



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106421778 A

(43)申请公布日 2017. 02. 22

(21)申请号 201610471339.9

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2003.04.09

A61K 39/395(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 21/00(2006.01)

60/371,611 2002.04.09 US

A61P 25/00(2006.01)

(62)分案原申请数据

03813317.2 2003.04.09

(71)申请人 比奥根MA公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 琳达·伯克利

阿尼拉·贾库博夫斯基 蒂莫西·郑

咸庚旻

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

权利要求书1页 说明书31页

序列表2页 附图25页

(54)发明名称

用于治疗TWEAK相关病症的方法

(57)摘要

本发明提供用于治疗TWEAK相关病症的方法和试剂,该病症包括心脏、肝脏、肾脏、肺、脂肪、骨骼、肌肉、神经、骨和软骨的病症。本发明还提供用于鉴定治疗TWEAK相关病症的TWEAK的激动剂或拮抗剂的方法。此外,本发明提供表达编码TWEAK多肽或其片段、类似物或突变体的外源DNA的转基因动物,以及用这种动物来鉴定TWEAK激动剂或拮抗剂的方法。本发明还提供用于诊断基于TWEAK表达的疾病的方法。本发明还提供用TWEAK多肽、激动剂或拮抗剂来影响祖细胞的细胞分化的方法。

1. 选自下组的TWEAK拮抗剂在制备用于治疗TWEAK相关的骨骼肌疾病的药物中的用途：
 - (a) 抗TWEAK抗体或其抗原结合片段；和
 - (b) 抗TWEAK受体抗体或其抗原结合片段，其中所述TWEAK受体是Fn14。
2. 选自下组的TWEAK拮抗剂：
 - (a) 抗TWEAK抗体或其抗原结合片段；和
 - (b) 抗TWEAK受体抗体或其抗原结合片段，其中所述TWEAK受体是Fn14；用于治疗TWEAK相关的骨骼肌疾病的用途。
3. 根据权利要求1的用途或用于根据权利要求2的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述TWEAK拮抗剂是抗TWEAK抗体或其抗原结合片段。
4. 根据权利要求1或3的用途或用于根据权利要求2或3的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述骨骼肌疾病是骨骼肌萎缩。
5. 权利要求4的用途或用于根据权利要求4的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述骨骼肌萎缩是肌肉萎缩症。
6. 权利要求4的用途或用于根据权利要求4的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述骨骼肌萎缩是线粒体肌病 (mitochondrial myopathy)，脂质肌病 (lipidmyopathy)，中央管肌病 (central tubular myopathy)，横纹肌溶解 (rhabdomyolysis) 或酒精性肌病 (alcoholic myopathy)。
7. 权利要求4的用途或用于根据权利要求4的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述骨骼肌萎缩是神经疾病的结果。
8. 权利要求4的用途或用于根据权利要求4的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述骨骼肌萎缩是恶病质 (cachexia)。
9. 根据权利要求1和3-8任一项的用途，或用于根据权利要求2-8的任一项的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述抗体是人的，人源化的，单克隆的或嵌合的。
10. 根据权利要求1和3-8任一项的用途，或用于根据权利要求2-8的任一项的用途的TWEAK拮抗剂，其中所述抗体是全长的。

用于治疗TWEAK相关病症的方法

[0001] 本申请是基于申请日为2003年4月9日,优先权日为2002年4月9日,申请号为201310506714.5,发明名称为:“用于治疗TWEAK相关病症的方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗TWEAK相关病症的方法和试剂,该病症包括心脏、肝脏、肾脏、肺、脂肪、骨骼肌、神经、骨、软骨、皮肤、胃肠道、胰腺、生殖器官和结缔组织疾病。本发明还涉及用于鉴定治疗TWEAK相关病症的TWEAK的激动剂或拮抗剂的方法。此外,本发明涉及表达编码TWEAK多肽或其片段、类似物或突变体的外源DNA的转基因动物,以及用这种动物来鉴定TWEAK激动剂或拮抗剂的方法。本发明还涉及用于诊断基于TWEAK表达的疾病的方法。本发明还涉及用TWEAK多肽、激动剂或拮抗剂来影响祖细胞的细胞增生和分化的方法。

背景技术

[0003] 肿瘤坏死因子家族成员的配体因其结构与TNF- α 相似而如此命名,是各种过程如炎症反应、细胞免疫和凋亡中的重要成分。TNF配体可能作为II型膜结合蛋白通过直接细胞与细胞接触而局部起作用,或作为具有自分泌、旁分泌或内分泌功能的分泌蛋白而起作用。TNF家族成员通过其C末端的细胞外结构域结合TNF受体(TNF-R)成员。各种TNF家族成员包括TNF、淋巴毒素(LT)、Fas、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX-40、TRAMP、CAR-1、TRAIL、GITR、HVEM、osteoprotegrin、NGF、TRAIL、Kay (BAFF)、APRIL和TWEAK (TNF相关而诱导细胞死亡的能力弱)。

[0004] 该细胞因子受体家族的特定特征在于富含半胱氨酸的细胞外结构域,最早通过两种不同的TNF受体的分子克隆来显示。该家族的基因编码糖蛋白,特征为I型跨膜蛋白具有细胞外配体结合结构域,单一的跨膜结构域和参与激活细胞功能的胞质区域。富含半胱氨酸的配体结合区域具有一个紧密结合的二硫键连接的核心结构域,根据特定的家族成员,该核心结构域重复出现多次。绝大部分的受体具有四个结构域,虽然可能少至1个或多达6个。

[0005] TNF家族成员在调控免疫系统中起作用,控制细胞存活和分化,以及在急性宿主防御系统如炎症中起作用。本领域一直在尝试操作TNF家族成员来产生治疗性效果,这可能提供控制疾病的独特方法。例如,该家族的一些配体能够直接诱导许多被转化的细胞的程序性死亡,如LT、TNF、Fas配体和TRAIL。Fas和可能TNF以及CD30受体的活化能够在未被转化的具有免疫调控功能的淋巴细胞中诱导细胞死亡。

[0006] 诱导编程细胞死亡的能力是多个TNF家族成员的重要和被深入研究特性。Fas介导的凋亡似乎在外周和可能在胸腺中起调控自身反应淋巴细胞的作用。此外,TNF和CD30系统与T细胞和大细胞退行发育的淋巴瘤细胞系的存活相关。这种细胞系对TNF、Fas或LT- β 受体信号响应的死亡具有凋亡的特征。

[0007] TNF家族的配体抗原根据它们诱导细胞死亡的能力被分成三类。首先,TNF、Fas配体和TRAIL能够有效地在许多细胞系中诱导细胞死亡,其受体最可能具有极好的规则的死

亡结构域。大概DR-3的配体 (TRAMP/WSL-1) 也属于这一类。接着是如TWEAK、CD30配体和LTa1b2等配体,其引起仅限于少数细胞的较为微弱的死亡信号。在这些系统中进行的研究已经证明,存在分开的较微弱的死亡信号机制。最后,存在不能有效地递送死亡信号的成员。可能所有类别的配体都对一些细胞类型产生抗增生作用,结果诱导细胞分化,如CD40。

[0008] 总之,死亡是由位于TNF受体的胞质一侧的死亡结构域集聚后引发的。这些死亡结构域协调各种信号传导成分的组装,引起caspase级联活化。一些受体缺乏规则的死亡结构域,如LTb受体和CD30,但是能够诱导细胞死亡,尽管较为微弱。相反,通过其他路径如CD40发送信号是维持细胞存活所必需的。还需要进一步鉴定和表征TNF家族成员的功能,从而便于开发用于TNF家族相关疾病的新治疗方法。

[0009] TWEAK在筛选杂交到促红细胞生成素探针的RNA中被分离。Chicheportiche等, J. Biol. Chem. 272:32401-32410 (1997)。小鼠和人的肽具有异乎寻常的高度保守性,包括在受体结合结构域中具有93%氨基酸同一性。TWEAK被证实高效地从细胞中分泌,在许多组织中丰富地被表达,包括心脏、大脑、胎盘、肺、肝脏、骨骼肌、肾脏、胰腺、脾脏、淋巴结、胸腺、阑尾和外周血液淋巴细胞。

[0010] 一种已知的TWEAK受体是Fn14,生长因子调节的立即早期反应基因,其降低对细胞外基质的细胞附着和减弱血清刺激的生长和迁移 (Meighan-Mantha等, J. Biol. Chem. 274: 33166-33176 (1999))。Fn14已经被证明会被FGF、小牛血清和氟波醇酯 (phorbol ester) 处理诱导,并且在心脏、肾脏、肺、皮肤、骨骼肌、卵巢和胰腺组织中,以及在肝细胞癌模型和其他癌细胞系中以相对高的水平被表达,在正常肝脏组织中以较低水平被表达。

