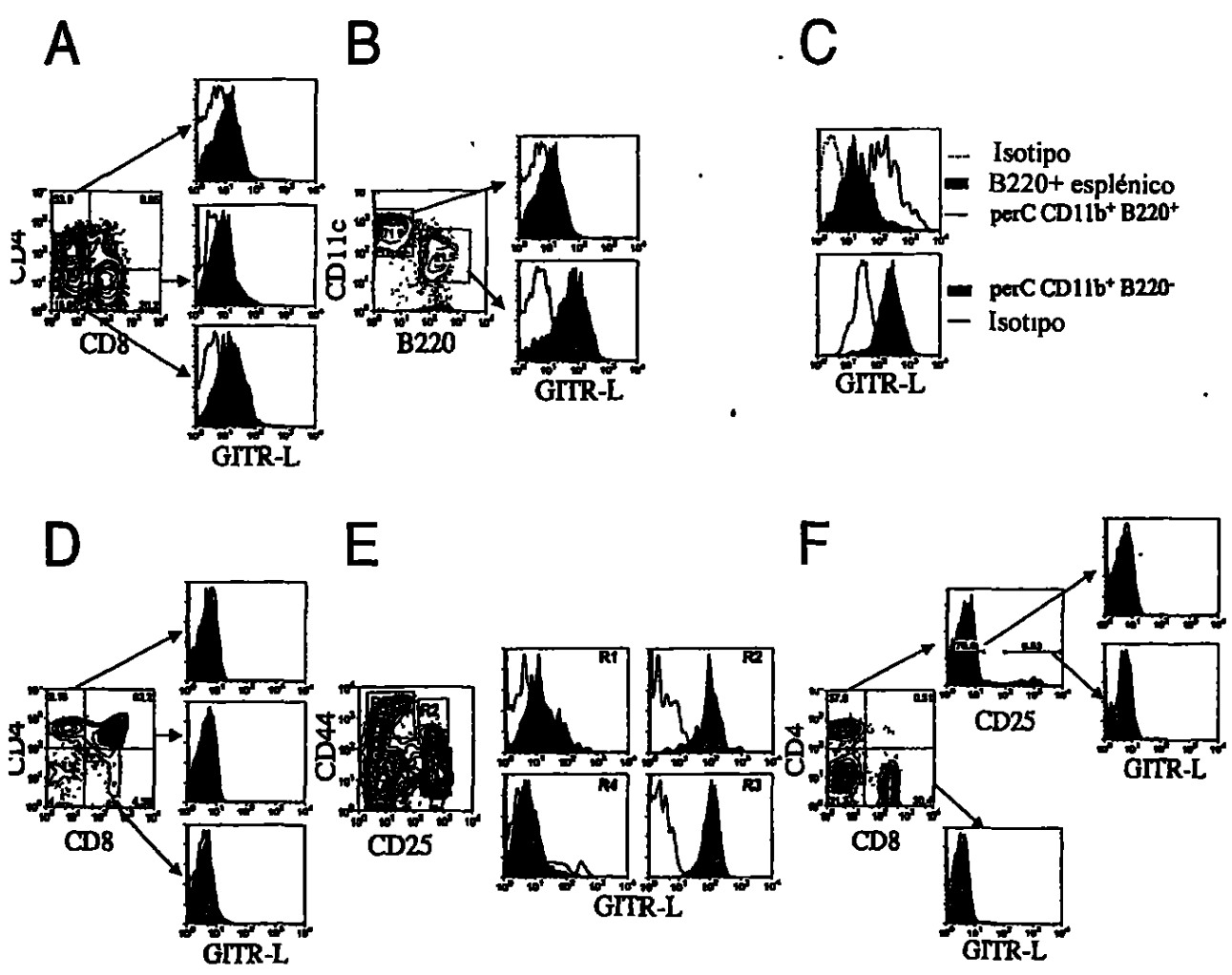
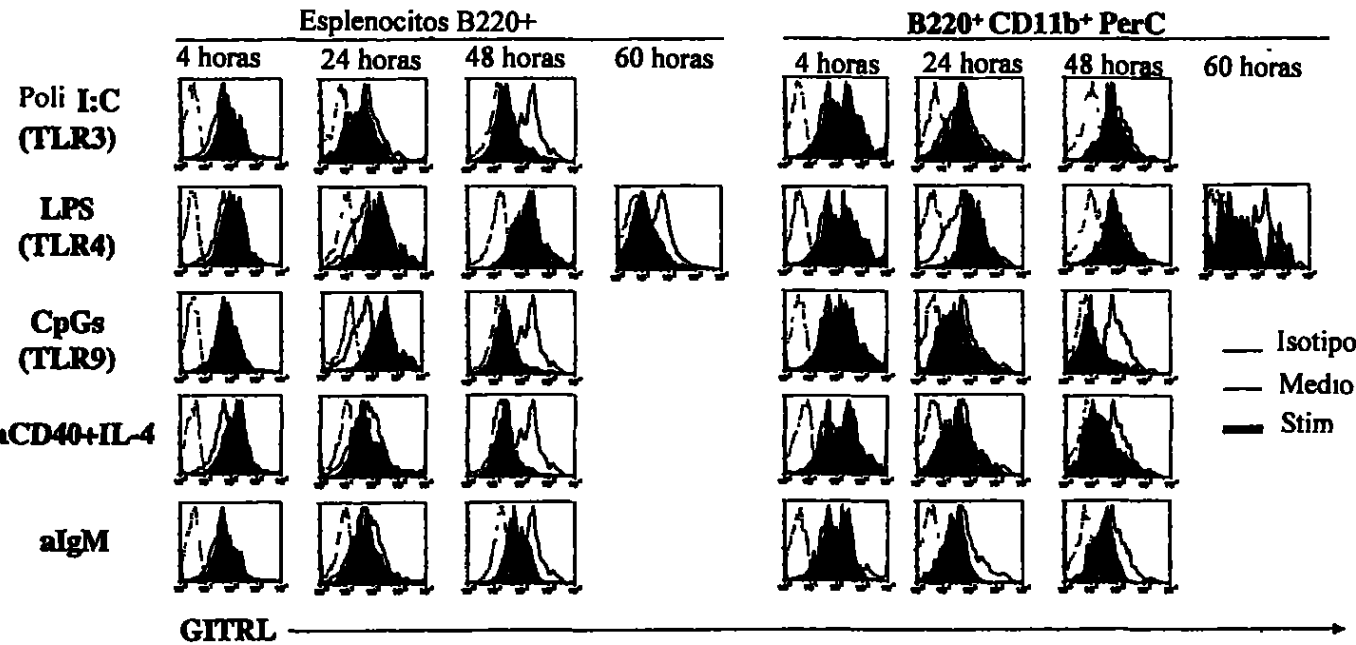


