



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **334266**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20044857	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.04.09 PCT/US2003/11350
(22)	Inng.dag	2004.11.08	(85)	Videreføringsdag	2004.11.08
(24)	Løpedag	2003.04.09	(30)	Prioritet	2002.04.09, US, 371611
(41)	Alm.tilgj	2005.01.07			
(45)	Meddelt	2014.01.27			
(73)	Innehaver	Biogen Idec MA Inc, 14 Cambridge Center, US-MA02142 CAMBRIDGE, USA Linda Burkly, 34 Winthrop Street, US-MA02465 WEST NEWTON, USA Aniela Jakubowski, 151 Mystic Street #41, US-MA02474 ARLINGTON, USA Timothy Zheng, 221 Massachusetts Avenue, Apt 1105, US-MA02155 BOSTON, USA Kyungmin Hahm, 2360 Commonwealth Avenue #2-3, US-MA02466 AUBURNDALE, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Anvendelse av TWEAK-antagonist for fremstilling av et medikament			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0145730 A2 WO 0042073 A1 WO 0185193 A2			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet fremgangsmåter og substanser for å behandle TWEAK-relaterte tilstander, innbefattende hjerte, lever, nyre, lunge, adipos, skjelett, muskel, nerve, ben og brusktilstander. Det er også beskrevet fremgangsmåter for å identifisere TWEAK-agonister eller antagonister til behandling av TWEAK-relaterte tilstander. I tillegg er det beskrevet transgene dyr som uttrykker et eksogent DNA som koder for et TWEAK-polypeptid, eller fragmenter, analoger, eller muteiner derav, samt fremgangsmåter for å bruke slike dyr til å identifisere TWEAK-agonister eller antagonister. Det er videre beskrevet fremgangsmåter for å diagnostisere en sykdom basert på TWEAK-ekspresjon. Det er også beskrevet fremgangsmåter for å påvirke cellulær differensiering av progenitorceller ved å bruke TWEAK-polypeptider, agonister, eller antagonister.

Teknisk område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår behandling av TWEAK-relaterte tilstander, innbefattende hjerte, lever, nyre, lunge, adipose, skjelett, muskel, nerve, ben, brusk, hud, magetarm, pankreatiske, reproduksjonsorgan og bindevevssykdommer. Nærmere bestemt angår oppfinnelsen anvendelse av TWEAK-antagonist for fremstilling av et medikament til behandling av en nyretilstand hos et individ, hvor nyretilstanden er valgt fra (a) primær glomerulær sykdom, (b) tubulær sykdom, (c) tubulointerstitiell sykdom, (d) nyresyndrom, (e) nefrolitiasis, (f) infeksjon i urinveiene, (g) obstruksjon i urinveiene og (h) fibrose.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Medlemmer av tumornekrosefaktor (TNF)-familien av ligander, betegnet slik for deres strukturelle likhet med TNF- α , er nøkkelkomponenter i diverse prosesser, så som inflammatoriske responser, cellulær immunitet og apoptose. TNF-ligander kan virke lokalt som type II membranbundede proteiner via direkte celle til celle kontakt eller som utskilte proteiner som har autokrine, parakrine eller endokrine funksjoner. TNF-familiemedlemmer binder TNF-reseptor (TNF-R) familiemedlemmer via sitt C-terminale ekstracellulære domene. Forskjellige TNF-familiemedlemmer innbefatter TNF, lymfotoksiner (LT), Fas, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX-40, TRAMP, CAR-1, TRAIL, GITR, HVEM, osteoprotegrin, NGF, TRAIL, Kay (BAFF), APRIL og TWEAK (TNF-tilhørighet og svak egenskap til å indusere celledød).

Et definerende trekk for denne familie av cytokinreseptorer er funnet i det cysteinrike ekstracellulære domene, initialt funnet ved molekylær kloning av to distinkte TNF-reseptorer. Denne familie gener koder for glykoproteiner som er karakteristiske for type I transmembranproteiner som har et ekstracellulært ligandbindende domene, et enkelt membran gjennomtrengende område og et cytoplasmisk område involvert i aktivering av cellulære funksjoner. Det cysteinrike ligandbindende område oppviser et tett knyttet disulfidbundet kjerneområde, som avhenger av det spesielle familiemedlem, er gjentatt flere ganger. De fleste reseptorer har fire domener, selv om det kan være så få som ett, eller som mange som seks.

TNF-familiemedlemmer spiller en rolle i reguleringen av immunsystemet, kontrollering av celleoverlevelse og differensiering, så vel som akutte vertsforsvarssystemet, så som inflammasjon. Fortsatt arbeid innen faget til å

manipulere medlemmer av TNF-familien for terapeutisk nytte kan gi enestående muligheter til å kontrollere sykdom. For eksempel kan enkelte av ligander av denne familie direkte indusere apoptotisk død hos mange transformerte celler, for eksempel LT, TNF, Fas-ligand og TRAIL. Fas og muligens TNF og CD30-reseptor-aktivering kan indusere celledød i ikke-transformerte lymfocytter som kan oppvise en immunoregulatorisk funksjon.

Egenskapen å indusere programmert celledød er et viktig og velstudert trekk hos flere medlemmer av TNF-familien. Fas-mediert apoptose synes å spille en rolle i reguleringen av autoreaktive lymfocytter i periferien og eventuelt tymus. I tillegg har TNF og CD30-systemene vært implikert i overlevelsen av T-celler og storcellede anaplastiske lymfomlinjer. Død i denne cellelinje som svar på TNF, Fas eller LT- β reseptorsignalisering har trekk som ligner apoptose.

TNF-familien av ligander kan bli kategorisert i tre grupper basert på sin egenskap å indusere celledød. Først kan TNF, Fas-ligand og TRAIL effektivt indusere celledød i mange linjer og deres reseptorer har mest sannsynlige gode kanoniske dødsdomener. Sannsynligvis vil liganden til DR-3 (TRAMP/WSL-1) også falle inn under denne kategori. Derneft finnes de ligander så som TWEAK, CD30-ligand, og LT α 2, som setter i gang et svakere dødssignal begrenset til et par celler. Studier i disse systemer har antydnet at en separat svakere dødssignaliserende mekanisme eksisterer. Til sist finnes det de medlemmer som ikke effektivt kan avlevere et dødssignal. Sannsynligvis kan alle grupper oppvise antiproliferative effekter på enkelte celletyper samtidig med induksjon av celledifferensiering, for eksempel CD40.

Generelt blir død satt i gang etter aggregeringen av dødsdomener som ligger på den cytoplasmiske side av TNF-reseptorene. Dødsdomenet delegerer sammen-setningen av forskjellige signaltransduksjonskomponenter som fører til aktivering av kaspasekaskaden. Enkelte reseptorer mangler kanoniske dødsdomener, for eksempel LT β -reseptor og CD30, men kan likevel indusere celledød, om enn svakere. Motsatt er signalisering via andre veier så som CD40 nødvendig for å opprettholde celleoverlevelse. Det forblir et behov å ytterligere identifisere og karakterisere funksjonene av TNF-familiemedlemmene for derved å lette utviklingen av nye behandlinger for TNF-familierelaterte sykdommer.

TWEAK ble isolert i et søk for RNA som hybridiserte til en erythropoietinprobe. Chicheportiche *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:32401-32410 (1997). Muspeptider og de

humane peptider har en uvanlig høy grad av konservering, innbefattende 93 % aminosyre identitet i det reseptorbindende domene. TWEAK, som er vist å bli effektivt utskilt fra celler, blir i stor grad uttrykt i mange vev, innbefattende hjerte, hjerne, placenta, lunge, lever, skjelettmuskel, nyre, pankreas, milt, lymfeknuter, tymus, blindtarm og periferiblodlymfocytter.

En kjent TWEAK-reseptor er Fn14, et vekstregulert umiddelbart-tidlig responsgen som minsker cellulær adhesjon til den ekstracellulære matrise og reduserer serumstimulert vekst og migrering (Meighan-Mantha *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:33166-33176 (1999)). Fn14 har blitt vist å bli induisert av FGF, kalveserum og forbolesterbehandling og blir uttrykt ved relativt høye nivåer i hjerte, nyre, lunge, hud, skjelettmuskel, ovarie, og pankreasvev, så vel som i hepatocellulære karsinommoduler og andre kreftcellelinjer, og ved lavere nivåer i normalt levervev.

TWEAK har blitt implikert i mange biologiske prosesser. For eksempel ble HT29-celler behandlet med IFN- γ og TWEAK vist å undergå apoptose; selv om TWEAKS egenskap å indusere apoptose er svakt og kun et lite antall celletyper er mottagelige. Chicheportiche *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:32401-32410 (1997). I motsetning til dette, har TWEAK også blitt vist å indusere angiogenese og proliferasjon av endoteliale celler i en VEGF-uavhengig reaksjonsvei. Lynch *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274:8455-8459 (1999). Astrocytter blir spesifikt bundet og stimulert av TWEAK. TWEAK kan infiltrere en betent hjerne for å påvirke astrocyttoppførsel. Astrocytter utsatt for TWEAK skiller ut høye nivåer av IL-6 og IL-8, samt oppregulerer ICAM-1-ekspresjon. Saas *et al.*, *GLIA* 32:102-107 (2000).

TWEAK har også blitt implikert i immunsystemregulering. Ved stimulering med IFN- γ , uttrykker monocytter raskt TWEAK, og anti-TWEAK-antistoff inhiberte delvis deres cytotoksiske aktivitet mot humane skjellede karsinomceller. En kombinasjon av anti-TWEAK og anti-TRAIL antistoff inhiberte nesten fullstendig cytotoksitet. Nakayama *et al.*, *J. Exp. Med.* 192:1373-1379 (2000). I motsetning til dette forsvant TWEAK mRNA raskt i mus behandlet med lipopolysakkarid (LPS), som er et induksjonsmiddel for immuninflammatoriske responser. Videre ble TWEAK mRNA også redusert i autoimmunhemolytisk anemi og systemisk lupus erytematosus i musemodeller. Disse data antyder at nedreguleringen av TWEAK-ekspresjon er en viktig hendelse i akutt og kronisk inflammasjon. Chicheportiche *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279:162-165 (2000).

For tiden mangler faget en fullstendig forståelse av hvilke tilstander eller sykdommer som er relatert til TWEAK-ekspresjon og funksjon, innbefattende rollen av TWEAK i både inflammatoriske og ikke-inflammatoriske tilstander.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår en anvendelse av TWEAK-antagonist for fremstilling av et medikament til behandling av en nyretilstand hos et individ, hvor nyretilstanden er valgt fra (a) primær glomerulær sykdom, (b) tubulær sykdom, (c) tubulointerstitiell sykdom, (d) nyresyndrom, (e) nefrolitiasis, (f) infeksjon i urinveiene, (g) obstruksjon i urinveiene og (h) fibrose, som angitt i krav 1. Det vises også til de uselvstendige anvendelseskravene 2-11.

Den foreliggende oppfinneslen angår rollen til TWEAK i å forverre alvorligheten og progresjonen av forskjellige patologiske tilstander, innbefattende sykdommer hos flere vevs- og organsystemer. Slike patologiske tilstander innbefatter akutt hjertesvikt, kronisk hjertesvikt, ikke-inflammatorisk dilatert kardiomyopati, kongestiv hjertesvikt, leverepitelial celle hyperplasi, hepatocyttdød, leverfibrose, hepatocyttevakuolering, andre leverskader, galleledersykdommer, innbefattende gallelederhyperplasi, inflammatoriske nyresykdommer, så som multifokal inflammasjon, ikke-inflammatoriske nyresykdommer så som tubulær nefropati, tubulær hyperplasi, glomerulære cyster, glomerulær nefropati, Alport Syndrom, tubulær nyrevakuolering, hyaline nyreavskallinger, nyrefibrose og inflammatorisk lungesykdom. Foreliggende oppfinnelse etablerer en faktisk sammenheng mellom TWEAK-molekylet og visse sykdommer hos hjertet, lever, nyre og lunger. Oppfinnelsen som er beskrevet heri etablerer også en tilknytning mellom TWEAK og oppførselen av progenitorceller for levervev, nyretubuler, hudceller, adipocytter, skjelettmuskel, brusk og ben, så vel som bindevevscelletyper, så som stromalceller i benmargen og fibroblaster.

I en utførelsesform angår oppfinnelsen behandling av TWEAK-relaterte tilstander, det vil si sykdommer, oppsett av skade eller andre patologiske tilstander hos vev, hvor en reseptor for TWEAK, for eksempel FN14 blir uttrykt. Disse tilstander innbefatter fibrose, kardiomyopati, og sykdommer hos nyre, lunge, lever, hud, skjelettmuskel, lipidmetabolisme (for eksempel fedme), magetarmkanalen, pankreas, reproduksjonsorganer, nervevev (innbefattende neurodegenerering), brusk, ben og bindevev. I en foretrukket utførelsesform er de TWEAK-relaterte tilstander ikke-inflammatoriske av natur. I en annen foretrukket utførelsesform

angår oppfinnelsen behandling av TWEAK-relaterte tilstander ved å interfare med interaksjonen mellom TWEAK-polypeptidet med dets cellereseptor.

I andre utførelsesformer angår oppfinnelsen TWEAK-agonister eller antagonister og farmasøytiske sammensetninger omfattende slike for anvendelse ved behandling av TWEAK-relaterte tilstander. Slike TWEAK-agonister eller antagonister (det vil si inhibitorer) kan være anti-TWEAK-antistoff, eller derivater derav; anti-TWEAK-reseptorantistoff, eller derivater derav; TWEAK-polypeptidfragmenter; TWEAK-polypeptidanaloger; TWEAK-muteiner; TWEAK-hermere; TWEAK-fusjonsproteiner; TWEAK-reseptorpolypeptidfragmenter; TWEAK-reseptorpolypeptidanaloger; TWEAK-reseptormuteiner; TWEAK-reseptorhermere; TWEAK-reseptorfusjonsproteiner; organiske forbindelser; og uorganiske forbindelser.

I andre utførelsesformer angår oppfinnelsen TWEAK-agonister eller antagonister og farmasøytiske sammensetninger som er anvendelige til å behandle vertsorgansimer som har behov for vevsregenerering eller erstatning. Det angår også anvendelsen av TWEAK-agonister eller antagonister for å modulere oppførselen av populasjoner av progenitorceller *in vivo* eller *in vitro*. Progenitorcellene kan være prekursorer for levercelletyper, nyretubuler, kardiomyocytter, lungecelletyper, hudcelletyper, skjelettmuskelcelletyper, adipocytter, gastrointestinale celletyper, pankreatiske celletyper, nervevevscelletyper, brusk og bencelletyper, bindevevscelletyper, innbefattende stromalceller i benmarg og fibroblaster. TWEAK-agonister eller antagonister og farmasøytiske sammensetninger omfattende disse kan bli administrert *in vivo* for å fremme vevsregenerering og erstatning i tilstander av sykdom eller vevsskade, innbefattende, men ikke begrenset til toksin, viral, kemoterapi eller strålingsindusert skade, og genetiske eller degenerative lidelser. I en annen utførelsesform kan TWEAK-agonister eller antagonister og farmasøytiske sammensetninger derav bli brukt i kombinasjon med celleterapi med stamceller eller progenitorceller for å regenerere vev og organsystemer. I enda en annen utførelsesform kan stamceller eller progenitorcellepopulasjoner bli utvidet *in vitro* med TWEAK-agonister eller antagonister og farmasøytiske sammensetninger derav. Progenitorcellepopulasjoner utvidet via anvendelsen av TWEAK-agonister eller antagonister kan bli brukt for transplantasjon i vertsorganismer i behov for vevsregenerering eller erstatning.

I andre utførelsesformer tilveiebringes identifisering av TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige som terapeutiske midler til behandling av TWEAK-relaterte tilstander. I en annen utførelsesform tilveiebringes transgene dyr som

uttrykker eksogene DNA som koder for TWEAK-polypeptider. I en ytterligere utførelsesform anvendes TWEAK som en molekylmarkør for sykdom.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1: Rollen av TWEAK i dilatert kardiomyopati er vist.

- A. En FL-TWEAK transgen (Tg)-mus viser trombose av høyre atrium og ventrikkel, så vel som alvorlig utvidelse.
- B. Normalt hjerte er vist for sammenligning.

Figur 2: TWEAK-overekspresjon i hjertet inducerer hjerteremodulering. Et tverrsnitt av hjertet er betraktet ved 10 ganger forstørrelse med hematoksylin/eosinfarging på dag 20 etter infeksjon av voksne C57BL/6-mus med en adenoviral vektor omfattende murin sTWEAK DNA sammenlignet med en adenovirus-GFP kontrollkonstruksjon.

Figur 3: TWEAK inducerer gallekanal og ovalcellehyperplasi, som vist i FL-TWEAK transgene (Tg)-mus sammenlignet med ikke-transgene (NTg) dyr fra samme kull ved 2 ukers alder og 7 måneders alder.

Figur 4: TWEAK inducerer gallekanal og ovalcellehyperplasi, som vist ved øket farging med A6 mAb som er spesifikk for en biliær epitelial og ovalcellemarkør i FL-TWEAK transgene (Tg) mus i forhold til ikke-transgene (NTg) dyr fra samme kull.

Figur 5: TWEAK inducerer ovalcellehyperplasi som vist ved tilstedeværelsen av store, ovale celler i portal området av FL-TWEAK transgene (Tg) mus.

Figur 6: TWEAK forårsaker hepatocellulær vakuolisering i FL-TWEAK transgene (Tg) mus i forhold til ikke-transgene (NTg) dyr fra samme kull.

Figur 7: Serum TWEAK-nivåer i mus infisert med en adenoviral vektor omfattende murint sTWEAK DNA.

Figur 8: TWEAK-overekspresjon i lever inducerer hepatocyttdød og ductal hyperplasi. Tverrsnitt av leveren blir betraktet ved 20 ganger forstørrelse med hematoksylin/eosinfarging på dag 3 og 11 etter infeksjon av voksne C57BL/6 mus med en adenoviral vektor omfattende murin sTWEAK DNA i forhold til en adenovirus GFP kontrollkonstruksjon.

Figur 9: TWEAK-reseptoren Fn14 blir induisert etter CCl₄ induisert leverskade hos mus. *In situ* hybridisering for Fn14 mRNA i normal muselever og CCl₄ induisert leverskade viser liten om noen påviselig ekspresjon i normal voksenlever og markert induksjon av Fn14-ekspresjon etter skade. Hemotoksylin og eosin (H&E) fargede snitt viser den tilsvarende normale friske lever og CCl₄ skadet levervev.

Figur 10: Fn14-ekspresjon blir oppregulert i biliære epitelialceller i en murinmodell av gallelederligering, som vist med øket farging med anti-sens mRNA-proben rettet mot Fn14 ved å bruke *in situ* hybridisering. Hemotoksylin og eosin (H&E) fargede snitt viser det tilsvarende område i lysfeltnmikroskopi.

Figur 11: Tverrsnitt av FL-TWEAK transgen (Tg) musenyre i forhold til ikke-transgen (NTg) musenyre ved 2 uker, 8 uker og 7 måneders alder. Resultatene viser tubulær basofili i TWEAK Tg-nyren ved 8 uker og 7 måneders alder, og dilatering av urinrommet i glomeruli, det vil si glomerulære cyster, med tilstøttende basofili tubuler ved 7 måneders alder.

Figur 12: Tverrsnitt av FL-TWEAK transgen (Tg) musenyre med H&E-farging.

- A. Glomerulær nefropati med basofilia av tilstøttende proksimal tubulært epitelium er vist.
- B. Segmental mesangial hypercellularitet, hypertrofi av kapsulært epitel og kapsulær fortykning.

Figur 13: Serielle snitt fra to FL-TWEAK transgene (Tg) musenyrer farget med H&E (topp) og prolifererende cellekjerneantigen (PCNA) (bunn). Basofilitubuler tilsvarer tubuler som uttrykker PCNA, det vil si prolifererende tubuler.

Figur 14: Serielle snitt fra en FL-TWEAK transgen (Tg) musenyre farget med H&E, et lektin fra T. Purpureas (en markør for proksimale tubuler) og et lektin fra A. Hypogaea (en markør for distale tubuler). Resultater viser at de basofilitubuler ikke uttrykker noen epitelial markør.

Figur 15: TWEAK-overekspresjon i nyren induserer tubulær hyperplasi og glomerulopati. Et tverrsnitt av nyren er betraktet ved 20 ganger og 40 ganger forstørrelse med hematoksylin/eosinfarging på dag 11 etter infeksjon av voksne C57BL/6 mus med en adenoviral vektor omfattende murint sTWEAK DNA sammenlignet med en adenovirus-GFP kontrollkonstruksjon.

Figur 16: TWEAK mRNA blir bredt uttrykt gjennom nyren i en voksen villtype mus. Et tverrsnitt av nyre er betraktet ved 5 ganger forstørrelse med hematoksylinfarging, eller under mørkfeltmikroskopi etter *in situ* hybridisering med sens eller antisens TWEAK-prober.

Figur 17: Fn14 mRNA blir uttrykt i de proksimale tubuler av yttermedulla i voksen villtype musenyre. Et tverrsnitt av nyre blir betraktet ved 5 ganger forstørrelse med hematoksylinfarging, eller under mørkfeltmikroskopi etter *in situ* hybridisering med sens eller antisens Fn14-prober.

Figur 18: En rolle for TWEAK i nyrefibrose er antydning ved oppreguleringen av Fn14 mRNA i Alports-nyrer. Graden av økning i Fn14 mRNA-nivåer er vist i to individuelle mus som bærer mutasjonen som fører til Alports sykdom i forhold til villtype dyr ved 4, 5, 6, og 7 ukers alder. mRNA-nivåer ble bestemt med hybridisering til en genstykkeinnholdende nukleotidsekvens tilsvarende en del av Fn14-genet. Ved 4 og 7 ukers tidspunkter, er replikate resultater for hver av de to mus vist (indikert henholdsvis med musen 1 gjentatt og musen 2 gjentatt søyler). Ved uke 7-tidspunktet er Fn14 mRNA vist å være redusert i to situasjoner hvor sykdom er inhibert, det vil si sTGFβR-Fc-behandling og i VLA-1 utslagningsmus (illustrert i figur 18 med hver av de to uavhengige mus behandlet med sTGFβR-Fc ("sTGFβR-behandlet") eller de to uavhengige Alport/VLA-1 KO-mus ("Alport/VLA-1 KO").

Figur 19: TWEAK-antagonistbehandling i unilateral ureteral obstruksjon (UUO), en murin modell av nyrefibrose, reduserte i vesentlig grad nyrefibrose. Metamorfmengebestemmelse av blåfargede område (fibrotisk område) på Trikrom-Masson fargede parafinnyresnitt indikerer at kollageninnhold var minsket i AB.G11 (anti-TWEAK monoklonalt Ab) behandlede nyreprøver til lignende nivåer observert i sTGF-βR-Ig positive kontrollprøver. I motsetning til dette viste isotypekontroll hamsterantistoff (HA4/8) behandlede nyrer ingen reduksjon i nyrefibrose lignende vehikkel (PBS)-behandlede nyrer.

Figur 20: TWEAK-transgenet forårsaker granulomatøs og lymfocytisk inflammasjon i lungen.

- A. Et tverrsnitt av en lunge fra en FL-TWEAK transgen (Tg) mus med H&E-farging.
- B. Et tverrsnitt av en lunge fra en sTWEAK Tg-mus med H&E farging.

Figur 21: TWEAK mRNA blir uttrykt i cellene som kler bronkiolene og alveolene i voksen villtype muselunge. Et tverrsnitt av lunge blir betraktet ved 10 ganger forstørrelse med hematoksylinfarging, eller under mørkfeltmikroskopi etter *in situ* hybridisering med sens eller antisens TWEAK-prober.

Figur 22: Fn14 mRNA blir uttrykt i bronkiolene og alveolene av voksen villtype muselunge. Et tverrsnitt av lunge blir betraktet ved 10 ganger forstørrelse med hematoksylinfarging, eller under mørkfeltmikroskopi etter *in situ* hybridisering med sens eller antisens Fn14-prober.

Figur 23: Inhibitorisk effekt av TWEAK på 3T3-L1 celleadipocyttdifferensiering *in vitro*. 3T3-L1-celler ble induert til å undergå differensiering ved å bruke en standard metode. Celler var ubehandlet, behandlet med et kontrollmiddel (rekombinant oppløselig human CD40L-FLAG 100 ng/ml) eller forskjellige versjoner av TWEAK ved 100 ng/ml rekombinant oppløselig human TWEAK-FLAG, rekombinant oppløselig human TWEAK, Fc-human TWEAK) på dag 0, sammen med dexametason og insulin, og ble skiftet ut daglig. I en forsøksgruppe ble det blokkerende anti-TWEAK mAb AB.G11 også tilsatt ved samme tid som Fc-hTWEAK. Cellene ble farget med olje rød O på dag 7.

Figur 24: Inhibitorisk effekt av TWEAK på myogenese *in vitro*. C2C12-myoblaster ble dyrket til nær konfluens i et DMEM-basert vekstmedium og på dag 0, byttet til et lavserum differensieringsmedium som inneholdt 2 % hesteserum for å sette i gang differensiering. Celler ble ubehandlet eller behandlet på dag 0 med Fc-hTWEAK (100 ng/ml). Myotubedannelse ble undersøkt ved å bruke et fasekontrastmikroskop og bilder ble tatt på dag 6 av differensiering. I andre forsøksgrupper ble Fn14-Fc eller et nøytraliserende anti-TNF-antistoff tilsatt på samme tid som Fc-hTWEAK, for derved å vise at den inhibitoriske effekt av Fc-hTWEAK var TWEAK spesifikk og ikke fremskaffet via TNF.