[0011] TWEAK与许多生物学过程相关。例如,用IFN- γ 和TWEAK处理的HT29细胞被证明发生凋亡;尽管TWEAK诱导凋亡的能力是微弱的,并且仅少数细胞类型易感。Chicheportiche等, J. Biol. Chem. 272:32401-32410 (1997)。相反,TWEAK已经被证明在不依赖VEGF的路径中诱导血管发生和内皮细胞增生。Lynch等, J. Biol. Chem. 274:8455-8459 (1999)。星细胞被TWEAK特异地结合和刺激。TWEAK能够渗入发炎的大脑中来影响星细胞的行为。暴露于TWEAK的星细胞分泌大量IL-6和IL-8,并上调ICAM-1表达。Saas等, GLIA 32:102-107 (2000)。

[0012] TWEAK还与免疫系统的调节相关。在用IFN- γ 刺激时,单核细胞迅速地表达TWEAK,抗TWEAK的抗体部分地抑制它们对人鳞状细胞癌的细胞的细胞毒性活性。抗TWEAK和抗TRAIL的抗体的结合几乎完全抑制细胞毒性。Nakayama等, J. Exp. Med. 192:1373-1379 (2000)。相反TWEAK的mRNA在用脂多糖 (LPS) 处理的小鼠中迅速消失,脂多糖是免疫炎症反应的诱导物。此外,在小鼠模型的自体免疫溶血性贫血和系统性红斑狼疮中,TWEAK的mRNA也减少。这些数据表明,下调TWEAK的表达是急性和慢性炎症中的重要事件。Chicheportiche等, Biochem. Biophys. Res. Comm. 279:162-165 (2000)。

[0013] 当前,本领域缺乏对哪些病症或疾病与TWEAK表达和功能相关的完整了解,包括TWEAK在炎症和非炎症病症中的作用。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及TWEAK对于促进各种病理状况的严重性和进展中的作用,包括多种组织和器官系统的疾病。这种病理状况包括急性心脏损伤,慢性心力衰竭,非炎症性充血性心脏病,充血性心力衰竭,肝脏上皮细胞增生,肝细胞死亡,肝脏纤维变性,肝细胞液泡化,其他肝脏损伤,胆管病症,包括胆管增生,炎症性肾脏病症,如多病灶 (multifocal) 炎症性、非

炎症性肾脏病症,如肾小管肾病,肾小管增生,肾小球囊肿,肾小球肾病,Alport综合症,肾小管液泡化,肾透明管型(kidney hyaline cast),肾纤维变性和炎症性肺病,本发明建立了TWEAK分子与某些心脏、肝脏、肾脏和肺疾病之间的因果关系。在此公开的本发明还建立了TWEAK与肝脏组织、肾小管、皮肤细胞、脂肪细胞、骨骼肌、软骨和骨的祖细胞,以及结缔组织细胞类型,如骨髓中的基质细胞,以及成纤维细胞的行为之间的联系。

[0016] 在一个实施方案中,本发明涉及用于治疗TWEAK相关病症的方法,所述病症即其中TWEAK的受体如FN14被表达的各种疾病,损伤情况或组织的其他病理状况。这些病症包括纤维变性,心肌病,和肾脏、肺、肝脏、皮肤、骨骼肌、脂肪代谢(如肥胖)、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经组织(包括神经退行性病变),软骨、骨和结缔组织的疾病。在优选实施方案中,TWEAK相关病症实质上是非炎症性的。在另一个优选实施方案中,本发明涉及通过干扰TWEAK与其分子受体之间的相互作用来治疗TWEAK相关病症的方法。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明涉及TWEAK激动剂或拮抗剂,和包含它们的用于治疗TWEAK相关病症的药物组合物。这种TWEAK激动剂或拮抗剂(即抑制剂)可能是抗TWEAK抗体或其衍生物;抗TWEAK受体抗体或其衍生物;TWEAK多肽片段;TWEAK多肽类似物;TWEAK突变蛋白;TWEAK模拟物;TWEAK融合蛋白;TWEAK受体多肽片段;TWEAK受体多肽类似物;TWEAK受体突变蛋白;TWEAK受体模拟物;TWEAK受体融合蛋白;有机化合物;和无机化合物。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明涉及TWEAK激动剂或拮抗剂和用于治疗需要组织再生或替换的宿主的药物组合物。还涉及TWEAK激动剂或拮抗剂在体内或体外调节祖细胞(progenitor)的群体的行为中的用途。该祖细胞可以是肝脏细胞类型、肾小管、心肌细胞、肺细胞类型、皮肤细胞类型、骨骼肌细胞类型、脂肪细胞、胃肠细胞类型、胰腺细胞类型、神经组织细胞类型、软骨和骨细胞类型、结缔组织细胞类型的前体(precursor)细胞,包括骨髓中的基质细胞和成纤维细胞。TWEAK激动剂或拮抗剂以及包含它们的药物组合物可以被体内施用来促进在疾病或组织损伤状况下的组织再生和替换,包括但不限于毒素、病毒、化学治疗或放射物导致的损害,和遗传性或退化性异常。在另一个实施方案中,TWEAK激动剂或拮抗剂和它们的药物组合物可以与干细胞或祖细胞的细胞治疗联合,用于再生组织和器官系统。在另一个实施方案中,干细胞或祖细胞群体可以在体外用TWEAK激动剂或拮抗剂以及它们的组合物扩增。通过使用TWEAK激动剂或拮抗剂扩增的祖细胞群体可以被移植到需要再生或替换组织的宿主中。

[0019] 在其他实施方案中,本发明涉及鉴定用作TWEAK相关病症治疗的治疗剂的TWEAK激动剂或拮抗剂的方法。在另一个实施方案中,本发明涉及表达编码TWEAK多肽的外源DNA的转基因动物。本发明的另一个实施方案包括TWEAK作为疾病的分子标志的用途。

[0020] 更具体地,本发明涉及

[0021] 1.一种用于治疗机体中的TWEAK相关病症的方法,包括将TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂施用给所述机体的步骤,其中所述TWEAK相关病症选自纤维变性;心脏病;肝脏疾病;肺部疾病;肾脏疾病;皮肤病;骨骼肌疾病;脂肪组织疾病;胃肠道疾病;胰腺疾病;生殖器官疾病;神经疾病;软骨疾病;骨病;结缔组织疾病;细胞死亡;或表达TWEAK受体的组织的病理状况。

[0022] 2.项1的方法,其中所述TWEAK相关病症是非炎症的病症。

[0023] 3.项2的方法,其中所述TWEAK相关病症是非炎症性的心肌病。

[0024] 4. 项1或2的方法,其中所述表达TWEAK受体的组织的病理状况选自:纤维变性;心脏病;肾脏病症;肺部病症;肝脏病症;皮肤病症;骨骼肌病症;脂肪组织病症;胃肠道病症;胰腺病症;生殖器官病症神经组织病症;软骨病症;骨病症;或结缔组织病症。

[0025] 5. 项1或2的方法,其中所述TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂选自:抗TWEAK抗体;抗TWEAK受体的抗体;TWEAK多肽片段;TWEAK多肽类似物;TWEAK突变蛋白;TWEAK模拟物;TWEAK融合蛋白;TWEAK受体多肽片段;TWEAK受体多肽类似物;TWEAK受体突变蛋白;TWEAK受体模拟物;TWEAK受体融合蛋白;有机化合物;或无机化合物。

[0026] 6. 项1或2的方法,其中所述TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂被施用给所述机体,给药途径选自:注射、经粘膜、口服、吸入、眼部、直肠、支架植入、体表、胃肠外、长效植入、缓释、基因治疗或耳朵的路径。

[0027] 7. 项1或2的方法,其中所述TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂在呈递的剂型中,该剂型选自片剂、药丸、脂质体、颗粒、球体、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、果汁、糖浆、悬浮液、支架包被或缓释制剂。

[0028] 8. 一种用于治疗机体中的TWEAK相关病症的方法,包括将能够干扰第一种TWEAK多肽与分子的作用的TWEAK拮抗剂施用给所述机体的步骤,所述分子选自:细胞受体、第二种TWEAK多肽和与TWEAK相互作用的配偶体。

[0029] 9. 用于鉴定作为TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂的化合物的方法,包括步骤:(a) 将表达编码TWEAK多肽、或其片段或突变蛋白的外源DNA的试验转基因动物暴露于所述化合物;(b) 将来自所述试验转基因动物的纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织与来自表达外源DNA但是不被暴露于所述化合物的参比动物的相应的器官或组织比较;和(c) 确定该化合物是否影响所述试验动物的纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织。

[0030] 10. 项9的方法,其中所述化合物选自:TWEAK多肽;TWEAK多肽片段;TWEAK多肽类似物;TWEAK突变蛋白;TWEAK模拟物;TWEAK融合蛋白;TWEAK受体多肽;TWEAK受体多肽片段;TWEAK受体多肽类似物;TWEAK受体突变蛋白;TWEAK受体模拟物;TWEAK受体融合蛋白;有机化合物;或无机化合物。