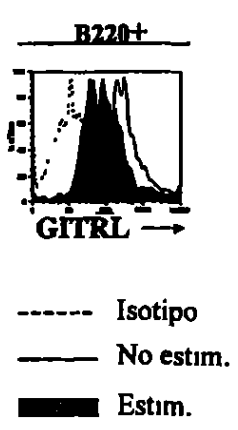
FIGURA 7

332

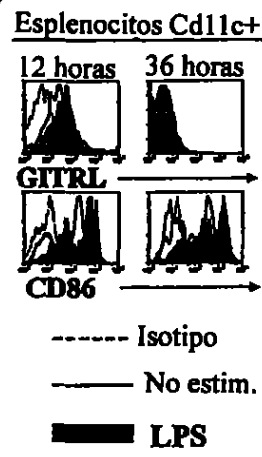
A



B



C



D

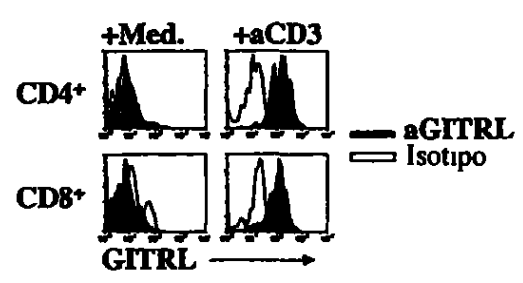


FIGURA 8

333

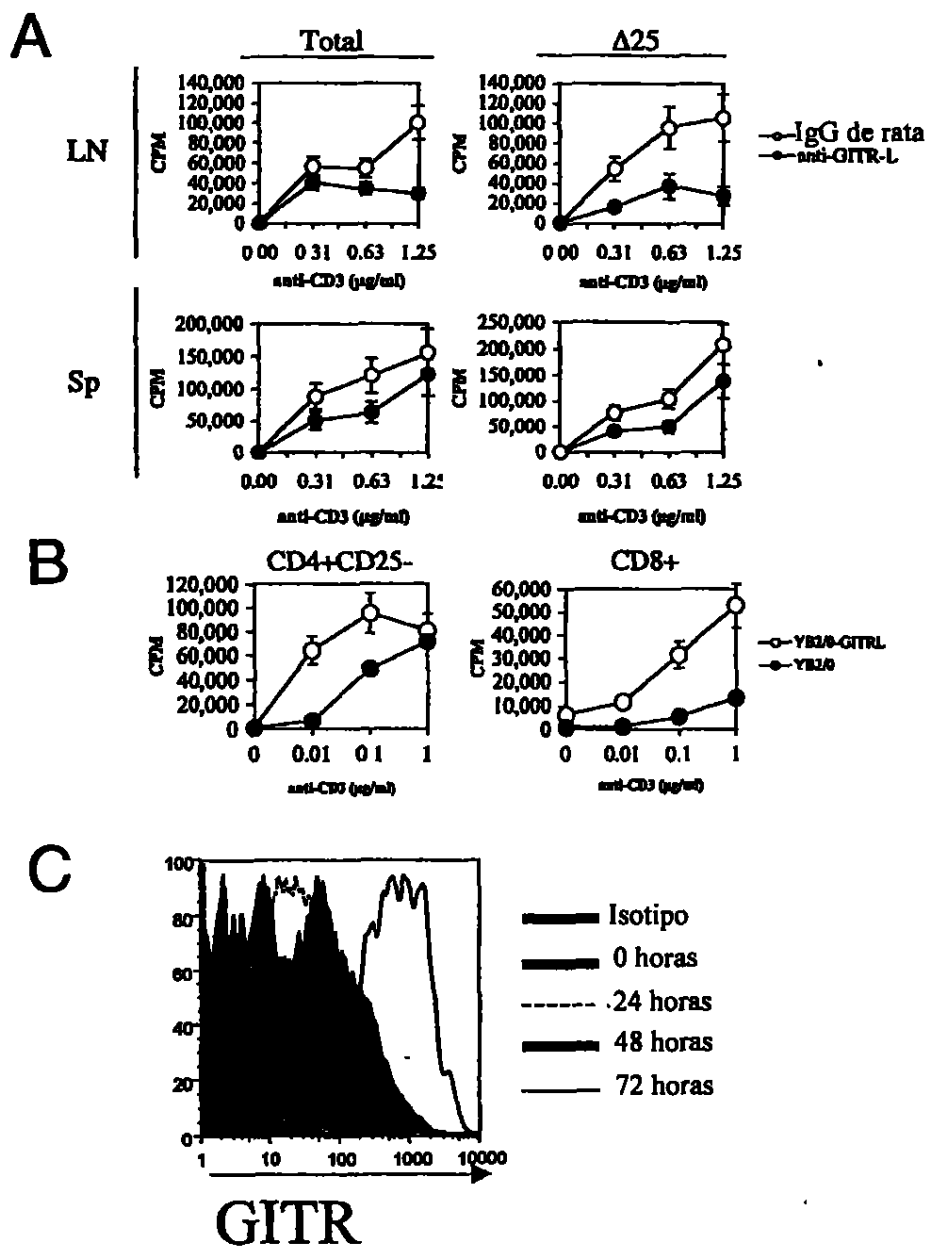


FIGURA 9

333
334

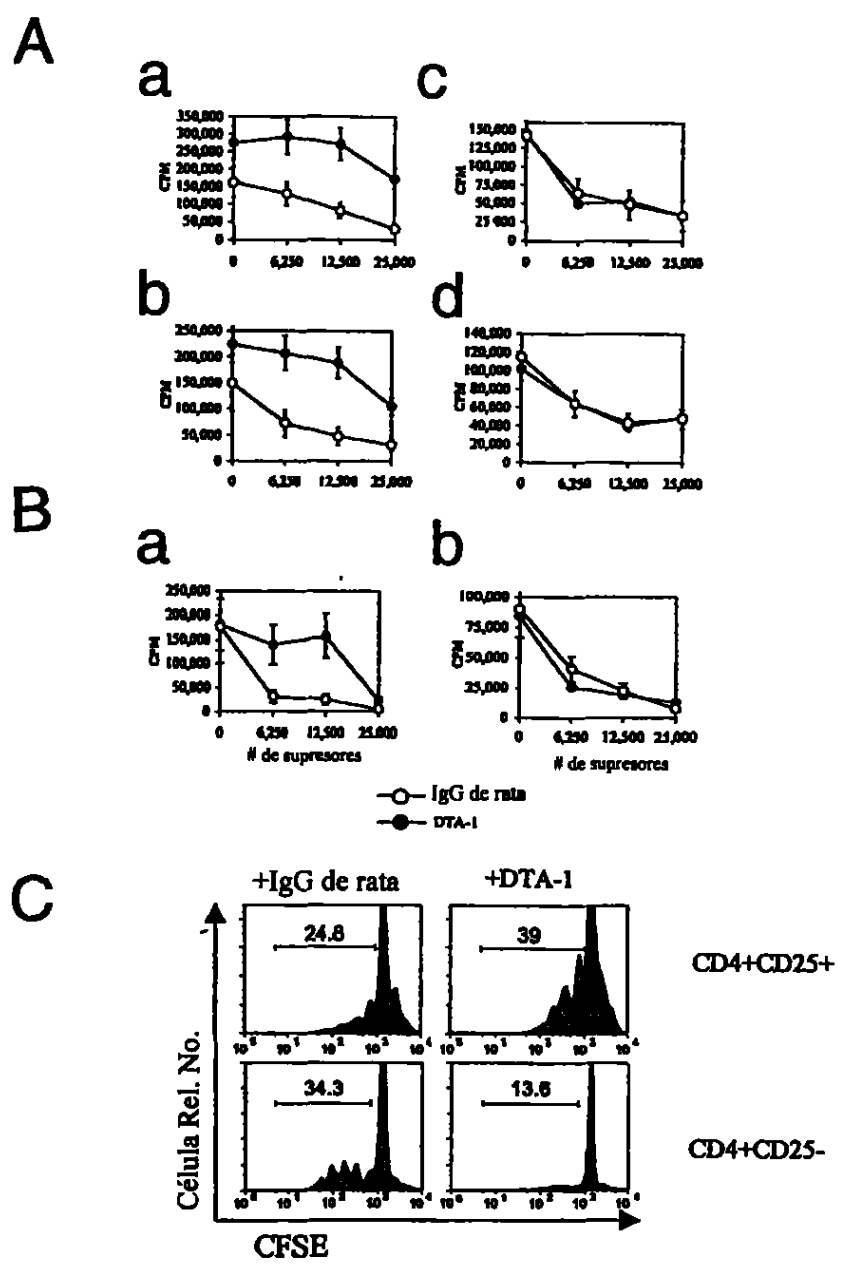


FIGURA 10

334
335

A

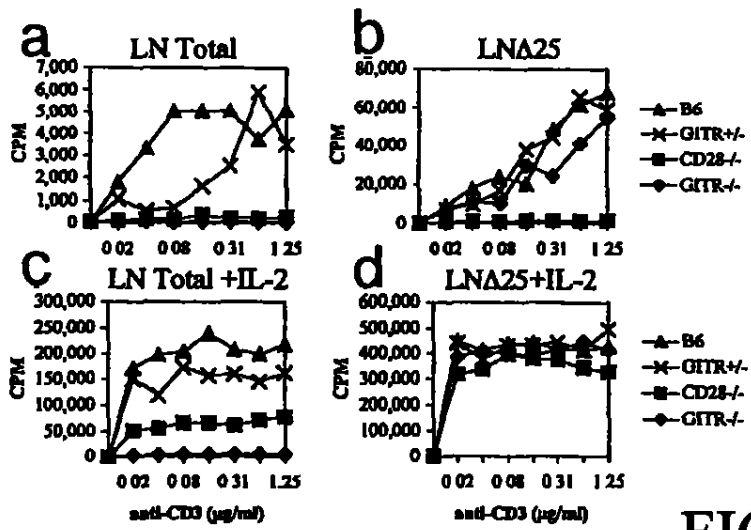
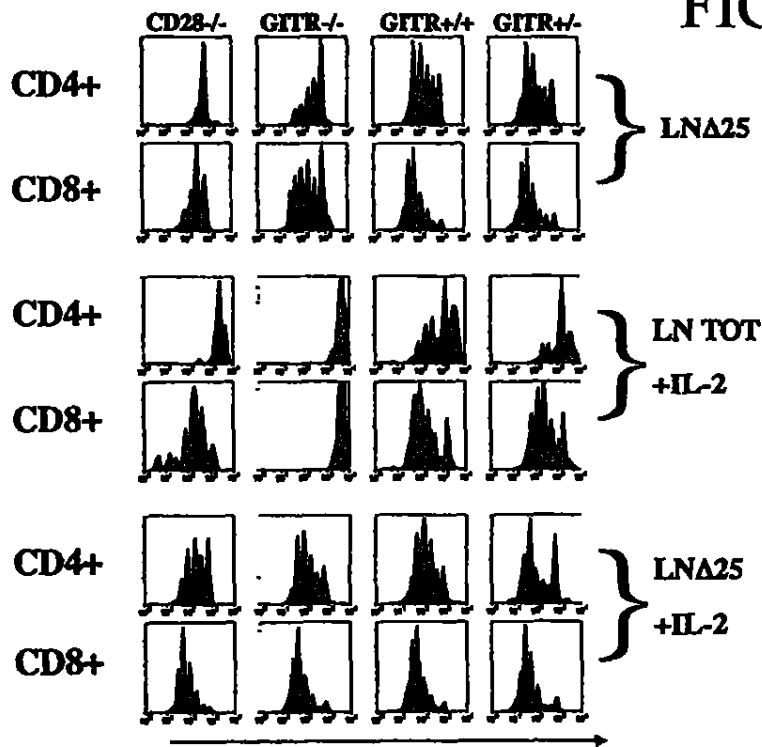
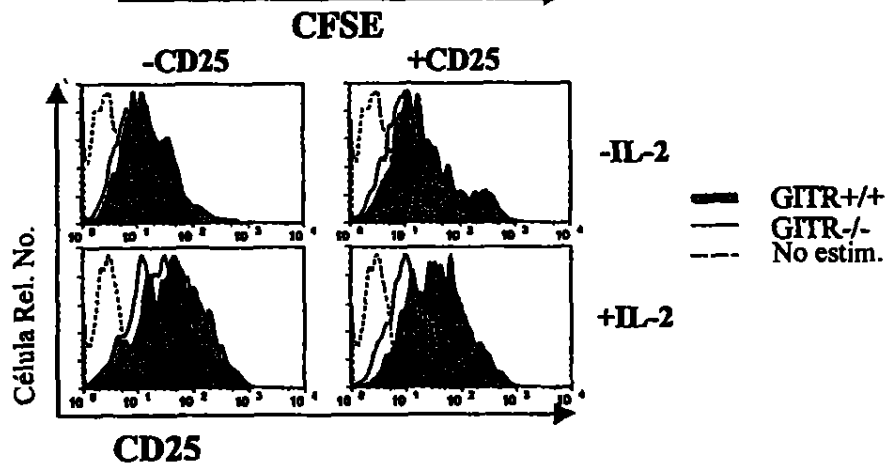