Figur 25: TWEAK kan binde til humane mesenchymalstamceller. Humane mesenchymalstamceller (hMSCs) ble inkubert med rekombinant Fc-TWEAK-protein fulgt av PE-konjugert geite anti-human Fc eller geit anti-mus Fc sekundære antistoff. Egenskapen av Fc-TWEAK til å binde til hMSCs ble bestemt ved å bruke fluorescens aktivert celledaterings (FACS) analyse. Bakgrunnsfargingen er gitt av den sekundære antistofffarging (kun annen) alene.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Med mindre annet er definert heri, skal vitenskapelige og tekniske uttrykk benyttet i forbindelse med foreliggende oppfinnelse ha de betydningene som vanligvis blir forstått av den vanlige fagperson. Videre, men mindre annet er krevet fra sammenhengen, skal entall innbefatte flertall og flertallsuttrykk skal inkludere entall. Generelt er nomenklaturer benyttet i forbindelse med, og teknikker av celle og vevskultur, molekylær biologi, immunologi, mikrobiologi, genetikk, virologi og protein og nukleinsyrekjemi samt hybridisering beskrevet heri, de som er velkjent og vanlig brukt innen faget. Metodene og teknikkene som anvendes her blir generelt utført i henhold til konvensjonelle metoder som er velkjent innen faget og som beskrevet i forskjellige generelle og mer spesielle referanser som er angitt og diskutert gjennom foreliggende beskrivelse med mindre annet er angitt. Se for eksempel Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, annen utgave, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) og Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), og Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Enzymatiske reaksjoner og opprenskningsteknikker blir utført i henhold til forhandlers spesifikasjoner, som vanlig utført innen faget, eller som beskrevet heri. Nomenklaturene benyttet i forbindelse med, og laboratorieprosedyrene og teknikkene av analytisk kjemi, syntetisk organisk kjemi, og medisinsk og farmasøytisk kjemi beskrevet heri er slike som er velkjent og vanlig benyttet innen faget. Standard teknikker blir brukt for kjemisk syntese, kjemisk analyse, farmasøytisk fremstilling, formulering, og avlevering, samt behandling av pasienter.

For at oppfinnelsen beskrevet heri skal bli mer fullstendig forstått, er den følgende detaljerte beskrivelse presentert. I beskrivelsen blir de følgende uttrykk benyttet:

"Antistoff" refererer til et intakt immunoglobulin, eller en antigenbindende del derav som konkurrerer med det intakte antistoff for spesifikk binding. Antigenbindende deler kan bli dannet med rekombinante DNA-teknikker eller med enzymatisk eller kjemisk spaltning av intakte antistoff. Antigenbindende deler innbefatter, blant annet, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, og komplementaritets bestemmende område (CDR) fragmenter, enkeltkjedede antistoff (scFv), kimeriske antistoff, diastoff og polypeptider som inneholder minst en del av et immunoglobulin som er tilstrekkelig til å gi spesifikk antigenbinding til polypeptidet. Et Fab-fragment er et monovalent fragment som består av

VL-, VH-, CL- og CH1-domenene; et F(ab')₂-fragment er et bivalent fragment som omfatter to Fab-fragmenter bundet med en disulfidbro med hengselsområdet; et Fd-fragment består av VH- og CH1-domenene; et Fv-fragment består av VL- og VH-domenene av en enkelt arm av et antistoff; og et dAB-fragment (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989) består av et VH-domene. Et enkeltkjedet antistoff (scFv) er et antistoff hvor et VL- og VH-område er pardannet for å danne et monovalent molekyl via en syntetisk linker som tillater dem å bli dannet som en enkel proteinkjede (Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988) og Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, (1988)). Diastoff er bivalente, bispesifikke antistoff hvor VH- og VL-domenene er uttrykt på en enkel polypeptidkjede, men ved å bruke en linker som er for kort til å tillate pardannelse mellom de to domener på samme kjede, for derved å tvinge domener til å pardanne med komplementære domener av andre kjede og danne to antigenbindende seter (se for eksempel Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), og Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994)). En eller flere CDR kan bli inkorporert i et molekyl enten kovalent eller ikke-kovalent for å gjøre dette til et immunoaderhin. Et immunoaderhin kan innbefatte CDR-delen(e) som en del av en større polypeptidkjede, kan kovalent binde det aktuelle CDR til en annen polypeptidkjede, eller kan inkorporere CDR-delen ikke-kovalent. CDR-delen tillater immunoaderhinet spesifikt til å binde til et spesielt antigen av interesse.

Et antistoff kan ha ett eller flere bindingsseter. Dersom det finnes mer enn ett bindingssete, kan bindingssetene være identiske til hverandre eller kan være forskjellige. For eksempel har et naturlig forekommende immunoglobulin to identiske bindingsseter, et enkeltkjedet antistoff eller Fab-fragment har ett bindingssete, mens et "bispesifikt" eller "bifunksjonelt" antistoff har to forskjellige bindingsseter.

"Antistoffrepertoar" refererer til summen av hver forskjellig antistofftype i et dyr eller menneske. Diversitet i antistoffrepertoar stammer fra blant annet, immunoglobulingenrekombinasjon, immunoglobulinhengseldiversitet, terminal deoksytransferaseaktivitet og somatisk hypermutasjon.

"Kimeriske antistoff" er antistoff som har blitt endret fra sin opprinnelige form til å omfatte aminosyresekvenser fra et annet protein. Kimeriske antistoff opprettholder minst en del av det opprinnelige antistoff aminosyresekvens, typisk delen som omfatter det antigenbindende område (Fab). Eksempler på kimeriske antistoff

innbefatter, men er ikke begrenset til bispesifikke antistoff og fusjoner med andre ikke-immunoglobulin proteinsekvenser.

“*cis* regulatoriske elementer” refererer generelt til sekvenser som regulerer den induserbare eller konstitutive ekspresjon av gensekvenser under spesielle forhold eller i spesifikke celler. Eksempler på cellulære prosesser som ekspresjonskontrollsekvenser regulerer innbefatter, men er ikke begrenset til, gen-transkripsjon, proteintranslasjon, messenger RNA-spleising, immunoglobulin isotypeskifting, proteinglykosylering, proteinspaltning, proteinsekresjon, intracellulær proteinlokalisering og ekstracellulær proteinretting.

“Cytokiner” refererer generelt til signaliserende molekyler av immunsystemet. Cytokiner innbefatter, men er ikke begrenset til interleukiner (IL), transformerende vekstfaktorer (TGF), tumornekrosefaktorer (TNF), lymfotoksiner (LT), interferoner, granulocyt-makrofagkoloni stimulerende faktorer (GM-CSF), makrofag CSF, granulocyt CSF, og migreringsinhiberende faktorer.

“Embryoniske stam (ES) celler” refererer til pluripotente eller multipotente celler som kan, når injisert i en blastocyst, medvirke til mange eller alle vev hos et prenatalt, postnatalt eller voksent dyr. Dyr som stammer fra blastocystinjeksjoner blir ofte referert til som “kimeriske” dyr siden deres somatiske og/eller kjønnsceller ofte er avledet fra både blastocystdonorene og de injiserte ES-celler. En viktig egenskap til ES-celler er deres egenskap å medvirke til kjønnslinjen av dyrene, noe som resulterer i ethvert ønsket arvelig særtrekk å bli passert til det kimeriske dyrs avkom. Immortaliserte ES-celler er et kraftig verktøy for å danne dyr med målrettede ødeleggelse av endogene gensekvenser eller for å danne dyr med fremmede gener (transgener).

“Ekspresjonskontrollsekvenser” refererer til sekvenser som muliggjør den konstitutive eller induserbare ekspresjon av gensekvenser under spesielle betingelser eller i spesifikke celler. Eksempler på cellulære prosesser som ekspresjonskontrollsekvenser regulerer innbefatter, men er ikke begrenset til gentranskripsjon, proteintranslasjon, messenger RNA-spleising, immunoglobulin isotypeskifting, proteinglykosylering, proteinspaltning, proteinsekresjon, intracellulær proteinlokalisering og ekstracellulær proteinretting.

“Fusjonsproteiner” refererer til kimeriske proteiner omfattende aminosyresekvenser av to eller flere forskjellige proteiner. Typisk stammer fusjonsproteiner fra *in vitro*

rekombinatoriske teknikker som er velkjent innen faget. Imidlertid kan fusjonsproteiner stamme fra *in vivo* crossover eller andre rekombinatoriske hendelser.

"Humane immunoglobulinmolekyler" refererer til immunoglobulinproteiner som er kodet av humane immunoglobulingensekvenser. Immunoglobulingensekvensene kan bli uttrykt i enhver celle eller dyr, humant eller ikke-humant.

"Humaniserte antistoff" er antistoff som er avledet fra en ikke-human art, hvori visse aminosyrer i rammeverk og konstante domener av de tunge og lette kjeder har blitt mutert for å unngå eller fjerne en immunrespons i mennesker. Alternativt kan humaniserte antistoff bli dannet ved å kondensere de konstante domener fra et humant antistoff til de variable domener av en ikke-human art. Eksempler på hvordan humaniserte antistoff kan dannes kan bli funnet i amerikanske patenter 6,054,297, 5,886,152 og 5,877,293.

"Inflammasjon" eller "inflammatorisk sykdom" refererer til de fundamentale patologiske prosesser som består av cytologisk og histologiske reaksjoner som inntreffer i blodkar og tilstøttende vev som svar på skade, abnormal stimulering eller biologiske substanser. Likeledes refererer "ikke-inflammatoriske tilstander" eller "ikke-inflammatoriske sykdommer" til enhver tilstand eller sykdom som ikke er inflammatorisk av natur, som beskrevet heri.

"Isolert protein" eller "isolert polypeptid" refererer generelt til et protein eller polypeptid som ut fra sin opprinnelse eller derivatiseringskilde: (1) ikke er assosiert med naturlig assosierte komponenter som følger dette i sin native tilstand, (2) er fri fra andre proteiner av samme typer, (3) blir uttrykt av en celle fra en forskjellig art, eller (4) ikke opptrer i natur. Således vil et polypeptid som er kjemisk syntetisert, syntetisert i et cellefritt biologisk system (for eksempel et kaninretikulocyttlysats), eller syntetisert i et cellulært system som er forskjellig fra cellen hvorfra den naturlige stamme være "isolert" fra sine naturlig assosierte komponenter. Et protein kan også bli gjort i hovedsak fritt for naturlig assosierte komponenter ved isolering, ved å bruke proteinopprensningsteknikker som er velkjent innen faget.

"Hermestoffer" eller "peptidhermere" er ikke-peptidanaloger som vanlig blir brukt i den farmasøytiske industri som medikamenter med egenskaper som er analoge med dem av templat peptidet. Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Verber og Freidinger, *TINS* s.392 (1985); og Evans *et al.*, *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987).

Hermere blir ofte utviklet ved hjelp av dataassistert molekylmodulering.

Peptidhermere som er strukturelt like terapeutisk anvendelige peptider kan bli brukt for å danne en ekvivalent terapeutisk eller profylaktisk effekt. Generelt er hermere strukturelt like et paradigmepeptid (det vil si et polypeptid som har en ønsket biokjemisk egenskap eller farmakologisk aktivitet), så som TWEAK, men har en eller flere peptidbindinger eventuelt erstattet med en binding valgt fra gruppen bestående av

--CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH--(cis og trans),

--COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, og --CH₂SO--, ved metoder som er velkjent innen

faget. Systematisk substitusjon av ett eller flere aminosyrer av en konsensus sekvens med en D-aminosyre av samme type (for eksempel D-lysin istedenfor L-lysin) kan også bli brukt for å danne mer stabile peptider. I tillegg kan begrensede peptider omfatte en konsensus sekvens eller en i hovedsak identisk konsensus sekvensvariasjon bli dannet ved metoder som er kjent innen faget (Rizo og Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); for eksempel ved å tilsette innvendige cysteinresiduer som er i stand til å danne intramolekylære disulfidbroer som cykliserer peptidet.

"Polypeptidanaloger" refererer til polypeptider som er avledet fra villtype-polypeptider, men er forskjellige fra disse i sine aminosyresekvenser. Polypeptider med endringer i sine aminosyresekvenser kan være muteiner, fusjonsproteiner, eller hermerer. Polypeptidanaloger refererer også til polypeptider som har ikke-aminosyresekvensforskjeller, i forhold til villtypepolypeptidene. Disse forskjeller kan være kjemiske eller biokjemiske, og innbefatter, men er ikke begrenset til, modifikasjonstypene som spesifikt er beskrevet heri.

"Polypeptidfragmenter" refererer til polypeptider som har en aminoterminal og/eller karboksyterminaldelesjon, men hvor den gjenværende aminosyresekvens er identisk med de tilsvarende posisjoner i den naturlige forekommende sekvens. Fragmenter er typisk minst 5, 6, 8 eller 10 aminosyrer lange, fortrinnsvis minst 14 aminosyrer lange, mer foretrukket minst 20 aminosyrer lange, vanligvis minst 50 aminosyrer lange, og enda mer foretrukket, minst 70 aminosyrer lange.

"Progenitorceller" refererer til celler som kan gi opphav til ett eller flere cellelinjer. Inkludert er stamceller, totipotente celler, pluripotente celler, multipotente celler, bipotente celler, embryoniske celler eller voksne celler. Også innbefattet er vevsspesifikke celler, innbefattende, men er ikke begrenset til, celler som irreversibelt følger en spesiell linje som er i stand til å undergå terminal differensiering,

celler som stammer fra vevsresidente celler, og sirkulerende celler som har målrettet seg til spesifikke vev.

“Individer” er mennesker og ikke-menneskelige individer. Et eksempel på et individ er en pasient.

“TWEAK-relaterte tilstander” refererer til enhver tilstand som stammer fra uriktig TWEAK-funksjon eller regulering. Uttrykket kan også referere til enhver tilstand som ikke direkte stammer fra uriktig TWEAK-funksjon eller regulering, men heller oppstår ut fra en eller annen andre mekanisme hvor ødeleggelse, økning eller på annen måte endring av TWEAK-aktivitet vil ha et påviselig utvalg på tilstanden. TWEAK-relaterte tilstander kan være enten inflammatoriske eller ikke-inflammatoriske i natur, og innbefatter, men er ikke begrenset til, tilstander og sykdommer som spesifikt er beskrevet heri.

“Vektorer” refererer til DNA-molekyler som tillater DNA-sekvenser av interesse og blir klonet videre formet, rekombinert, mutert, eller uttrykt utenfor sine native celler. Ofte har vektorer ekspresjonskontrollsekvenser som muliggjør induserbare eller konstitutive ekspresjon av gensekvenser under spesifikke tilstander eller i spesifikke celler. Eksempler på vektorer innbefatter, men er ikke begrenset til, plasmider, kunstige gjærkromosomer (YACs), virus, Epstein Bar virus (EBV)-avledede episomer, bakteriefager, kosmider og fagemider.

“Xenogene dyr” refererer til dyr som bærer vesentlige deler av humane immunoglobulinloki. Ofte bærer xenogene dyr homologt målrettede endogene immunoglobulinloki, som gjør dem ute av stand til å uttrykke sine endogene immunoglobulingener. Eksempler innbefatter musen av XenoMouse™-linje (Abgenix, Inc., Fremont, California), som er i stand til somatisk rearrangering av transgene humane immunoglobulingener, hypermutasjon av de humane variable gener, immunoglobulin-genekspresjon, og immunoglobulin isotypebyttning. Xenogene dyr er i stand til å fremskaffe effektive humorale responser til antigene angrep ved å bruke de humane immunoglobulingensekvenser. Antistoff som er dannet i xenogene dyr er fullstendig humane og kan bli isolert fra dyrene i seg selv eller avkommet derav, og fra hybridomer dannet fra xenogene B-lymfocytlinjer eller avkommet derav. Videre kan de rearrangerte humane gensekvenser som koder for immunoglobuliner fremskaffet mot spesifikke antigene angrep bli isolert med konvensjonelle rekombinante teknikker.

“Xenogene antistoff” refererer til antistoff som er kodet av fremmede immuno-globulinloki. For eksempel koder i mus av XenoMouse™-linjen, de humane antistoffloki xenogene antistoff.

“Xenogene monoklonale antistoff” refererer til homogene populasjoner av antistoff som blir dannet i klonede, immortaliserte celler, for eksempel hybridomer, avledet fra xenogene dyr. For eksempel danner hybridomer dannet fra mus av XenoMouse™-linjen xenogene antistoff.

Forståelsen av behandlingen av sykdommer baserer seg fundamentalt på bestemmelse av den molekylære mekanisme eller de biokjemiske reaksjonsveier som ligger under disse. Leger og forskere har ved dette muliggjort å skreddersy terapeutiske midler og formulere farmasøytiske sammensetninger som spesifikt målrette disse molekylære mekanismer eller biokjemiske veier.

Enkelte av de mest komplekse og skadelige sykdommer som påvirker mennesker innbefatter de hos hjertet, lever, nyre, lunge, hud, skjelettmuskel, lipid-metabolisme, magetarmkanal, nervesystem, pankreas, reproduksjonsorganer, brusk, ben, bindevevssystem, og progenitor- eller stamceller. Foreliggende oppfinnelse fremskaffer fordelaktig viktige fordeler ved forståelsen av disse sykdommer. Mer spesielt fremskaffes transgene dyr som uttrykker eksogene TWEAK-proteiner og viser for første gang en korrelasjon mellom ekspresjon av TWEAK-protein og visse patologiske tilstander hos hjertet, lever, nyre og lunge. Det fremskaffes også metoder for å behandle eller forebygge slike patologiske tilstander, så vel som metoder for å identifisere TWEAK-agonister eller antagonister for anvendelse i slike metoder. Patologiske tilstander som kan bli behandlet i henhold til slike metoder innbefatter akutt hjertesvikt, kronisk hjertesvikt, ikke-inflammatorisk dilatert kardiomyopati, kongestiv hjertesvikt, leverepitelial celle hyperplasia, hepatocyttdød, leverfibrose, hepatocyttevakuolering, leverskader, galleledertilstander, innbefattende gallelederhyperplasi, inflammatoriske nyretilstander, så som multifokal nyreinflammasjon, ikke-inflammatoriske nyresykdommer så som tubulær nefropati, tubulær hyperplasi, glomerulære cyster, renal hyperplasi, renal kapsulær fortykning, glomerulær nefropati, Alport Syndrom, tubulær nyrevakuolering, hyaline nyreavskallinger, nyrefibrose og inflammatoriske lungesykdommer. Videre fremskaffes metoder for å påvise TWEAK-strukturer eller funksjoner som molekylmarkører for sykdom, innbefattende TWEAK-proteiner eller deres funksjoner, TWEAK-antistoff og TWEAK-nukleinsyrer.

De TWEAK-relaterte tilstander som er beskrevet heri blir behandlet ved å bruke TWEAK-agonister eller antagonister som er i stand til å endre TWEAK-aktivitet eller ødelegge interaksjonen mellom en membranbundet eller fullengdet form av TWEAK-polypeptider med sine cellulære reseptorer. Alternativt ødelegger de terapeutiske substanser og behandlingsmetoder interaksjonen mellom en membranbundet eller fullengdet form av TWEAK-polypeptider med et annet TWEAK-polypeptid. Slik interferens kan oppstå på overflaten av en celle, intracellulært, ekstracellulært eller *in vitro* bundet til en fast fase eller i oppløsning. I et annet alternativ ødelegger de terapeutiske midler og behandlingsmetoder interaksjonen mellom membranbundne eller fullengdede former av TWEAK-polypeptider og TWEAK-reagerende partnere. Slike samreagerende partnere kan være proteiner, nukleinsyrer, sakkarider, lipider, fettsyrer og stereoider.

I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er den TWEAK-relaterte tilstanden ikke-inflammatorisk av natur.

I en annen foretrukket utførelsesform er den TWEAK-relaterte tilstanden fibrose, kardiomyopati, nyresykdom, lungesykdom eller leversykdom.

I en annen foretrukket utførelsesform er den TWEAK-relaterte tilstanden skjelettmuskelsykdom, sykdom i adipost vev, sykdom i mage-/tarmkanalen, pankreatisk sykdom, en sykdom i reproduksjonsorganer, en nervevevssykdom, celledød, hudsykdom, brusksykdom, bensykdom eller bindevevssykdom.

I en annen utførelsesform kan TWEAK-agonister eller antagonister bli brukt til å behandle individer som lider av en tilstand, sykdom eller skade som krever vevserstatning eller regenerering (for eksempel brannofre eller strålingspasienter) ved å påvirke progenitorceller *in vivo*. TWEAK-agonistene eller antagonistene kan også bli brukt til å behandle individer *in vivo* i kombinasjon med progenitorcelle eller vevstransplantasjonsterapi. TWEAK-agonistene eller antagonistene kan også bli brukt til å utvide cellepopulasjoner *in vivo* eller progenitorcellepopulasjoner *in vitro* for etterfølgende transplantasjon i individer med eller uten ytterligere behandling. Progenitorcellepopulasjoner benyttet for *in vivo* celleterapi eller *in vitro* utvidelse fulgt av transplantasjon kan være embryoniske eller voksne av opprinnelse. Voksenavledete progenitorer kan være multipotente eller vevsbegrensede (Lagasse et al., *Immunity* 14:425-436 (2001); Jackson et al. *J.Clin.Invest.* 107:1355-402 (2001); Anversa and Nadal-Ginard, *Nature* 415:240-243 (2002); Gussoni et al., *Nature* 401:390-394 (1999); Brazelton et al., *Science*

290:1672-1674 (2000); Peterson et al., *Science* 284:1168-1170 (1999); Lagasse et al., *Nature Medicine* 6:1229-1234 (2000)).

Hjertesykdom er den største årsak til handikap og død i industrialiserte land. I USA forårsaker hjertesykdom omkring 40 % av alle dødsfall, noe som utgjør omtrent 750.000 dødsfall årlig. Det mest grunnleggende til funksjonens hjerte er myokardium som består i hovedsak av forgrenede og anastomoserende striale muskelceller (hjertermycytter). Hjertermycytter er mye større enn de mellomliggende interstitialceller og utgjør mer enn 90 % av volumet av myokardium. Inflammatoriske celler er sjeldne, og det er lite kollogan i et normalt myokardium.

Myokardial sykdom er vanlig, men opptrer sekundært i et antall forskjellige hjertetilstander. Eksempler på myokardial sykdom innbefatter inflammatoriske lidelser (for eksempel myokarditt) og ikke-inflammatoriske hjertetilstander så som dilatert kardiomyopati, systemiske metabolske sykdommer, muskulær dystrofi og genetiske abnormaliteter i hjertemuskelceller.

Hovedtypene av kardiomyopati innbefatter dilaterte, hypertrofiske og restriktive kardiomyopatier. Det er et mål for oppfinnelsen å fremskaffe behandling av dilatert kardiomyopati som er typisk ikke-inflammatorisk av natur. I tilfelle med ikke-inflammatorisk dilatert kardiomyopati som utgjør omtrent 90 % av de kliniske tilfeller av myokardial sykdom, er hjertet karakterisert av progressiv hjerte-hypertropi, dilatering og kontraktil (systolisk) dysfunksjon. Dilatert kardiomyopati kan opptre ved enhver alder, men er vanligst hos personer som ligger i alder fra 20 til 60 år. Diagnose blir ofte foretatt via ikke-invasiv hjerteavbildning, spesielt via to-dimensjonal ekkokardiografi. Histopatologien av dilatert kardiomyopati er karakterisert av degenererende myocytter med mild til moderat hypertropi med fravær av inflammatoriske celler og interstitial fibrose.

Klinisk presenterer dilatert kardiomyopati sakte progressiv kongestiv hjertesvikt, men pasienter kan gå raskt fra en kompensert til en dekompensert funksjonell tilstand. Hjertetransplantasjon er ofte nødvendig. Femti prosent av pasientene dør innen to år, og 75 % innen 5 år. Dødsårsaken er typisk progressiv hjertesvikt eller arytmi, men emboli forårsaket av løsning av en interkardial trombe kan inntreffe.

Hjertesom er karakterisert av dilatert kardiomyopati er forstørrede, løse og veier to til tre ganger så mye som normale hjerter. Alle kamre er utvidede med

veggfortynning, fibrose og typisk murale tromber. I en mindre del av dilaterte kardiomyopater stammer mitral eller trikuspid gjenoppstøtning fra utvidelse av venstre ventrikulære kammer. Hjertemuskelceller er hypertrofierte med forstørrede kjerner. Noe av årsaken til dilatert kardiomyopati innbefatter myokarditt, misbruk av alkohol eller andre toksiner, graviditet (peripartum kardiomyopati), iskjemi, koronar hjertesykdom, hypertensjon og genetisk påvirkning.

Idiopatisk dilatert kardiomyopati (IDC), som er en sykdom av ukjent etiologi, er karakterisert ved dilatering av en eller begge ventrikler, systolisk dysfunksjon og ofte progresjon til kongestiv hjertesvikt. Det skal bemerkes at uttrykket "IDC" blir brukt av enkelte fagpersoner om hverandre med uttrykket "dilatert kardiomyopati", noe som antyder at IDC faktisk er en bred kategori av dilaterte kardiomyopater som ikke er resultatet av alkoholmisbruk, toksisk skade eller myokarditt.

Mikroskopisk er IDC særpreget av myokardiocythypertropi, karymegali og interstitial og perivaskulær fibrose. I motsetning til myokarditt er nekrose og cellulær infiltrasjon ikke typisk hyppig hos IDC-pasienter, noe som er en indikasjon på dets ikke-inflammatoriske etiologi. Konsistent med denne etiologi er det faktum at ikke-inflammatoriske medikamenter, så som prednison, i hovedsak er ineffektiv ved behandling av IDC.

Det er et mål for foreliggende oppfinnelse å fremskaffe metoder for å behandle eller forebygge dilatert kardiomyopati assosiert med TWEAK-aktivitet. Fordi årsaken til dilatert kardiomyopati (for eksempel IDC) er for en stor del ukjent, har spesielle behandlingsmetoder ikke blitt utviklet. Pasienter bli typisk behandlet for hjertesvikt ved å bruke fysiske, ernæringsmessige og farmakologiske metoder (for eksempel beta-adrenoceptorantagonister, kalsiumantagonister og antikoagulanter) til å kontrollere symptomene. I tillegg blir hjertetransplantasjon benyttet når tilgjengelig.

Fagpersonen har vært ute av stand til å identifisere noen immunologisk, histokjemisk, morfologisk, ultrastrukturell eller mikrobiologisk markør som kunne bli benyttet til å diagnostisere IDC. Imidlertid antyder epidemiologiske resultater at predisposisjon til IDC kan være genetisk basert. I 20 % av IDC-pasienter viser førstegrads slektsledd også tegn på IDC, noe som antyder hyppig familieoverføring. Fagpersonen har forstått behovet for å bestemme molekulære genetiske markører for IDC i subkliniske og kliniske hjertesykdomspasienter.

Til i dag innbefatter listen av gener assosiert med dilatert kardiomyopati hjertetropinin T, d-sarkoglykan, hjerte b myosin tung kjede, hjerteaktin, a-tropomyosin, Lamin A/C, Desmin, hjerteryanodinreseptor, desmoplakin, plakoglobin, dystrofin og tafazzin. Det eksisterer fremdeles et behov for å finne ytterligere genetiske faktorer som medvirker til dilatert kardiomyopati og til å utforme terapeutika som målretter disse. Foreliggende oppfinnelse har for første gang vist en årsakssammenheng mellom TWEAK og dilatert kardiomyopati. Det er følgelig et mål for oppfinnelsen å identifisere dilatert kardiomyopati hos en pasient ved å påvise endringer i TWEAK proteinekspresjon, TWEAK proteinfunksjon, TWEAK mRNA-ekspresjon eller en kromosomal endring. Metoder og reagenser for å påvise slike molekylære markører for sykdom er velkjent innen faget, og involverer immunologiske og immunohistokjemiske analyser, enzym eller andre proteinfunksjonsassayer og standard hybridiseringsbaserte assayer så som Northern blots, Southern blots, enkel nukleotid polymorfi (SNP) analyse og fluorescens *in situ* hybridiserings-(FISH)-analyse.