[0031] 11. 项9的方法,其中所述化合物是抗一种抗原的抗体,该抗原选自:TWEAK多肽;TWEAK多肽片段;TWEAK突变蛋白;TWEAK模拟物;TWEAK融合蛋白;TWEAK受体多肽;TWEAK受体片段;TWEAK受体突变蛋白;TWEAK受体模拟物;TWEAK受体融合蛋白;表达TWEAK多肽,其片段、突变蛋白或融合蛋白的细胞;和表达TWEAK受体多肽,其片段、突变蛋白或融合蛋白的细胞。

[0032] 12. 项9的方法,其中所述试验转基因动物和所述参比转基因动物各选自:小鼠;大鼠;仓鼠;兔;狗;猫;牛;猪;山羊;马;绵羊;豚鼠;鸟;灵长类;鱼;两栖类;昆虫;或无脊椎动物。

[0033] 13. 项9的方法鉴定的化合物,其中所述化合物选自:TWEAK多肽;TWEAK多肽片段;TWEAK多肽类似物;TWEAK突变蛋白;TWEAK模拟物;TWEAK融合蛋白;TWEAK受体多肽;TWEAK受体多肽片段;TWEAK受体多肽类似物;TWEAK受体突变蛋白;TWEAK受体模拟物;TWEAK受体融合蛋白;抗TWEAK多肽的抗体,或其片段、类似物、突变蛋白、模拟物或融合蛋白;抗TWEAK受

体多肽,或其片段、类似物、突变蛋白、模拟物或融合蛋白的抗体;有机化合物;或无机化合物。

[0034] 14.项13的化合物,其中所述抗体是多克隆抗体。

[0035] 15.项13的化合物,其中所述抗体是单克隆抗体。

[0036] 16.项15的化合物,其中所述单克隆抗体是人源化抗体。

[0037] 17.项14或15的化合物,其中所述抗体是异种抗体。

[0038] 18.一种表达编码TWEAK多肽的外源DNA的转基因动物,其中所述表达导致选自如下的病症:纤维变性;心肌病;肾脏疾病;肝脏疾病;肺疾病;皮肤疾病;骨骼肌疾病;脂肪组织疾病;胃肠道疾病;胰腺疾病;生殖器官疾病;神经疾病;软骨疾病;骨病;结缔组织疾病;或细胞死亡。

[0039] 19.项18的转基因动物,其中所述动物选自:小鼠;大鼠;仓鼠;兔;狗;猫;牛;猪;山羊;马;绵羊;豚鼠;鸟;灵长类;鱼;两栖类;昆虫;或无脊椎动物。

[0040] 20.项18的转基因动物,其中所述DNA由组成型启动子启动表达。

[0041] 21.项18的转基因动物,其中所述DNA由诱导型启动子启动表达。

[0042] 22.项18的转基因动物,其中所述DNA由组织特异性启动子启动表达。

[0043] 23.项18的转基因动物,其中所述TWEAK多肽选自:全长TWEAK多肽;可溶性TWEAK多肽;突变蛋白;或TWEAK多肽片段。

[0044] 24.表达编码TWEAK多肽的外源DNA的转基因动物,其中所述DNA在选自下面的器官或组织中被表达:心脏;血管;肺;肝脏;肾脏;皮肤;神经;胎盘;骨骼肌;胰腺;脾;淋巴;胸腺;阑尾;外周血液淋巴细胞;生殖器官;脂肪组织;胃肠组织;软骨;骨;或结缔组织。

[0045] 25.项24的转基因动物,其中所述DNA由组成型启动子启动表达。

[0046] 26.项24的转基因动物,其中所述DNA由诱导型启动子启动表达。

[0047] 27.项24的转基因动物,其中所述DNA由组织特异性启动子启动表达。

[0048] 28.用于在机体中鉴定充血性心肌病的方法,包含在所述机体中检测TWEAK蛋白表达、TWEAK蛋白功能、TWEAKmRNA表达的变化或染色体改变的步骤。

[0049] 29.项28的方法,其中所述TWEAK蛋白表达、TWEAK蛋白功能、TWEAKmRNA表达的变化或染色体改变通过选自下面的方法检测:(a)免疫分析;(b)免疫组织化学分析;(c)酶的或其他蛋白功能的分析;(d)Northern印迹;(e)Southern印迹;(f)单核苷酸多形性分析;或(g)荧光原位杂交分析。

[0050] 30.用于影响细胞增殖或分化的方法,包括将祖细胞暴露于TWEAK肽、TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂。

[0051] 31.项30的方法,其中所述祖细胞选自:(a)干细胞;(b)全能细胞;(c)多潜能细胞;(d)多能细胞;(e)双能细胞;(f)组织特异性细胞;(g)胚胎细胞;或(h)成体细胞。

[0052] 32.项30的方法,其中所述祖细胞是未分化的脂肪细胞。

[0053] 33.项30的方法,其中所述祖细胞是未分化的生肌细胞。

[0054] 34.促进组织替换或再生的方法,包括给需要组织替换或再生的机体施用一种化合物,该化合物选自:(a)抗TWEAK抗体;(b)抗TWEAK受体抗体;(c)TWEAK多肽片段;(d)TWEAK多肽类似物;(e)TWEAK突变蛋白;(f)TWEAK模拟物;(g)TWEAK融合蛋白;(h)TWEAK受体多肽片段;(i)TWEAK受体多肽类似物;(j)TWEAK受体突变蛋白;(k)TWEAK受体模拟物;(l)TWEAK

受体融合蛋白；(m) 有机TWEAK激动剂；(n) 有机TWEAK拮抗剂；(o) 无机TWEAK激动剂；或(p) 无机TWEAK拮抗剂。

[0055] 35. 项1、30和34的任何一项的方法，其中所述方法与祖细胞或组织移植治疗联合应用。

[0056] 36. 项35的方法，其中所述细胞或组织移植治疗扩增细胞群体。

[0057] 37. 项30的方法，其中所述祖细胞是未分化的软骨细胞。

[0058] 38. 项30的方法，其中所述祖细胞是未分化的骨细胞。

[0059] 39. 项30的方法，其中所述祖细胞是未分化的结缔组织细胞。

[0060] 40. TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂在制备用于在机体中治疗TWEAK相关病症的药物组合物中的用途，其中所述TWEAK相关病症选自：(a) 纤维变性；(b) 心脏病；(c) 肝脏疾病；(d) 肺疾病；(e) 肾脏疾病；(f) 皮肤病；(g) 骨骼肌疾病；(h) 脂肪组织疾病；(i) 胃肠道疾病；(j) 胰腺疾病；(k) 生殖器官疾病；(l) 神经疾病；(m) 软骨疾病；(n) 骨病；(o) 结缔组织疾病；(p) 细胞死亡；或(q) 表达TWEAK受体的组织的病理状况。

[0061] 41. 项40的用途，其中所述TWEAK激动剂或TWEAK拮抗剂选自：(a) 抗TWEAK抗体；(b) 抗TWEAK受体抗体；(c) TWEAK多肽片段；(d) TWEAK多肽类似物；(e) TWEAK突变蛋白；(f) TWEAK模拟物；(g) TWEAK融合蛋白；(h) TWEAK受体多肽片段；(i) TWEAK受体多肽类似物；(j) TWEAK受体突变蛋白；(k) TWEAK受体模拟物；(l) TWEAK受体融合蛋白；(m) 有机化合物；或(n) 无机化合物。

[0062] 42. TWEAK拮抗剂在制备用于在机体中治疗TWEAK相关病症的药物组合物中的用途，其中所述TWEAK拮抗剂能够干扰第一种TWEAK多肽与一种分子的作用，该分子选自：细胞受体、第二种TWEAK多肽和与TWEAK相互作用的配偶体。

附图说明

[0063] 附图1：显示TWEAK在充血性心肌病中的作用。A. FL-TWEAK转基因(Tg) 小鼠表现为右侧心房和心室栓塞，并且严重扩张。B. 显示正常的心脏作为比较。

[0064] 附图2：TWEAK在心脏中过度表达导致心脏重塑(cardiac remodeling)。在用包含小鼠TWEAK DNA的腺病毒载体感染成年C57BL/6小鼠后第20天，在10X放大倍数下观察用苏木精/曙红染色的心脏的横截面，与腺病毒-GFP对照构建体比较。

[0065] 附图3：TWEAK诱导胆管和卵形细胞(oval cell) 增生，如与2周龄和7月龄的非转基因(NTg) 同窝小鼠相比，FL-TWEAK转基因(Tg) 小鼠中所显示。

[0066] 附图4：在与非转基因(NTg) 同窝小鼠相比时，在FL-TWEAK转基因(Tg) 小鼠中，对胆管上皮和卵形细胞标记特异的A6mAb的染色增加，这表明TWEAK诱导胆管和卵形细胞增生。