FIGURA 11

B

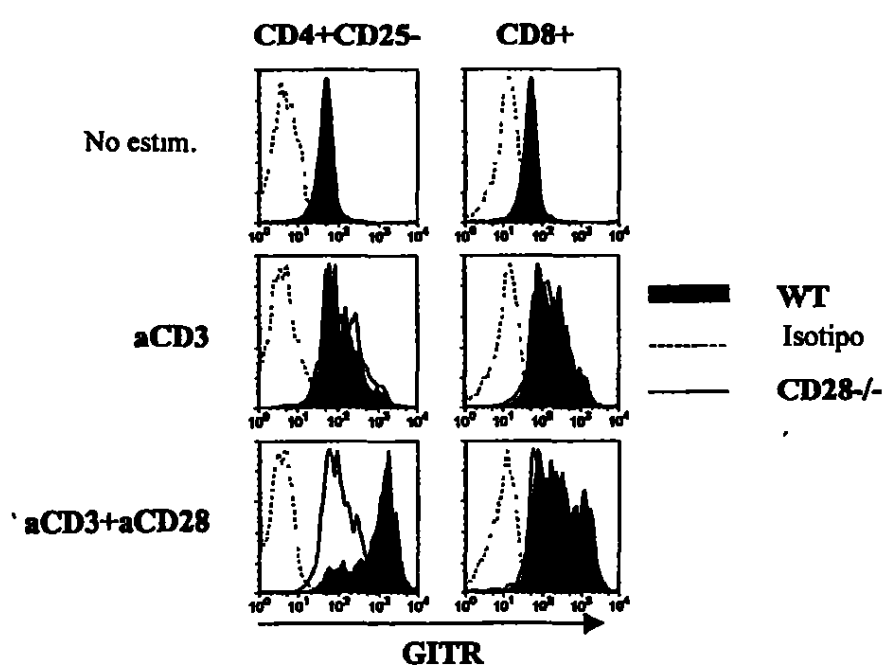


C

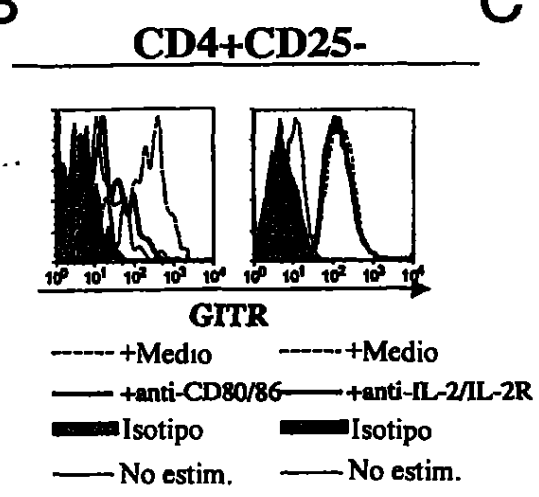


235
336

A



B



C

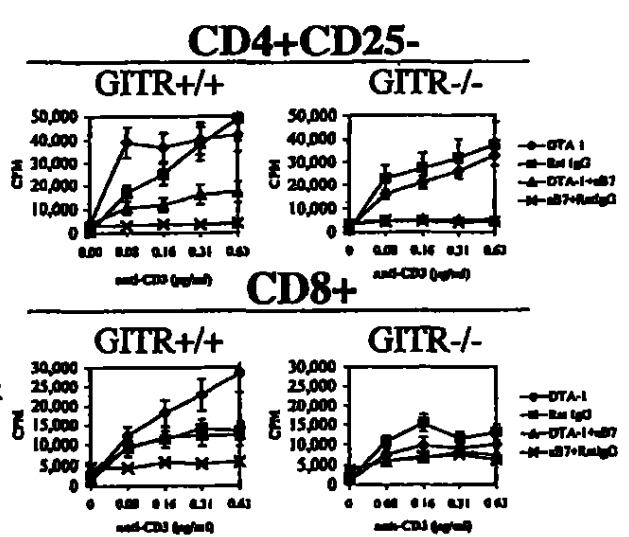


FIGURA 12

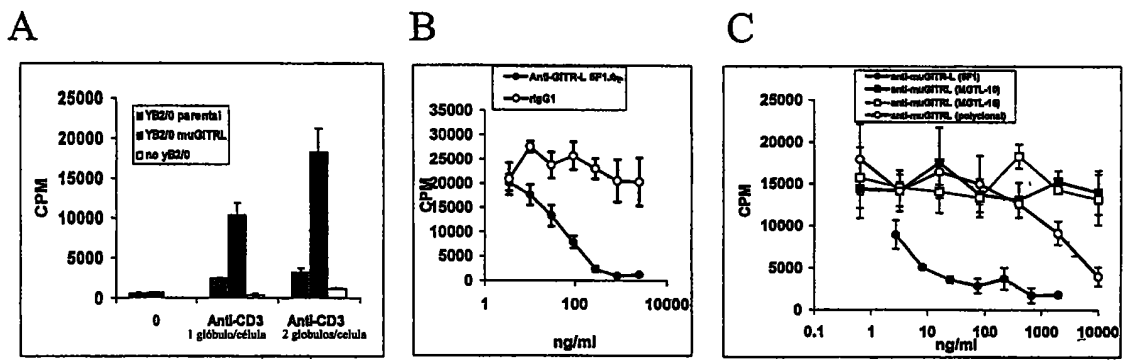


FIGURA 13

Handwritten signature

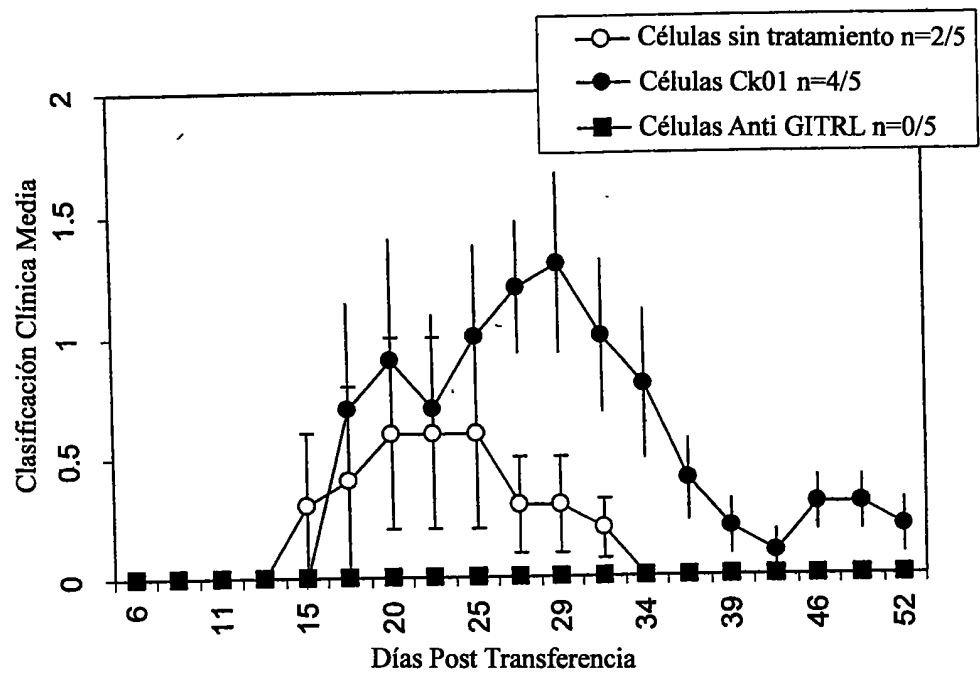


FIGURA 14

66

338
339

01997028500pc.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth
The Government of the United States of America as
represented by the Secretary of the Department of Health and Human
Services
Collins, Mary
Shevach, Ethan M.
McHugh, Rebecca S.
Whitters, Matthew J.
Young, Deborah A.
Byrne, Michael C.
Reddy, Padmalatha F.
Stephens, Geoffrey L.
Carreno, Beatriz M.

<120> GITR LIGAND AND GITR LIGAND-RELATED MOLECULES AND ANTIBODIES AND
USES THEREOF

<130> 01997.028500

<150> US 60/472,844

<151> 2003-05-23

<150> US 60/547,975

<151> 2004-02-26

<160> 12

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 522

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(522)

<400> 1
atg gag gaa atg cct ttg aga gag tca agt cct caa agg gca gag agg 48
Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg
1 5 10 15
tgc aag aag tca tgg ctc ttg tgc ata gtg gct ctg tta ctg atg ctg 96
Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu
20 25 30
ctc tgt tct ttg ggt aca ctg atc tat act tca ctc aag cca act gcc 144
Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala
35 40 45
atc gag tcc tgc atg gtt aag ttt gaa cta tca tcc tca aaa tgg cac 192
Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His
50 55 60
atg aca tct ccc aaa cct cac tgt gtg aat acg aca tct gat ggg aag 240
Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys
65 70 75 80
ctg aag ata ctg cag agt ggc aca tat tta atc tac ggc caa gtg att 288
Page 1

01997028500pc.ST25

Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile
85 90 95

cct gtg gat aag aaa tac ata aaa gac aat gcc ccc ttc gta gta cag 336
Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln
100 105 110

ata tat aaa aag aat gat gtc cta caa act cta atg aat gat ttt caa 384
Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln
115 120 125

atc ttg cct ata gga ggg gtt tat gaa ctg cat gct gga gat aac ata 432
Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile
130 135 140

tat ctg aag ttc aac tct aaa gac cat att cag aaa aat aac aca tac 480
Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr
145 150 155 160

tgg ggg atc atc tta atg cct gat cta cca ttc atc tct taa 522
Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser
165 170

<210> 2
<211> 173
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Glu Met Pro Leu Arg Glu Ser Ser Pro Gln Arg Ala Glu Arg
1 5 10 15