Det bør bemerkes at ikke-inflammatorisk dilatert kardiomyopati er karakterisert ved progressiv hjertehypertrofi, dilatering og kontraktile dysfunksjon. I motsetning til dette er Chagas sykdom en sjelden form for myokarditt som er en inflammatorisk hjertesykdom som utvikler seg hos mennesker og forsøksdyr etter kronisk Trypanosomi cruzi-infeksjon. Studier av Chagas sykdom som er hyppig i sentral- og sør-Amerika har identifisert anti-selv-antistoff i serumet hos Chagas sykdomspasienter. Joshua Wynne og Eugene Braunwald, *Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine*, volum 2, kap. 41, side 1442-1444 (5. utgave, 1997). Metodene beskrevet heri er rettet mot behandling av den mer vanlige ikke-inflammatoriske type dilatert kardiomyopati assosiert med TWEAK-aktivitet.

En voksen menneskenyre prosesserer mer enn 1.700 liter blod per dag, noe som resulterer i omtrent 1 liter urin. Nyren virker til avfallsmiddelutskillelse, metabolisme, vann, salt og pH-homeostase, så vel som medvirkning til det endokrine system. Nyresykdom er mer sannsynlig å forårsake morbiditet enn dødelighet med omtrent 35.000 dødsfall årlig i USA. I motsetning til dette blir millioner personer påvirket årlig av ikke-dødelige nyresykdommer så som infeksjoner, nyrestein og urinveisblokkering.

Typisk er glomerulære sykdommer forårsaket av immunologiske lidelser, mens tubulære og interstitiale sykdommer vanligvis er forårsaket av toksiner eller infeksjonsmidler. En del liste av nyresykdommer innbefatter akutt nefritisk

syndrom, asymptomatisk hematuria eller proteinuria, akutt nyresvikt, kronisk nyresvikt, renale tubulare defekter, urinveisinfeksjon, nefrolitiasis, urinveisblokkering og nyrefibrose.

Nyreskader som involverer tubulene involverer typisk også interstitium. Sykdommer hos tubulene kan være inflammatoriske eller ikke-inflammatoriske av natur, og innbefatter iskjemisk eller toksisk tubular skade. En delliste av tubulussykdommer innbefatter akutt tubular nekrose og akutt nyresvikt; inflammatoriske reaksjoner hos tubulene og interstitium (tubulointerstital nefritt); tubular hyperplasi; tubulointerstital fibrose (en arrdannende sykdom satt i gang av tubulare epitelialceller med interstitial fibroblast, mononukleær celle, glomerular ultrafiltrat, cytokine og kjemokine komponenter); samt autosomal dominant polycystisk nyresykdom (ADPKD)(en arvet sykdom karakterisert av store, væskefylte cyster fra tubulene og oppsamlende ledere og forårsaket av en mutasjon i enten PKD1- eller PKD2-genene).

Glomerulare sykdommer representerer den alvorligste av nyresykdommene. For eksempel er kronisk glomerulonefritt den vanligste årsak til kronisk nyresvikt hos mennesker. I de såkalte sekundære glomerulare sykdommer, kan glomeruli bli skadet ved immunologiske sykdommer så som systemisk lupus erytematosus (SLE) så vel som vaskulære lidelser, for eksempel hypertensjon og polyarteritis nodosa. I tillegg påvirker metabolske sykdommer så som diabetes mellitus (dvs. diabetisk nefropati) og arvelige sykdommer så som Fabry-sykdom glomeruli. Den hovedsakelige glomerulare sykdom innbefatter primær glomerulonefritt og glomerulopati.

Gruppen av sykdommer under paraplyen arvelig nefritt innbefatter familial nyresykdom assosiert i hovedsak med glomerular skade. Alports syndrom er en form for nefritt som blir fulgt av nervedøvheter og forskjellige øyesykdommer innbefattende linseforskyvning, posterior katarakt og corneal dystrofi. Sykdommen er hyppigere hos menn på grunn av dets dominante X-tilknyttede genotype. Imidlertid er enkelte kvinner påvirket grunnet en av enten en autosomal dominant og resessiv genotype. Glomeruli hos Alport-nyrer viser segmental proliferasjon eller sklerose. Enkelte ganger får epitelialcellene et skumaktig utseende grunnet nøytralt fett og mucopolysakkaridakkumulering. De glomerulare og tubulare vasalmembraner viser irregulære foci av fortykning eller svekkelse med splitting og laminering av lamina densa.

Fordi nyresykdommer er av vesentlig klinisk viktighet, har fagpersonen forstått behovet for å forstå deres fysiologiske og genetiske årsaker. Fagpersoner forstår videre behovet for å utvikle nye terapeutiske midler for behandling av kroniske og akutte nyresykdommer. Oppfinnelsen viser for første gang en årsakstilknytning mellom TWEAK og nyresykdom.

Følgelig fremskaffer i en utførelsesform oppfinnelsen metoder til behandling av nyresykdommer. I en mer foretrukket utførelsesform kan nyresykdommene være Alport-syndrom. I andre mer foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen kan målnyresykdommene være karakterisert av multifokal inflammasjon, tubular nefropati, tubular hyperplasi, cyster, glomerular nefropati, tubular vakuolering, fibrose eller hyalinavskallinger.

Lungesykdom har vært og forblir en vedvarende sykdom. Primære respiratoriske infeksjoner, så som bronkitt, bronkolungebetennelse og andre typer lungebetennelse må vanligvis bli behandlet av lege. Lungesykdommer kan bli forverret av miljøfaktorer så som sigaretttrøyk, luftforurensning og andre inhalasjonsstoffer. Kronisk bronkitt, emfysem, pulmonar fibrose og ondartede sykdommer er også vanlige. Lungene er også sekundært involvert i mange dødelige sykdommer med pulmonart ødem, atelektasis eller bronkolungebetennelse funnet i de fleste kritisk syke pasienter.

Astma er en kronisk gjentakende inflammatorisk lidelse som er karakterisert av hyperreaktive luftveier. Symptomene er typisk særpreget av en episodisk, reversibel bronkokonstriksjon. Astma blir forårsaket av en øket reaksjon hos det trakeobronkiale tre til forskjellige stimuli og er ofte assosiert med en IgE-respons overfor eksterne allergener.

Det finnes to hovedtyper astma. Den første er ekstrinsisk astma som blir satt i gang av en type I hypersensitivitetsreaksjon induisert av eksponering til et ekstrinsisk antigen. Listen av ekstrinsisk astmatilstander innbefatter atopisk (allergisk) astma, arbeidstilknyttet astma og allergisk bronkopulmonar aspergillosis. Den andre typen er intrinsisk astma som stammer fra ikke-immune mekanismer og blir satt i gang av faktorer så som aspirininntak, pulmonare infeksjoner, stress, kulde, inhalerte irriteranter og trening.

Fagpersonen har innsett behovet for en bedre forståelse av lungesykdom innbefattende både ikke-inflammatoriske og inflammasjonsbaserte sykdommer så

som astma. En øket forståelse ville lette utviklingen av forbedrede farmasøytiske medikamenter for å behandle lungesykdommer. Foreliggende oppfinnelse viser for første gang en årsakstilknytning mellom TWEAK og lungesykdom samt behandling derav. I mer foretrukne utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er lungesykdommen særpreget ved inflammasjon innbefattende granulomatøs og/eller lymfocytisk inflammasjon.

Leveren er hovedregulatoren for nedbrytning og metabolsk homeostase, innbefattende prosesseringen av aminosyrer fra maten, karbohydrater, lipider og vitaminer så vel som syntesen av serumproteiner, detoksifisering og utskillelse i gallen av endogene avfallsprodukter og forurensende xenobiotika. Således er nyresykdom typisk meget alvorlig og enkelte ganger livstruende.

Leveren er sårbar overfor mange typer sykdommer, innbefattende metabolsk, toksisk, mikrobielle, sirkulatorisk og neoplastisk skade. Toksiner eller immunologiske sykdommer kan gjøre at hepatocytene svulmer opp og blir ødematøse av utseende, med uregelmessig aggregert cytoplasma og store klare rom. I tillegg kan tilbakeholdt gallemateriale gjøre at hepatocytene blir skumaktige og oppsvulmede. Akkumulering av substanser så som jern, kopper og fettdråper (steatose) kan akkumulere i hepatocytter. I tilfelle med alkoholisk leversykdom og akutt fettlever hos gravide opptrer små dråper som ikke skyver kjernen (kjent som mikrovesikulær steatose).

Hepatocyttnekrose som stammer fra vesentlig leverskade, kan blant annet bli karakterisert av iskjemisk koagulativ nekrose. Ofte er celledød fra toksiske eller immunologisk relaterte tilstander karakterisert av opprundede hepatocytter og skrumpede, pyknotiske, intenst eosinofile "councilman-legemer" inneholdende fragmenterte kjerner (som stammer fra apoptose). Alternativt kan hepatocytter bli osmotisk oppsvulmede og sprekke (lytisk nekrose).

Hepatitt stammer fra skade på leveren assosiert med et innløp av akutte eller kronisk inflammatoriske celler. Hepatocyttnekrose kan gå forut for igangsettingen av inflammasjon eller vice versa. Fibrose, som er en irreversibel følge av leverskade stammer vanligvis fra inflammasjon eller ikke-inflammatoriske mekanismer så som en direkte toksisk skade. Den karakteristiske avleiring av kollagen påvirker blodstrøm og perfusjon av hepatocytter. Med fortsatt fibrose deles leveren opp i områder med regenererende hepatocytter med omliggende arrvev (cirrose).

Ovale celler har dette navn på grunn av sitt morfologiske utseende som små, prolifererende epitelialceller med en oval kjerne og lite basofilt cytoplasma. Oval celler opptrer normalt i de terminale galleganger som forbinder de intrahepatiske ganger som ligger i portaltriaden med hepatocytstrene. Disse celler kan være avledet fra iboende leverprogenitorceller eller fra benmargsprogenitorceller som har sirkulert og slått seg ned i leveren. Disse duktulare progenitorceller har potensiale å differensiere til både gallegangepitelialceller og hepatocytter. Foreliggende oppfinnelse viser at ekspresjon av et TWEAK transgen i mus har kapasiteten å ekspandere populasjonen av duktulare progenitorceller.

På grunn av de høye nivåer av morbiditet og dødelighet forårsaket av leversykdom, har fagområdet innsett at de molekylære og genetiske grunnpilarer for denne sykdom må bli utarbeidet. Identifisering av årsaksfaktorer letter oppdagelsen av terapeutiske midler for behandling av kroniske og akutte leversykdommer. Foreliggende oppfinnelse viser en årsakssammenheng mellom TWEAK og leversykdom, og fremskaffer fordelaktig behandling derav. I en mer foretrukket utførelsesform er leversykdommen epitelial hyperplasi, hepatocyt vacuolering, gallegangsskade som resulterer i fibrose, hepatocyttdød eller leverskade.

Det skelettmuskulære system er kritisk for holdning og bevegelse. Skjelettmuskler kan atrofare som reaksjon på ikke å bli brukt, som kan være sekundært til tilstander angående nerve- og blodtilførselsmangel og medikamenteksponering så som glukokortikoider. Skjelettmuskel kan også atrofare under tilstander med genetiske eller degenerative sykdommer. Disse tilstander eller sykdommer kan være inflammatoriske eller ikke-inflammatoriske av natur. Muskeldystrofi utgjør en stor gruppe arvelige myopatier særpreget ved atrofi og tap av muskelfibre ved fravær av nervesykdom; hvor en vanlig som er inkludert i denne gruppe er Duchenne's muskeldystrofi. Kongenital muskelsykdom kan også opptre i forbindelse med glykogenlagringssykdommer så som sur maltasedefisiens, som resulterer i barn med svake muskler, dårlig styrke, forstørrede hjerter og ofte tidlig død av hjertesvikt. Kongenitale sykdommer som fører til muskelatrofi innbefatter også, men er ikke begrenset til, mitokondrielle myopatier, lipid myopatier, sentrale tubulære myopatier og rabdomyolyse. Myopatiske tilstander kan også utvikles hos voksne, hvor en av de mest vanlige observerte er alkoholisk myopati. Skjelettmuskelsvinn kan også inntreffe som en komponent av nervesykdom innbefattende, men ikke begrenset til, amyotrofisk lateralsk sklerose (ALS). I tillegg er skjelettmuskelsvinn også kjent som cachexia, en viktig patologisk tilstand observert i de fleste terminalt syke kreftpasienter, og

er ofte direkte ansvarlig for pasientens død. Sykdommer hos skjelettmuskel som oppstår i forbindelse med inflammasjon eller autoimmunitet innbefatter polymyositis, inflammatoriske myopatiser og glukokortikoidindusert atrofi. Foreliggende oppfinnelse etablerer en forbindelse mellom TWEAK og egenskapen hos myoblaste til å differensiere til myotuber. Det er følgelig et mål for oppfinnelsen å fremskaffe behandling av skjelettmuskellidelser ved å fremme skjelettmuskelregenerering ved å bruke *in vivo*-eller *in vitro*-metoder.

Akkumulering av fettceller opptrer i forbindelser med fedme, innbefattende fedme assosiert med metabolske sykdommer så som Type II diabetes. Innvekst i organer av fettceller, såkalt fettinfiltrering opptrer i et mengdeforhold, og er en patologisk komponent av muskulære dystrofier. Foreliggende oppfinnelse har vist en forbindelse mellom TWEAK og egenskapen av preadipocytter til å differensiere til adipocytter. Det er følgelig et mål for oppfinnelsen å fremskaffe behandling av lidelser assosiert med en akkumulering eller knapphet av adipocytter ved å modulere adipocyttdifferensiering med TWEAK-agonister eller antagonister eller farmasøytiske sammensetninger derav.

TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige ved behandling av TWEAK-relaterte tilstander i henhold til foreliggende oppfinnelse er beskrevet heri og er kjent innen faget. Slike midler innbefatter dem beskrevet i for eksempel PCT International Publication Nos. WO 98/05783, WO 98/35061, WO 99/19490, WO 00/42073 og WO 01/45730, hvorav alle er. TWEAK-antagonister som er anvendelige ifølge oppfinnelsen innbefatter anti-TWEAK antistoff så som antistoff som er humane, ikke-humane, humaniserte eller xenogene, som beskrevet heri og er polyklonale, monoklonale eller syntetiske. Videre kan antistoffene være av full lengde, fragmenter derav eller fusjonsproteiner som innbefatter antigengjenkjenningssekvenser.

TWEAK-antagonister som er anvendelige ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter også anti-TWEAK reseptorantistoff. Her kan TWEAK-reseptoren være FN14 eller andre medlemmer av TNF-R-familien som blir bundet av TWEAK. Antistoffene mot TWEAK-reseptoren kan være humane, ikke-humane, humaniserte eller xenogene som beskrevet heri, og er polyklonale, monoklonale eller syntetiske. Videre kan antistoffene være av full lengde, fragmenter derav eller fusjonsproteiner som innbefatter antigengjenkjenningssekvenser.

Immunisering av dyr med TWEAK eller TWEAK-reseptor antigener kan bli utført med enhver metode som er kjent innen faget. Se for eksempel Harlow og Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Metoder for immunisering av ikke-humane dyr så som mus, rotter, sauer, geiter, griser, kyr, hester og lignende er velkjent innen faget. Se for eksempel Harlow og Lane og US patent 5.994.619. I en foretrukket utførelsesform blir antigenet administrert med eller uten en adjuvant til å stimulere immunresponsen. Slike adjuvanter innbefatter blant annet fullstendig eller ufullstendig Freund's adjuvant, RIBI (muramyl dipeptider) eller ISCOM (immunostimulerende komplekser).

Antigenet valgt for immunisering kan være ethvert av de følgende: et TWEAK-polypeptid; et TWEAK-polypeptidfragment; et TWEAK-mutein; en TWEAK-hermer; et TWEAK-fusjonsprotein; et TWEAK-reseptorpolypeptid; et TWEAK-reseptorfragment; et TWEAK-reseptormutein; en TWEAK-reseptorhermer; et TWEAK-reseptorfusjonsprotein; en celle som uttrykker et TWEAK-polypeptid, fragment, mutein eller fusjonsprotein derav; eller en celle som uttrykker et TWEAK-reseptorpolypeptid, fragment, mutein eller fusjonsprotein derav. Immunoglobulinene dannet i dyrene ved immunisering kan bli gjenvunnet fra forskjellige vev eller væsker fra dyrene innbefattende serum, melk, bukvæske, pankreas, tymus, perifere blodceller, føtal lever, benmarg, peritoneum og ethvert annet vev eller væske som har vesentlige immunoglobulinkonsentrasjoner. I tillegg kan hybridomer bli dannet og isolert som produserer monoklonale antistoff skilt ut i mediet.

I foretrukne utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse er antistoffene polyklonale antistoff, monoklonale antistoff eller humaniserte antistoff. I en mer foretrukket utførelsesform omfatter de humaniserte antistoff humant antistoff-konstant og/eller rammeverkområde. I en annen foretrukket utførelsesform er antistoffene xenogene antistoff. I mer foretrukne utførelsesformer er de xenogene antistoff polyklonale antistoff eller monoklonale antistoff.

Xenogene antistoff er fullstendige antistoff fra en art som blir uttrykt i en fullstendig forskjellig art. For eksempel dersom en mus uttrykker det DNA som er nødvendig for å danne fullstendige humane antistoff, er de resulterende antistoff xenogene (dvs. humane antistoff dannet i en mus). Målrettet inaktiverings(knockout)-teknologi gir muligheten til å ødelegge et dyrs normale ekspresjon av endogene immunoglobulingener. Transgen dyreteknologi gir muligheten å fremskaffe ikke-humane dyr som danner xenogene immunoglobulinproteiner. Slike xenogene dyr

kan bli avlet til de immunoglobulene knockout dyrene beskrevet ovenfor, noe som resulterer i dyr som kun danner de xenogene immunoglobuliner og ikke endogene immunoglobuliner.

Ekspresjon av xenogene immunoglobulingener tillater fremstillingen av et sterkt variert repertoar av humane antistoff innbefattende monoklonale antistoff. Dette er fordi (1) de exogene immunoglobulingener opprettholder sine *cis* regulatoriske elementer og er utsatt for vertsdyrets normale variable (V), diversitet (D), og sammenbindende (J) rekombinatoriske hendelser; (2) de exogene immunoglobulingener blir uttrykt på en lignende måte som endogene immunoglobulinloci; og (3) de resulterende antistoff støtter åpenbart normal B lymfocyttisk utvikling og humorale reaksjoner.

De exogene immunoglobulingener kan bli introdusert i dyrene som et fullstendig immunoglobulinlocus, en del av et immunoglobulinlocus, eller som et "minilocus" hvor et mer fullstendig exogent Ig-locus blir etterapet via inklusjonen av en håndfull av de individuelle gener fra dette Ig-locus. Videre kan transgene dyr bli bearbeidet til å uttrykke transgener som koder for modifiserte antistoffer så som enkeltkjedede antistoff eller kimeriske antistoff.

TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige ifølge oppfinnelsen kan også være TWEAK-polypeptider eller fragmenter, analoger, muteiner eller hermere derav som beskrevet heri. Analoger kan være forskjellige fra den naturlige forekommende TWEAK-aminosyresekvens, eller på måter som ikke involverer sekvensen eller begge deler. I en foretrukket utførelsesform er TWEAK-polypeptidanalogene muteiner. Metoder for å danne muteiner er velkjent innen faget angående molekylær biologi, og innbefatter å endre DNA-molekyler ved tilfeldig mutagenese, seterrettet mutagenese, delesjoner og avkortninger. Teknikker for å mutagenesere DNA er velkjent innen faget, og innbefatter polymerase kjedereaksjon(PCR)mutagenese, metnings- (dvs. kjemisk eller stråling)-mutagenese, kjemisk DNA-syntese, alanin scannende mutagenese, oligonukleotid-fremmet mutagenese (hybridisering til et DNA-templat *in vitro* fulgt av enzymatisk forlengelse), kasett-(rekombinant)mutagenese og kombinatorisk mutagenese (introduksjon av tilfeldige degenererte sekvenser i TWEAK DNA-materiale).

TWEAK-polypeptidene binder til TWEAK-reseptorer, til andre TWEAK-polypeptider eller til andre TWEAK-interreagerende partnere. TWEAK-fragmentene kan være membranbundet og kan bli avlevert i farmasøytiske sammensetninger som

omfatter liposomer eller andre cellulære eller pseudocellulære avleveringssystemer. TWEAK-fragmentene kan også være oppløselige TWEAK-polypeptider som enten inneholder en avkortning eller innvendig delesjon som fjerner det transmembrane domene. Videre kan TWEAK-polypeptidene som er anvendelige ifølge oppfinnelsen resultere i enten ingen TWEAK-respons eller en endret TWEAK-respons. Eksempler på slike TWEAK-polypeptider er analoger av TWEAK-proteinet innbefattende delesjons- eller forkortningsmutanter, peptider inneholdende en eller flere aminosyresubstitusjoner, TWEAK-hermere så vel som ikke-aminosyre-sekvensmodifiserte TWEAK-polypeptider.

TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige i oppfinnelsen kan også være TWEAK-reseptorpolypeptider eller fragmenter, analoger, muteiner eller hermere derav som beskrevet heri. TWEAK-reseptorpolypeptidene blir bundet av TWEAK-polypeptider, til andre TWEAK-reseptorpolypeptider, eller til andre TWEAK-reseptorsamvirkende partnere. TWEAK-reseptorfragmentene kan være membranbundet eller kan bli avlevert i farmasøytiske sammensetninger som omfatter liposomer eller andre cellulære eller pseudocellulære avleveringssystemer. TWEAK-reseptorfragmentene kan også være oppløselige TWEAK-reseptorpolypeptider som inneholder enten en avkortning eller innvendig delesjon som fjerner transmembrandomene. Videre kan TWEAK-reseptorpolypeptidene som er anvendelige ifølge oppfinnelsen resultere i enten ingen TWEAK-respons, eller en endret TWEAK-respons. Eksempler på slike TWEAK-reseptorpolypeptider er analoger av TWEAK-reseptorpolypeptider innbefattende delesjons- eller avkortningsmutanter, peptider inneholdende en eller flere aminosyresubstitusjoner, TWEAK-reseptorhermere så vel som ikke-aminosyresekvensmodifiserte TWEAK-reseptorpolypeptider.

Videre kan TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige ifølge oppfinnelsen være organiske eller uorganiske forbindelser. De organiske forbindelser kan enten være små organiske forbindelser så som dem funnet i kjemiske biblioteker som er velkjent innen faget. Andre organiske forbindelser innbefatter, men er ikke begrenset til, nukleinsyrer, peptider, sakkarider, lipider og fettsyrer, steroider eller derivater derav. Uorganiske forbindelser kan være silikonbaserte eller andre mineraler og salter. De organiske eller uorganiske forbindelser kan binde til TWEAK-polypeptider, TWEAK-reseptorpolypeptider eller andre TWEAK-samreagerende partnere som beskrevet heri.

Ikke-sekvensmodifikasjoner av TWEAK eller TWEAK-reseptorpolypeptidene kan stamme fra in vivo eller in vitro kjemisk derivatisering av polypeptider, og innbefatter, men er ikke begrenset til endringer i acetylering, metylering, fosforylering, karboksylering, oksidasjonstilstand eller glykosylering. I tillegg kan kjemisk derivatisering involvere kopling til organiske polymerer så som polyetylen-glykol (PEG) eller andre polymerer som er kjent innen det medisinske fag. Følgelig kan en TWEAK-polypeptidanalogue stamme fra en ikke-aminosyresekvensmodifikasjon.

TWEAK eller TWEAK-polypeptidene kan bli uttrykt som fusjonsproteiner. Fusjonsproteiner er velkjent innen faget. Fagpersonen kan velge fra en mengde fusjonspartnerenheter innbefattende dem fra prokaryoter og eukaryoter.

I henhold til foreliggende oppfinnelse kan ethvert individ innbefattende mennesker og dyr bli behandlet på en farmasøytisk akseptabel måte med en farmasøytisk effektiv mengde av en TWEAK-agonist eller antagonist eller sammensetning omfattende et slikt middel over en tidsperiode som er tilstrekkelig til å behandle en TWEAK-relatert tilstand hos individet til hvilket de blir administrert over en tidsperiode. Alternativt kan individer motta en profylaktisk effektiv mengde av en TWEAK-agonist eller antagonist eller sammensetning omfattende et slikt middel, som er effektiv til å forhindre en TWEAK-relatert tilstand hos et individ til hvilket de blir administrert over en tidsperiode. TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige ifølge oppfinnelsen kan bli formulert i farmasøytiske sammensetninger ved metodene som er beskrevet heri, og kan bli avlevert via parenteral rute, injeksjon, transmukosal, oral, inhalering, okular, rektal, langtidsvirkende implantasjon, topisk, vedvarende frigjøring eller stentbelagte anordninger. TWEAK-agonister eller antagonister kan foreligge i en mengde konvensjonelle former benyttet for administrasjon. Disse innbefatter for eksempel faste, semi-faste og flytende doseringsformer så som flytende oppløsninger eller suspensjoner, oppslemminger, geler, kremer, balsamer, emulsjoner, lotioner, pulvere, sprayer, skum, pasta, smøringer, salver og dråper.

I tillegg kan TWEAK-agonister eller antagonister bli avlevert via en genterapi rute. Kort angitt blir nukleinsyremolekyler som koder for proteiner eller som uttrykker antisensmolekyler avlevert til et individ ved å benytte enhver av vektorene som er kjent innen faget til å være egnet for avlevering av nukleinsyremolekylene til målvevet eller organene. Typiske vektorer innbefatter liposomer, plasmider og virale vektorer (for eksempel retrorvirus, adenovirus og adenoassosierte virus).

Den mest effektive administrasjonsmåte og doseringsregime av TWEAK-agonister eller antagonist eller sammensetninger omfattende disse vil avhenge av den ønskede effekt, tidligere behandling, om noen, individets helsestatus, status for tilstanden i seg selv, reaksjonen overfor TWEAK-agonistene eller antagonistene og vurderingen hos den behandlende lege. TWEAK-agonister eller antagonist eller sammensetninger omfattende disse kan bli administrert i enhver doseringsform som er akseptabel for farmasøytika eller veterinærpreparater, på en gang eller over en serie av behandlinger.