[0067] 附图5：在FL-TWEAK转基因(Tg) 小鼠的门脉区中存在大的、卵形细胞，这表明TWEAK诱导卵形细胞增生。

[0068] 附图6：与非转基因(NTg) 同窝小鼠相比，TWEAK在FL-TWEAK转基因(Tg) 小鼠中引起肝细胞液泡化。

[0069] 附图7：用包含小鼠TWEAK DNA的腺病毒载体感染的小鼠中的血清TWEAK水平。

[0070] 附图8：TWEAK在肝脏中过度表达导致肝细胞死亡和胆管增生。在用包含小鼠TWEAK DNA的腺病毒载体感染成年C57BL/6小鼠后第3和11天，在20X放大倍数下观察用苏木精/曙

红染色的肝脏的横截面,与腺病毒—GFP对照构建体比较。

[0071] 附图9:在CC14引起肝脏损伤后,TWEAK受体Fn14在小鼠中被诱导。在正常小鼠肝脏和CC14损伤的肝脏中原位杂交Fn14mRNA,表明如果在正常的成年肝脏中有任何可检测的表达,也是微弱的,而在损伤后显著地诱导Fn14表达。苏木精/曙红(H&E)染色的切片展示相应的正常健康的肝脏和CC14损伤的肝脏组织。

[0072] 附图10:在胆管结扎的小鼠模型中,胆管上皮细胞中Fn14表达被上调,用于原位杂交的直接抗Fn14的反义mRNA探针的染色增加表明了这一点。苏木精/曙红(H&E)染色的切片展示在明视野显微镜下的相应切片。

[0073] 附图11:在2周龄、8周龄和7月龄时,与非转基因(NTg)小鼠的肾脏比较的FL-TWEAK转基因(Tg)小鼠肾脏的横截面。这些结果表明在8周龄和7月龄的TWEAK Tg小鼠肾脏中肾小管嗜碱性,肾小球中的储尿腔(urinary space)扩张,即肾小球囊肿,在7月龄具有近端嗜碱性肾小管。

[0074] 附图12:具有H&E染色的FL-TWEAK转基因(Tg)小鼠的肾脏的横截面。A.表示邻近的近端肾小管上皮嗜碱性的肾小球肾病。B.节段性肾小球膜的细胞过多(segmental mesangial hypercellularity)、肾小囊上皮肥大、和肾小囊增厚。

[0075] 附图13:来自两只FL-TWEAK转基因(Tg)小鼠肾脏的连续切片,用H&E(上面)和扩增的细胞核抗原(PCNA)(下面)染色。嗜碱性肾小管对应于表达PCNA的肾小管,即增生的肾小管。

[0076] 附图14:FL-TWEAK转基因(Tg)小鼠肾脏的连续切片,用H&E、得自T.Purpureas的凝集素(近端肾小管的标记)和得自A.Hypogaea的凝集素(远端肾小管的标记)标记。结果表明嗜碱性肾小管不表达任何上皮标记。

[0077] 附图15:TWEAK在肾脏中过度表达导致肾小管增生和肾小球肾病。在用包含小鼠TWEAK DNA的腺病毒载体感染成年C57BL/6小鼠后第11天,在20X和40X放大倍数下观察用苏木精/曙红染色的肾脏的横截面,与腺病毒—GFP对照构建体比较。

[0078] 附图16:TWEAK mRNA在整个成年野生型小鼠肾脏中广泛的表达。在5X倍数下观察苏木精染色的肾脏的横截面,或在用正义或反义TWEAK探针原位杂交后,在暗视野显微镜下观察。

[0079] 附图17:Fn14mRNA在野生型小鼠肾脏的外层髓质的近端肾小管中被表达。在5X倍数下观察苏木精染色的肾脏的横截面,或在用正义或反义Fn14探针原位杂交后,在暗视野显微镜下观察。

[0080] 附图18:TWEAK在肾脏纤维变性中的作用,得到Alports肾脏中的Fn14mRNA上调的支持。Fn14mRNA水平上升的倍数以两只分别具有导致Alports疾病的突变的小鼠在4,5,6和7周龄与野生型动物比较来表示。mRNA水平通过与含有对应于一部分Fn14基因的核苷酸序列的基因芯片杂交来确定。在第4和7周,给出两只小鼠中每只小鼠的重复结果(分别用小鼠1重复和小鼠2重复柱来表示)。在第7周,Fn14mRNA在疾病被抑制的两种情况下降低,即sTGF R-Fc处理和VLA-1敲除的小鼠中(在附图18中或者用sTGFbR-Fc处理的两只单个小鼠("sTGFbR处理")或者两只单个的Alport/VLA-1KO小鼠("Alport/VLA-1KO")表示。

[0081] 附图19:在一种肾脏纤维变性小鼠模型,单侧输尿管阻塞(UUO)中用TWEAK拮抗剂处理显著地降低肾脏纤维变性。三色—马森(Trichrome-Masson)染色的石蜡肾脏切片上的

蓝色染色区域(纤维变性区域)的结构改变的量化表明,胶原质含量在AB.G11(抗TWEAK单克隆Ab)处理的肾脏样本中下降到与在sTGF- β R-Ig阳性对照样本中观察的水平相似的水平。相反,同种型对照仓鼠抗体(HA4/8)处理的肾脏没有显示出肾脏纤维变性降低,与载体(PBS)处理的肾脏类似。

[0082] 附图20:TWEAK转基因在肺中引起肉芽肿性和淋巴组织细胞炎症。A.用H&E染色的来自FL-TWEAK转基因(Tg)小鼠肺的横截面。B.用H&E染色的来自sTWEAK(Tg)小鼠肺的横截面。

[0083] 附图21:TWEAK mRNA在成年野生型小鼠的内衬于肺的支气管和肺泡的细胞中被表达。在10X放大倍数下用苏木精染色观察肺的横截面,或者在用正义或反义TWEAK探针原位杂交后在暗视野显微镜下观察。

[0084] 附图22:Fn14mRNA在成年野生型小鼠的支气管和肺泡中被表达。在10X放大倍数下用苏木精染色观察肺的横截面,或者在用正义或反义Fn14探针原位杂交后在暗视野显微镜下观察。

[0085] 附图23:TWEAK在体外对3T3-L1细胞脂肪细胞分化的抑制作用。3T3-L1细胞被采用标准方法诱导来进行分化。在第0天,细胞不被处理、用对照试剂(重组的可溶性人CD40L-FLAG 100ng/ml)或100ng/ml各种形式的TWEAK(重组可溶性人TWEAK-FLAG、重组可溶性人TWEAK、Fc-人TWEAK)处理,以及地塞米松和胰岛素,并且每天补充。在一个试验组中,阻断性抗TWEAK mAb AB.G11还与Fc-hTWEAK同时被加入。在第7天用Oil-red O染色细胞。

[0086] 附图24:TWEAK在体外对肌细胞生成的抑制作用。C2C12成肌细胞在DMEM基础生长培养液中生长到接近汇合,在第0天被转移到含有2%马血清的低血清分化培养液中来引发分化。细胞不被处理或在第0天用Fc-hTWEAK(100ng/ml)处理。使用相差显微镜来检测肌管形成,在分化的第6天拍摄照片。在另一个试验组中,Fn14-Fc或中和性抗TNF抗体与Fc-hTWEAK同时被加入,从而证明Fc-hTWEAK的抑制作用是TWEAK特异的,不是通过TNF调节。

[0087] 附图25:TWEAK能够结合到人间充质干细胞上。人间充质干细胞(hMSCs)用重组的Fc-TWEAK蛋白培养,接着用PE-偶联的山羊抗人Fc或山羊抗小鼠Fc第二抗体培养。Fc-TWEAK结合hMSCs的能力采用荧光激活细胞分选仪(FACS)分析测定。背景染色通过单独用第二抗体染色(仅用第二抗体)来提供。方法:人间质干细胞(hMSCs)购自BioWhittaker(Cambrex),并按照推荐的方法培养。用含有5mM EDTA的PBS培养后收获细胞,染色检测细胞结合重组Fc-Tweak蛋白的能力(附图1中实线)。简而言之,hMSCs在具有100ng/ml Fc-Tweak的FACS缓冲液培养1h。在用FACS培养液洗涤2次后,细胞用PE偶联的山羊抗人Fc第二抗体(Jackson ImmunoResearch 1:200)温育。仅用第二抗体染色测定的背景用虚线表示。

[0088] 发明详述

[0089] 除非本文特别指出,所用的与本发明有关的科技术语具有与本领域技术人员通常所理解相同的含义。此外,除非上下文另有规定,单数术语包括复数形式,而复数术语包括单数形式。一般地,本文所描述的细胞和组织培养物、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学、病毒和蛋白质和核酸化学和杂交所用的相关命名和技术是本领域那些公知和常用的。除非特别指出,本发明的方法和技术通常按照本领域熟知的常规方法进行,这些方法被描述在本说明书全文中所引用和讨论的各种概括或特定参考文献中。参见,如Sambrook等Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, 纽约 (1989) 和 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), 以及 Harlow 和 Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约 (1990), 在此引入作为参考。酶促反应和纯化技术按照生产商的说明进行, 如本领域常规技术或本文所描述。与分析化学、合成有机化学、和医学和药物化学相关的所用命名, 和实验室操作和技术, 是本领域熟知和通常使用的。标准技术被用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和呈递, 以及治疗患者。