Cys Lys Lys Ser Trp Leu Leu Cys Ile Val Ala Leu Leu Leu Met Leu
20 25 30

Leu Cys Ser Leu Gly Thr Leu Ile Tyr Thr Ser Leu Lys Pro Thr Ala
35 40 45

Ile Glu Ser Cys Met Val Lys Phe Glu Leu Ser Ser Ser Lys Trp His
50 55 60

Met Thr Ser Pro Lys Pro His Cys Val Asn Thr Thr Ser Asp Gly Lys
65 70 75 80

Leu Lys Ile Leu Gln Ser Gly Thr Tyr Leu Ile Tyr Gly Gln Val Ile
85 90 95

Pro Val Asp Lys Lys Tyr Ile Lys Asp Asn Ala Pro Phe Val Val Gln
100 105 110

Ile Tyr Lys Lys Asn Asp Val Leu Gln Thr Leu Met Asn Asp Phe Gln
115 120 125

34
34

Ile Leu Pro Ile Gly Gly Val Tyr Glu Leu His Ala Gly Asp Asn Ile
130 135 140

Tyr Leu Lys Phe Asn Ser Lys Asp His Ile Gln Lys Asn Asn Thr Tyr
145 150 155 160

Trp Gly Ile Ile Leu Met Pro Asp Leu Pro Phe Ile Ser
165 170

<210> 3
<211> 10289
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
tcaggagaca gctataccag gctcctagct gcaagcactc acaaaccaca tgaaactcaa 60
aaagtaagac caaagtgtgg atgcttcaat ccttcctaga aggggtgaaca aaatacccat 120
ggaccaaagg aaaactccac ctctacacc cacggggcta attactataa aacatgacat 180
tgcatcgttc atccatcact tgtgggtatc tgctttcccc agttctcatt ccatcagaga 240
acgagttcta gcctcatgga ggaaatgcct ttgagagagt caagtcctca aagggcagag 300
aggtgcaaga agtcatggct cttgtgcata gtggctctgt tactgatgct gctctgttct 360
ttgggtacac tgatctatac ttcactcaag gtaagggtgg catagagtct acagctgcta 420
attatatcat ataaagggtta tttatttgtt agtctgggta ttatcactgc cattcagcat 480
tgctagaggt agtgggaagg aagacatttg acagtacaaa cagtgtgaagc aatttaagcc 540
ttgtaatgac atggctcttc aaatgtgttt ttattcatcg aatgttttaa gacaaaagac 600
actagaaaat actatatatt ctctgtaggt gtgagctaga tagaactaca tgtttaaact 660
gagccttttag gtgtctgtgg aagttctttt gtccttcctg ggactctact agaaccttct 720
tgattggcaa agaaaagacc tgaaccatgg tactaatctt cgggtaaccc cagacaagct 780
gtagtctcat tgggggaaga gatacaaac agtaatgggg gacagtgaca ggaagcaact 840
gcatgctgag gaagggcatg gtgtcaaagt agaaaaaaag gaaatcctgg gttccagttc 900
tagattagcc tccccataac cagctgtgca aatttgagta agttgtatcg ttgttctgat 960
tctagttttt aggtctgcaa catggtgata agggaaatggc tctgtttact tggcatcctg 1020
ctagctgtaa ttatagcgcg cagtaattga cctaggagaa ggataaacca tatagttgtg 1080
gtttatgagg ggaataactt tgggcttggg tgaccagggg aggcttcatg gaggagggag 1140
jagcacatgt ctgtttggga agcccctgat ggttatcagg aatttcccat tgaactctag 1200
tgtaaattgt gggcttagat gggatatgaa ctggaaatgt atatcaatta ggtttttcta 1260
jaagtgttct ctcatacaga acagccaggg ctgcagagag agagagagag aaaaaaaac 1320
igcaaaaacc aaaccaaaac aaacagacaa aaaaaaaa aaacaacaaa acaaaacaaa 1380

01997028500pc.ST25

acaaaaaaaaa ccaaaaaaag cattgaccag aaaagccaga aaggaatcaa atattaaata 1440
 agacattata taattcaagg gttggcctat ttatattaaa atatactaaa tcttgggcag 1500
 aattaaatga cgcatagctg tgtaagaaag ggttgatgag tgagcccagg aacatttttc 1560
 taaagagacc aaccagagat ggtcttaaag gtatggttct atattggcaa gatattgaga 1620
 aaagatgcag gaggaagtaa tgcactgttg attcgagggt acttagtatg gtactggcta 1680
 aagacttaca taggagccca ttaatctgta gtctgtaact gtacaaatgg atcaaaggca 1740
 gagggagttc taaccccagc cccacccttc caaagaatga accaagacac gaactttctg 1800
 aagcaatgag tggtgagagg actctcagca ttctcaaggg tttaaaggag gaaggctgag 1860
 gatgcattaa gttcacactg aaagggcttt ttcctcaggc aaacttcctc aagtcttatt 1920
 aatcaggtgg ctctgagcat cagtgaagtct aggtgccgct gactcctgct ggtgaggagt 1980
 ggccgagggg aatgcctttc cgagtgacat ctctccac aatcaaacct tggttaattca 2040
 tgattgctga aactttgatt ccaggttggc ctctcaaaag aacacatccc tttcaatgaa 2100
 gggttcctct tctaaacgta aaagttatcc caaatttaag gaagtaaaaa gttttggagt 2160
 ctcttttctc gtcaggatgc ttggcagcgt agttactatg gaaacgacac tggctttcag 2220
 ggtagcttc agtattacac ttccttatt ggctacaaat aaatgtcttg agcagagaga 2280
 tctgagtggc tggcaggtgc tgagttattg tgaggtggtt gcttcacct tttcatactt 2340
 aagaacttag aagttttttt tttctttctt ttttgatgca aatctccatt tttaaaagtc 2400
 tcttctaaaa aaagaagact tccctctttt tttttttttt tttataaat aaccctctta 2460
 tgtttaaaag taagatatga agcttggtt ctttcagatt ttttttctc tctatctcct 2520
 aggagacatc tagttaagag actagactgg agctcaaggc ggttgccaa ctctccatg 2580
aaagcagctc acaaaagttg tctctgaagc atccaaatag tcaggaaagt ccctttcttc 2640
 agtgaggaag ggtggaattc cagaaggga aatggaattt gtacaattgt acttgcaaac 2700
 agacggagta gattttcttt ccaaacatat gaggttagga ttagcctgga gtctgccttg 2760
 gtcattctga gacaaaacaa gtcaatctgg tcttcaacca aagtgaggtt agaagaccaa 2820
 ctgatccttc taaataaaag caaaactaga gtaaactgaa agctttgtat gtagcttttc 2880
 gtaacatcaa ttgaattata aatagaaact gcccagtgta gtcgtagggg tgagagagag 2940
 agagagagag agagagtttt gaataagagt ctggttgagg atgccagcct ttcttatcag 3000
 ccatatgacc ttgggcttat tacttcatca ccgtgctctc atttctcat ctgcagaagg 3060
 aacgtggtaa ttcttacaga gttgccttaa ggaataagga ggcagtaatg tgcctgacct 3120
 tcctgactca tgctaggctc tagatggctg tgattaatat ttatgccacg gttacttata 3180
 aggtttacaa tgaatacaaa caacaaggtc atttaaaata tacatggctt gtctgacctc 3240

340
341

01997028500pc.ST25

ccttcctcag taaaagacct cttctctcaa ccaaaatgat aattttccaa ttatatattta	3300
acttatggca atagttatgg atgaactcag tggcattttc taactctaaa tagatattaa	3360
agccactcga aataggcttt ctggatgctt ttctctgtca gttcattttgt ctattgattt	3420
agattttctg tgtacttctt acacatgggtg atagctggaa caaaatccaa gacatttgta	3480
ttttgctggc tacttaattg cttcctatgt atgatcatgt cagtctagct agattacaaa	3540
cttcctgaga gataacaatt gtacattaaa tgtgtctttc ttgcttagaa tgctagtata	3600
atgttgggac tataggtaat taagttgttt atttaacttg tttttataat cagcatcatt	3660
atcaaaatag ctgatattta ctgagaagct tcaggtagcc tgtctggaga aaccctctcc	3720
aagaatcaga gtggtaaagt aagaacaaac ggtttagtga tccccgctc ttactccctg	3780
cttaatagat aaggaaattg gaattctgga agccccgtct ataacctgt cagtctttgt	3840
gctgaactga ctttggacat ctcttttaag aaaacccaaa atgtggatga aataattgca	3900
agagtagagt gggtttcagg aaatccagtg tcttttagtt tttagagtca tggcttctcc	3960
ccttttttat tgcaccgcct tattggtata aaatgctctt attataactt ctaacatatg	4020
tatactagat agtatctcac gtctgagtat aaaaccatgt acacaaaaga tgtgtacaca	4080
cacaagatgg aaagtctaaa agtttaatac agattttccc gtctaagtct attttgcttt	4140
agttaagttg ttaagrtgtc tataatatat taacattgat gcaaacataa tacagtaatt	4200
gaaatattgt ttctttgggtg ctgatctctt agtcacattc agagccctag tgatttgata	4260
ttatttgttt tatttcctta attttagctt aacattttat aatacagtaa cttgagattt	4320
atatttcta tttatcttgat ttatgatttt gactgtacca attgaaaatt accttcttgg	4380
acttgatgtt cacatataat ttcattgtct aaagcaatga atcttggcat catatatcta	4440
actacctact tgatatctaa taagcaacac aaaccacac cttcaaaagt tgtcatgggt	4500
~~cccccttacc~~ ~~tttcttctta~~ ~~ttagtctttc~~ gaatttgggt aattaactta atttttttca	4560
atgactgcag tcccaaactt tggagttatc tttcttttat tgcattgcct catgctagta	4620
ttcatgtcag gaactccagt tacttcttgc ttccttctcc atatagccta gcttgatctg	4680
aaagtcacag ttctcctgct tcaacctaaag tgctattaag acaggcgtgc atctctctgt	4740
tggaccctct gccagcacct tggtcagagc catgtgcttt ccagtttata gactccatcc	4800
agtcacatgcc taactgactt cattgctttt accttctggt ctcittggtt ttttttttt	4860
cctagcataa tagctggaaa aatcctttta aaggatcata gatcagtcct catgcttaaa	4920
aaaagtcttt tgagcacttt gctcccagga aaccaatgca ttctcagtac ccaaaacttt	4980
aatgtttggg ccttattttt aaccctgaag catttaacag catttaagtg attgtatttg	5040
taaattagcc ataattaatg ttacctttca gcatgtcgca gacattttga aacacttggt	5100
ctgattctg aaggcattcc atttattata catggcctgt gatttttcta tacattaaat	5160