Mengden av TWEAK-agonister, eller antagonist eller sammensetninger omfattende disse som gir en enkel dose vil variere avhengig av den spesielle administrasjonsmåte, de spesifikke TWEAK-agonister eller antagonist eller sammensetning, dosenivå og dosefrekvens. Et typisk preparat vil inneholde mellom 0,01 % til omkring 99 %, fortrinnsvis mellom omkring 1 % og omkring 50 % av TWEAK-agonister eller antagonist eller sammensetninger derav (vekt/vekt).

Et eksempelvis ikke-begrensende område for en terapeutisk eller profylaktisk effektiv mengde av en TWEAK-agonist eller antagonist er mellom omkring 0,005 – 10,00 mg/kg kroppsvekt, mer foretrukket mellom omkring 0,05 – 1,0 mg/kg kroppsvekt.

TWEAK-agonister eller antagonist, eller sammensetninger omfattende disse kan bli administrert alene eller som del av et farmasøytisk eller veterinærpreparat, eller som del av et profylaktisk preparat, med eller uten adjuvant. De kan bli administrert ved parenterale eller orale ruter. For eksempel kan de bli administrert ved orale, pulmonare, nasale, aurale, anale, dermale, okulare, intravenøse, intramuskulære, intraarterielle, intraeutoneale, mukosale, sublinguale, subkutane, transdermale, topiske eller intrakranielle ruter, eller inn i munnhulen. I enten farmasøytiske eller veterinærapplikasjoner kan TWEAK-agonister eller antagonist bli topisk administrert til enhver epitelial overflate. Slike overflater innbefatter orale, okulare, aurale, anale og nasale overflater. Farmasøytiske sammensetninger kan bli fremstilt ved hjelp av konvensjonell blanding, oppløsning, granulering, dragé-dannelse, levigaterende, emulgerende, innkapslende, innfangende eller frysetørkende prosesser.

Farmasøytiske sammensetninger for anvendelse i samsvar med foreliggende oppfinnelse kan bli formulert på en konvensjonell måte ved å bruke ett eller flere fysiologiske akseptable bæremidler omfattende eksipienser og hjelpestoff som

letter prosessering av de aktive forbindelser til pre-parater som kan bli brukt farmasøytisk. Den passende formulering vil avhenge av den tiltenkte administrasjonsrute.

For transmukosal administrasjon blir penetreringsmidler som er passende for barrieren som skal trenge gjennom bli brukt i formuleringen. Slike penetreringsmidler er generelt kjent innen faget. For okular administrasjon blir suspensjoner i en passende fysiologisk saltvannsoppløsning bli brukt, slik som det er kjent innen faget.

For oral administrasjon kan TWEAK-agonistene eller antagonistene bli formulert lett ved å kombinere de aktive midler med konvensjonelle farmasøytiske akseptable bærematerialer. TWEAK-agonister eller antagonister kan bli formulert som tabletter, piller, liposomer, granuler, sfærer, drageer, kapsler, væsker, geler, siruper, oppslemminger, suspensjoner og lignende for oralt inntak av en pasient som skal behandles.

TWEAK-agonister eller antagonister, eller sammensetninger omfattende disse kan også omfatte ethvert konvensjonelt bæremiddel eller adjuvant benyttet i farmasøytiske eller veterinærpreparater. Disse bæremidler og adjuvanter innbefatter for eksempel Freunds adjuvant, ionebyttere, alumina, aluminiumstearat, lecitin, buffersubstanser så som fosfater, glysin, sorbinsyre, kaliumsorbat, delvise glyseridblandinger av mettede vegetabiliske fettsyrer, vann, salter eller elektrolytter så som protaminsulfat, dinatriumhydrogenfosfat, natriumklorid, sinksalter, kolloidal silika; magnesium, trisilikat, cellulosebaserte substanser og polyetylglykol. Adjuvanter for topiske- eller gel-baseformer kan for eksempel innbefatte natriumkarboksymetylcellulose, polyakrylater, polyoksyetylenpolyoksypropylenblokk polymerer, polyetylglykol og trevoksalkoholer.

Farmasøytiske sammensetninger for oralt bruk kan bli oppnådd som en fast eksipient, eventuelt ved å male en resulterende blanding, og prosessere blandingen av granuler etter å ha tilsatt egnede hjelpestoffer, om ønsket, for å oppnå tabletter eller dragékjerner. Passende eksipienser innbefatter fyllmidler så som sukker, innbefattende laktose, sukrose, mannitol eller sorbitol; cellulosepreparater så som for eksempel maisstivelse, hvetestivelse, risstivelse, potetstivelse, gelatin, gummitragakant, metylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, natriumkarboksymetylcellulose og/eller polyvinylpyrrolidon (PVP). Om ønsket kan disinte-

grasjonsmidler bli tilsatt så som fornettet polyvinylpyrrolidon, agar eller algininsyre eller et salt derav så som natriumalginat.

Dragékjerner blir fremskaffet med egnede belegg. For dette formål kan konsentrerte sukkeroppløsninger bli brukt som eventuelt kan inneholde gummiarabikum, talk, polyvinylpyrrolidon, karbopolgel, polyetylenglykol og/eller titandioksid, lakkoppløsninger og egnede organiske oppløsningsmidler eller oppløsningsmiddelblandinger. Fargestoffer eller pigmenter kan bli tilsatt til tablettene eller dragébeleggende for identifikasjon eller for å karakterisere forskjellige kombinasjoner av aktive forbindelsesdoser.

Farmasøytiske sammensetninger som kan bli brukt oralt innbefatter press-tilpassede kapsler laget av gelatin, så vel som myke, forseglede kapsler laget av gelatin og et plastifiseringsmiddel, så som glyserol eller sorbitol. Presstilpasningskapslene kan inneholde aktive bestanddeler i blanding med fyllmaterialer så som laktose, bindemidler så som stivelser og/eller smøremidler så som talk eller magnesiumstearat og, eventuelt stabilisatorer. I myke kapsler kan de aktive forbindelser være oppløst eller suspendert i passende væsker så som fettoljer, flytende parafin eller flytende polyetylenglykoler. I tillegg kan stabilisatorer bli tilsatt. Alle sammensetninger for oral administrasjon bør være i doser som er egnet for slik administrasjon.

For bukal administrasjon kan sammensetningene ta form av tabletter eller sugetabletter formulert på konvensjonell måte.

For administrasjon ved inhalering blir TWEAK-agonister eller antagonister passende avlevert i form av en aerosolspraypresentasjon fra trykksatte pakker eller en nebulisator, ved bruk av et egnet middel, for eksempel diklordifluormetan, triklorfluormetan, diklortetrafluoretan, karbondioksid eller annet egnet gass. I tilfelle med en aerosol som står under trykk kan doseringsenheten bli bestemt ved å tilføre en ventil eller avlevere en tilmålt mengde. Kapsler og patroner av for eksempel gelatin for anvendelse i en inhalator eller insufflator kan bli formulert inneholdende en pulverblanding av forbindelsen og en egnet pulverbase så som laktose eller stivelse.

TWEAK-agonister eller antagonister kan bli formulert for enten parenteral administrasjon ved injeksjon, for eksempel ved bolus injeksjon, eller kontinuerlig infusjon. Midlene kan bli formulert i vandige oppløsninger, vandige suspensjoner,

oljeholdige suspensjoner, eller emulsjoner, og kan inneholde formulatoriske midler så som suspenderende, stabiliserende og/eller dispergerende midler. Formuleringer for injeksjon kan bli presentert i enhetsdoseform, for eksempel i ampuller eller multidosebeholdere, med et tilsatt preservativ.

Typiske vandige oppløsningsformuleringer innbefatter fysiologisk kompatible buffere så som Hanks-oppløsning, Ringers-oppløsning, eller fysiologisk saltvannbuffer. Typiske oljeholdige suspensjoner kan innbefatte lipofile oppløsningsmidler eller vehikler som inkluderer fettoljer så som sesamolje, eller syntetiske fettsyreesterer, så som etyloleat eller triglyserider, eller liposomer. Vandige injeksjonssuspensjoner kan inneholde substanser som øker viskositeten av suspensjonen, så som natriumkarboksymetylcellulose, sorbitol, eller dekstran. Eventuelt kan suspensjonene også innholde passende stabilisatorer eller midler som øker oppløseligheten av forbindelsene for å tillate fremstilling av høyt konsentrerte oppløsninger. Alternativt kan TWEAK-agonister eller antagonister være i pulverform for konstitusjon med en egnet vehikkel, så som sterilt pyrogenfritt vann, før bruk.

TWEAK-agonistene eller antagonistene kan også bli formulert i rektale sammensetninger, så som suppositorier eller retensjonsskylninger, for eksempel inneholdende konvensjonelle suppositoriumbaser så som kokossmør eller andre glyserider.

I tillegg til formuleringene som er beskrevet, kan TWEAK-agonister eller antagonister også bli formulert som et depot preparat. Slike langt virkende formuleringene kan bli administrert ved implantasjon (for eksempel subkutan eller intramuskulært) eller ved intramuskulær injeksjon. Således kan for eksempel forbindelsene bli formulert med passende polymere eller hydrofobe materialer (for eksempel en emulsjon i en akseptabel olje) eller ionebytteresiner, eller som sparsomt oppløselige derivater, for eksempel som et dårlig oppløselig salt.

Et farmasøytisk bæremateriale for TWEAK-agonister eller antagonister som er hydrofobe er et ko-oppløsningsmiddelsystem omfattende benzylalkohol, en ikke-polar surfaktant, en vannblandbar organisk polymer, og en vandig fase. Ko-oppløsningsmiddelsystemet kan være VPD-ko-oppløsningsmiddelsystemet. VPD er en oppløsning av 3 % vekt/volum benzylalkohol, 8 % vekt/volum av den ikke-polare surfaktant polysorbat 80, og 65 % vekt/volum polyetylenglykol 300, gjort opp til volum i absolutt etanol. VPD-ko-oppløsningsmiddelsystemet (VPD:5W) består av VPD fortynnet 1:1 med 5 % dekstrose i vannoppløsning. Dette ko-

oppløsningsmiddelsystem oppløser også hydrofobe forbindelser, og gir i seg selv lav toksisitet ved systemisk administrasjon. Naturligvis kan andelene av et ko-oppløsningsmiddelsystem bli variert i vesentlig grad uten å ødelegge dets oppløselighet og toksisitets karakteristika. Videre kan identiteten av ko-oppløsningsmiddelkomponentene bli variert: for eksempel kan andre lav toksisitets ikke-polare surfaktanter bli brukt istedenfor polysorbat 80; fraksjonsstørrelsen av polyetylenglykol kan bli variert; andre biokompatible polymerer kan erstatte polyetylenglykol, for eksempel polyvinylpyrrolidon; og andre sukkerarter eller polysakkarider kan bli skiftet ut for dekstrose.

Alternativt kan andre avleveringssystemer for hydrofobe farmasøytisk forbindelser bli benyttet. Liposomer og emulsjoner er eksempler på avleveringsvehikler eller bærematerialer for hydrofobe medikamenter. Visse organiske oppløsningsmidler, så som dimetylsulfoksid kan også bli benyttet, selv om de kan oppvise en større toksisitet.

I tillegg kan TWEAK-agonister eller antagonister bli avlevert ved å bruke et vedvarende frigjøringsystem, så som semipermeable matrikser av faste hydrofobe polymerer inneholdende det terapeutiske middel. Forskjellige vedvarende frigjørende materialer er tilgjengelige og velkjent av fagpersonen. Kapsler med vedvarende frigjøring kan avhenge av deres kjemiske natur, frigjøre forbindelsene over et par uker opp til over 100 dager.

Avhengig av den kjemiske natur og den biologiske stabilitet av TWEAK-agonisten eller antagonisten kan ytterligere strategier for proteinstabilisering bli benyttet.

De farmasøytiske sammensetningene kan også omfatte egnede faste eller gelfasebærere eller eksipienter. Eksempler på slike bærere eller eksipienter innbefatter, men er ikke begrenset til kalsiumkarbonat, kalsiumfosfat, forskjellige sukkerarter, stivelser, cellulosederivater, gelatin, og polymerer så som polyetylenglykoler.

TWEAK-agonister eller antagonister kan bli tilsatt som salter med farmasøytisk compatible motioner. Farmasøytisk compatible salter kan bli dannet med mange syrer, innbefattende men er ikke begrenset til salt, svovel, eddik, melke, vin, eple, rav, etc. Salter har en tendens til å være mer oppløselige i vandige eller andre protoniske oppløsningsmidler enn de tilsvarende frie baseformer er.

TWEAK-agonister eller antagonister kan også bli formulert til farmasøytiske sammensetninger som er anvendelige for å belegge stenter, til behandling av de TWEAK-relaterte hjertesykdommer.

Foreliggende oppfinnelse angår også å identifisere en TWEAK-agonist eller antagonist. Slike TWEAK-agonister eller antagonister er anvendelige for å behandle TWEAK-relaterte tilstander, det vil si sykdommer, skadetilstander eller andre patologiske tilstander hos vev hvor en reseptor for TWEAK, for eksempel FN14 blir uttrykt. Disse tilstander innbefatter fibrose og sykdommer i hjertet (for eksempel kardiomyopater), nyre, lunge, lever, hud, skjelettmuskel, lipidmetabolisme (for eksempel fedme), magetarmkanaler, pankreas, reproduksjonsorganer, nervevev (innbefattende neurodegenerering), brusk, ben og bindevev. Slike TWEAK-agonister eller antagonister er også anvendelige for å fremme vevserstatning ved å modulere oppførselen av progenitorceller *in vivo* eller *in vitro* i henhold til foreliggende oppfinnelse.

En utførelsesform for å identifisere en TWEAK-antagonist omfatter trinnene å: 1) eksponere et transgent forsøksdyr som uttrykker et eksogent DNA som koder for et TWEAK-polypeptid, eller et fragment, analog, mutein, eller hermer derav, for en forbindelse som er en mulig TWEAK-antagonist; 2) sammenligne de fibrotiske, hjerte, nyre, lever, lunge, hud, skjelettmuskel, lipid, magetarmkanal, pankreas, reproduksjonsorganer, nerve, brusk, ben eller bindevev fra det transgene forsøksdyr med samme organ eller vev fra et referansedyr som uttrykker det eksogene DNA, men ikke ble eksponert til forbindelsen; og 3) bestemme hvor vidt forbindelsen har påvirket det fibrotiske, hjerte, nyre, lever, lunge, hud, skjelettmuskel, lipid, magetarmkanal, pankreas, reproduksjonsorganer, nerve, brusk, ben eller bindevev. I en annen utførelsesform er det transgene forsøksdyr enten et pattedyr eller et ikke-pattedyr, som beskrevet heri.

De transgene dyr beskrevet heri uttrykker eksogene DNA som koder for TWEAK-polypeptider, hvor ekspresjonen resulterer i en TWEAK-relatert tilstand. I eksemplene ble transgene mus dannet som uttrykker eksogene TWEAK-proteiner i enten en avkortet, oppløselig form eller i fullengde membran bundet form. Musene som uttrykker de eksogene TWEAK-proteiner viste fenotyper som innbefatter ikke-inflammatorisk dilatert kardiomyopati, kongestiv hjertesvikt, lever epitelial cellehyperplasi, hepatocyt vakuolering, leverskade og inflammatoriske nyretilstander, så som multifokal inflammasjon, ikke-inflammatoriske nyretilstander, så som tubulær nefropati, cyster, glomerulær nefropati, nyretubulær

hyperplasi, nyrefibrose og inflammatoriske lungetilstander. Videre viste villtype mus som ble infisert med virale vektorer som uttrykker eksogene TWEAK-proteiner duktal hyperplasi, hepatocyttød, leverfibrose og leverskade.

Ved å ha disse dyr for hånden, har fagpersonen en kraftig metode for medikament-opptagelse. Spesifikt representerer dyrene som uttrykker eksogene TWEAK-proteiner et modellsystem for å oppdage TWEAK-agonister eller antagonister som er anvendelige for forebygging eller behandling av de TWEAK-relaterte tilstander beskrevet heri.

I foretrukne utførelsesformer er dyrene som er anvendelige i disse modellsystemer enten pattedyr eller ikke-pattedyr. I mer foretrukne utførelsesformer, er pattedyrene mus, rotter, hamstrer, kaniner, hunder, katter, kyr, griser, geiter, hester, sau, marsvin og primater. I andre mer foretrukne utførelsesformer, er ikke-pattedyr dyrene fugler, fisk, amfibier, insekter, og virvelløse dyr.

Det eksogene DNA som koder for TWEAK-polypeptidet uttrykkes i de transgene dyr via ekspresjonskontrollsekvenser som kontrollerer ekspresjonen av det eksogene DNA i dyret. Ekspresjonskontrollsekvenser som kontrollerer transkripsjon innbefatter, for eksempel promoterer, forsterkere transkripsjonstermineringsseter, locus-kontrollområder, RNA-polymerase prosessivitetssignaler, og kromatin remodelerende elementer. Ekspresjonskontrollsekvenser som kontrollerer post-transkripsjonelle hendelser innbefatter spleisedonor og akseptorseter og sekvenser som modifierer halveringstiden av det transkriberte RNA, for eksempel sekvenser som dirigerer poly(A)-tilsetning eller bindingsseter for RNA-bindende proteiner. Ekspresjonskontrollsekvenser som kontrollerer translasjon innbefatter ribosom-bindende seter, sekvenser som dirigerer målrettet ekspresjon av polypeptidet til eller innen spesielle cellerom, og sekvenser i de 5'- og 3'-utranslaterte områder som modifierer hastigheten eller effektiviteten av translasjon.

Foretrukne ekspresjonskontrollsekvenser for TWEAK-ekspresjon i de transgene dyr innbefatter virale elementer som dirigerer høye nivåer av proteinekspresjon, så som promoterer og/eller forsterkere avledet fra retrovirale LTRs, cytomegalovirus (CMV) (så som CMV-promoter/forsterker), Simian Virus 40 (SV40) (så som SV40-promoter/forsterker), adenovirus, (for eksempel adenovirus senhovedpromoter (AdMLP)), polyoma og sterke pattedyrpromotere så som native immunoglobulin og aktinpromotere. I en utførelsesform blir det DNA som koder for et TWEAK-polypeptid drevet av alfa1 anti-trypsin (AAT)-promoter. For videre beskrivelse av

virale ekspresjonskontrollelementer, og sekvenser derav, se for eksempel US patenter 5,168,062; 4,510,245; og 4,968,615.

Det eksogene DNA kan også bli uttrykt i de transgene dyr fra vevsspesifikke ekspresjonskontrollelementer, innbefattende promotorer. Vevsspesifikke ekspresjonskontrollelementer er kjent innen faget. Ikke-begrensede eksempler på egnede vevsspesifikke promotorer innbefatter den lever-spesifikke albuminpromoter (Pinkert *et al.*, *Genes Dev.* 1:268-277 (1987)), lymfoid-spesifikke promotorer (for eksempel Calame og Eaton, *Adv. Immunol.* 43:235-275 (1988); Winoto og Baltimore, *EMBO J.* 8:729-733 (1989); Banerji *et al.*, *Cell* 33:729-740 (1983); og Queen og Baltimore, *Cell* 33:741-748 (1983); neuron-spesifikke promotorer (for eksempel, Byrne og Ruddel *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477 (1989)), pankreas-spesifikke promotorer (for eksempel Edlund *et al.*, *Science* 230:912-916 (1985)), bruskkjertel spesifikke promotorer (for eksempel amerikansk patent 4,873,316 og europeisk patentsøknad 264,166), og utviklingsregulerte promotorer (for eksempel Kessel og Gurss, *Science* 249:374-379 (1990); Campes og Tilghman, *Genes Dev.* 3:537-546 (1989)). Andre ikke-begrensede eksempler på vevsspesifikke promotorer innbefatter hjertevevspromoter α myosin tungkjede-promoter (α MHC), hudvevspromoter keratin-14(K14), lungevevspromoter surfaktant protein C (SPC), og nyrevevspromoterer Ksp-kadherin og nyreandrogen-regulert protein (KAP). Det eksogene DNA kan også bli uttrykt fra en induserbar eukaryotpromoter, så som metallotioninpromoter (MT), eller andre induserbare eukaryotpromoterer som er kjent innen faget.

I en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse kan TWEAK-polypeptidet uttrykke i de transgene dyr være et fullengdet TWEAK-polypeptid. I en annen utførelsesform er polypeptidene uttrykt i de transgene dyr fragmenter av TWEAK-polypeptidet. I en foretrukket utførelsesform er TWEAK-polypeptidfragmentene oppløselige TWEAK-polypeptider.

I en annen utførelsesform angår oppfinnelsen transgene dyr som uttrykker et eksogent DNA, som koder for et TWEAK-polypeptid i et vev valgt fra gruppen bestående av: hjerte; blod; blodkar; lunger; lever; nyre; hjerne; placenta; skjelettmuskel; pankreas; milt; lymfe; tymus; blindtarm, perifer blodlymfocyt; magetarmkanal; neuroner; hud; adipocyt; brusk; ben; bindevev. I en utførelsesform blir TWEAK DNA-materiale uttrykt fra en konstitutiv promoter. I en annen utførelsesform blir DNA-materialet uttrykt fra en induserbar promoter. I en annen utførelsesform blir DNA-materialet uttrykt fra en vevsspesifikk promoter.

Foreliggende oppfinnelse angår også å identifisere TWEAK-agonistforbindelser som kan virke som terapeutiske midler for behandling av TWEAK-relaterte tilstander eller for å fremme vevserstatning ved å modulere oppførselen av progenitorceller *in vivo* eller *in vitro* i henhold til foreliggende oppfinnelse. Aktuelle agonistforbindelser kan bli administrert til normale dyr og deres effekt på organsystemer bli undersøkt. Fibrotisk materiale, hjerte, lever, nyre, lunge, hud, skjelettmuskel, lipid, magetarmkanal, pankreas, reproduksjonsorganer, neuralt, brusk, ben eller bindevev fra det behandlede dyr blir så sammenlignet med det samme vev fra et ubehandlet dyr, og det blir derved bestemt hvor vidt forbindelsen har induisert en biologisk effekt i noen av nevnte vev.

Foreliggende oppfinnelse angår også å identifisere TWEAK-regulerte gener som kan virke som terapeutiske mål for behandling av TWEAK-relaterte tilstander. For eksempel kan RNA-profilering bli utført i TWEAK-transgene dyr i forhold til normale dyr i forskjellig vev og medikamentmål således blir identifisert.

Det er et ytterligere mål for oppfinnelsen å påvirke progenitorstamcelleproliferasjon eller differensiering, innbefattende den hos mesenchymale stamcelletyper som gir opphav til muskelceller, brusk, ben eller bindevevs celletyper så som stromalceller, fibroblaster, adipocytter og dermalceller. Det er også et mål for oppfinnelsen å påvirke den proliferative eller differensierende egenskap hos ovalceller, som kan gi opphav til biliære epitelialceller eller hepatocytter og nyreprogenitorer, som kan gi opphav til tubulært epitel.

Eksempler

For at foreliggende oppfinnelse kan bli bedre forstått, er de følgende eksempler presentert. Disse eksempler er for illustrasjonsformål alene og skal ikke bli betraktet som begrensende for omfanget av oppfinnelsen på noen måter.

Eksempel 1

Dannelse av TWEAK-transgene mus

For å identifisere målorgen(er) for TWEAK-aktivitet og de biologiske konsekvenser av TWEAK-signalisering *in vivo*, ble to murine TWEAK-ekspresjonskonstruksjoner dannet og brukt for overekspresjonen av TWEAK-peptider i normale (C57B1/6 x DBA/2)F1 og (C57B1/6 x SJL/J)F2-mus ved å bruke standard transgene teknikker.

R. S. Williams og P. D. Wagner, *J. Applied Physiology* 88:1119-1126 (2000). TWEAK-ekspresjonskonstruksjonene som ble benyttet var som følger: (1) Et TWEAK-cDNA fra aminosyrer 101-249 av SEKV. ID NR:1, som koder for en oppløselig form av murin TWEAK (betegnet sTWEAK) nedstrøms for en murin IgG-signalsekvens ble satt inn i CH269-ekspresjonsvektoren (et derivat av vektor PCDEP4 (Invitrogen) som inneholder SV40 poly A-addisjonssekvensen) nedstrøms for den human alfa1 anti-trypsin (AAT) promoter og et beta-globin intron og oppstrøms for det humane veksthormon (hGH) poly A-sekvens; og (2) Et cDNA som koder for fullengdet transmembranform av proteinet (betegnet FL-TWEAK) som tilsvarer aminosyrer 1-249 av SEKV. ID NR:1 ble satt inn i pBlueScript-ekspresjonsvektoren (som beskrevet i Desplat-Jego *et al.*, *J. Neuroimmunology* 133:116-123 (2002)) inneholdende SV40 poly A-addisjonssete. FL-TWEAK-sekvensen pluss poly A-addisjonssete ble så isolert og klonet i en annen vektor; et fragment inneholdende ApoE-forsterker-human AAT promoter regulatorisk område ble så satt i oppstrøms for å danne ekspresjonsvektoren CA300. AAT-promoteren har blitt vist å dirigere transkripsjon i hovedsak i lever og ved lavere nivåer i andre vev innbefattende nyre. P. Koopman *et al.*, *Genes Dev.* 3:16-25 (1989).

For sTWEAK-transgenkonstruksjonen, ble 23 uavhengig transgene grunnleggende dyr identifisert med hale DNA PCR ved å bruke prober som tilsvarer sekvensen av nukleotider 468 til 488 (5'-primer) og den komplementære kjedesevens for nukleotider 693 til 713 (3'-primer) av SEKV. ID NR:2. I tillegg viste et serum ELISA for TWEAK at 10 av disse 23 grunnleggende dyr har påviselige nivåer av TWEAK i sitt serum, i området fra 0,06-3,0 mikrogram per ml. De gjenværende 13 grunnleggende dyr hadde ingen påviselig serum TWEAK, det vil si < 10 ng/ml. Ni av de 10 PCR+, serum TWEAK+ grunnleggende dyr startet å oppvise dårlig helse ved omtrent 4-5 måneders alder. Vekt tap, krumholdning, matt pels og bulende øyne ble observert. Fem av disse grunnleggende dyr døde uventet og følgelig ble de gjenværende fire som viste tegn på sykdom avlivet med tegn på dårlig helse. I motsetning til dette oppviste kun 1 av 13 PCR+ serum negative grunnleggende dyr dårlig helse eller døde. I tillegg oppviste 0 av 4 PCR negative dyr fra samme kull dårlig helse/døde.