[0090] 为了本文所描述的发明被更加充分地理解, 给出如下的详细描述。在本说明书中使用如下术语:

[0091] “抗体”是指完整的免疫球蛋白, 或指其抗原结合部分, 该部分可与完整抗体竞争而与抗原特异性结合。抗原结合部分可以通过重组DNA技术或通过酶促或化学裂解完整抗体来制备。抗原结合部分包括, 例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb 和互补决定区 (CDR) 片段、单链抗体 (scFv)、嵌合抗体、双抗和含有至少一部分免疫球蛋白的多肽, 该部分免疫球蛋白足以赋予该多肽特异性结合抗原的能力。Fab 片段是单价片段, 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成; F(ab')₂ 片段是双价片段, 其包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段; Fd 片段由 VH 和 CH1 结构域组成; Fv 片段由 VL 和抗体的一个臂的 VH 结构域组成; 和 dAb 片段 (Ward 等, *Nature* 341:544-546, 1989) 由 VH 结构域组成。单链抗体 (scFv) 是其中 VL 和 VH 区域通过合成接头配对来形成单价分子的抗体, 这使得它们可以作为单一的蛋白链被制备 (Bird 等, *Science* 242:423-426 (1988) 和 Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, (1988))。双抗 (diabody) 是二价的, 双特异性抗体, 其中 VH 和 VL 结构域在单一多肽链上被表达, 但是采用一个极短的接头使得在同一条链上的两个结构域不能配对, 从而迫使该结构域与另一条链的互补结构域配对, 产生两个抗原结合位点 (参见, 如 Holliger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), 和 Poljak 等, *Structure* 2:1121-1123 (1994))。一个或多个 CDRs 被共价地或非共价地结合到分子上来使之成为一种免疫粘附素。免疫粘附素可纳入 CDR(s) 作为较大的多肽链的部分, 可以共价地将 CDR(s) 连接到另一个多肽链上, 或者可以非共价地纳入 CDR(s)。CDR 使得免疫粘附素特异性地结合到特定的目标抗原上。

[0092] 抗体可以具有一个或多个结合位点。如果存在一个以上结合位点, 该结合位点可以与另一个相同或不同。例如, 天然的免疫球蛋白具有两个相同的结合位点, 单链抗体或 Fab 片段具有一个结合位点, 而“双特异性”或“双功能”抗体具有两个不同结合位点。

[0093] “抗体谱 (antibody repertoire)”是指动物或人中的每种不同的抗体种类的总和。抗体谱的多样性来自, 例如, 免疫球蛋白基因重组、免疫球蛋白基因结合多样性、末端脱氧转移酶活性和体细胞超变 (somatic hypermutation)。

[0094] “嵌合抗体”是从其原始形式被改变来包含来自另一个蛋白质的氨基酸序列的抗体。嵌合抗体保留至少一部分原始抗体氨基酸序列, 通常是包含抗原结合区域 (Fab) 的那部分。嵌合抗体的例子包括但是不限于, 双特异性抗体和与其他非免疫球蛋白序列的融合。

[0095] “顺式调控元件”通常是指在特定条件下或在特定细胞中调控基因序列的可诱导的或组成型表达。表达控制序列调控的细胞过程的例子包括但是不限于, 基因转录、蛋白质翻译、信使 RNA 剪接、免疫球蛋白同种型转换、蛋白质糖基化、蛋白质裂解、蛋白质分泌、细胞

内蛋白质定位和细胞外蛋白质自归巢(homing)。

[0096] “细胞因子”一般是指免疫系统的信号分子。细胞因子包括但是不限于白细胞介素(IL)、转化生长因子(TGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、淋巴毒素(LT)、干扰素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞CSF、粒细胞CSF和迁移抑制因子。

[0097] “胚胎干细胞(ES)”是指多潜能(pluripotent)或多能(multipotent)细胞,当被注射到胚泡中时,其能够形成许多或所有出生前、出生后或成年动物的组织。从胚泡注射得到的动物通常被称作“嵌合”动物,由于其体细胞和/或生殖细胞通常来源于胚泡供体和被注射的ES细胞。ES细胞的重要特性在于其能够形成动物的生殖细胞系,产生被传递到嵌合动物后代的任何期望的可遗传的特征。无限增生的ES细胞是生产具有靶向内源基因序列破坏的动物或者生成具有外源基因的动物(转基因)的有力工具。

[0098] “表达控制序列”是指在特定条件下或在特定细胞中组成型表达或可诱导表达基因序列的序列。表达控制序列调控的细胞过程的例子包括但是不限于,基因转录、蛋白质翻译、信使RNA剪接、免疫球蛋白同种型转换、蛋白质糖基化、蛋白质裂解、蛋白质分泌、细胞内蛋白质定位和细胞外蛋白质自归巢。

[0099] “融合蛋白”是指包含两种或多种蛋白质的氨基酸序列的嵌合蛋白。典型地,融合蛋白产生自本领域熟知的体外重组技术。但是,融合蛋白可以从体内交换或其他重组事件中产生。

[0100] “人免疫球蛋白分子”是指由人免疫球蛋白基因序列编码的免疫球蛋白。免疫球蛋白基因序列可以在任何细胞或动物,人或非人类中被表达。

[0101] “人源化抗体”是衍生自非人类的物种的抗体,其中重链和轻链的框架区和恒定区中特定的氨基酸被突变,以在人中避免或消除免疫反应。可选择地,人源化抗体可以通过将来自人抗体的恒定区融合到非人类物种的可变区上来制备。如何制备人源化抗体的实例可以在美国专利6,054,297、5,886,152和5,877,293中发现。

[0102] “炎症”或“炎症性疾病”是指由细胞和组织反应组成的基础病理过程,在对损伤,异常刺激或生物学试剂响应时在血管和邻近组织中发生。同样地,“非炎症性病症”或“非炎症性疾病”是指实质上是非炎症的任何病症或疾病,如本文所公开的。

[0103] “分离的蛋白质”或“分离的多肽”一般是指蛋白质或多肽,从其起源或来源来讲:(1)不是天然地结合在天然状态下与其相伴的相关成分上,(2)不含有来自同一物种的其他蛋白,(3)由来自不同物种的细胞表达,(4)在天然条件下不存在。因此,嵌合地合成,在无细胞的生物系统中(如兔网状细胞溶解产物)合成,或者在不同于其天然来源的细胞系统中合成的多肽可以从其天然相关的成分中“分离”。还可以采用本领域熟知的纯化技术,通过分离以使蛋白基本上不含有天然相关的成分。

[0104] “模拟物”或“肽模拟物”是非肽的类似物,其通常被用于制药工业作为具有与模板肽类似的性质的药物。Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber和Freidinger, TINS 392 (1985); 和Evans等, J. Med. Chem. 30:1229 (1987), 在此引入作为参考。模拟物通常借助计算机分子建模来开发。结构上类似于治疗上有用的肽的肽模拟物可以被用于产生等价的治疗性或预防性作用。一般地,模拟物在结构上类似于范例多肽(即,具有期望的生物化学性质或药理学活性的多肽),例如TWEAK,但是具有一种或多种肽键可选择地通过本领域熟知的方法被一种键替换,该键选自--CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂-- , --CH=CH-- (顺式和反

式), --COCH₂-- , --CH(OH)CH₂-- , 和--CH₂SO--。用相同类型的D-氨基酸系统性地取代共有序列的一种或多种氨基酸(例如用D-赖氨酸取代L-赖氨酸)也可以被用于生产更加稳定的肽。此外, 包含共有序列或实质上相同的共有序列变体的限定的肽可以通过本领域已知的方法来生产(Rizo和Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992), 在此引入作为参考); 例如, 通过增加能够形成分子间二硫键的内在半胱氨酸残基, 二硫键使肽环化。

[0105] “肽类似物”是指来自野生型多肽但是氨基酸序列不同的多肽。氨基酸序列改变的多肽可以是突变蛋白, 融合蛋白和模拟物。多肽类似物还指与野生型多肽相比具有非氨基酸差别的多肽。这些差别可以是化学的和生物化学的, 并且包括但是不限于特别在本文中公开的修饰类型。

[0106] “多肽片段”是指氨基末端和/或羧基末端被缺失但是剩下的氨基酸序列与天然序列的相应部分相同的多肽。片段典型为长至少5, 6, 8或10个氨基酸, 优选至少14个氨基酸, 更加优选长至少20个氨基酸, 通常至少长50个氨基酸, 和甚至更加优选长至少70个氨基酸。