01997028500pc.ST25

atttctggag ctaatgctgt tgttttaagt aaagggaaaa caaagataag cagaggtccc 5220
attatttttc ccacatgcaa cagatcatct tgggaaatga ttgatgggga tatggagact 5280
gctgtttgta gtgaactaga gaggaagaac ccagcttcat cacttgcctt gtgtgtcaaa 5340
ggaaaacgaa caggatgaga caccaaagtc ttggataaaa gacaccctcc aaaaagatct 5400
gctacctttc ttctcatgat taaatctatc attccatgac accattttta aaattaaaac 5460
aatgctgctc accaccctta ttcatgcttt ctttcccttt ttaagattta tttattatat 5520
gtatgtacac tgtagcaatc ttcagacgct ccagaagaag gcgtcagagc tcgttataga 5580
tggttgtgag ccaccaggta gttgctggga tttgaactca ggaccttgg aagagcattc 5640
agtgtcttta actgctgaac catctttgct gccctctctt catgctttct tttgtctctg 5700
tatacagcta aattcgtgtg tctaataac ctctgccac acatccttat tcacttgctt 5760
cctcatgtct tcctaaaact ctcatgtaag tcaaagttaa aggacagaac cagtcatctg 5820
tagagggaaa tgaagaagta tgtcagggtg acagggtgtct gtgtttgtgt gttgggagga 5880
ggggcatatt ttcgggaggg gtttgggggt tggaaaatag tttgcttcag aaactttaaa 5940
ctctaagtaa ttagtcaagc atgtagcagt ggtgccatca ttctgaccag ttcttctttt 6000
ccttcaacag ccaactgcca tcgagtcctg catggttaag tttggtgagt aacccatctc 6060
ccatggtttc ctttcatttt ccttagattc tgaggcaaga aggccagtgc cagtgccctc 6120
ggaaagcccg tgcatecttt agttcacttt cagtgattgt ttattacaat tactcacccc 6180
atacttgctg tctgccagc gagaactgag gctccagggc tgagcccgat tgacaagccc 6240
acaccagggtg acactcttgg caggcataga catcccacta acaagagcct tgtggatctg 6300
catacagcaa tcagctttta gtttggtagt ttattaagga ttttttcag attcctacaa 6360
ccttttgtca gagcatttct tatatttcat acatgtctag tgtctagtag agcatatggg 6420
aaccattact gctgttagta agtgcagaga agagaaggaa gaagcgcttc ctctttgctt 6480
ctgagtcact tttcgtgaca gtcacctgat attcgctcag aaaacatgga aaacagtgct 6540
gctgagtgtt ttagtttcat ttctgttgct tttataagat accctgtcaa aaaacaactt 6600
ttggagaaaa aggatttggt ttattcacia gtgcaaatta tagtcctca accgtggaga 6660
aatcatggcc acaggagttt gaagcatcta gtcacattca gtcaagagca gaggaaaacg 6720
aagtgcactt gcttattgct tgcttttttt taattggata ttttatttat ttacatttca 6780
aatgttattc ctttcccgga ttgcccaca gaaccccccc tttccatctc tctccccctg 6840
cttctatgag ggtgttcccc caccaccca catactcctg cctccctgac ctacactct 6900
cctacactga ggcatagagc cttcactgga ccaagggcct cttctcccat tgatgccga 6960
caaggccatc ctctgtaca tatgtagttg gagccatggg tccctccatg tgtactcctt 7020

01997028500pc.ST25

ggttagtggg	ttagaccctg	ggagctctgg	ttgggtcata	ctgttggtct	tgctatgggg	7080
ttgcaaacc	cttcagctct	ctcattactt	tctctaactc	ctccattggg	gacttcatga	7140
tcagttcaat	ggttggcttc	gagcatctgt	atttggttat	gtcaggctct	ggcagagcct	7200
ctcaggaggc	agttatgtca	ggctcctggt	agctcagttc	cttttctcta	cttctttaca	7260
gttcaggaca	tcttgccctag	ggaatggcac	caaccatagt	gggctggatt	ttcccatatc	7320
taataactta	attaaaatac	tctataagac	caacttgata	tagacaattc	tttcttgggg	7380
cctcttctct	ggtgactata	gattgtgtca	atttgacaag	gaaagctaac	taccataccg	7440
agtctcagaa	tatttcttag	agcacatgaa	aaatatcaag	tgtatacatt	tgtgattgct	7500
tgtaccacat	tttcatttga	cactagacaa	tttctttagt	tcagtttttc	actctcctat	7560
cttttgctcc	agtttttaaa	aatactttgg	tccccagagg	ttaggacagt	ttttgaatgt	7620
gtccccactct	gattttgtgt	tttgtttttt	cagtgaaaac	aagagagtat	ataatgtggt	7680
caaatttctc	cttaatgtga	taaaaatcaa	gtgtttttta	aaattccata	actggattaa	7740
ataggaaaaa	atagactttc	ccatggtgtg	ccaccaagaa	aaaaatgcag	agttcactgg	7800
agatgcagcg	agtttttggt	ttgcttataa	cactccattc	ctcttgctca	ttcctctatt	7860
ctcttccagc	atctacctcc	aagtcttatc	ctagttattt	tatgtgtgaa	tgagaatcta	7920
agtcagtctt	acctctttta	ggctatgccc	tctataacta	aagttatgga	gaattagaga	7980
aacattcaga	taactttgaa	tcaataaaaa	cacctgttgg	gggccttgaa	gttacatagc	8040
tgtacaaaac	cactaacatt	agggaaatat	ttcaatgtaa	tacacaggaa	aagaaatgac	8100
taaatttgta	cacatatccc	actttccatg	tggcaatatt	agacttagga	tagttacaat	8160
taaatacata	tatattaatt	aaattaattt	atagcagtaa	ataattggaa	ataagctaga	8220
taatgttatg	ttaagttgaa	agtgacacag	agaatcatat	tttagatata	aagcatcaaa	8280
atcagaaata	cagacctgtc	aatcaattta	gagctaatta	ctgatactga	gctgggaaga	8340
ttatttgaac	tcagcaattt	gagcccagac	agcaatacag	caagactccc	atatcaaaat	8400
aaaagaaaag	tttgttgagc	acacacaatt	ctgctagctt	atttaggtga	tgagaatata	8460
gcaattggaa	aaaatggaga	atacttatta	tcaaagacac	cacactcaag	tagatgtgag	8520
acactagaaa	aatggccaaa	ttaattgata	acatacttct	tgctaacacc	ttacatgaag	8580
aaaattacag	caatgcagag	cacggtagtc	agaggagaac	aatgctgagt	gttgattgtc	8640
tatgtaatgt	gttattggca	aagcaccata	gagtaaacag	tatttgaata	agaaagatat	8700
ggggacgcct	agattataag	cggttcttat	tctagtcttg	tgtgatttgt	ctctccattc	8760
cactcccttc	ctcattcata	ttacctgaga	tgagatacag	agttattaag	atctgaagcc	8820
tctcaaaaac	agagagatag	tttattctct	caatagattc	-gaaatatggg	ctgggaaaag	8880
tagtatatat	agtccaggta	aagaagccac	ctgaaggcag	taaaacatat	agaggatgga	8940

01997028500pc.ST25

```

atagtcatgg aaacatgatc tttttcttcc tctttttcaa tttcttatag aactatcatc 9000
ctcaaaatgg cacatgacat ctcccaaacc tcaactgtgtg aatacgacat ctgatgggaa 9060
gctgaagata ctgcagagtg gcacatattt aatctacggc caagtgattc ctgtggataa 9120
gaaatacata aaagacaatg ccccttcgt agtacagata tataaaaaga atgatgtcct 9180
acaaactcta atgaatgatt ttcaaactt gcctatagga ggggtttatg aactgcatgc 9240
tggagataac atatatctga agttcaactc taaagaccat attcagaaaa ctaacacata 9300
ctgggggatc atcttaatgc ctgatctacc attcatctct tagagattgg gtttggcttc 9360
ctcatcttct tctttgtatc ccgagatgct ggtgggtggg ttggaggggg atgattgatg 9420
gcaatgcaca cagtttgtga gggcttacia attgacacia tcagagcctc ttggcatata 9480
aaattttagc cctcatatct gtctgaagag gactcagcaa atgggccaat ccctaattgt 9540
gggtctgcaa atggacttgt acaatccatg ataaaaagga gtatgggcca cagaagacag 9600
aaactcttcc aaagaatgtc tttctaacct tgatccctgg gtagaatgag atcctgtttc 9660
catgggagtc ttacttggct tgcaaaaaag ggtgtagggc agtagcttgg ccttttttcc 9720
atcataattt ccttgagctg ttttacctta atccctcaa actctcacct tctgagagcc 9780
tcctaataaa acattgttag actggtgggg tggccaagac atgccaacia cacccttctt 9840
tagagggtgt gtttttagag gacagagaac attatgaagc ctagagcagc agagggtcaag 9900
atgccacgaa atggaattga tctgggaatt tttttttttt ttcattctca ggatgcagg 9960
tcattctgaa ctttccccta ggccttcatt gcttttgtgt gtatgtgtgc ataaattctg 10020
caaatagaaa aatgagagtt tgcaccagta ctactagat ttaacaccag aaagtgggtac 10080
ttttctggct gtattatgcc atgatagcac attttctgtt ggtgttccct aactgacaag 10140
tataacagtt ttcctaaacc acacaacaat gctatgatgt taatggggta gatatttttg 10200
gaaaaaaatt gcacagttag aacatgggta gatgaaccct aagactctta cctcaattca 10260
gaactcgcaa ggagttaagt gagtgggt 10289

```

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Mus musculus GITRL forward PCR primer

<400> 4
 atggaggaaa tgcctttgag ag 22

<210> 5
 <211> 25
 <212> DNA

342
343

01997028500pc.ST25

<213> Artificial

<220>

<223> Mus musculus GITRL reverse PCR primer

<400> 5

gaatggtaga tcaggcatta agatg

25

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Mus musculus GITRL forward PCR primer containing Sali site

<400> 6

tttaaagtcg acccaccatg gaggaaatgc ctttgagag

39

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Mus musculus GITRL reverse PCR primer containing EcoRI site

<400> 7

tttaaagaat tctcattaag agatgaatgg tagatcaggc at

42

<210> 8

<211> 534

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (534)

<400> 8

atg	tgt	ttg	agc	cac	ttg	gaa	aat	atg	cct	tta	agc	cat	tca	aga	act	48
Met	Cys	Leu	Ser	His	Leu	Glu	Asn	Met	Pro	Leu	Ser	His	Ser	Arg	Thr	
1				5					10					15		

caa	gga	gct	cag	aga	tca	tcc	tgg	aag	ctg	tgg	ctc	ttt	tgc	tca	ata	96
Gln	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Ser	Trp	Lys	Leu	Trp	Leu	Phe	Cys	Ser	Ile	
			20					25					30			

gtt	atg	ttg	cta	ttt	ctt	tgc	tcc	ttc	agt	tgg	cta	atc	ttt	att	ttt	144
Val	Met	Leu	Leu	Phe	Leu	Cys	Ser	Phe	Ser	Trp	Leu	Ile	Phe	Ile	Phe	
		35				40						45				

ctc	caa	tta	gag	act	gct	aag	gag	ccc	tgt	atg	gct	aag	ttt	gga	cca	192
Leu	Gln	Leu	Glu	Thr	Ala	Lys	Glu	Pro	Cys	Met	Ala	Lys	Phe	Gly	Pro	
	50					55					60					

tta	ccc	tca	aaa	tgg	caa	atg	gca	tct	tct	gaa	cct	cct	tgc	gtg	aat	240
Leu	Pro	Ser	Lys	Trp	Gln	Met	Ala	Ser	Ser	Glu	Pro	Pro	Cys	Val	Asn	
65					70					75				80		