For den FL-TWEAK transgene konstruksjon, ble to uavhengige transgene grunnleggende dyr identifisert med hale DNA PCR og Northern blott analyse for TWEAK mRNA-ekspresjon i levervev. I tillegg vist et serum ELISA for TWEAK at ingen av disse to grunnleggende dyr hadde påviselige nivåer av TWEAK i sitt

serum, det vil si med mindre enn 10 nanogram/ml. FL-TWEAK Tg grunnlegger mus oppviste ikke en klinisk observerbar fenotype.

Eksempel 2

Overekspresjon av TWEAK i mus infisert med en adenoviral vektor som avleverer et eksogent DNA som koder for sTWEAK

For å identifisere de biologiske effekter av overekspresjon av TWEAK *in vivo*, ble 8-10 uker gamle C57BL/6 voksne hunnmus infisert med en replikasjonsdefektiv adenoviral vektor med en cytomegalovirus (CMV) promoter som driver cDNA for enten murin sTWEAK ("Adeno-TWEAK") eller grønt fluorescent magnetprotein ("GFP") ved å bruke standard adenovirale teknikker som beskrevet i Tao *et al.*, *Molecular Therapy* 3:28-35 (2001). En adenoviral vektor omfattende GFP ("Adeno-GFP") ble brukt som negativ kontroll. For å bestemme hvor vidt mus var korrekt infisert med Adeno-TWEAK-konstruksjonen, ble TWEAK-proteinnivåer i serumet bestemt og overvåket ved forskjellige tidspunkter ved å bruke standard ELISA-assays.

Systemisk overekspresjon av murin sTWEAK i de voksne mus induserte vevsendringer i minst tre hovedorganer: lever, nyre og hjerte. Se tabell 1. Fenotypene av disse adenoviralkonstruksjons uttrykkende mus ble sammenlignet med fenotypene av TWEAK-Tg-mus fra eksempel 1 i tabell 1. Disse observasjoner er diskutert i større detalj i de følgende eksempler nedenfor.

Tabell 1: TWEAK-overekspresjon inducerer vevsremodulering i voksne mus

Organ	Fenotype	TWEAK Tg	Adeno-TWEAK i voksne mus	Adeno-GFP i voksne mus
Lever	Gallegang hyperplasi	+	+	-
	Hepatocyttdød	-	+	-
Nyre	Tubulær hyperplasi	+	+	-
Hjerte	Dilatert kardiomyopati	+	+	-

Eksempel 3

sTWEAK og FL-TWEAK inducerer dilatert kardiomyopati

Fire av de overlevende PCT+ serum sTWEAK+ grunnleggende dyr fra eksempel 1 ble avlivet og undersøkt for morfologiske abnormaliteter. Se tabell 2. Makroskopisk observasjon ved tidspunkter for nekropskopi viste forstørrede hjerter, enkelte 2-3 ganger forstørret i størrelse i forhold til dem hos normale dyr. Siden det forstørrede hjertefenotype ble observert i flere uavhengig sTWEAK-transgene grunnleggende dyr, er det svært usannsynlig at dette er grunnet uavhengige innsetningshendelser. Videre viste en analyse av serumet i kjemien av de sTWEAK-transgene mus øket hjerte spesifikt kreatinkinase.

Tabell 2: sTWEAK-transgene mus

OPPHAV	SERUM TWEAK	FENOTYPE
10 PCR+	0,06-3,0 µg/ml	9/10 døde ved 4-5 måneder 4/5 utsatt for histopatologisk undersøkelse hadde forstørret hjerte
13 PCR+	< 10 ng/ml	1/13 døde ved 6 måneder med forstørret hjerte
4PCR-	---	0/4 døde ved 6 måneder

Den forstørrede hjertefenotype ble også observert i individuelle mus fra en FL-TWEAK tansgen linje som ble etablert via suksessiv tilbakekrysning på C57BL/6-stammen. Se tabell 3. De FL-TWEAK transgene, negative dyr fra samme kull viste ingen hjerteabnormaliteter.

Tabell 3: FL-TWEAK transgene mus

Individer	Serum TWEAK	Fenotype
7 PCR+	---	7/7 viste forstørrede hjerter ved 5 mnd
4 PCR-	<10 ng/ml	0/4 døde ved 5 mnd

Tatt sammen indikerer disse data sterkt at den forstørrede hjertefenotype er TWEAK-avhengig.

Histopatologisk analyse av hjertene fra de sTWEAK transgene dyr og FL-TWEAK transgene mus viste lignende funn. Laveffektsmikroskopi av et FL-TWEAK transgent hjerte ("Tg") i forhold til et normalt hjerte fra et transgent, negativt ("NTg") dyr fra samme kull er vist i figur 1. Det FL-TWEAK transgene hjerte som er vist er også representativt for TWEAK transgene hjerter fra sTWEAK transgene mus (PCR+, serum TWEAK+). De transgene hjerter oppviste dilatert kardiomyopati særpregget ved utvidelse av ventriklene og atriene. Konsistent med denne defekt ble atriell og ventrikulær trombose hos mange av dyrene funnet (figur 1). Analyse av lunge- og levervev viste tilstopning av blodkarene i enkelte dyr.

Høyere forstørrelsesmikroskopi viste andre histopatologiske funn i hjerte innbefattende myokardiocyt hypertrofi og karyomegali. Bemerkelsesverdig viste den histopatologiske analyse av ventriklene i TWEAK transgene mus ingen tegn på inflammasjon. Følgelig er den observerte TWEAK-relaterte kardiomyopati ikke-inflammatorisk av natur.

Kjemisk serumanalyse av terminale tapninger fra sTWEAK transgene mus (3 grunnleggende dyr og 1 avkommas) viste abnormt høye nivåer av kreatinkinase (CK), spesielt i hjerte (det vil si MB-typen av CK), noe som bekrefter et signifikant nivå av hjertestress/skade.

C57BL/6 hunnmus 8-10 uker gamle infisert med Adeno-TWEAK (se eksempel 2) viste dilatert kardiomyopati som opptrådte tre uker etter infeksjon i forhold til mus infisert med det negative kontroll Adeno-GFP-virus. I TWEAK-infiserte mus var hjertene særpregget av utvidede kammere som vist ved histopatologi (figur 2).

Tatt sammen ble TWEAK vist å spille en kritisk rolle i kardiomyopati, innbefattende dilatert kardiomyopati og kongestiv hjertesvikt (CHF).

Eksempel 4

TWEAK forårsaker leverepitelial cellehyperplasi, hepatocytt vakuolering, hepatocellulær død, galleganghyperplasi, leverfibrose og leverskade

En rolle for TWEAK i leverepitelial hyperplasi og hepatocytt vakuolering ble vist i sTWEAK og FL-TWEAK transgene mus så vel som skade i villtypemus infisert med et adenovirus som inneholder et DNA som uttrykker et sTWEAK polypeptid.

Leverne fra TWEAK Tg-mus fra eksempel 1 viste vesentlig gallegang og ovalcellehyperplasi ved 2 ukers alder i forhold til NTg-mus. Se figur 3. Som vist i tabell 4 viste selv ved serum TWEAK-nivåer <10 ng/ml leverne av to FL-TWEAK transgene mus grunnleggende dyr mild gallegang og ovalcellehyperplasi. FL-TWEAK transgene mus tilbakekrysset i C57BL/6 bakgrunnen viste vesentlig gallegang og ovalcellehyperplasi (tabell 4).

Tabell 4: FL-TWEAK transgene mus

Mus	Serum TWEAK	Fenotype
2 grunnleggende dyr	<10 ng/ml	Mild gallegang og ovalcellehyperplasi
1 grunnleggende dyr tilbakekrysset til C57BL/6	---	Fremstående gallegang og ovalcellehyperplasi

På lignende måte viste sTWEAK transgene grunnleggende dyr som har TWEAK serumnivåer mellom 0,2 og 3,0 µg/ml vesentlig gallegang og ovalcellehyperplasi (tabell 5).

Tabell 5: sTWEAK transgene mus

Mus	Serum TWEAK	Fenotype
9 grunnleggende dyr	0,2 – 3,0 µg/ml	Fremstående gallegang og ovalcellehyperplasi
1 grunnleggende dyr	0,06 µg/ml	Mild gallegang og ovalcellehyperplasi

Denne galle- og ovalganghyperplasi ble bekreftet ved immunohistokjemisk (IHC) farging av FL-TWEAK Tg-leversnitt tatt fra Tg-musene i eksempel 1 med A6 mAb,

som skiller galleepitelceller og ovalceller fra hepatocytter (Engelhardt et al., *Differentiation* 45:29-37 (1990)). Figur 4 viser en økning i A6-positive celler som er assosiert med portalområder så vel som utvidet til leverparenchyma i FL-TWEAK Tg i forhold til NTg-mus. Høyere forstørrelse av et hematoksylin- og eosinfarget snitt fra en FL-TWEAK Tg-mus viser også klart en markert økning i tilstedeværelsen av ovalceller ved siden av gallegangene i portalområdet (figur 5). Immunihistokjemi for det prolifererende celle kjerneantigen (PCNA) bekreftet en øket frekvens av prolifererende galle- og ovalceller i TWEAK Tg-mus i forhold til NTg-mus så tidlig som ved 2 ukers alder. Ved senere tidspunkter ble en økning i frekvens av prolifererende hepatocytter i TWEAK Tg-mus i forhold til NTg-mus observert, det vil si mellom 8 ukers og 7 måneders alder (ikke vist). Videre induerte både FL-TWEAK og sTWEAK hepatocellulær vakuolisering i 7 måneder gamle Tg-mus fra eksempel 1 i forhold til NTg-dyr fra samme kull (figur 6).

C57BL/6 og BALB/c SCID-mus på 8-10 ukers alder som overuttrykker sTWEAK ved å bruke Adeno-TWEAK-viruset som i eksempel 2 viste vesentlige serum TWEAK-nivåer. Se figur 7 som viser effekten av å tilføre forskjellige doser av adenovirus på de målte serum TWEAK-nivåer. Mus ble infisert med enten 10^{11} partikler av adenovirus pr. mus intravenøst (representert av "B"-linjen), 10^{10} partikler av adenovirus pr. mus intravenøst (representert av "J"-linjen) eller 10^{11} partikler av adenovirus pr. mus intramuskulært (representert av "H"-linjen). De Adeno-sTWEAK-infiserte mus viste leverskade med serumgulsott observert på dag 3 og 7 i C57BL/6 musbakgrunnen og på dager 3 og 4 av BALB/c SCID musbakgrunnen. Enkelte av BALB/c SCID musene døde på dag 4.

Videre utviklet Adeno-sTWEAK-infiserte C57BL/6-mus som beskrevet i eksempel 2, også hepatocellulær død som opptrådte så tidlig som 2-3 dager etter administrering, som vist av det høye nivå av aspartat aminotransferase ("AST") og alanin aminotransferase ("ALT") leverenzymmarkører i TWEAK-infiserte leverer (Adeno-sTWEAK) i forhold til kontroll GFP-infiserte leverer (Adeno-GFP) ved dag 3 (se tabell 6 og figur 8). På dag 7 etter infeksjon steg begge leverenzymene også i de Adeno-GFP-behandlede mus, slik som ville være forventet grunnet inflammasjonen induert av adenovirusvektoren alene. Hepatocyttdød forekom også i TWEAK-infiserte leverer, som vist av den histologiske morfologi karakterisert av opprundede hepatocytter og innskrumpede, pyknotiske, intenst eosinofile "Councilman legemer" som inneholder fragmenterte kjerner (figur 8). Adeno-sTWEAK-behandlede mus utviklet videre en sterk hyperplastisk ductal respons som nådde en topp på dag 7 etter infeksjon og fremdeles var lett synlig på dag 11 (figur 8). I de TWEAK-

infiserte leverer ble hyperplastiske strukturer observert som uttrykte A6-markøren som er spesifikk for galleepitel og ovalceller, som identifisert med lysfeltmikroskopi.

Tabell 6: Leverenzymverdier i Ad-TWEAK- og Ad-GFP-dyr

Adeno-GFP			Adeno-sTWEAK	
Dag	AST (U/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)
3	148	110	1715	672
7	2140	1545	1910	1194
11	2540	2304	795	508
20	683	420	451	320

Fn14, som er vist å være en cellulær TWEAK-reseptor, ble indusert etter eksponering til levertoksiner, så som galaktosamin (GalN) og karbontetraklorid (CCl₄). Figur 9 viser at Fn14 ikke er påviselig i normal voksen muselever som målt ved *in situ* hybridisering (ISH) ved å bruke en radiomerket probe for Fn14 og mørkfeltmikroskopi. Imidlertid blir Fn14 sterkt indusert etter CCl₄-skade. Lignende resultater ble oppnådd etter GalN-skade (ikke vist).

Adeno-TWEAK-infiserte C57BL/6-mus som beskrevet i eksempel 2, viste også oppregulering av Fn14 i hepatocytene og enkelte hyperplastiske strukturer, som observert i Adeno-sTWEAK-leverer i forhold til Adeno-GFP kontrollevere (data ikke vist).

Rollen til Fn14 ble videre vist i en gallegangmodell hvor leverskade i 10 uker gamle C57BL/6-mus ble indusert ved ligering av gallegangen som beskrevet av Liu et al., *Hepatology* 28: 1260-1268 (1999), Olynyc et al., *Am. J. Pathol.* 152: 347-352 (1998). Den vanlige gallegang ble ligert på dag 0 med kirurgi og fem C57BL/6-mus av 10 ukers alder ble så avlivet på dag 4 og dag 8 etter inngrep. Parafinsnitt av lever ble så fremstilt og ekspresjonen av TWEAK og Fn14 ble bestemt ved *in situ* hybridisering ved å bruke en radiomerket murin TWEAK og FN14 anti-sens-probe som omfatter det fullstendige FN14-gen. Som vist i figur 10 ble på dag 4, Fn14 uttrykt sterkt i biliære epitelialceller i galleganger, men ikke i hepatocytter. På dag 8 minsket Fn14-ekspresjonen i biliære epitelialceller i vesentlig grad, men var fremdeles påviselig ved lave nivåer i enkelte mus (data ikke vist). Imidlertid endret TWEAK-ekspresjonen seg ikke og var ikke påviselig i denne gallegang ligeringsmodell. Disse resultater viser at Fn14-ekspresjonen blir oppregulert i biliære

epitelialceller som svar på visse leverskader og spiller således en viktig rolle i leverfibrose.

Tatt sammen viser disse observasjoner at TWEAK er en viktig faktor i lever-epitelialcelle hyperplasi, hepatocyt vakuolering, leverskade, hepatocellulær død, galleganghyperplasi og leverfibrose.

Eksempel 5

FL-TWEAK og sTWEAK forårsaker nyresykdom

FL-TWEAK transgene mus fra eksempel 1 viste markert nyresykdom innbefattende mild multifokal inflammasjon, tubulær nefropati, cyster, glomerulær nefropati, tubular basofilia, tubular dilatasjon, tubulær vakuolering og hyalinvaskulering.

Adeno-TWEAK-infiserte C57BL/6 mus av 10 ukers alder som beskrevet i eksempel 2, viste glomerular nefropati og tubular hyperplasi i forhold til negative kontroll Adeno-GFP-infiserte mus. I tillegg ble en rolle for TWEAK i Alports syndrom vist ved øket Fn14-ekspressjon i en musemodell av Alports sykdom. Videre ble en rolle for TWEAK i nyrefibrose vist i den murine modell av unilateral ureteral obstruksjons-indusert nyrefibrose ved behandling med en TWEAK-antagonist.

Ekspansjonen av det kortikale interstitium er typisk grunnet ødem eller infiltrasjon med akutte eller kronisk inflammatoriske celler og fibrøst vev. FL-TWEAK transgene mus fra eksempel 1 viste tubular nefropati og mild, multifokal interstitiell inflammasjon. Mer spesifikt viste nyretverrsnitt som sammenligner en ikke-transgen mus med FL-TWEAK transgene mus uttalt tubular basofilia ved 8 ukers alder (figur 11, midtre panel).

Glomerular nefropati kan bli karakterisert ved en infiltrasjon av leukocytter, både neutrofile og monocytter samt proliferasjon av endoteliale, epiteliale og mesangiale celler. FL-TWEAK transgene mus som beskrevet i eksempel 1, viste markert glomerular nefropati som vist ved hypercellularitet av de mesangiale celler og hypertrofi av kapsulært epitel og mild kapsulær fortykning med basofilia av tilstøtende, tubulært epitel (figur 12). I tillegg viste FL-TWEAK transgene mus dilatering av det urinære rom som fører til dannelsen av glomerulære cyster med mild peri-glomerular fibrose (figur 11, nedre høyre panel), i forhold til normal murin glomerular morfologi (figur 11, øvre høyre panel).

Den tubulare basofilia som observeres i FL-TWEAK Tg-mus er indikatorisk for øket RNA i cytoplasma av disse tubulare celler, det vil si transkripsjonell aktivitet og en antydning om at disse var prolifererende celler. Prolifererende celle-kjerneantigen (PCNA)-farging bekreftet at det fantes et subsett av tubulære celler som prolifererer i nyrene hos TWEAK Tg-mus som beskrevet i eksempel 1, og at disse tilsvarte de basofile tubuler (figur 13). For å bestemme hvorvidt basofile tubuler var proksimale eller distale tubuler, ble tre serielle vevsnitt fra TWEAK Tg-mus farget (1) med hematoksylin og eosin (H&E) for å lokalisere de basofile tubuler, (2) med en lecitin som er spesifikt for proksimale tubuler (lecitin fra *T. Purpureas*) og (3) med et lectin som er spesifikt for distale tubuler. Figur 14 viser at de basofile (prolifererende) tubuler i TWEAK Tg-mus som beskrevet i eksempel 1, ikke uttrykker verken den proksimale eller distale, tubulare epitelialmarkør.

Tilstedeværelsen av prolifererende tubuler som mangler minst enkelte epiteliale markører i TWEAK Tg-musene er konsistent med en modell for tilfeller av nyreskade hvor celler avledet fra S3-segmentet av den proksimale tubul oppviser egenskaperene av progenitorceller, det vil si de starter å proliferere og uttrykke mesenchymalcellemarkører som er indikatorisk for dedifferensiering. Etterfølgende differensiering av disse celler kan spille en rolle i vevsreparasjon via regenereringen av nye tubuler (Witzgall et al., *J. Clin. Invest.* 93: 2175-2188 (1994)). Alternativt kan det være proliferering og differensiering av en preeksisterende progenitorpopulasjon som oppholder seg i S3-området.

Tilstedeværelsen av prolifererende celler som mangler enkelte epitelialmarkører i TWEAK Tg-mus er også konsistent med en modell for nyreutvikling hvor epitelialtubuler blir dannet fra mesenchymalprogenitorer som undergår differensiering for derved å oppnå epitelialmarkører og egenskaper som er karakteristiske for tubuler.

På lignende måte induserte infeksjon av 10 uker gamle C57BL/6-mus med et Adeno-sTWEAK-virus, som beskrevet i eksempel 2, glomerular nefropati og basofilia av det tubulare epitel så vel som sporadisk fortykning og hyperplasi av den glomerulære kapsel på dag 11 etter infeksjon (figur 15). Dette sto i motsetning til den normale histologi observert i de negative kontroll Adeno-GFP-infiserte mus. Videre var basofilia som er indikatorisk for epitelcelleproliferasjon, tydelig ved dag 3, men toppet seg omkring en uke etter administrasjon.

Konsistent med en rolle for TWEAK i nyresykdom ble TWEAK mRNA vist å bli uttrykt bredt i boksene C57BL/6 musenyrrer (figur 16) og Fn14 mRNA ble vist å bli uttrykt i de proksimale tubuler av den indre korteks/ytte medulla (figur 17), som vist ved *in situ* hybridisering (ISH) ved å bruke radiomerket TWEAK og Fn14-antisensprober og vist med mørkfeltmikroskopi. I tillegg ble Fn14 mRNA vist å bli induisert i nyrene hos musemodeller for Alport syndrom. Dette er vist i figur 18 ettersom grad av økning i Fn14 mRNA i to individuelle Alport mus i forhold til villtype dyr ettersom sykdom går fremover i Alport musene fra 4 til 7 ukers alder.

Rollen av TWEAK i en murin modell av Alport sykdom ble direkte undersøkt ved behandling med en TWEAK-antagonist, et murint Fn14-Fc-fusjonsprotein. To grupper av 5 Alport knockout (KO) mus fremstilt i henhold til Cosgrove *et al.*, *Genes Dev.* 10(23):2981-2992 (1996), ble behandlet med kontroll IgG2a (muP1.17), eller muFN14-Fc-fusjonsprotein (fremstilt av Biogen (Cambridge)). IgG2a-kontrollen som ble benyttet er det murine myelomprotein P1.17 dannet fra en hybridom og renses med standard mAb-opprenskningsprosedyre. muFN-14-Fc er et fusjonsprotein av det ekstracellulære domene av murin Fn14 og Fc-området av murin IgG2a. Fusjonsproteinet ble dannet enten i humane 193 embryone nyreceller eller i kinesisk hamster ovarier (CHO) celler og renses med standard mAb-opprenskningsprosedyrer. Den første behandling var ved tre ukers alder med en dose på 100 mikrogram protein via en intraperitoneal (IP) rute. Behandlinger fortsatt i de neste fire uker med den samme dose administrert to ganger per uke. Mus ble avlivet ved slutten av sjuende uke (7 uker gamle). Nyrrer ble kontrollert og støpt inn i parafin og frosset. Graden av nyrefibrose og inflammasjon ble verdsatt med glomerulær morfologi fra H&E-farging av parafinsnitt, aktivert myofibroblast med glatt muskel aktin farging, og aktiverte monocytter med CD11b-farging av frosne snitt. Glatt muskel aktin og CD11b fargede snitt ble brukt til å mengdebestemme positivt fargede områder for å vurdere utstrekningen av henholdsvis fibrose og inflammasjon, med MetaMorph computer programmet. Analyseresultater viser at helse av glomeruli i FN14-Fc behandlede mus var sterkt forbedret (59 % glomeruli med patologi i kontroll Ig behandlede i forhold til kun 39 % med patologi i Fn14-Fc behandlede, P-verdi = 0,03). Glomerulær sykdom er særpreget ved tilstedeværelse av halvmåner og/eller glomerulær fibrose. I tillegg var fibrose i de kortikale områder av nyren i behandlede mus vesentlig redusert som målt med alfa glattmuskel aktin farging, p-verdi = 0,04. Det fantes også en generell tendens til reduksjon av monocytinfiltrering i FN14-Fc behandlede mus. Disse resultater indikerer klart at FN14-Fc behandling av Alports mus reduserer fibrose i det kortikale område av nyren og forbedrer den generelle morfologi av glomeruli.

Rollen til TWEAK ble også undersøkt i den murine modell av unilateral ureteral obstruksjonsindusert nyrefibrose ved behandling med en TWEAK-antagonist, som er en hamster anti-TWEAK monoklonalt antistoff. I musemodellen for renal fibrotisk progresjon, blir et ureter ligatert, noe som resulterer i unilateral ureteral obstruksjon (UUO). (Klahr *et al.*, *Am J Kidney Dis* 18:689-699 (1991); Moriyama *et al.*, *Kidney Int* 54(1):110-119 (1998). UUO forårsaker progressiv nefrosklerose uten nesten avsluttende renal svikt hos mus fordi den utilstoppede nyre kan opprettholde relativt normal nyrefunksjon. Mens den tilstoppede nyre undergår rask global fibrose, undergår den utilstoppede nyre adaptiv hypertrofi.

Effekten av TWEAK-antagonist behandling på UUO-indusert renal fibrose ble mengdebestemt morfometrisk. Fire grupper av åtte virale antigenfri C57BL/6 hannmus (Jackson Laboratories, Bar Harbor ME), 8-10 ukers alder ble brukt. Musene ble oppdelt i de følgende grupper: PBS alene (VEH), kontrollhamster anti-nøkkelhul igle hemocyanin (KLH) antistoff (HA4/8; innkjøpt fra BD Biosciences (San Jose)), hamster antimus TWEAK-antistoff (AB.G11; fremstilt av Biogen (Cambridge)), oppløselig murin TGF- β -reseptor Ig (TGF- β R, positiv kontroll; fremstilt av Biogen (Cambridge)) og uoperert (UNOP).

For å indusere nyrefibrose, ble venstre ureter isolert aseptisk og knut av i nyren av den opererte side på dag 0 som beskrevet i Hammad *et al.*, *Kidney Int* 58:242-250 (2000). De følgende grupper: PBS, HA4/8 og AB.G11 (anti-TWEAK mAb) ble i tillegg behandlet på dag 2, 6 og 9 etter kirurgisk inngrep og sTGF- β R-Ig-gruppe på dag 1, 3, 6 og 8. På dag 10 etter kirurgisk inngrep, ble venstre ligerte nyre fjernet og skåret i to transvers gjennom sentrum av den renale pelvis og preparert for parafinsnitting.

Parafinbehandlede nyresnitt ble farget med Trikrom-Masson farging som er spesifikt for kollagen. Ved å bruke et Metamorf-program, ble blå fargede områder i Trikrom-Masson delene målt for å mengdebestemme kollageninnhold for å undersøke utstrekningen av fibrose i de opererte nyrer (figur 19).

Overraskende viste nyresnitt fra anti-TWEAK monoklonalt (AB.G11) antistoff-behandlede dyr en 42 % minskning i kollageninnhold i forhold til PBS-behandlede dyr og en 30 % minskning i kollageninnhold i forhold til kontroll (HA4/8) antistoff-behandlede dyr. Imotsetning til dette oppviste nyrene fra oppløselig TGF- β -reseptor Ig-behandlede (TGF- β R) dyr kun en 33 % minskning i kollageninnhold i forhold til PBS-behandlede dyr og en 19 % minskning i kollageninnhold i forhold til kontroll

(HA4/8) antistoff-behandlede dyr. Disse resultater viser klart at behandling med en TWEAK-antagonist, så som et anti-TWEAK monoklonalt antistoff, signifikant reduserende nyrefibrose i en større grad enn den vist med oppløselig TGF- β -reseptor Ig (TGF- β R).

Tatt sammen viser resultatene presentert heri at TWEAK spiller en viktig rolle i inflammatoriske nyresykdommer, så som multifokal inflammasjon, og i ikke-inflammatoriske nyresykdommer, så som tubulær nefropati, cyster, glomerulær nefropati, Alports syndrom, tubulær basofilia, tubulær dilatasjon, tubulær vakuolering, hyalin avskaling, tubulær hyperplasi og nyrefibrose.