[0107] “祖细胞”是指能够产生一种或多种细胞系的细胞。包括干细胞、全能细胞、多潜能细胞、多能细胞、双能细胞(bipotent cell), 胚胎细胞或成体细胞(adult cell)。还包括组织特异性细胞, 包括但是不限于, 定向于能够进行终末分化的特定细胞系的细胞, 来自于组织定居细胞(tissue resident cell)的细胞, 和定向于特定组织的循环细胞。

[0108] “机体”是人或非人类机体。机体的例子是患者。

[0109] “TWEAK相关病症”是指由异常TWEAK功能或调控产生的任何病症。该术语还指不是直接从异常TWEAK功能或调控产生的任何病症, 而是产生自一些其他的机制, 其中破坏、升高或另外改变TWEAK的活性对该病症具有可检测的结果。TWEAK相关病症可以是炎症性的或实质上非炎症性的, 并且包括但是不限于本文特别公开的病症和疾病。

[0110] “载体”是指使目标DNA序列在其天然细胞之外被克隆、繁殖、重组、突变和表达的DNA分子。通常地, 载体具有使基因序列在特定条件下或在特定细胞中可诱导地或组成型地表达的表达控制序列。载体的例子包括但是不限于质粒, 酵母人工染色体(YACs), 病毒, EB病毒, (EBV)来源的附加体, 噬菌体、粘粒和噬菌粒。

[0111] “异种动物”是指携带人免疫球蛋白基因座实质部分的动物。经常地, 异种动物携带同源靶向内源免疫球蛋白基因座, 使得它们不能表达其内源免疫球蛋白基因。实例包括XenoMouse™细胞系的小鼠(Abgenix, Inc., Fremont, 加利福尼亚), 其能够体内重排转基因的人免疫球蛋白基因, 超变人可变基因, 免疫球蛋白基因的表达, 和免疫球蛋白同种型转换。异种动物能够利用人免疫球蛋白基因序列发动对抗原攻击的有效体液应答。在异种动物中产生的抗体完全是人的, 并且可从动物本身或其后代中, 从提取自动物或其后代的培养细胞中和从异种B淋巴细胞系或其后代中产生的杂交瘤中分离得到。而且, 被重排的编码免疫球蛋白的人基因序列可以通过常规的重组技术分离得到, 该免疫球蛋白产生来抵抗特定抗原攻击。

[0112] “异种抗体”是指通过外源免疫球蛋白基因座编码的抗体。例如, 在XenoMouse™系的小鼠中, 人抗体基因座编码异种抗体。

[0113] “异种单克隆抗体”是指在来自异种动物的克隆的、无限增生的细胞中如杂交瘤中产生的同源抗体群。例如从XenoMouse系小鼠中制备的杂交瘤产生异种抗体。

[0114] 对疾病的理解 and 治疗根本上朝向于确定阐明疾病的分子机制或生物化学路径。因

此,医生和科研人员能够制备治疗剂和配制药物组合物,它们特异性地靶向这些分子机制或生物化学路径。

[0115] 一些困扰人的最复杂且使人虚弱的疾病包括那些心脏、肝脏、肾脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪代谢、胃肠道、神经系统、胰腺、生殖器官、软骨、骨、结缔组织系统和祖细胞或干细胞的疾病。本发明的优点在于提供对这些疾病的了解的重要进展。更加特别地,本发明提供表达外源TWEAK蛋白的转基因动物,并首次证明TWEAK蛋白的表达与某些心脏、肝脏、肾脏和肺的病理状况之间的相关关系。本发明还提供用于治疗或预防这种病理状况的方法,以及用于鉴定用于这些方法中的TWEAK激动剂或拮抗剂的方法。可以按照本发明的方法治疗的病理状况包括急性的心脏损伤、慢性心力衰竭、非炎症性充血性心肌病、充血性心力衰竭、肝脏上皮细胞增生、肝细胞死亡、肝脏纤维变性、肝细胞液泡化、肝脏损伤、胆管病症,包括胆管增生、炎症性肾脏病症,如肾脏多病灶炎症,非炎症性肾脏病症,如肾小管肾病,肾小管增生,肾小球囊肿、肾肥大、肾小囊增厚、肾小球肾病、Alport综合症、肾小管液泡化、肾透明管型、肾脏纤维变性和炎症性肺病症。本发明还提供用于检测TWEAK结构或功能,作为疾病的分子标记的方法,包括TWEAK蛋白或其功能,TWEAK抗体和TWEAK核酸。

[0116] 本文所描述的TWEAK相关病症采用TWEAK激动剂或拮抗剂处理,TWEAK激动剂或拮抗剂能够改变TWEAK活性或者破坏膜结合或全长形式的TWEAK多肽与其分子受体之间的相互作用。可选择地,治疗剂和治疗方法破坏膜结合或全长形式的TWEAK多肽与另一种TWEAK多肽之间的相互作用。这种干涉可能发生在细胞表面、细胞内、细胞外或体外结合到固相上或在溶液中。在另一种选择中,治疗剂和治疗方法破坏膜结合或全长形式的TWEAK多肽与TWEAK相互作用的配偶体之间的相互作用。这种相互作用的配偶体可以是蛋白质、核酸、糖、脂肪、脂肪酸和类固醇。

[0117] 在一个本发明的优选实施方案中,TWEAK相关的病症实质上是非炎症的。

[0118] 在另一个优选实施方案中,TWEAK相关的病症是纤维变性、心肌病、肾脏疾病、肺部疾病或肝脏疾病。

[0119] 在另一个优选实施方案中,TWEAK相关的病症是骨骼肌疾病、脂肪组织疾病、胃肠道疾病、胰腺疾病、生殖器官疾病、神经组织疾病、细胞死亡、皮肤疾病、软骨疾病、骨病或结缔组织疾病、

[0120] 在另一个实施方案中,TWEAK激动剂或拮抗剂可以被用于在体内通过影响祖细胞来治疗患需要组织替换或再生的病症、疾病或损伤的机体(如灼伤的或被放射的患者)。TWEAK激动剂或拮抗剂还可以被用于与祖细胞或组织移植治疗结合来体内治疗机体。TWEAK激动剂或拮抗剂还可以被用于体内扩增细胞群或体外扩增祖细胞群,用于随后被移植到机体中,伴随或不伴随其他治疗。用于体内细胞治疗或体外扩增随后用于移植的祖细胞群体可以是胚胎或成体来源的。成体(adult)来源的祖细胞可以是多能的或组织限制性的(Lagasse等,Immunity 14:425-436 (2001);Jackson等J.Clin.Invest.107:1355-402 (2001);Anversa和Nadal-Ginard,Nature 415:240-243 (2002);Gussoni等,Nature 401:390-394 (1999);Brazelton等,Science290:1672-1674 (2000);Peterson等,Science 284:1168-1170 (1999);Lagasse等,Nature Medicine 6:1229-1234 (2000))。

[0121] 心脏病在工业国家中是劳动力丧失和死亡的重要原因。在美国,心脏病约占全部死亡率的40%,每年引起约750,000人死亡。心脏功能中最基础的是心肌,主要由分支和吻

合的纹状肌细胞(心肌细胞)组成。心肌细胞比介于其中的间质细胞大得多,占心肌体积的90%以上。正常的心肌中炎症性细胞极少并且胶原质也很少。

[0122] 心肌病很普遍,但是在不同心脏病症中位于第二位。心肌病的例子包括炎症性紊乱(如心肌病),而非炎症性心脏病症如充血性心肌病、系统性代谢紊乱、肌肉营养失调和心肌细胞的遗传异常。

[0123] 心肌病的主要类型包括充血性的、肥大性的和限制性的心肌病。本发明的目的在于提供用于治疗充血性心肌病的方法,充血性心肌病通常实质上是非炎症性的。在非炎症性充血性心肌病的情况下,其约占心肌病的临床病例的90%,心脏表现为进行性的心脏肥大、扩张和收缩(心脏收缩)障碍。充血性心肌病可能发生在任何年龄段,但是最普遍发生在年龄在20—60岁的人中。通常通过非侵入性的心脏成像来诊断,特别是通过二维心回波描记术诊断。充血性心肌病的组织病理学的特征在于心肌细胞退行性变伴随轻度到中度的肥大,不存在炎症细胞和间质纤维变性。

[0124] 临床的充血性心肌病出现缓慢的渐进的充血性心力衰竭,但是患者可能迅速从代偿状态滑落到失代偿状态,通常需要进行心脏移植。50%的患者在两年之内死亡,75%在五年之内死亡。死亡的原因典型的是渐进的心力衰竭或心率失常,但是可能出现由于心脏内血栓脱落而引起的栓塞。

[0125] 表现为充血性心肌病的心脏被扩大、松弛,为正常心脏的2—3倍重。所有的腔室都扩张,壁变薄,纤维变性,并且典型地为壁孔血栓症。在少数充血性的心肌病中,由于左心室扩张导致二尖瓣或三尖瓣回流。心肌细胞过度增生,核扩大。一些充血性心肌病的病因包括心肌炎、滥用酒精或其他毒素、怀孕(围产期心肌病)、缺血、冠心病、高血压和遗传影响。