01997028500pc.ST25

aag gtg tct gac tgg aag ctg gag ata ctt cag aat ggc tta tat tta 288
Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu
85 90 95

att tat ggc caa gtg gct ccc aat gca aac tac aat gat gta gct cct 336
Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro
100 105 110

ttt gag gtg cgg ctg tat aaa aac aaa gac atg ata caa act cta aca 384
Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr
115 120 125

aac aaa tct aaa atc caa aat gta gga ggg act tat gaa ttg cat gtt 432
Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val
130 135 140

ggg gac acc ata gac ttg ata ttc aac tct gag cat cag gtt cta aaa 480
Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys
145 150 155 160

aat aat aca tac tgg ggt atc att tta cta gca aat ccc caa ttc atc 528
Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile
165 170 175

tcc tag 534
Ser

<210> 9
<211> 177
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Cys Leu Ser His Leu Glu Asn Met Pro Leu Ser His Ser Arg Thr
1 5 10 15

Gln Gly Ala Gln Arg Ser Ser Trp Lys Leu Trp Leu Phe Cys Ser Ile
20 25 30

Val Met Leu Leu Phe Leu Cys Ser Phe Ser Trp Leu Ile Phe Ile Phe
35 40 45

Leu Gln Leu Glu Thr Ala Lys Glu Pro Cys Met Ala Lys Phe Gly Pro
50 55 60

Leu Pro Ser Lys Trp Gln Met Ala Ser Ser Glu Pro Pro Cys Val Asn
65 70 75 80

Lys Val Ser Asp Trp Lys Leu Glu Ile Leu Gln Asn Gly Leu Tyr Leu
85 90 95

Ile Tyr Gly Gln Val Ala Pro Asn Ala Asn Tyr Asn Asp Val Ala Pro
100 105 110

213
214

01997028500pc.ST25

Phe Glu Val Arg Leu Tyr Lys Asn Lys Asp Met Ile Gln Thr Leu Thr
115 120 125

Asn Lys Ser Lys Ile Gln Asn Val Gly Gly Thr Tyr Glu Leu His Val
130 135 140

Gly Asp Thr Ile Asp Leu Ile Phe Asn Ser Glu His Gln Val Leu Lys
145 150 155 160

Asn Asn Thr Tyr Trp Gly Ile Ile Leu Leu Ala Asn Pro Gln Phe Ile
165 170 175

Ser

<210> 10
<211> 10331
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 10
attaatctca aactttatatt tttcttataa aaagtgattt tcttatctag aaataatctg 60
gaataactttc ttagatgaga gcacaccact ttattctccc aagcctcctc tacacgtgca 120
ctgtactgcc gtttgattta ggaaagaaat ttttttcccc tctgaacttc cttgtgctt 180
ttttttttat gttctgagtt tgtgttggtt ttcagccttc cgttcctttt gttgtatttg 240
atctggtgcc aaatgagagt cagcacttaa gttataagta tcattttcta acacagtgc 300
agaaggaaaa ctccgccttc cacaccact actaattacc atattgctac aaaacatgac 360
attgcatcct tcacccatca cttgtgaatt ttgttttcc acagctctca tttctccaaa 420
aatgtgrrtg agccacttgg aaaatatgcc ttaagccat tcaagaactc aaggagctca 480
gagatcatcc tggaagctgt ggctcttttg ctcaatagtt atgttgctat ttctttgctc 540
cttcagttgg ctaatcttta tttttctcca attagaggta aggaggcaat tgtacctaag 600
gttactatatt gctataatcc tctatttatt tgtttttcta gttgttatca ttgtcactca 660
gtattgttag caatagttgg aaggaagaga tgtgtataca taatgtaaat acaattctaa 720
tattgtcatg acatggcgtt tgaagtttat cttaaagggtt tgagataaaa ggtatcagaa 780
aatgctaaat gttagctgca gaactctgtt agatagagag aactgggtta gccaattgac 840
aggggcctgt ggagtatttt tccttccctc tgctatagct cttggtggaa taaaaaagg 900
aaaaatatga atgaatatca aggaatggga tgcaagctat agtcttattt atggaaaaga 960
cttaaaaaaa tagtgaaaga caggattaag taaatgacag gtggtttgtg tgtctttgag 1020
gaggggaagt gccctgagct aggtgtaaga agatctggat tctggttctg ggtctcctaa 1080

01997028500pc.ST25

taaccagctg tataaatttg ataaagacat ttaatctctc tagtttgag cttctttatc	1140
taaaaaaact ggtggtaggg gaatggattt attatgatgt ttcttctagc tataaaatgt	1200
catgatcaag aattttattta agggtagtat gaagaataaa tgcctaagtc actcaaaagc	1260
agggacaat gacttttagat tgagttgatc aggggaagact tcatggagga atgagaaagc	1320
ccatatctat ttgggaagcc cctgatgctt gtcaggaatt tcccattgag atgcaggcca	1380
agctgtgggc ctagagaatg ggatggtaca ctgggaatgg agattagttt tgttctttac	1440
taaaaaatct ttcttcacag ttaactacgt agcactgatc aaaaagaaaa taagaaatgc	1500
tttatttatt tcaggattta gcctatttct ggctaaattt gaagactcta agttttgggg	1560
agaataaagt ggcatatgtc catctgagaa agagttgaaa tgtgactgca gaaacacttt	1620
tcttaaggga actgaccagc aaagatttca aagatatagt tctaccactt aagataagta	1680
aaagtaattg agaaaagatg caggaggaag cagtccccta ttgatattaa tttagagtag	1740
gtatagcttt ggccaatttt tccacagtag ccattaattt tgtattccat aactgtatac	1800
aaggcttatg tgcaacagag gcatttctaa ttacaaccct gctctctcaa gaaatgtatg	1860
aagcagaagt gtgaactttc tgggtcagtg aagttgaaag aaagaattgt cagaaattct	1920
tagtgtctag atttctgaag aagaggaagg gtgagaatag caataactta aatttggaag	1980
tgttctttc ttctaaaaat tataagatta attagccaga taaccctgaa gaacactgaa	2040
tataagcatc atcagttcct acatatgact caggaatgaa tacacagaag ctttcccaa	2100
aggcaccag cagttcttgc aaagggaaag agaaagtcta ataatgccag atcatctggg	2160
acacctctct tcagaatcaa actggattaa tcccatgtgt ttgagctctg attctggttt	2220
ctctctccta gatccagttt ctcaatgaaa tgttctacct cttaaagataa cccagagttt	2280
<u>gtttcaaatt tggggaagta taaaatgttt ttagaatatt gttctgacag gacacttgca</u>	<u>2340</u>
ggatttgttt ctatgggaaa agccagtggc ctggccaacc atacatgata ttagcttctg	2400
catttcactt tccacttacc tgtacttccc ttccctatt ggccacaaat aaatatctct	2460
ggaaaagaag tctgagaggc tggcagatag tgattcatta tgatgtggcc acttccacat	2520
tgtcacaata cccatgaacc gtgaagtgtt attttggctt ccactctagt ttttacatac	2580
aaagtccac tttccagatt gtctagacac tactttaaaa agtgtacact taaaagaaag	2640
tgtaacactt taaaaagtgt tagatgggaa gcttggctcc ttgggtcaat tttttcttt	2700
ttttctctct tctttgagaa aatatttaac taaaaggata gctgtgagtc caaggagttt	2760
ggtcaatccc tcagtgaaaa taatctcaca ggaattatca ctaagaaatc aaatgttcag	2820
cagagtctga acttcagcaa aatgaaggat actttcagaa ggggaagttg tacttatact	2880
taaaagcaga gcagatttta ttttactga tgatttgatt agggttggtt tggagagaga	2940

01997028500pc.ST25

atgattgttt	tggccatttt	gagccgaact	acgtaaatct	agccttaa	caagaagagg	3000
ttacaaaagc	aactgatcct	tctaagcaaa	aataacgaac	ccatatgtgt	ctttaaaagt	3060
gggtattttac	tactttccaaa	catcagcaga	attataaata	gaaacttacc	ccacagagtg	3120
gtagagggtga	gagtgttgac	ccagacaggc	tgggtgtaga	tctcattctt	gccttttatt	3180
ggctgcatga	ccttaggcta	gttactta	ccctctcatc	ctcatttcct	catctgcaaa	3240
atgagcaacc	taatttttgt	agagttgtgc	taaggattaa	tgagacagta	gagtatctga	3300
cataaagtag	ctcccagtag	aggggagtg	ttaatatitg	ccccattact	attaatgaga	3360
taataatggg	caaaaattta	acaagaccat	ttaacaatat	ggatagtctt	tgccctaccta	3420
tatcactctc	tcaatcaa	actatatctc	agagccaa	ttatgatttt	gcaattagat	3480
ggatttttag	tgggtggcaat	aattagagag	tatcacagtg	atggtctctg	tagcgctaaa	3540
tagacataaa	gcagcctgca	gtatattata	cggaatttct	gactctggaa	attagtttgg	3600
acttaggttg	tctatagctt	aggtttctct	gagcacatct	catacatgct	agtagatggt	3660
gcagatacta	tctgtggcac	gtattttggc	actcattcat	atttagattg	ttaccaaatt	3720
gctttgggtg	tgtaatcatg	tctttctaga	aagattataa	acttcttgag	aagcaaggac	3780
caaaaattac	atttgtttct	catgcttaca	atgctgtaca	atgttgga	tatggatgct	3840
taaattgtag	ttcaattctt	cattacaatc	accatcatca	cccaaacagc	taatatttat	3900
tgaacaggtc	caggcaggat	atctaggcaa	agcccttatt	aaaaacgacc	tcatttaacc	3960
ccaacaactt	caacaagcta	ggtgctatta	tttctcccat	tttatagatg	aggaaattgg	4020
ggttaagggg	gtctttgtca	cgtccctatc	atgggttgaa	ctaaattgaa	tttcaacatc	4080
tcctccagga	aacaccaaaa	tgaggatgaa	ataattgcaa	gaggccaggc	acagtggctc	4140
acgcctataa	tcccagcact	ttgggaggct	gaggcggtga	gattgcttga	ggtcaagagt	4200
ttgagaccag	cctgggcaac	atggcaaa	cctgtctcta	caaaaaata	caaaaaaat	4260
agctgggctt	ggtggcatgc	acctgtagtc	ccagctactc	agggggctga	cgtgggagaa	4320
ttggttgagt	ccaggaggat	gaggctgtag	tgaactgaga	taacaccact	gcactccagc	4380
ctgggcaacg	gaatgagacc	ctgtctcaaa	aaacaacaac	aacaacaaca	acaacaaaaa	4440
aaaacaagtg	tagggaatca	aaaaatttat	ttcctagaat	agtggctttc	agacttttta	4500
attgcacctc	cctttcaata	acatattatc	agtataattc	ccaacatttg	tatgctaatt	4560
attatactat	atacaagtac	taataatatg	tacactaaag	agatacacia	aatatatatt	4620
tataaggggtg	agccaaataa	tatattcaat	gtaactctca	caatgcaaaa	ccattttgct	4680
ttcaccaaaa	tgttatatatt	tctataatca	ttaatatgtc	ataaacatta	ctaaaataag	4740
taaaatattt	taataacgtg	gtgaatgcat	ttatttttatt	ttttaatctg	agcttaacac	4800
tatgtgatac	agcaatttga	agtttgatat	gttaattttac	cttgtttcat	gatttttgacc	4860