Eksempel 6

TWEAK forårsaker lungebetennelse

I tverrsnitt av lunger fra FL-TWEAK transgene og kontrollmus som beskrevet i eksempel 1, ble markert granulomatøs og lymfocytisk inflammasjon vist i både FL-TWEAK og sTWEAK-Tg-mus (figur 20). I tillegg ble endogen TWEAK-ekspressjon vist i lungeceller som kler bronkiolene og alveolene hos normale mus, som vist ved *in situ* hybridisering (ISH) ved å bruke radiomerkede TWEAK-antisensprober og vist med mørkfelt (ISH) mikroskopi (figur 21).

Konsistent med en rolle for TWEAK i lungesykdom, ble Fn14 mRNA vist å bli uttrykt i stor grad i voksen C57BL/6 muselunge (figur 22) ved ISH ved å bruke radiomerkede Fn14 antisensprober og vist med mørkfeltmikroskopi.

Tatt sammen viser disse data at TWEAK er en viktig faktor i å fremme inflammatoriske lungetilstander, innbefattende granulomatøs og lymfocytisk inflammasjon.

Eksempel 7

TWEAK inhiberer både adipogenese og myogenese

Effekten av TWEAK på cellulær differensiering ble undersøkt ved å bruke to *in vitro*-modeller av adipogenese og myogenese som er velkjent innen faget. (Green og Meuth, *Cell* 3:127-133 (1974); Yaffe og Saxel, *Nature* 270:725-727 (1977)).

For adipogenese ble 3T3-L1-celler først dyrket til konfluens i et Dulbeccos modifisert eagles Medium (DMEM) – basert vekstmedium og så induisert til å undergå adipogenese i henhold til metoder kjent innen faget. Green og Kehinde, *Cell* 5:19-27 (1976). Kort fortalt ble celler stimulert på dag 0 med det DMEM-baserte MDI-medium som inneholdt deksametason, insulin og IBMX i to dager fulgt av insulin-alone DMEM-medium i ytterligere to dager. På dag 5 ble celler dyrket i det vanlige DMEM-baserte vekstmedium og adipogenese ble undersøkt på dag 7 med oljerødfarging.

For myogenese ble C2C12-celler dyrket til nær konfluens i et DMEM-basert vekstmedium og på dag 0, byttet til et lavserum differensieringsmedium som inneholdt 2 % hesteserum for å sette i gang differensiering (Yaffe og Saxel, *Nature* 270:725-727 (1977)). Myotubedannelse ble undersøkt ved å bruke et fasekontrastmikroskop og bilder ble tatt på dag 6 av differensiering.

For å undersøke effekten av TWEAK på disse to differensieringsveier, ble forskjellige versjoner av rekombinant human TWEAK (TWEAK-FLAG, TWEAK eller Fc-TWEAK) tilsatt på dag 0 ved en sluttkonsentrasjon på 100 ng/ml og fornyet daglig. TWEAK inhiberte både adipogenese og myogenese i begge systemer (figurer 23 og 24). Spesifisiteten av TWEAKs inhibitoriske effekt ble bekreftet ved å bruke enten hamster anti-TWEAK monoklonalt antistoff AB.G11 eller hFn14-Fc som nøytraliserende reagens.

Disse resultater viser at TWEAK spiller en viktig rolle i cellulær differensiering. Foreliggende oppfinnelse forsøker følgelig å påvirke cellulær differensiering av progenitorcellene beskrevet heri ved å bruke TWEAK-polypeptidene, peptidene, agonistene eller antagonistene beskrevet heri.

Eksempel 8

TWEAK binder til humane mesenchymale stamceller

Humane mesenchymale stamceller (hMSCs) (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ) ble dyrket i MSCGM-medium (Cambrex) og innhøstet ved å inkubere dem med PBS inneholdende 5 mM EDTA, og preparert for fluoresens aktivert celledaterings (FACS) analyse.

Cellene ble inkubert i FACS-buffer inneholdende PBS og 1 % FBS sammen med 100 ng/ml av Fc-TWEAK i 1 time på is. Etter vask to ganger med FACS-buffer, ble cellene så inkubert med fykoerytrin-konjugert geite anti-human Fc eller geit anti-mus Fc sekundære antistoff ved en fortynning på 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) (figur 25). Bakgrunnsfarging ble målt med sekundær antistoff farging alene, som vist av den stiplede linje.

Som vist i figur 25 binder TWEAK til humane mesenchymale celler, som vist av skiftet i fargeprofil av Fc-TWEAK i forhold til sekundært antistoff alene. Således viser egenskapen hos TWEAK til å binde til mesenchymalceller (en progenitor-celletype som er i stand til å differensiere til muskelceller så vel som brusk, ben, bindevevs cellertyper så som stromalceller, fibroblaster, adipocytter og dermalceller) at TWEAK spiller en viktig rolle i differensieringen av disse celletyper både i normale og sykdomsmodeller.

Eksempel 9

Fn14 blir uttrykt på nervestamceller

Ekspresjonen av Fn14 ble undersøkt i hjernene fra embryoniske dag 13,5 mus på en blanding av både C57BL/6 og 129/Sve-bakgrunn. Hjernene ble utsatt for *in situ* hybridisering med Fn14 anti-sens proben. Et positivt signal kunne påvises i den subventrikulære sone av de embryoniske ventrikler, noe som korrelerer med posisjonen av nervestamceller (data ikke vist). Disse resultater viser at Fn14 spiller en viktig rolle i nervecellulær differensiering.

Eksempel 10

Metoder for identifisering av terapeutiske midler for å behandle TWEAK-relaterte tilstander

For å identifisere TWEAK-antagonistforbindelser som virker som terapeutiske midler til behandlingen av TWEAK-relaterte tilstander i henhold til foreliggende oppfinnelse, ble et forsøksdyr så som en mus, fremskaffet som uttrykker et eksogent DNA som koder for et TWEAK-polypeptid, eller et fragment, analog, mutein eller hermer derav. Dyret blir så eksponert til en mulig forbindelse som kan virke som et terapeutisk middel for en TWEAK-relatert tilstand. Fibrotiske hjerte, nyre, lever, lunge, hud, skjelettmuskel, lipid, magetarmkanal, pankreas,

reproduksjonsorganer, nerve, brusk, ben eller bindevev fra forsøksdyret blir så sammenlignet med det samme vev fra et referansedyr, som uttrykker det eksogene DNA, men ikke har blitt eksponert til forbindelsen; og det blir bestemt hvor vidt forbindelsen har påvirket enhver TWEAK-relatert tilstand av det fibrotiske, hjerte, nyre, lever, lunge, hud, skjelettmuskel, lipid, magetarmkanal, pankreas, reproduksjonsorganer, nerve, brusk, ben eller bindevev.

For å identifisere TWEAK-agonistforbindelser som virker som terapeutiske midler for behandling av TWEAK-relaterte tilstander i henhold til foreliggende forbindelse, kan et forsøksdyr som enten uttrykker eller ikke uttrykker et eksogent DNA som koder for et TWEAK-polypeptid, eller et fra fragment, analog, mutein eller hermer derav blir eksponert til en mulig forbindelse som kan virke som et terapeutisk middel for en TWEAK-relatert tilstand. Fibrotisk, hjerte, nyre, lever eller lungevev fra forsøksdyret blir så sammenlignet med det samme vev fra et referansedyr som ikke har blitt eksponert til forbindelsen; og det blir bestemt hvor vidt forbindelsen har induisert noen biologisk endring i nevnte vev som beskrevet heri, grunnet TWEAK-signalisering *in vivo*.

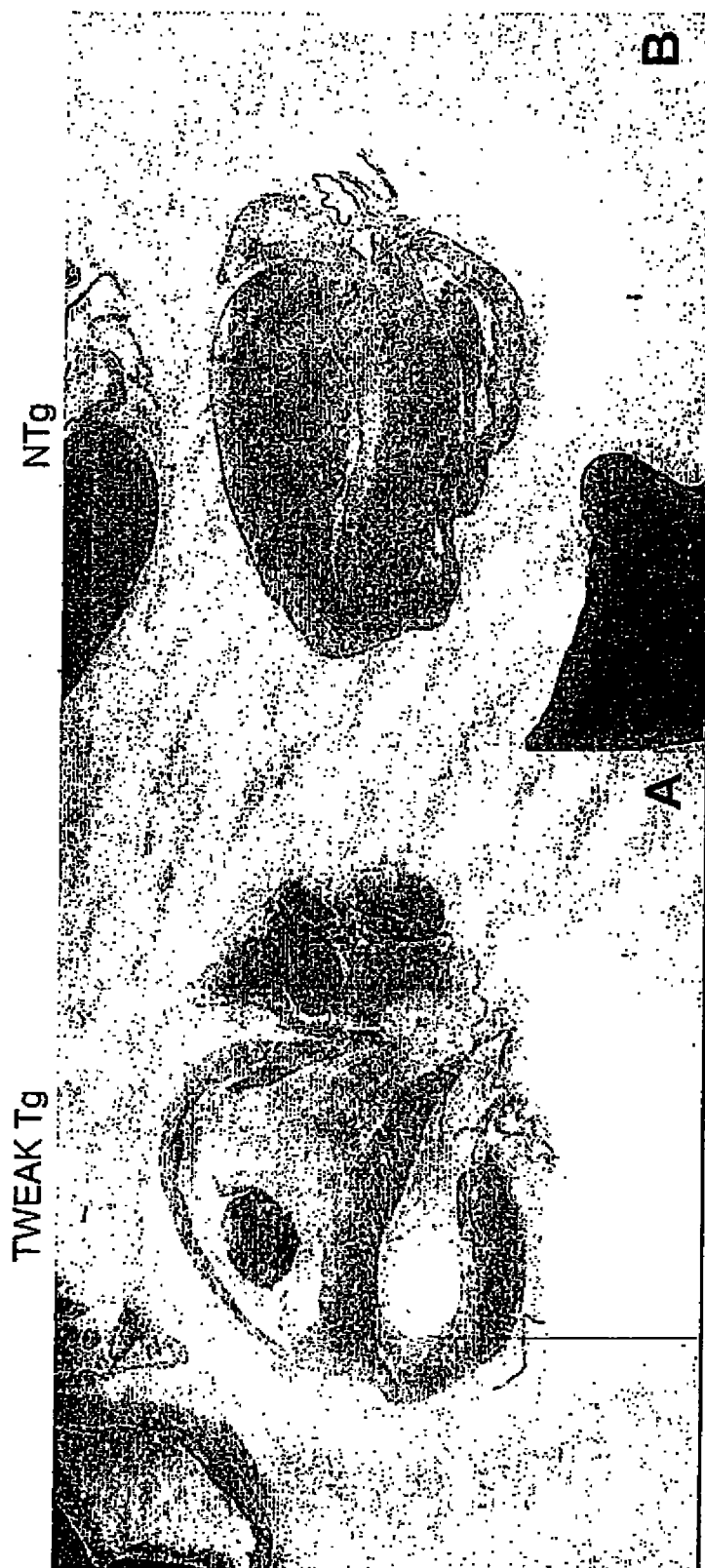
P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av TWEAK-antagonist for fremstilling av et medikament til behandling av en nyretilstand hos et individ, hvor nyretilstanden er valgt fra (a) primær glomerulær sykdom, (b) tubulær sykdom, (c) tubulointerstitiell sykdom, (d) nyresyndrom, (e) nefrolitiasis, (f) infeksjon i urinveiene, (g) obstruksjon i urinveiene og (h) fibrose.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nyretilstanden er en inflammatorisk nyretilstand.
3. Anvendelse ifølge krav 2, hvor den inflammatoriske nyretilstand er multifokal inflammasjon.
4. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nyretilstanden er en ikke-inflammatorisk nyretilstand.
5. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 1-4, hvor TWEAK-antagonisten omfatter (a) et anti-TWEAK-antistoff; (b) et anti-TWEAK-reseptor-antistoff eller (c) et TWEAK-reseptor polypeptidfragment.
6. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den primære glomerulære sykdom er glomerulosklerose, cyster eller Alports syndrom.
7. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den tubulære sykdom er valgt fra akutt tubulær nekrose, tubulær hyperplasi, autosomal dominant polycystisk nyresykdom (ADPKD), tubulær nefropati, cyster, tubulær basofilia, tubulær dilatasjon, tubulær vakuolasjon, tubulær hyperplasi og cyster.
8. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den tubulointerstitiale sykdom er tubulointerstitial nefritt eller tubulointerstitial fibrose.
9. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nyresyndromet er valgt fra akutt nefritisk syndrom, asymptomatisk hematuria, asymptomatisk proteinuria, akutt nyresvikt og kronisk nyresvikt.
10. Anvendelse ifølge krav 5, hvor anti-TWEAK-antistoffet er humant eller humanisert, monoklonalt eller chimerisk.

11. Anvendelse ifølge krav 5, hvor anti-TWEAK-antistoffet er av full lengde eller et antigenbindende fragment.

Fig. 1

Rolle av TWEAK i hjerte: Dilatering i TWEAK Tg-hjarter



A. Høyre atriell og ventrikulær trombose og dilatering FL-Tweak Transgen

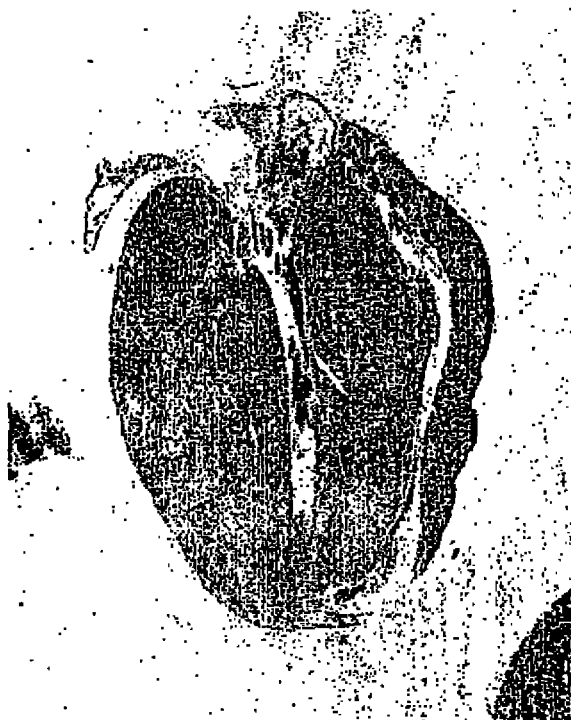
B. Normalt hjerte. H&E.

Fig. 2

TWEAK inducerer hjertemodellering i voksne mus

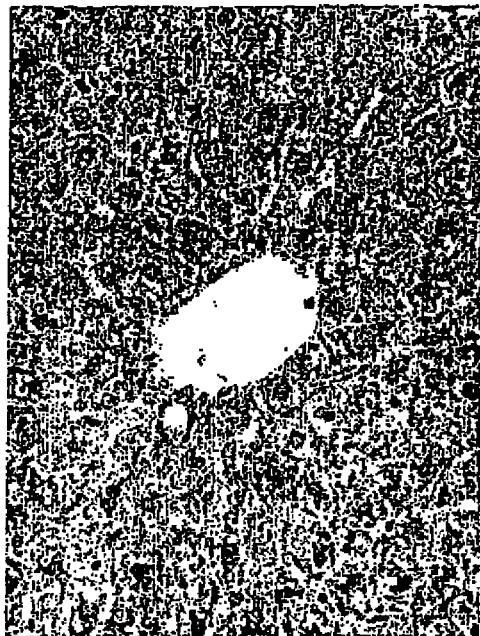
Adeno-GFP

Adeno-TWEAK

**Dag 20**

Gallegang og ovalcelle-hyperplasi er åpenbar i 2 uker gamle TWEAK Tg-mus
Fig. 3
7 måneder gamle

2 uker



NTg

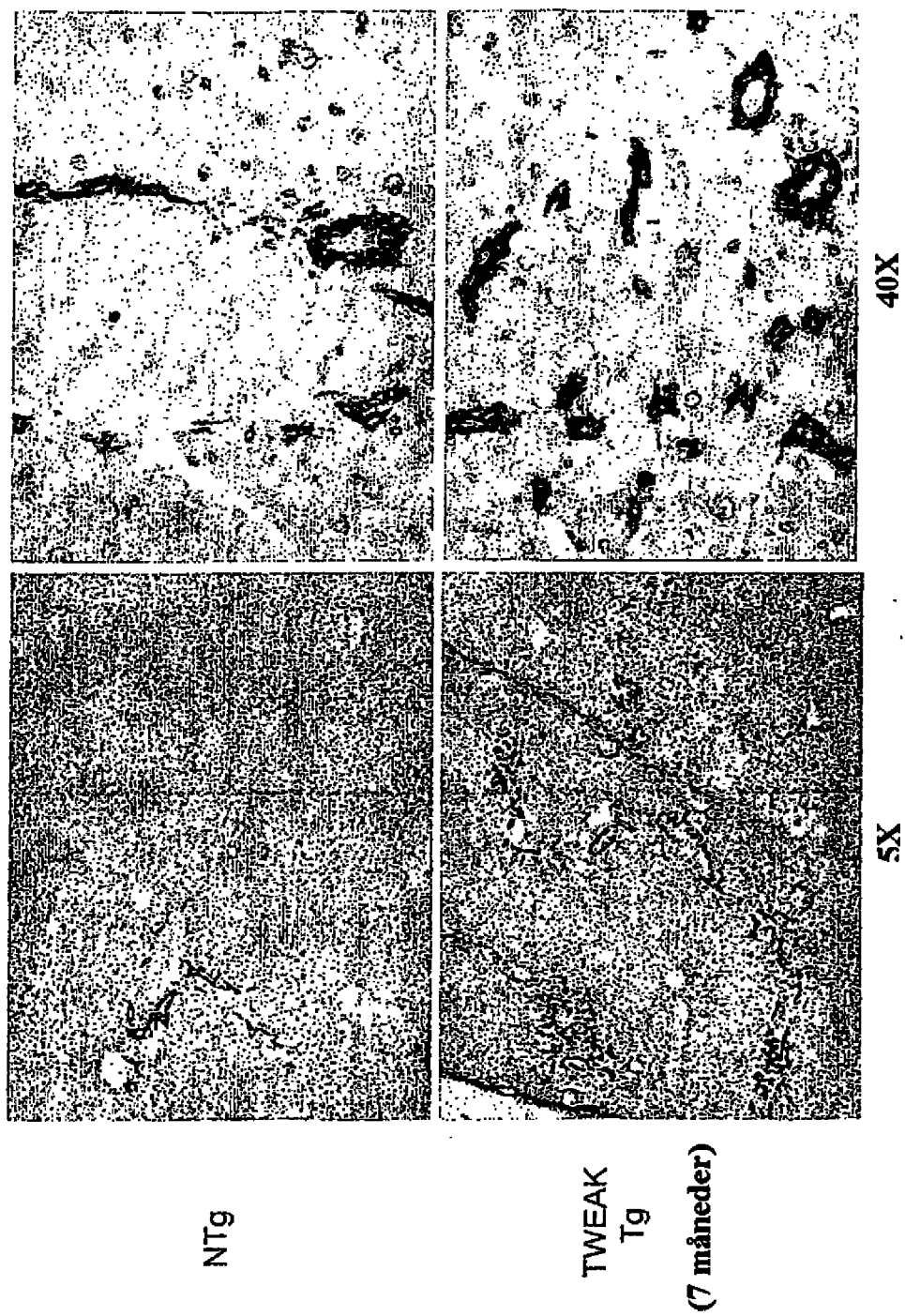


Tg



Farging av BEC og ovalceller med A6 mAb (anti-keratin)

Fig. 4



Gallegang og ovalcelle-hyperplasi i lever hos TWEAK Tg-mus

Fig. 5



Fig. 6

Hepatocellulær vakuolering i TWEAK Tg-mus (7 måneder)

NTg



TWEAK Tg



Rolle av TWEAK i lever: Adenoviral avlevering

Fig.7

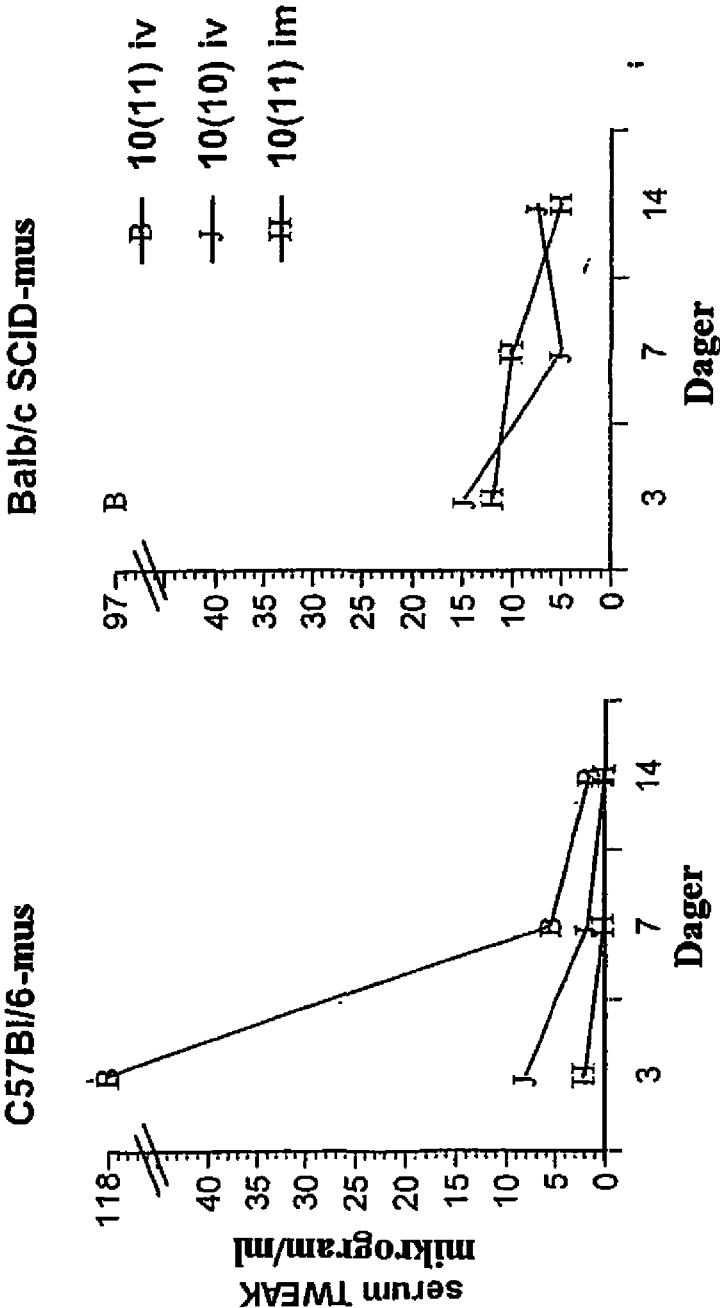


Fig. 8

TWEAK induserer hepatocyttdød og duktal hyperplasi i voksne mus

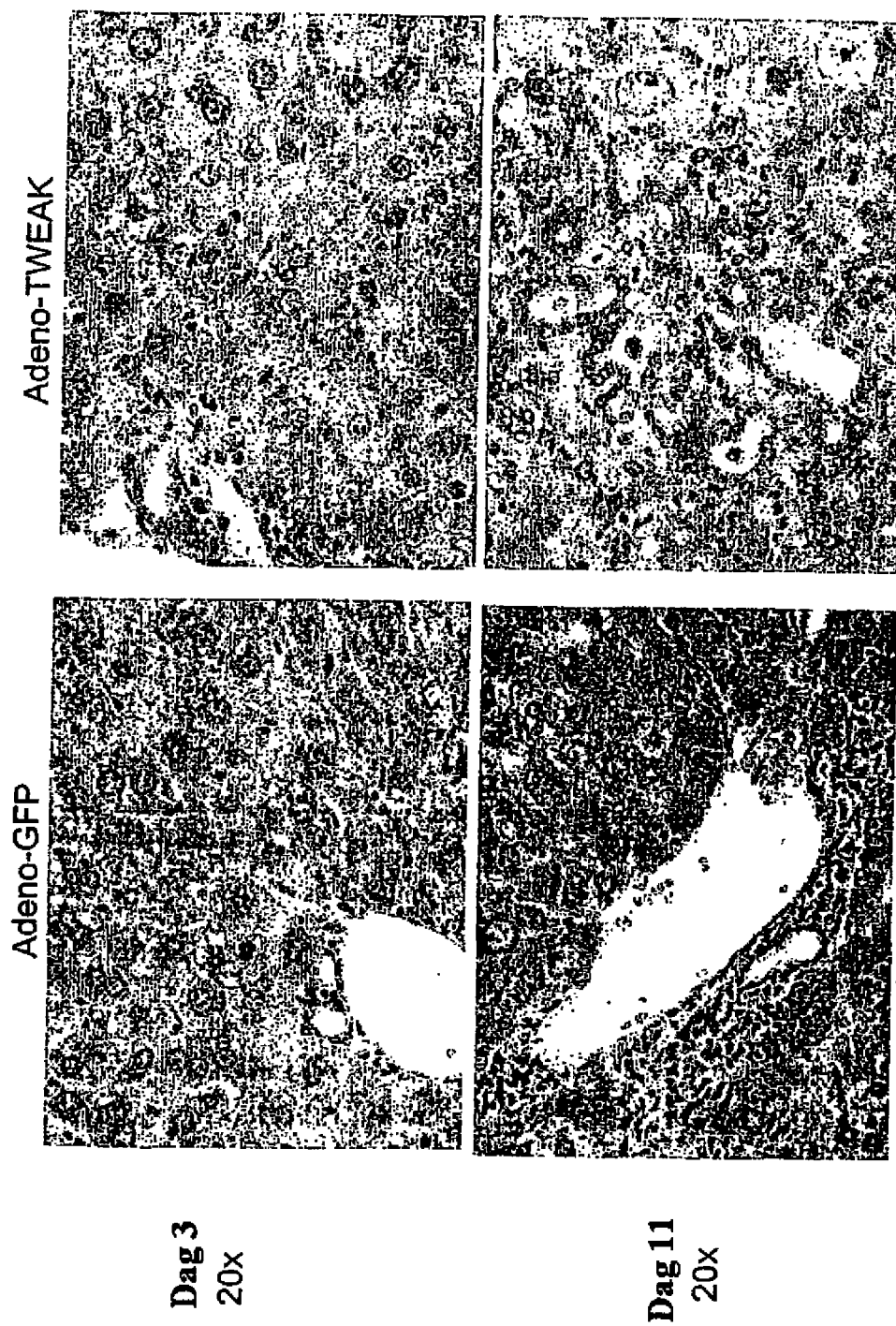


Fig. 9

FN14 mRNA-ekspresjon er upåviselig i normal lever, men blir sterkt induisert ved akutt leverskade