[0126] 特发性充血性心肌病(IDC)是一种未知病因的疾病,其特征位于一侧或两侧心室扩张、心脏收缩功能障碍,并且逐步发展为充血性心力衰竭。应当指出,术语“IDC”被本领域的技术人员与术语“充血性心肌病”交换使用,表明IDC实际上是充血性心肌病的一种广义分类,不是滥用酒精、毒素损伤或心肌病的结果。

[0127] 在显微镜下,IDC的特征为心肌细胞增生、核过大和间质的和血管周围的纤维变性。与心肌病不同,坏死和细胞浸润通常不显著出现在IDC患者中,这表明其病因是非炎症性。与该病因学一致的是抗炎症药物如强的松在治疗IDC中通常是无效的。

[0128] 本发明的一个目的在于提供一种治疗或预防与TWEAK活性相关的充血性心肌病的方法。由于充血性心肌病(如IDC)的病因在很大程度上是未知的,还没有开发出特定的治疗方法。通常采用物理的、饮食的和药理学的干涉(如 β -肾上腺素受体拮抗剂、钙离子拮抗剂和抗凝血剂)治疗患者的心力衰竭来控制该疾病的症状。此外,当可能时,进行心脏移植。

[0129] 本领域的技术人员不能确定任何可以被用于诊断IDC的免疫学的、组织化学的、形态学的、超结构的或微生物学的标记。但是,流行病学证据表明易感IDC是有遗传基础的。在20%的IDC患者中,一度(first-degree)相关也显示IDC迹象,表明频繁的家族传播。本领域的技术人员已经认识到需要确定亚临床和临床心脏病患者中的IDC的分子遗传标记。

[0130] 迄今,与充血性心肌病相关的基因的列表包括心肌钙蛋白T、d-肌聚糖(d-sarcoglycan)、心脏b肌球蛋白重链、心肌动蛋白、 α -原肌球蛋白、核纤层蛋白A/C、肌间线蛋白、心斯里兰卡肉桂碱受体(cardiac ryanodine recaptor)、桥粒斑蛋白、斑珠蛋白、肌营养不良蛋白和tafazzin。还需要寻找引起充血性心肌病的其他遗传因子和设计靶向这些因

子的治疗剂。本发明首次证明了TWEAK和充血性心肌病之间的因果联系。因此,本发明的目的在于提供一种在患者中鉴定充血性心肌病的方法,通过检测TWEAK蛋白表达、TWEAK蛋白功能、TWEAK mRNA表达的变化或染色体改变。用于检测疾病的分子标记的方法和试剂在本领域是熟知的,包括免疫学或免疫组织化学分析,酶或其他蛋白功能分析,和标准的杂交分析,如northern印迹、Southern印迹、单核苷酸多态性(SNP)分析,和荧光原位杂交(FISH)分析。

[0131] 应当指出,非炎症性充血性心肌病的特征在于渐进的心脏肥大、扩张和收缩障碍。相反,Chagas病是心肌病的一种罕见形式,是一种炎症性的心脏病,在慢性Trypanosoma cruzi感染后,在人类和试验动物中产生。Chagas病在美国中部和南部流行,对Chagas病的研究已经在Chagas病患者的血清中鉴定出抗自身的抗体。Joshua Wynne和Eugene Braunwald,Heart Disease,A Textbook of Cardiovascular Medicine,2,Ch.41,1442-1444(第五版1997)。本文公开的方法被用于治疗更加常见的、与TWEAK活性相关的非炎症型的充血性心肌病。

[0132] 一个成年人的肾脏每天处理超过1,700L血液,产生大约1L尿液。肾脏在废物排泄、代谢、水、盐和pH平衡中起作用,以及对内分泌系统起作用。肾脏疾病更可能导致发病而不是死亡,美国每年死亡约35,000人。相反,每年有数百万人遭受非致死性肾脏疾病,如感染、肾结石和尿路堵塞。

[0133] 典型地,肾小球肾病由于免疫紊乱引起,而肾小管和肾间质紊乱通常由毒素或感染剂引起。部分肾脏疾病包括急性肾病综合症、无病症的血尿症或蛋白尿症、急性肾衰竭、慢性肾衰竭、肾小管缺陷、尿路感染、肾结石、尿路阻塞和肾脏纤维变性。

[0134] 包括肾小管损伤的肾脏损伤通常也包括间质组织损伤。肾小管疾病可以是炎症性的或实质上非炎症性的,包括局部缺血或中毒性的肾小管损伤。部分肾小管疾病的列表包括急性肾小管坏死和急性肾衰竭;肾小管的炎症反应和间质组织炎症反应(肾小管间质组织肾炎);肾小管增生;肾小管间质组织纤维变性(由肾小管上皮细胞与间质组织成纤维细胞、单核细胞、肾小球超滤液、细胞因子和化学因子成分引起的疤痕疾病);和常染色体显性的多囊性肾脏疾病(ADPKD)(一种由PKD1或PKD2基因突变引起的遗传紊乱,特征为来自肾小管和集合管的大、充满液体的囊肿)。

[0135] 肾小球疾病是最令人恐惧的肾脏疾病。例如,慢性肾小球肾炎是人的慢性肾衰竭的最常见原因。在所谓的次级肾小球疾病中,肾小球可能通过免疫紊乱受损,免疫紊乱如系统性红斑狼疮(SLE),以及血管疾病,如高血压和结节性多动脉炎。此外,代谢疾病,如糖尿病(即糖尿病肾病)和遗传性病症,如Fabry病,影响肾小球。最主要的肾小球疾病包括主要的肾小球肾炎和肾小球肾病。

[0136] 遗传性肾炎包括主要与肾小球损伤相关的家族性肾脏疾病。Alports综合症是一种肾炎形式,伴随着神经性耳聋和各种眼病,包括晶状体脱落、晚期白内障和角膜营养失调。这些疾病由于其显性X连锁基因型,在男性中更加普遍。但是由于常染色体其中之一的显性和隐性基因型,某些女性也患有此病。Alport肾脏的肾小球表现为节段性的增生或硬化。有时由于中性脂肪和粘多糖沉积,上皮细胞具有泡沫状外观。肾小球和肾小管基底膜表现为不规则的增厚或变薄,伴随致密板的断裂和叠片。

[0137] 由于肾脏疾病具有极其重要的临床意义,本领域技术人员认识到需要了解其生理

的和遗传的病因。本领域技术人员还意识到需要开发用于治疗慢性和急性肾脏疾病的新治疗试剂。本发明首次证明了TWEAK和肾脏疾病之间的因果关系。

[0138] 因此,在一个实施方案中,本发明提供用于治疗肾脏疾病的方法。在一个更加优选的实施方案中,肾脏疾病可以是Alport综合症。在本发明的其他更加优选实施方案中,目标肾脏疾病的特征为多病灶的炎症、肾小管肾病、肾小管增生、囊肿、肾小球肾病、肾小管液泡化、纤维变性或透明管型。

[0139] 肺部疾病曾经并仍然是人类普遍罹患的疾病。主要的呼吸系统感染,如支气管炎,支气管肺炎和其他类型肺炎,通常必须由医生治疗。肺部疾病可能会因为环境因素如吸烟、空气污染和其他吸入物恶化。慢性支气管炎、肺气肿、肺纤维变性和恶性肿瘤也是非常常见的。其次还涉及许多晚期疾病,在最严重的患者中存在肺水肿、肺肿胀不全,或支气管肺炎。

[0140] 哮喘是慢性复发的炎症性疾病,表现为超反应气道。该综合症典型地表现为阵发性、可逆的支气管狭窄。哮喘由气管支气管树对各种刺激反应增加引起,通常与IgE对外部变应原反应相关。

[0141] 有两种主要类型的哮喘。第一种类型为外源性哮喘,由暴露于外源性抗原引起的I型超敏性反应起始。外源性哮喘病症的列表包括特异反应性(过敏性)哮喘、职业性哮喘和过敏性支气管肺曲霉病。第二种类型是内在哮喘,由非免疫性机制产生,被许多因素触发,例如摄取阿司匹林、肺部感染、应激、受冷、吸入刺激物和锻炼。

[0142] 本领域技术人员认识到需要更加清楚了解肺部疾病,包括非炎症性和炎症性的疾病,如哮喘。更为深入的了解将方便开发用于治疗肺部疾病的改进的药物制剂。本发明首次证明TWEAK与肺部疾病之间的因果关系,以及用于治疗这些疾病的方法。在本发明的更加优选的实施方案中,肺部疾病的特征为炎症,包括肉芽肿性和/或淋巴组织细胞性炎症。

[0143] 肝脏是消化和代谢平衡的主要调节器,包括食入的氨基酸、糖、脂肪和维生素的加工处理,以及血清蛋白的合成、解毒和将内源性废物和污染性生物异源物排泄到胆汁中。因此,肝脏疾病通常是非常严重的,有时威胁生命安全。