01997028500pc.ST25

atcatgactg aaaaattacc cgacaaacaa atatagatta aaatggaaga acacatcttt 4920
 ggatattctt atbatgtcat accacttaat tttcaatcca tcattcaatg atggaatgcct 4980
 ctctttcctt ccttccacaa ctaaattcca agatctatag ctttaacacc tccctcgcat 5040
 aaactcactc acttgcttct ctctatcttc attatactct aatgacaaaa gctcgactat 5100
 ggaaaacctc caatgctgat taaatccaac tgctctgtct ctttactgt tgaatatatc 5160
 tgaagaaaaa cataaaattt ttgaaaggc cttactttaa attcacagcc actgccttca 5220
 agtggatttc attgttgctc tggaaacagc ccatgtttcc ccagtccatt cactctcctc 5280
 tactggatga tttcatacct ttagcttctc ttcaaaccatc taataactct tccccattct 5340
 cactctccac tgataacgtt gcctccatat tttaagagaa aatagaagta cggaggaaag 5400
 aagttccaat atcaacaact cattggcatt tgtgtccagg tatactgtta ttctgtcttg 5460
 tcactatgga taaattgtcc atgcatctat ccaagccatc tatgaactaa atcttatcct 5520
 ctcttgccca ctcagggaca ttgctgcaac agttctctcc tcgctcttac atattatgcc 5580
 tcatccattt tacagaaaca tttccatcaa atggaaatag aaaaacgtgt tgtcatttct 5640
 ctcacattaa aacgtaacaa caacaacaac aacaacaaca acaaaaaacc tcttgatct 5700
 ctcacctca tccaaactcc actcattttt ttctgctctc cctacagcaa aattcctcca 5760
 acttctcttg tccatttac ccttaaattt attttaacta agcttctgcc ctcttcacat 5820
 atcacagaaa ctaattttgt caagaactcc agtgactacc atgttgctca atctatcagt 5880
 caattcactg tactcttctt acttgatcta tcaacagcat ttgacaccag ctgactcactc 5940
 gtccttcactg aaatactttc ttttcttggc ttcaaaccat cagactctcc tagtttcctt 6000
 tcagactcag cttttccttt ctattgtccc ttgcttgctc tttctcattc tccgacctct 6060
aaacatcaca acgccccagt gtctctctcc atctacaccc actaacatga tggcctcata 6120
 caatctcaca gcttaaaaca tcaactatga gcttaagact cttaaagtga tatcaccaga 6180
 gtccttaaa tttcagcctg cttgacacac ttacttggat ttataataag catcacaac 6240
 taatatgtcc acaaccaaac tcatcattgt tccctcccc atttattcct ctacatctt 6300
 atccatttta gtgaataaca actttatctt tccaattatg caggcctaaa atactggagt 6360
 catctttgtt tcttctcatt ccctacccca tatccatgtc aggaacttct gttggctcta 6420
 tttccaacc aagtatcacc atctacagag ctagcacctt ggtcagagac accatgctct 6480
 cttgcctaga tgaatgactg taatgatctc ttagctagtc tcactacatt tgcccttgcc 6540
 tctgtttaat ttgttcctag catagcagcc agagaaatcc tacaaaagga aagtgtgcaa 6600
 cacgtttaag ttcaaaaagt cttttaagca ctttgccatt aggaaaccaa taacctttgg 6660
 gtgatacaaa aaatgtttgt ggttatgcct gaatttacta caacgtattt ttgagcattt 6720

345
346

01997028500pc.S125

agcattaact acttgtgttt gtaaaattaa ccacacactg atggcatctt gtagcatgtg	6780
aactgccgta cattgcagta gtctgaaact tggaaactgtt tttcagggta tctcagatac	6840
tgtatatgac atgtagttat ctgaatatta tacatgggtg gtttcatcaa tctgagttgt	6900
aaatattttct agggccttaat ttactgtttt aaataaaata aacataaata gaagcttcac	6960
tattttcctt tcacatgcca acagatcacc ttgtgcagtc actggggtgt ggaaactgct	7020
attttgttga aaaactttta gagcccaagg ttgggggggg ggtccgatat caaatagttg	7080
tcctgtaggt atagattagg taatggaatg agatcttgac ctttgtctaa aagacctaaa	7140
aggggaagcta ggtaataaaa ggtaaggat ggagccactc aactttaaag ggaggctgag	7200
agggctgaga catggtgaag ggaaggattt tttttatggt tatagaacac tagtttgctt	7260
caggaattca aagctctaaa taaatcaatc aaaaaatta atgacactgt catcatccta	7320
atcaattcat cttttatttc cccaacagac tgctaaggag ccctgtatgg ctaagtttgg	7380
tgagtaacct atcttgcag tcttttactt tcttagttt ttgatgcaag aaggcaggtg	7440
tcagtgatct caagaaaacc tgtattttct tttattcatt tctgagctac tatgtataat	7500
tacttatcat gtactgggca gttgcccaag agctgaggct ttcagaggta aaccaggcaa	7560
aagaagccca tgccttgata aagcttatgt tgaaggctgc atctctggcc aggaatgagc	7620
atctctctta ctggcctatg aatctgagat ccgggaatct ccttttaatt ctgtgtttta	7680
ataaacacaa caagtttcag atttctacaa cttttcctta aagcttttct catgtttcac	7740
atattgctaa tgtccaatgg agtatgtgag agagtgccat tgttgtttct aaatgtatag	7800
aagagcaatg agagttggaa aagtggccac ttcctctact attttctctt ctaagcttag	7860
cttctgagtc attttccctt gtggtcacct gatatttget tagaaaacac accagtttac	7920
agttacactg agccttagat tcttagaata catggaaaat ttcagataaa tacatttttt	7980
ttaaagttgt ttataggttt caggccaaac atacattttc agttgagaac agaccatttc	8040
tagagttaac tctgcaacce ctgtgttctt atatagttta aaccagtagg tttccttggc	8100
ttgtgggaat tagaaaatgt ccttttgcct gtctcttctt ttgtgttttg tttttgtttt	8160
gcccataagt ggaatggaat gcatggcatg tgtgaaatta tgccttgatg tggtaaaagt	8220
tgagaaactc aagtgatgt aaggtggtct ttaaattgacc cccttcaca gaattaaatg	8280
ggagaaccaa tgacacttct tctggtgac ctgcctattg cctattacat gtcaaggaag	8340
aagaaattta ctgggctccg agctcattgg cgatactggg tggctttgtc ttttgttcta	8400
gtgatcgctc tttcattctc ctccagaatc taccttcaga gtcttatatt agtcattcat	8460
atgaatgagc attgaagtaa aaatgtracc tcttcagggt tgtttcttca tcaagttttc	8520
tttttaatta tgggacaaag gacaaaaatt atggagaatt gcagaacaga taagcattct	8580
gggtggtaaa agcacctccc ggggctgtga gatcacactg ctgtgcaaaa ccaagtaatg	8640

01997028500pc.ST25

```

ttaggcaaac atctaagttt catatgtgct aatgaaaatg aatgattagg tctttacctt 8700
ttctttacca tttgggacag tattgcaacta gggatcctta tatttaaata gtcaagttat 8760
ttctatttat aaactcataa atttacaatt agctattttt gggggattta tttaatgaat 8820
cctaagtagg tcttaaatga tatataccta caaactgagg agaacagcca taatttagac 8880
acaaagcacc taattcagga acatggaagt atcattcaat caataaatat ttatggaaca 8940
tctaccaggt accagggact ttttcaggtg ctgaaaatac aagaatgaac aaaatagaga 9000
tatatttgtc ctaaaaaatt ttacattcaa agtgatacaa gatggacaat aaacaaatga 9060
acaatttagt ttataacatc ctagacactg acacacttta tgaagaaaac tcaagcaagg 9120
taaaatgagg gaatgatagg agaacacttt ttaatatagc ataattaagg aaagccacac 9180
tgataaagtg ataaacagcc agtgggtattt acaccgaaaa tgcctggaaa ggcattggact 9240
gccaaccctg gttttcaaaa ttttggcttg tgatttcttt ctccattagt cttttcttct 9300
cctttctttt tcccacaaat attaatac acagagatgcg aagtcactta agtcattttt 9360
ctatttcaaa ttcttttctt tagaattctt gctccaagca agaaatactc tttggatttg 9420
caatttctct aaaacaagga gtagataggt acttaaaata gaaaaattct gcttgaagag 9480
aactagtgtg gatcaggtaa agaaacaaca tgtatgtggt aaataattaa ctacaatctg 9540
gaaaaggatg aaataatgaa ataactatgc tticatcttt tttatccttg tatatttctt 9600
ataggaccat taccctcaaa atggcaaatg gcatcttctg aacctccttg cgtgaataag 9660
gtgtctgact ggaagctgga gatacttcag aatggcttat atttaattta tggccaagtg 9720
gctcccaatg caaactacaa tgatgtagct ctttttgagg tgcggctgta taaaaacaaa 9780
gacatgatac aaactctaac aaacaaatct aaaatccaaa atgtaggagg gacttatgaa 9840
ttgcatgttg gggacacat agacttgata ttcaactctg agcatcaggt tctaaaaaat 9900
aatacatact ggggtatcat ttactagca aatccccaat tcatctccta gagacttgat 9960
ttgatctcct cattcccttc agcacatgta gaggtgccag tgggtggatt ggaggagaa 10020
gatattcaat ttctagagtt tgtctgtcta caaaaatcaa cacaaacaga actcctctgc 10080
acgtgaattt tcatctatca tgcctatctg aaagagactc aggggaagag ccaaagactt 10140
ttggttgat ctgcagagat acttcattaa tccatgataa aacaaatatg gatgacagag 10200
gacatgtgct tttcaaagaa tctttatcta attcttgaat tcatgagtgg aaaaatggag 10260
ttctattccc atggaagatt tacctggtat gcaaaaagga tctggggcag tagcctggct 10320
ttgttctcat a 10331