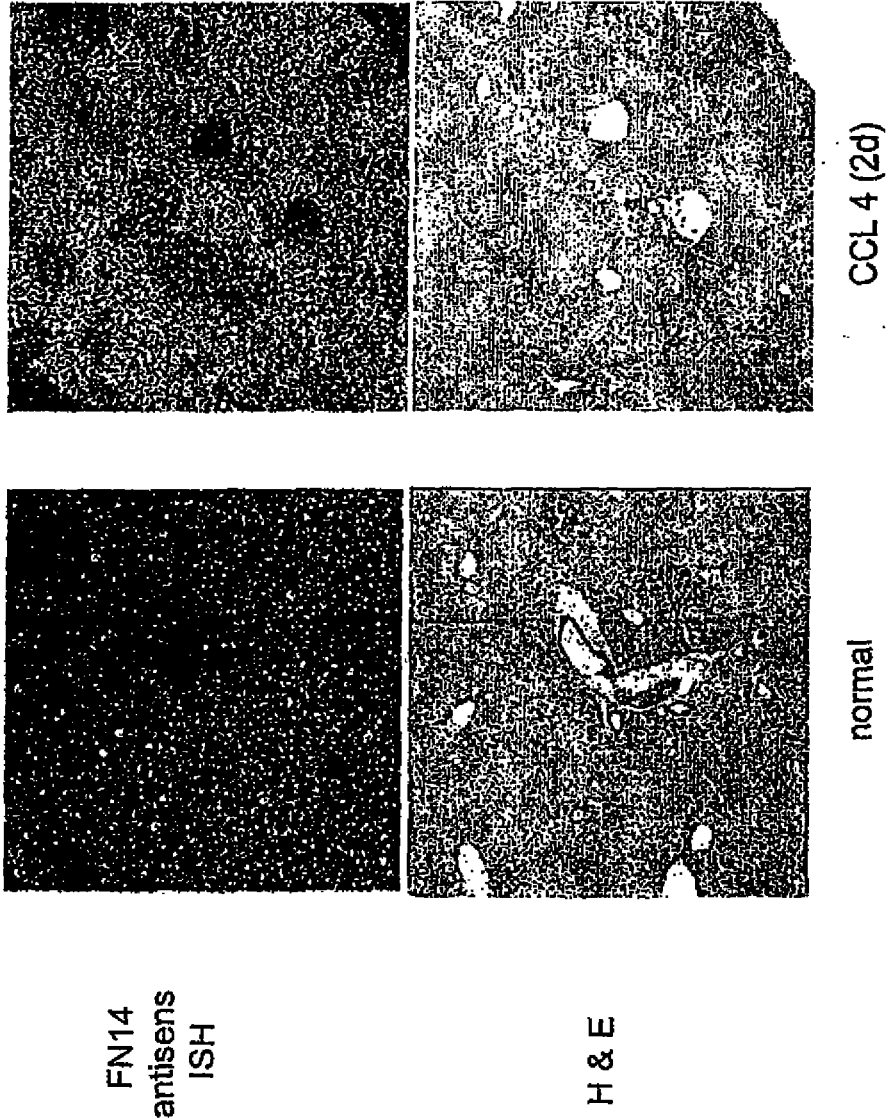
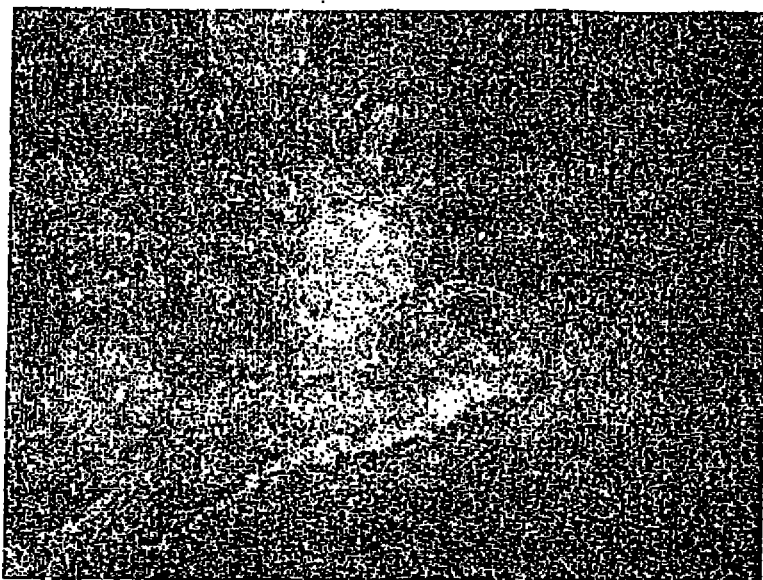


Fig. 10

A. H&E-farging av leversnitt**B. FN14 anti-sense mRNA in situ hybridisering**

Tubulær basofilia og glomerulær nefropati i TWEAK Tg-mus Fig. 11

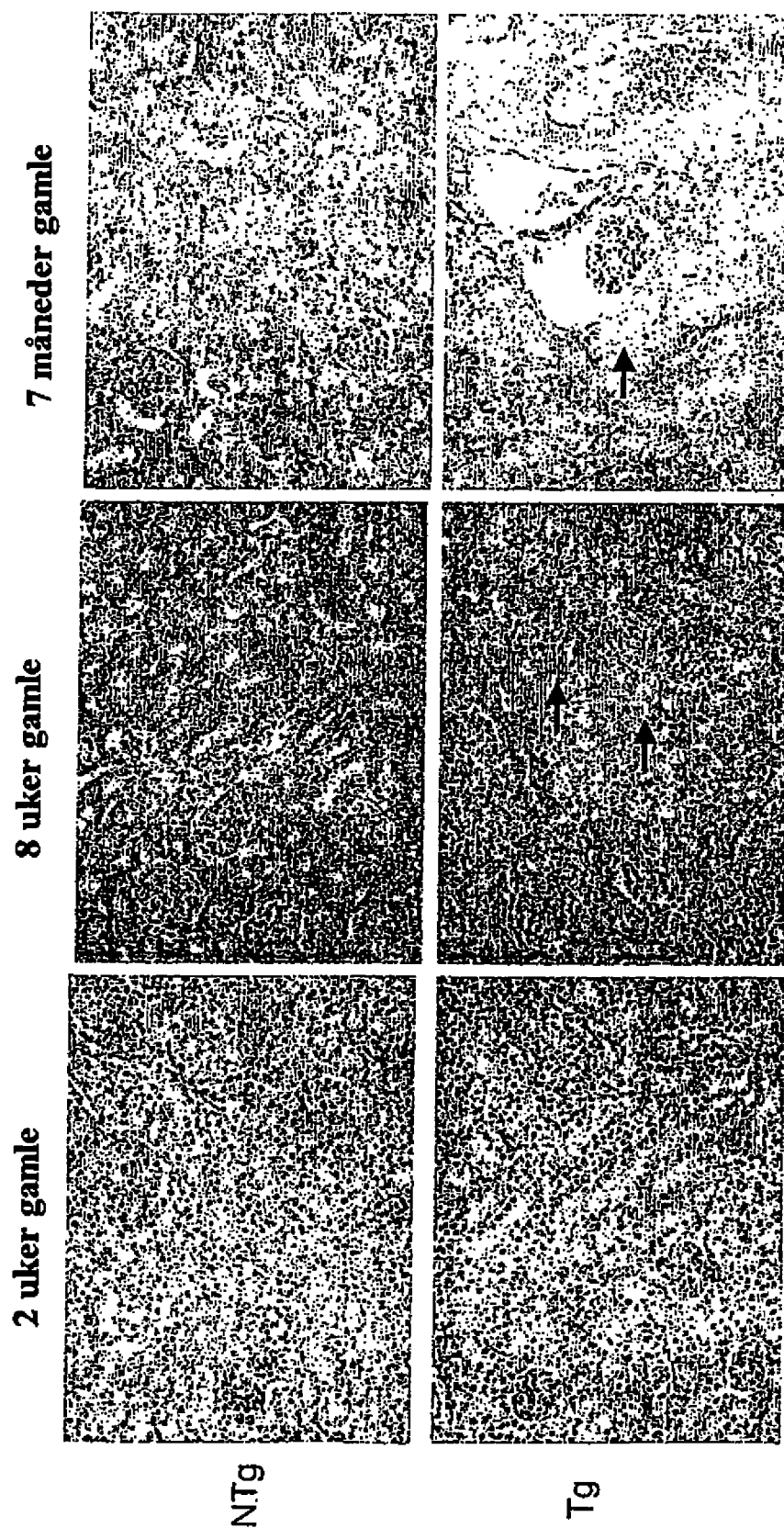
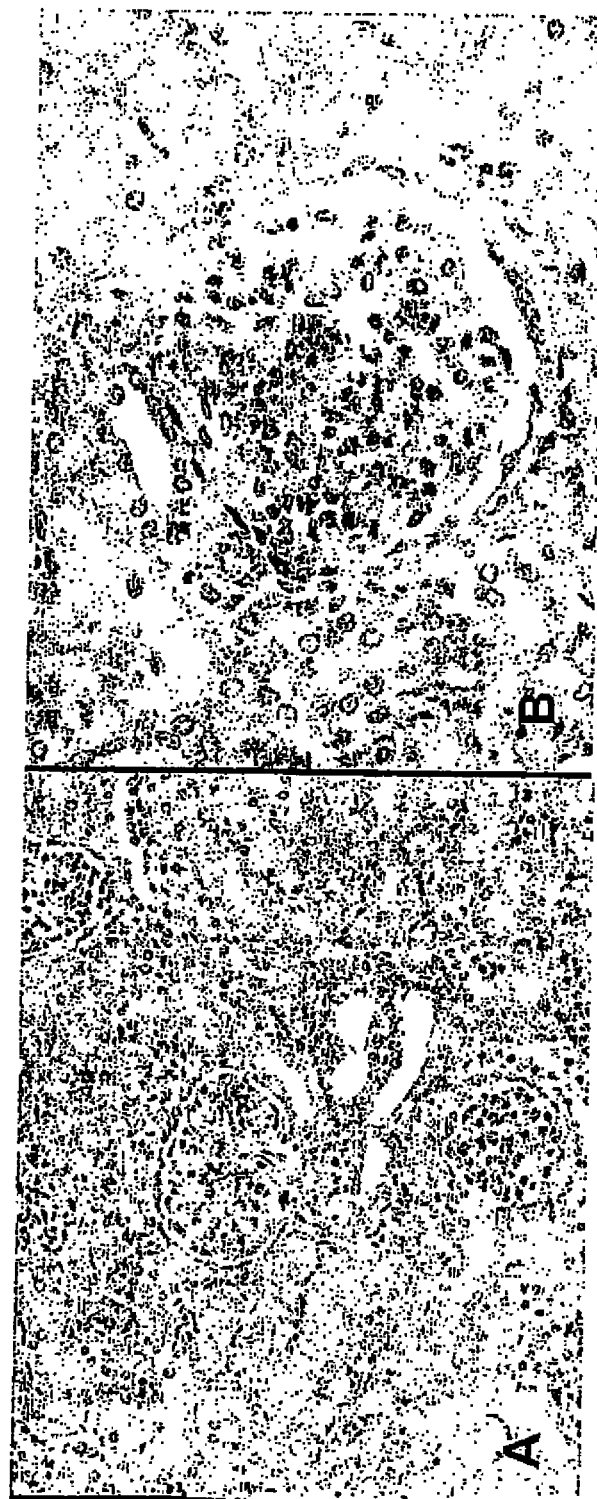


Fig. 12

Rolle av TWEAK i nyre: FL-TWEAK Tg-mus tilbakekrysset (4x) til B6



- A. Glomerulær nefropati med basofilia av tilstøtende proksimalt tubulært epitel
 B. Segmental mesangial hypercellularitet, hypertrofi av kapsulært epitel og mild kapsulær fortynkning. H&E

Fig. 13

**Basofile tubuler i TWEAK Tg-mus tilsvarer PCNA+-områder
(to individuelle TWEAK Tg ved 8 uker alder)**

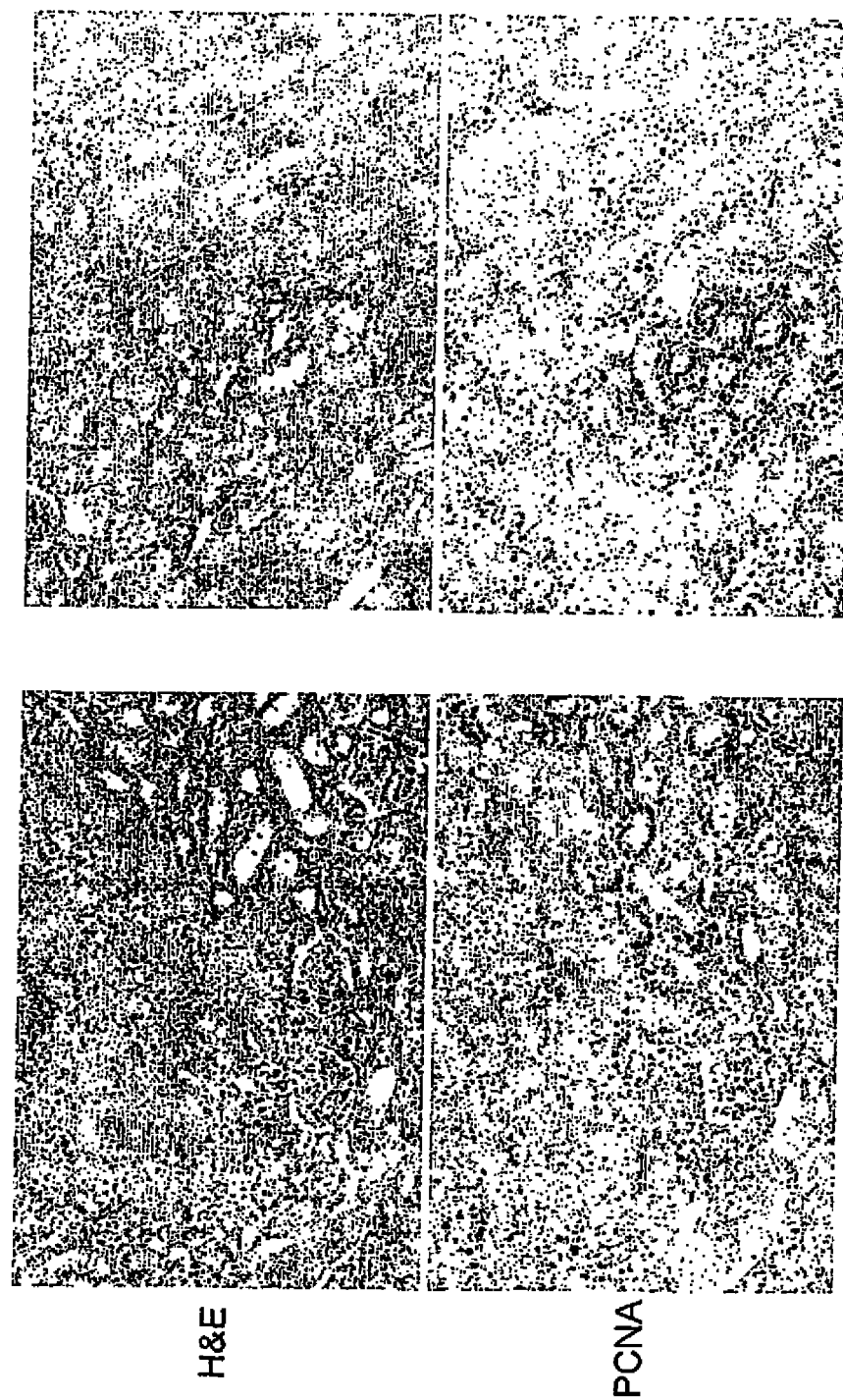


Fig. 14

Basofile tubuler fra TWEAK Tg-mus uttrykker ikke lektin-bindingsmarkører
 karakteristiske for proksimale eller distale tubuler

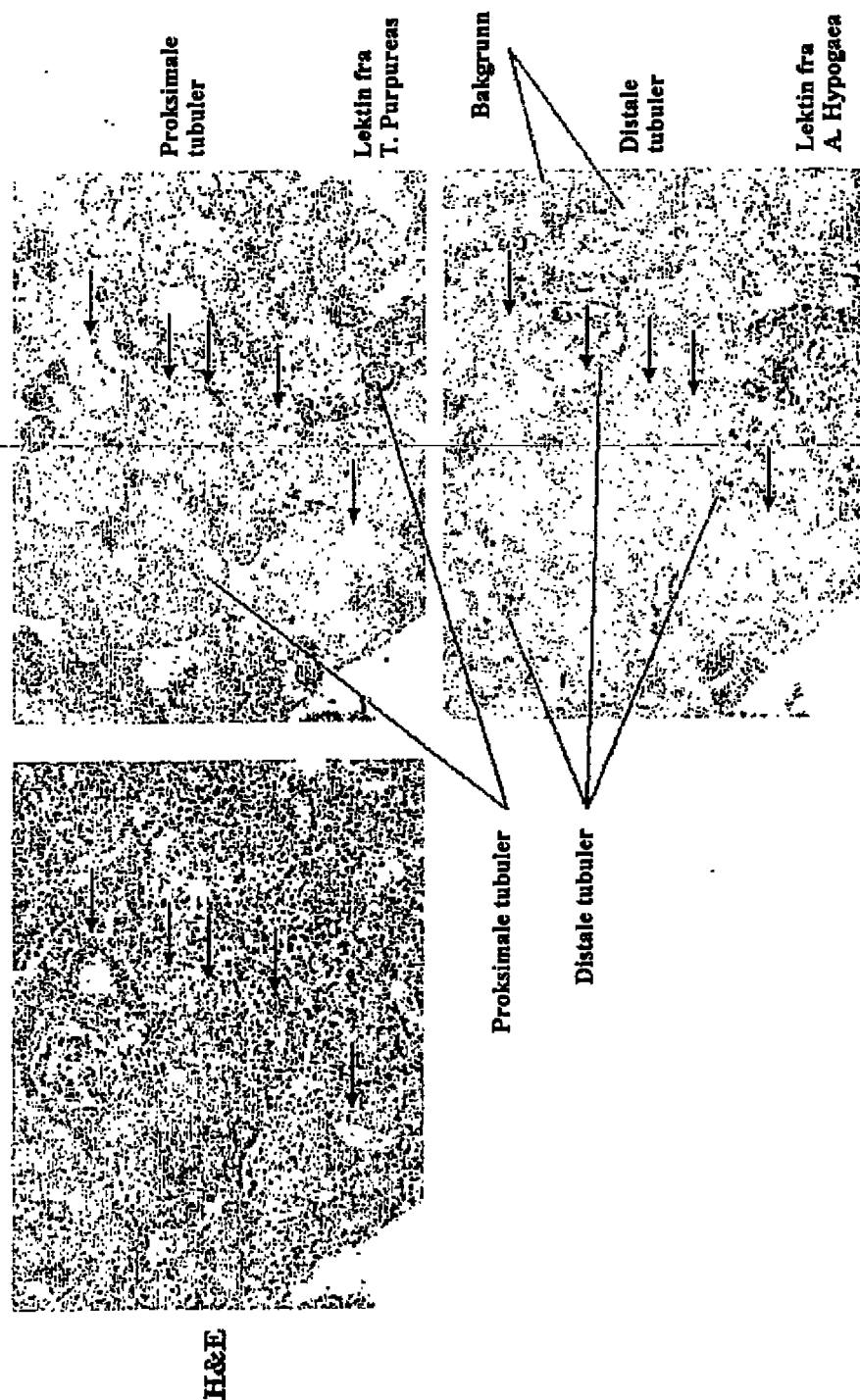


Fig. 15
TWEAK inducerer tubuler hyperplasi og glomerulopati i voksne mus

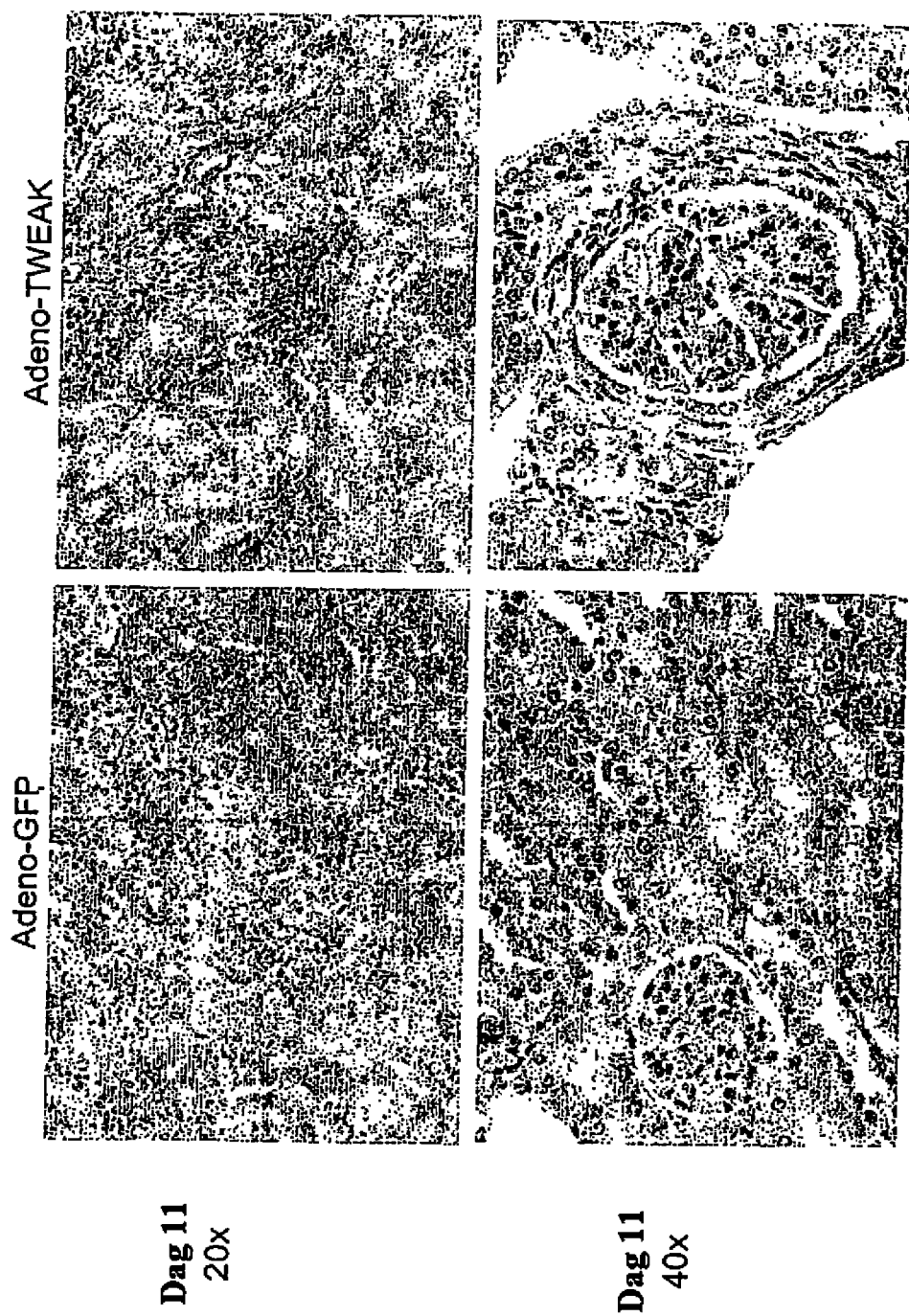


Fig. 16

TWEAK mRNA blir bredt uttrykt i hele nyren hos voksne mus

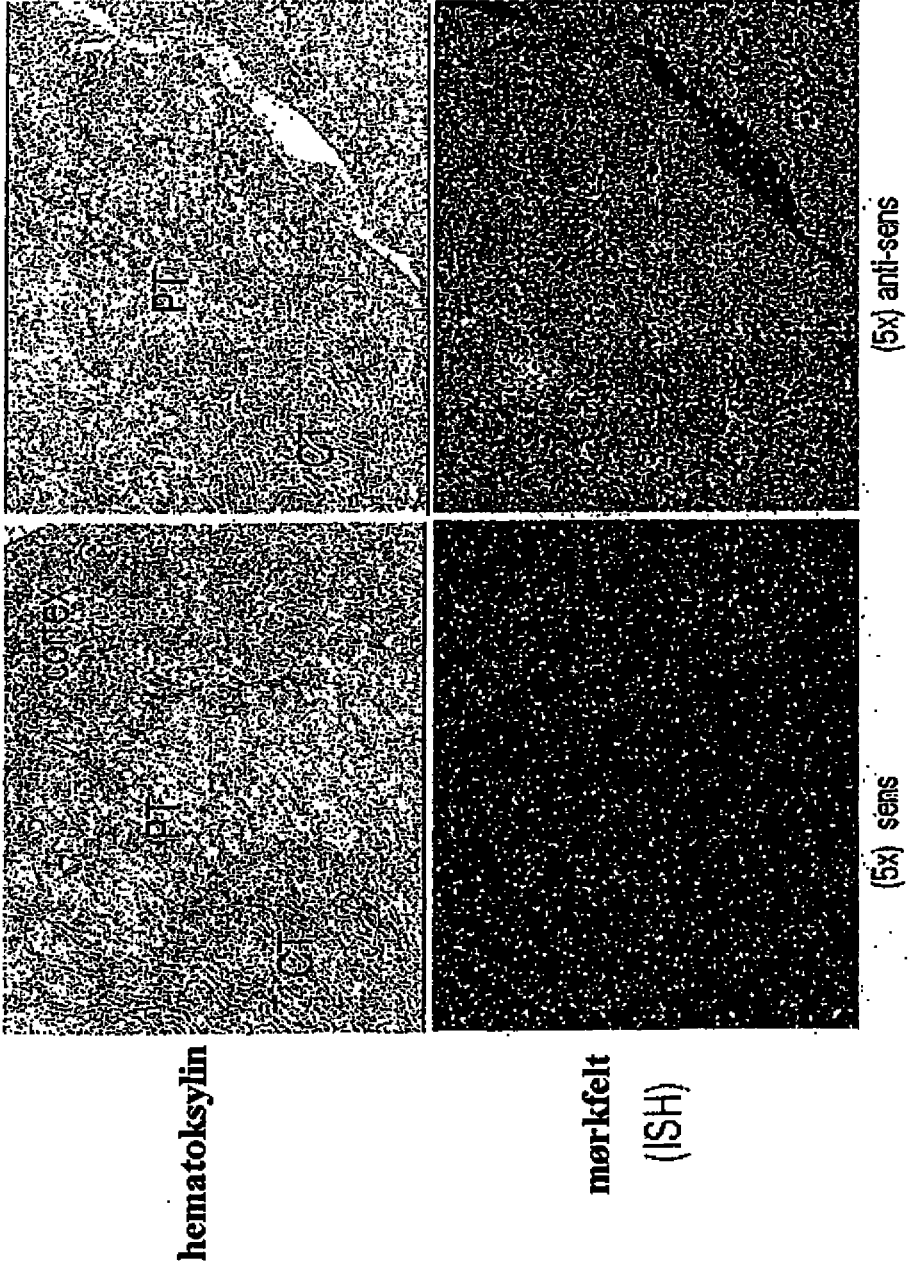


Fig. 17

Fn14mRNA-ekspresjon i de proksimale tubuler i den ytre medulla i nyrer

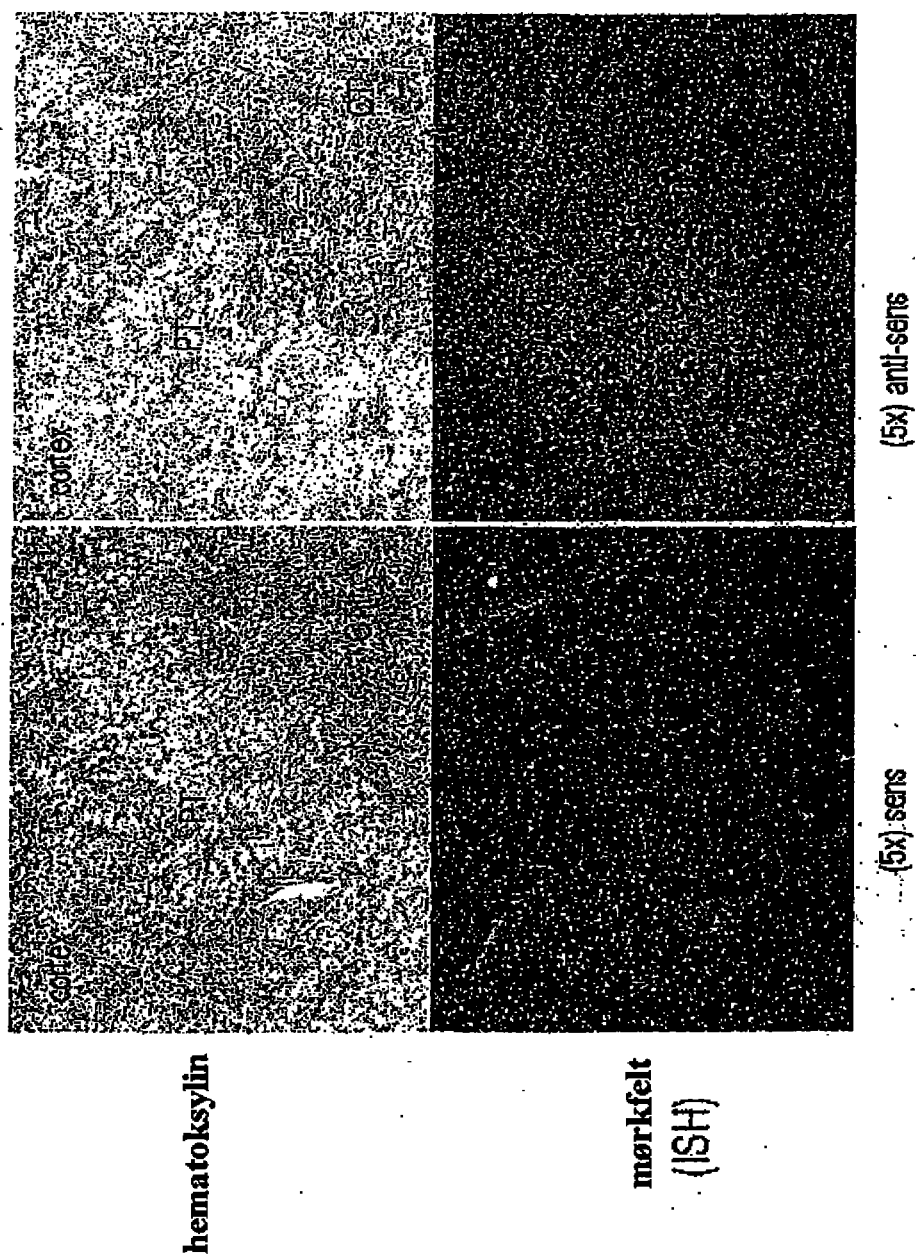


Fig. 18

Oppregulering av Fn14 mRNA i Alports nyrefibrose

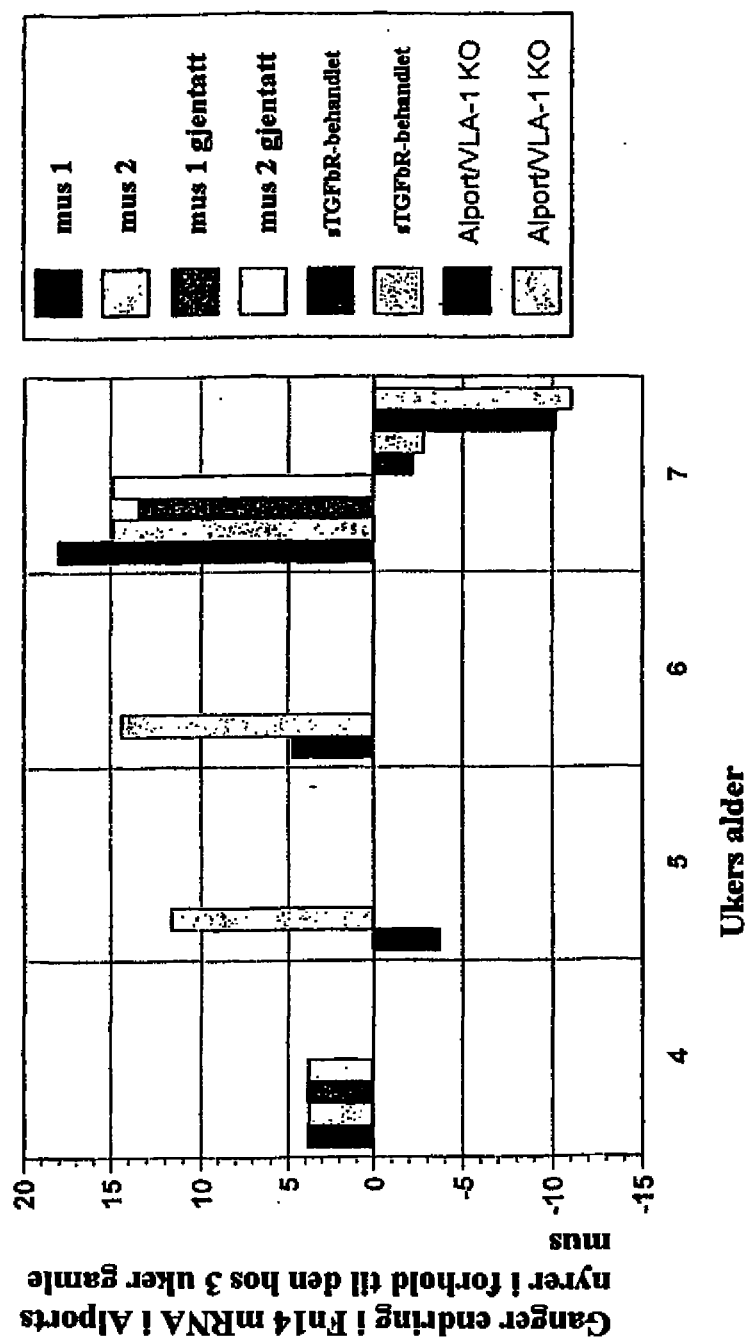


Fig. 19

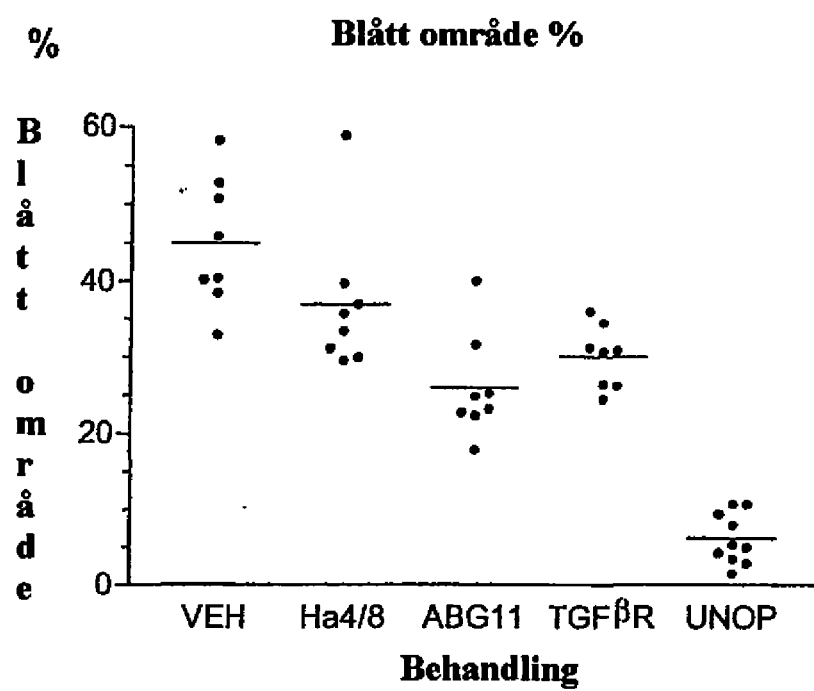
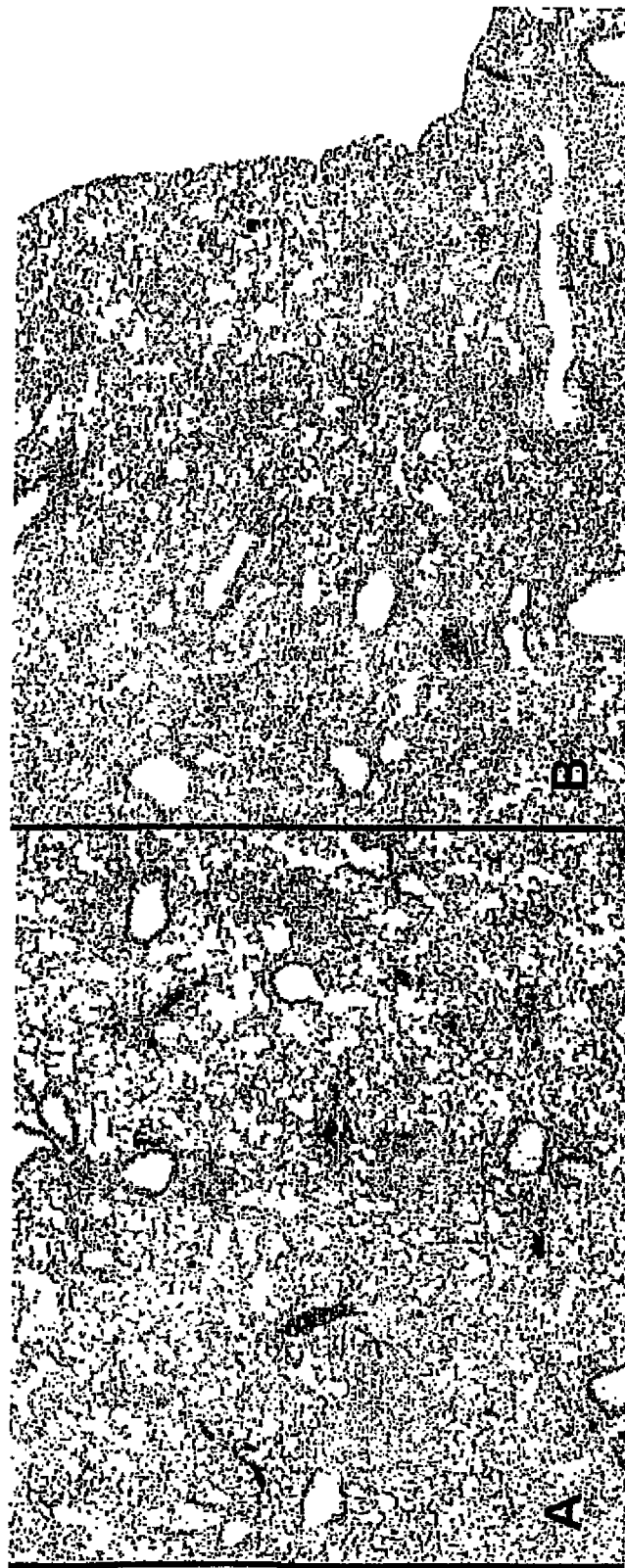


Fig. 20

Rolle av TWEAK i lunge: Inflammasjon i TWEAK Tg-mus



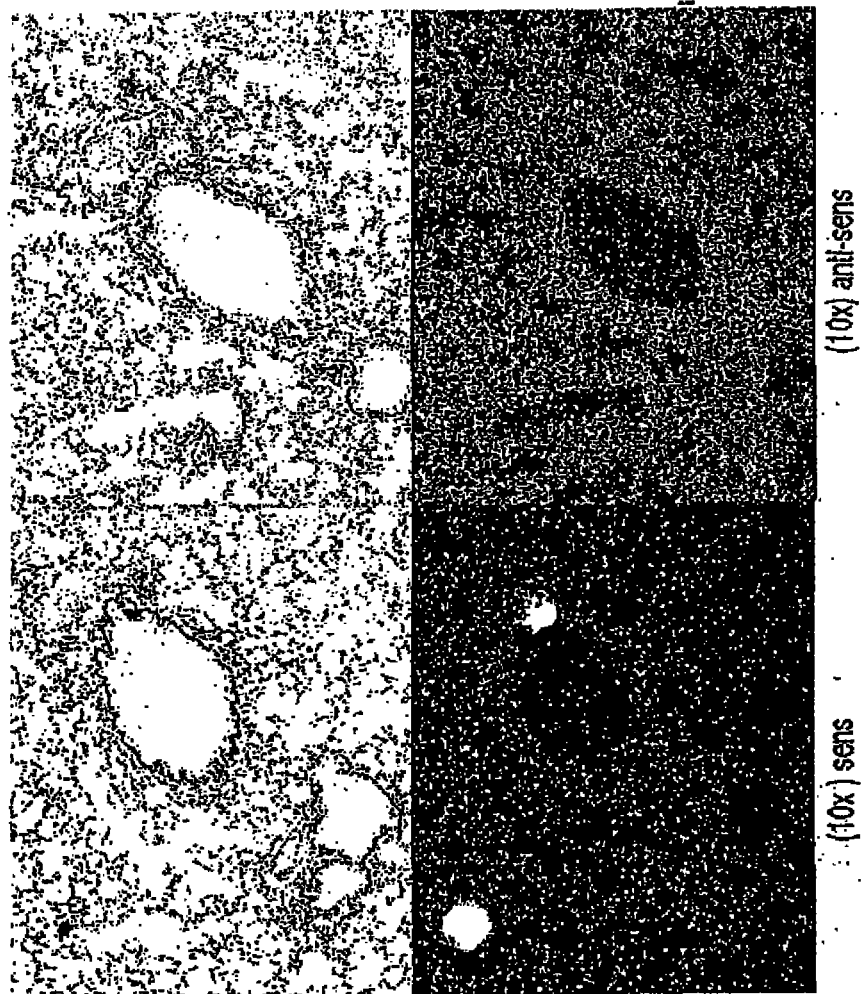
Granulomates/lymfocytisk inflammasjon

A. FL-TWEAK Tg-mus tilbakekrysset 4x til B6

B. s TWEAK Tg-mus H&E.

Fig. 21

TWEAK mRNA uttrykkes i lungeceller som lder bronkiolene & alveolene



hematoksylin

**Mørkfelt
(ISH)**

(10x) anti-sens

(10x) sens

Fig. 22

Fn14 mRNA-ekspresjon i celler som kler bronkiolene & alveolene

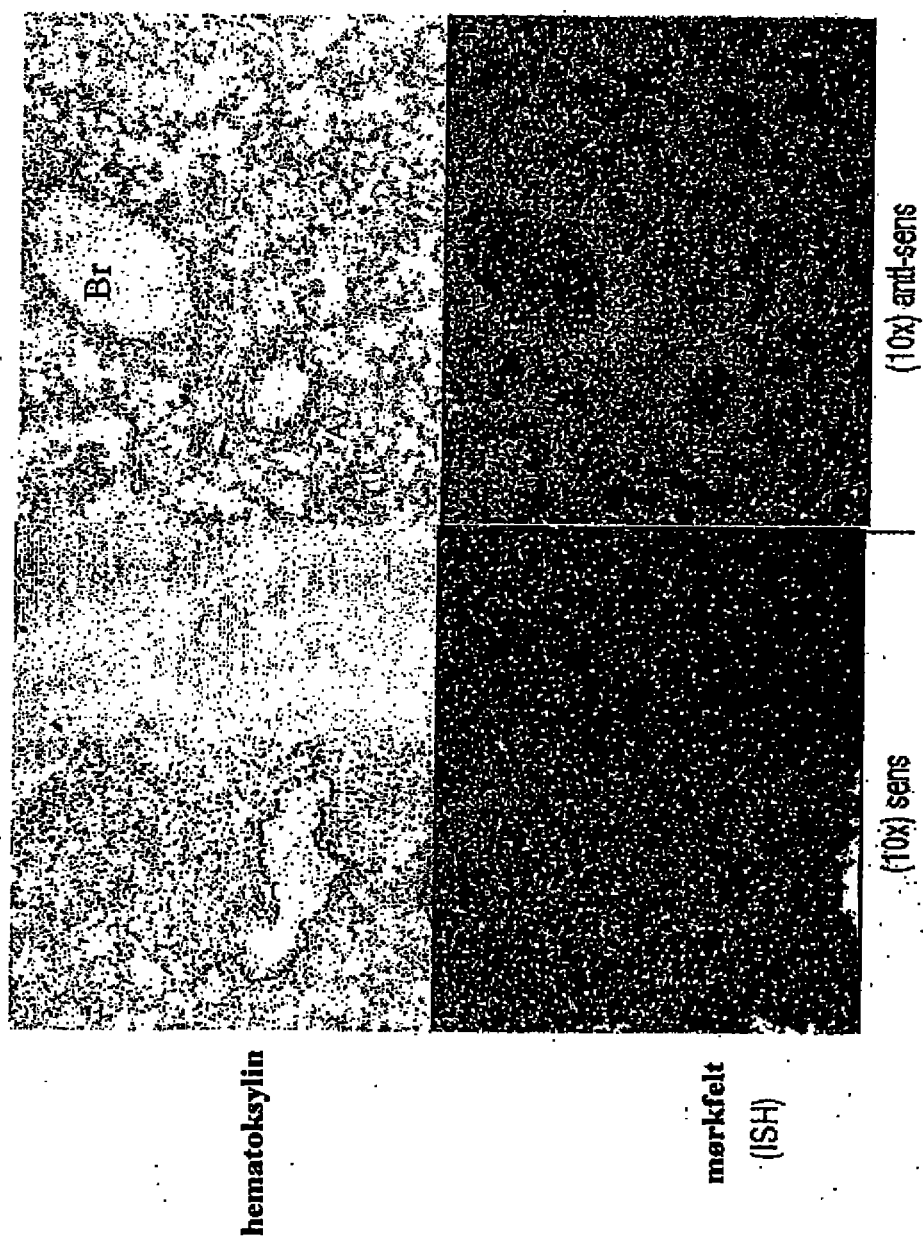


Fig. 23

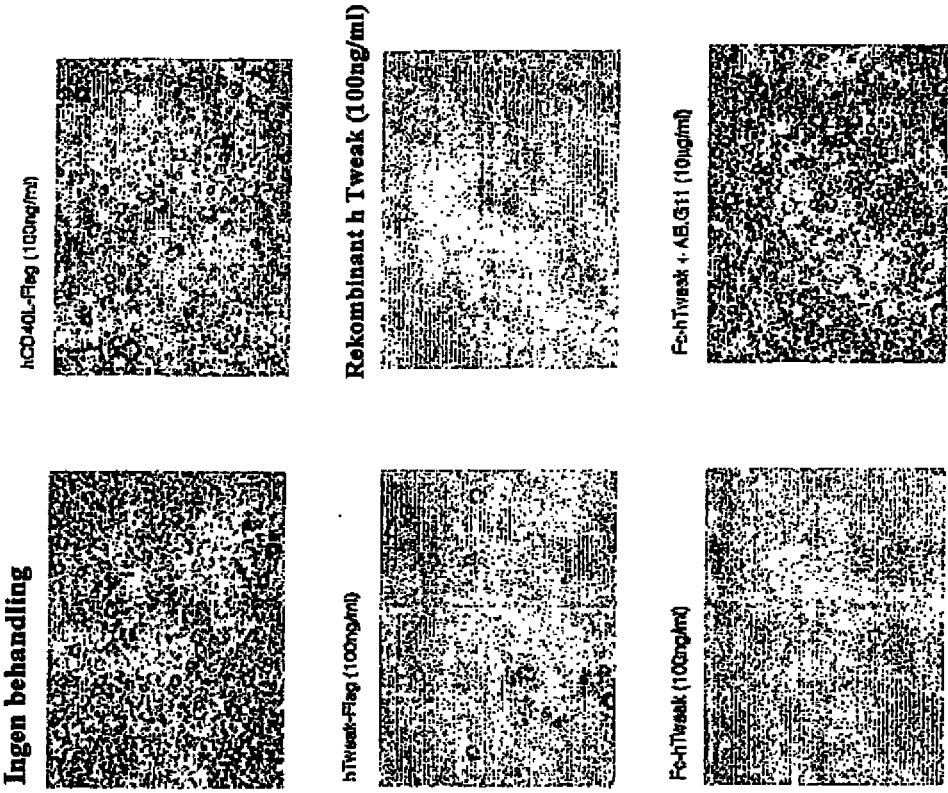


Fig. 24

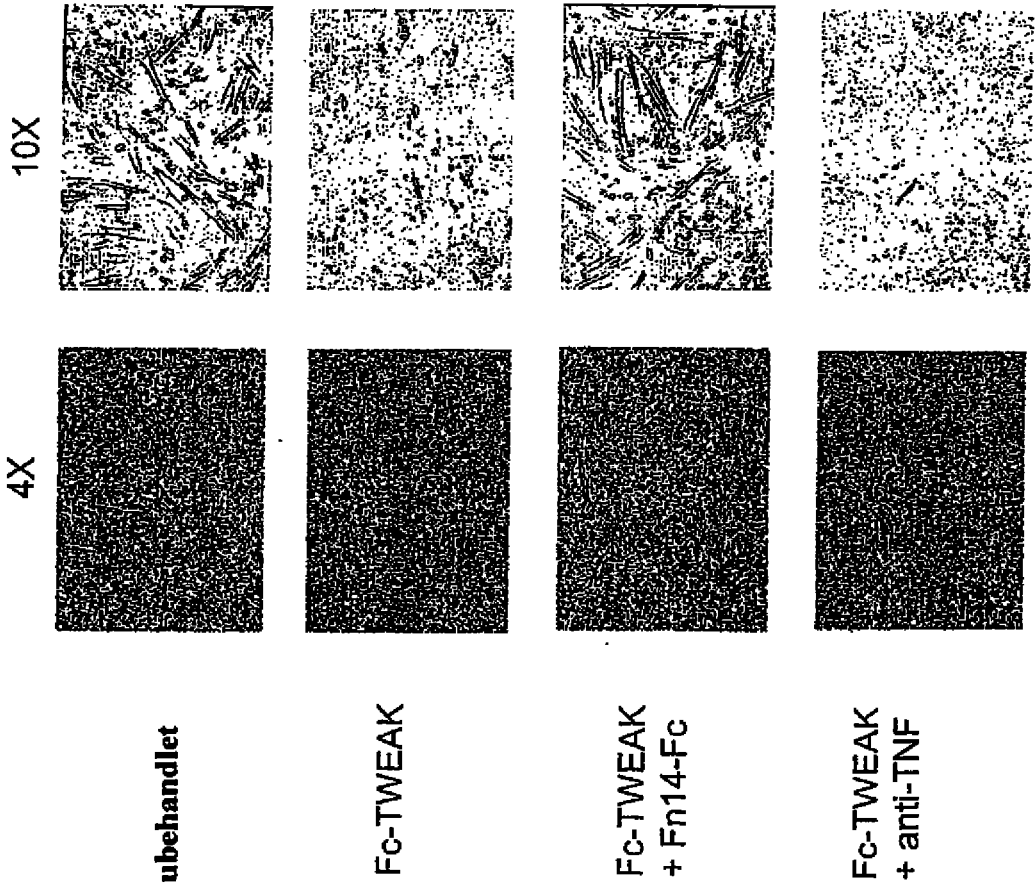
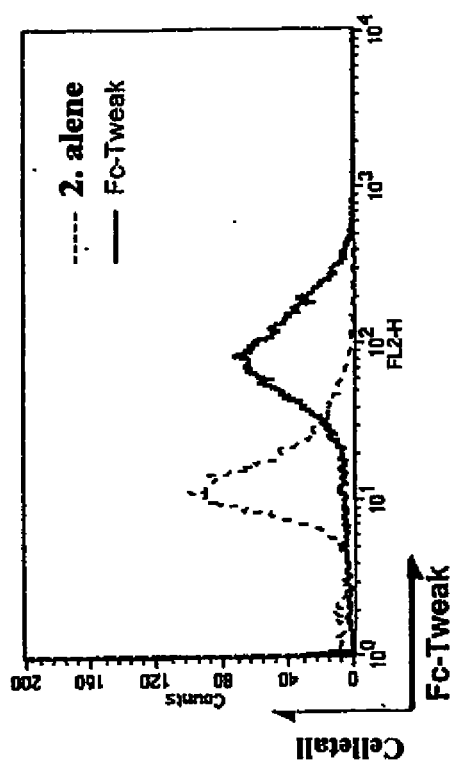


Fig. 25



Metode:

Humane mesenchymale stamceller (hMSCs) ble innkjøpt fra BioWhittaker (Cambrex) og dyrket i henhold til anbefalt metode. Celler ble innhøstet ved inkubering med PBS- inneholdende 5mM EDTA og farget for sin evne til å binde rekombinant Fc-Tweak-protein (Figur 1 hel linje). Kort angitt ble hMSCs inkubert i FACS-buffer (PBS, 1% FBS) med 100ng/ml Fc-Tweak i 1 time. Etter to vask med FACS-buffer ble cellene så inkubert med PE-konjugert geit anti-human Fc sekundær antistoff (Jackson ImmunoResearch 1:200). Bakgrunnsfargingen, som målt med sekundær antistofffarging alene, er vist med stiplet linje.