```

<210> 11
<211> 21
<212> PRT

3/18
342

01997028500pc.ST25

<213> Apis mellifera

<400> 11

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> synthesized PLP peptide

<400> 12

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/US2004/016381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/715 C12N15/11 C07K16/00 A01K67/00 A61K38/00
A61K39/00 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307885 retrieved from EBI Database accession no. AY234223 abstract	1-12
X	GURNEY A L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NEW MEMBER OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR FAMILY AND ITS RECEPTOR, A HUMAN ORTHOLOG OF MOUSE GITR" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, vol. 9, no. 2, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 215-218, XP000938588 ISSN: 0960-9822 the whole document	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☐ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2004

Date of mailing of the international search report

16/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/016381

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	SHIMIZU JUN ET AL: "Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cell through GITR breaks immunological self-tolerance" NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP,, GB, vol. 3, no. 2, 20 February 2002 (2002-02-20), pages 135-142, XP002247979 ISSN: 1529-2908 page 136, left-hand column, paragraph 2 - page 141	22-24, 27-50
X	MCHUGH R S ET AL: "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 16, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 311-323, XP002247980 ISSN: 1074-7613 page 320, paragraph 2 - page 321; figures 5,6	1-54
P,X	KIM J D ET AL: "Cloning and characterization of GITR ligand." GENES AND IMMUNITY, vol. 4, no. 8, December 2003 (2003-12), pages 564-569, XP002307882 ISSN: 1466-4879 the whole document	1-54
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307923 retrieved from EBI Database accession no. Q7TNY2 abstract	1-12
P,X	TONE MASAHIDE ET AL: "Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 25, 9 December 2003 (2003-12-09), pages 15059-15064, XP002307883 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-54
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307924 retrieved from EBI Database accession no. Q80Y62 abstract	1-12
-/-		

349
348

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/016381

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 21 and 21 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 20-46 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/016381

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P, X	JI HONG-BIN ET AL: "Cutting edge: The natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 172, no. 10, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 5823-5827, XP002307884 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-54

PATENT COOPERATION TREATY

35/30

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/US2004/016381

International filing date (day/month/year)
24.05.2004

Priority date (day/month/year)
23.05.2003

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K14/715, C12N15/11, C07K16/00, A01K67/00, A61K38/00, A61K39/00, G01N33/50

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

FILE NO. 1997-28500PCT
ATTORNEY JOP
DUE DATE 3/16/05
DOCKETED WMS 2/20/04

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220

3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx. 523656 epmu d
Fax +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Strobel, A

Telephone No +49 89 2399-7362



257
352

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/016381

Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

52
353

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/016381

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not been furnished:

- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).
- ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☒ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

Additional observations, if necessary

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2004/016381

353
354

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 20-46 (industrial applicability)

because

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 20-46 (industrial applicability)
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

357
355

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2004/016381

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	2,3,6-8,12-14,17-26,33-35,40-43,46-54
	No: Claims	1,4,5,9-11,15,16,27-32,36-39,44,45
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-54
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-19,47-54
	No: Claims	20-46

2. Citations and explanations

see separate sheet

355
356

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/016381

Re Item II

Priority

The validity of the claimed priority could not be checked. Hence, the relevance of the cited intermediate documents could not be assessed.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 20-46 are directed towards diagnostic/therapeutic methods for the treatment of the human or animal body. These claims have not been searched. According to Rule 66 1(e) PCT, claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

- D1 DATABASE EMBL [Online] EBI; XP002307885 retrieved from EBI Database accession no. AY234223
- D2 GURNEY A L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NEW MEMBER OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR FAMILY AND ITS RECEPTOR, A HUMAN ORTHOLOG OF MOUSE GITR" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE., GB, vol. 9, no. 2, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 215-218, XP000938588 ISSN: 0960-9822
- D3 SHIMIZU JUN ET AL: "Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cell through GITR breaks immunological self-tolerance" NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP., GB, vol. 3, no. 2, 20 February 2002 (2002-02-20), pages 135-142, XP002247979 ISSN: 1529-2908
- D4: MCHUGH R S ET AL: "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 16, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 311-323, XP002247980 ISSN: 1074-7613
- D5: KIM J D ET AL: "Cloning and characterization of GITR ligand." GENES AND IMMUNITY, vol. 4, no. 8, December 2003 (2003-12), pages 564-569,

3876
357

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/US2004/016381

XP002307882 ISSN: 1466-4879

D6: TONE MASAHIDE ET AL: "Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 25, 9 December 2003 (2003-12-09), pages 15059-15064, XP002307883 ISSN: 0027-8424

D7: JI HONG-BIN ET AL: "Cutting edge: The natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 172, no. 10, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 5823-5827, XP002307884 ISSN: 0022-1767

1. Novelty (Article 33(2) PCT)

D1 discloses a murine cDNA coding for the murine GLTR protein. Said sequence is 100% identical to SEQ ID No:1 in a 521 nucleotide overlap, SEQ ID No:1 having a length of 522 nucleotides. The last codon of SEQ ID No:1 is TAA (Stop), whereas the corresponding codon of D1 is TAG (also stop). This means that D1, although comprising a nucleotide sequence differing in one position from SEQ ID No:1, discloses implicitly SEQ ID No:1. D1 is thus regarded as novelty destroying for claims 1, 4, 5 and 9-11.

D3 discloses an agonistic monoclonal anti-GITR ab directed against murine GITR (D3, page 135, right-hand column, second paragraph, page 136, left-hand column, second paragraph to 138, left-hand column, first paragraph; page 141, left-hand column, third paragraph). D3 thus takes away the novelty of claims 15, 16, 27-32, 36-39, 44, and 45.

2. Inventive step (Article 33(3) PCT)

The additional features of the present claims 2, 3, 6-8, 12-15, 17-27, 33-35, 40-43, 46-54 are in view of D1-D4 either trivial or conventional in the art or within the competence of a skilled man seeking to improve the prior art processes mentioned in the search report and in the present opinion, so that the subject-matter of said claims also lacks an inventive step (Article 33(3) PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

357 358

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 01997.028500	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/016381	International filing date (day/month/year) 24/05/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 23/05/2003
Applicant WYETH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 07 sheets

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regards to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/016381

359

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/016381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/715 C12N15/11 C07K16/00 A01K67/00 A61K38/00
A61K39/00 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307885 retrieved from EBI Database accession no. AY234223 abstract	1-12
X	GURNEY A L ET AL: "IDENTIFICATION OF A NEW MEMBER OF THE TUMOR NECROSIS FACTOR FAMILY AND ITS RECEPTOR, A HUMAN ORTHOLOG OF MOUSE GITR" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE,, GB, vol. 9, no. 2, 25 February 1999 (1999-02-25), pages 215-218, XP000938588 ISSN: 0960-9822 the whole document	1-12
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☐ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2004

Date of mailing of the international search report

16/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fac (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Strobel, A

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	SHIMIZU JUN ET AL: "Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cell through GITR breaks immunological self-tolerance" NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP,, GB, vol. 3, no. 2, 20 February 2002 (2002-02-20), pages 135-142, XP002247979 ISSN: 1529-2908 page 136, left-hand column, paragraph 2 - page 141	22-24, 27-50
X	MCHUGH R S ET AL: "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor" IMMUNITY, CELL PRESS, US, vol. 16, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 311-323, XP002247980 ISSN: 1074-7613 page 320, paragraph 2 - page 321; figures 5,6	1-54
P,X	KIM J D ET AL: "Cloning and characterization of GITR ligand." GENES AND IMMUNITY, vol. 4, no. 8, December 2003 (2003-12), pages 564-569, XP002307882 ISSN: 1466-4879 the whole document	1-54
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307923 retrieved from EBI Database accession no. Q7TNY2 abstract	1-12
P,X	TONE MASAhide ET AL: "Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 100, no. 25, 9 December 2003 (2003-12-09), pages 15059-15064, XP002307883 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-54
P,X	-& DATABASE EMBL 'Online! EBI; XP002307924 retrieved from EBI Database accession no. Q80YG2 abstract	1-12
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/016381

361
362

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
P,X	JI HONG-BIN ET AL: "Cutting edge: The natural ligand for glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein abrogates regulatory T cell suppression" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 172, no. 10, 15 May 2004 (2004-05-15), pages 5823-5827, XP002307884 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-54

363
367

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 21 and 21 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 20-46 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/016381

364

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

365/363

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 85118453 88888888
Fecha (AMD): 2005-11-22 17:56:32
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 87,640
FECHA : NOVIEMBRE 15 DE 2005

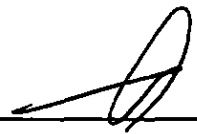
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	27496710	15/11/2005	56,100,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo K662-891-001-2

366 2/6

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 85110453 88888888 Folios: 365
Fecha (AMD): 2005-11-22 17:56:32
Trámite : 811 PCT-PATENT 378 FASE MACI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable:

Fecha:

[Firma]
Nov. 22 de 2005

367
367

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	5 118453
	Solicitud internacional	US2004/016381
	Fecha inicio fase nacional	23/12/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	736

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT); regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 27 ENE 2006
adpa11

270108