[0144] 肝脏容易受到许多类型的疾病的攻击,包括代谢性、毒性的、微生物的、循环的和肿瘤性转化侵害。毒素或免疫紊乱可能引起肝细胞肿胀,外观上变得水肿,具有不规则的丛生细胞质和大片清澈的空间。此外,滞留的胆汁物质可能引起肝脏细胞变为泡沫状和肿胀。物质如铁、铜和脂肪小滴(脂肪变性)的沉积物可在肝细胞内集聚。在酒精性肝病和怀孕的急性脂肪肝的情况下,出现没有转移核的微滴(称作微泡脂肪变性)。

[0145] 肝细胞坏死从严重的肝脏损伤产生,表现为,其中,局部缺血性凝结物坏死。通常,毒性的或免疫学相关的病症中的细胞死亡表现为聚集的肝细胞和收缩、固缩、强烈的嗜曙红性的含有核片段的“聚集体”(Councilman bodies)(由凋亡产生)。可选择地,肝细胞可能渗透性肿胀和破裂(细胞溶解坏死)。

[0146] 肝炎由对肝脏的某些损伤引起,与急性或慢性炎症细胞的流入相关。肝细胞坏死可能在炎症开始之前,或者反之亦然。纤维变性,是肝脏损伤的一种不可逆转的结果,通常由炎症或非炎症性机制产生,例如直接毒性侵害。胶原的特征性沉积影响血流和肝细胞灌注。伴随连续纤维变性,肝脏被细分为具有周围疤痕组织的再生肝细胞结节(硬化)。

[0147] 卵形细胞(oval cell)因其外形为小的、增生性的上皮细胞,具有卵圆形细胞核和稀疏的嗜碱性细胞质而得名。卵形细胞通常定居在连接肝内导管的末端胆管中,所述肝内

导管位于具有肝细胞索的肝门三联中。这些细胞来源于定居的肝脏祖细胞,或来自循环或定向于肝脏的骨髓祖细胞。这些导管性祖细胞具有分化为胆汁导管上皮细胞和肝细胞的潜能。本发明证明在小鼠中TWEAK转基因的表达能够扩增导管祖细胞群体。

[0148] 由于肝脏疾病引起的高水平发病率和死亡率,本领域认识到必须阐明这种疾病的分子和遗传基础。确定因果关系因素便于发现用于治疗慢性和急性肝脏疾病的治疗试剂。本发明证明了TWEAK与肝脏疾病之间的因果关系,并且有力地提供用于治疗这些疾病的方法。在更加优选的实施方案中,肝脏疾病是上皮增生、肝细胞液泡化、导致纤维变性的胆管损伤、肝细胞死亡或肝脏损伤。

[0149] 骨骼肌系统对于体态和运动是非常重要的。停止使用会使骨骼肌萎缩,这可能亚于去除神经或血液供应和暴露于药物如糖肾上腺皮质激素的病症。在遗传或退化性病症中骨骼肌也可能萎缩。这些病症或疾病可以是炎症性的或实质上非炎症性的。肌肉营养失调组成了大量的遗传性肌病,在不是神经疾病时表现为萎缩和丢失肌纤维;该病中包括的一种常见形式是Duchenne肌肉营养失调。先天性肌肉疾病还可能发生在糖原储存疾病的情况下,如酸性麦芽糖酶缺乏症,在肌无力、运动差、心脏扩大,并且通常早年死于心力衰竭的婴儿中发生。导致肌肉萎缩的先天性疾病还包括但是不限于线粒体肌病、脂肪肌病、中心管肌病和横纹肌溶解。肌病病症还在成年人中产生,最为常见的是酒精性肌病。骨骼肌萎缩还可以作为神经性疾病的一部分,包括但是不限于肌萎缩性侧索硬化(ALS)。此外,骨骼肌萎缩还被称为恶病质,是最末期的癌症患者中存在的重要病理状况,并且通常直接导致患者死亡。在炎症或自体免疫中发生的骨骼肌疾病包括多肌炎,炎症性肌病,和肾上腺糖皮质激素诱导的萎缩。本发明建立了TWEAK与成肌细胞分化为肌管的能力之间的联系。因此,本发明的目的在于提供通过采用体内或体外方法促进骨骼肌再生来治疗骨骼肌疾病的方法。

[0150] 在肥胖病症中发生脂肪细胞聚积,这些病症包括与代谢紊乱相关的肥胖症如II型糖尿病。脂肪细胞内生到器官中,称作脂肪浸润,发生在各种条件下,是肌肉营养失调的病理构成。本发明已经证明了TWEAK与前脂肪细胞分化为脂肪细胞的能力之间的联系。因此,本发明的目的在于提供通过用TWEAK激动剂或拮抗剂或它们的药物组合物调节脂肪细胞分化来治疗与脂肪细胞沉积或脂肪细胞缺乏相关的疾病的方法。

[0151] 按照本发明的治疗TWEAK相关病症的方法采用TWEAK激动剂或拮抗剂或包含它们的药物组合物。本发明的治疗TWEAK相关病症的TWEAK激动剂或拮抗剂在本文被描述,并且是本领域已知的。这些试剂包括那些公开在如PCT国际公开WO 98/05783,WO 98/35061,WO 99/19490,WO 00/42073和WO 01/45730中,全部在此引入作为参考。用于本发明的方法中的TWEAK拮抗剂包括抗TWEAK的抗体,如人的、非人类的、人源化的或异种的抗体,如本文所描述,并且是单克隆的、多克隆的或合成的。而且,抗体可以是全长的,其片段,或者包含抗原识别序列的融合蛋白。

[0152] 用于本发明的方法的TWEAK拮抗剂还包括抗TWEAK受体的抗体。在此,TWEAK受体可以是FN14或者被TWEAK结合的TNF-R家族的其他成员。抗TWEAK受体的抗体可以人的、非人类的、人源化的或异种的抗体,如本文所描述,并且是单克隆的、多克隆的或合成的。而且,抗体可以是全长的,其片段,或者包含抗原识别序列的融合蛋白。

[0153] 用TWEAK或TWEAK受体抗原免疫动物可以通过本领域知晓的任何方法进行。参见如Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,纽约:Cold Spring Harbor Press,

1990。用于免疫非人动物的方法在本领域是已知的，参见如Harlow和Lane以及美国专利5,994,619，动物如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛、马等。在一个优选实施方案中，抗原与或不与佐剂一起被施用，来刺激免疫反应。这种佐剂包括，其中，完全或不完全的Freund佐剂、RIBI (胞壁酰二肽) 或ISCOM (免疫刺激复合物)。

[0154] 被选择用于免疫的抗原可以是如下任何之一：TWEAK多肽；TWEAK多肽片段；TWEAK突变蛋白；TWEAK模拟物；TWEAK融合蛋白；TWEAK受体多肽；TWEAK受体片段；TWEAK受体突变蛋白；TWEAK受体模拟物；TWEAK受体融合蛋白；表达TWEAK多肽、片段、突变蛋白或其融合蛋白的细胞；表达TWEAK受体多肽、片段、突变蛋白或其融合蛋白的细胞。通过免疫在动物中产生的免疫球蛋白从各种组织或动物的体液中收集，包括血清、乳汁、腹水、脾脏、胸腺、外周血液细胞、胎儿肝脏、骨髓、腹膜和任何其他具有高免疫球蛋白浓度的组织或体液。此外，可以制备和分离杂交瘤，其将单克隆抗体分泌到培养液中。

[0155] 在本发明的优选实施方案中，抗体是多克隆抗体、单克隆抗体或人源化抗体。在更加优选的实施方案中，人源化抗体包含人抗体恒定区和/或构架区。在另一个优选实施方案中，抗体是异种抗体。在更加优选的实施方案中，异种抗体是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0156] 异种抗体是一种物种的完整抗体，其在一个完全不同的物种中被表达。例如，如果小鼠表达用于制备完整的人抗体所需的DNA，那么生成的抗体是异种的 (即在小鼠中制备的人抗体)。靶向灭活 (敲除) 技术提供破坏动物正常表达内源免疫球蛋白基因的可能。转基因动物技术提供了制备生产异种免疫球蛋白的非人类动物的机会。这种异种动物可以与上述免疫球蛋白敲除的动物交配，生成仅生产异种免疫球蛋白而不是内源免疫球蛋白的动物。

[0157] 异种免疫球蛋白基因的表达使得可以产生极度多样化的人抗体谱，包括单克隆抗体。这是因为 (1) 外源免疫球蛋白基因保留其顺式调控元件，并且经受宿主动物的正常的变化 (V)、多样 (D) 和连接 (J) 重组事件；(2) 外源免疫球蛋白基因以与内源免疫球蛋白基因座相似的方式被表达；和 (3) 生成的抗体显然支持正常的B淋巴细胞的发育和体液反应。

[0158] 外源免疫球蛋白基因可以被导入到动物中，作为完整的免疫球蛋白基因座，免疫球蛋白基因座的一部分，或作为“微小的基因座 (minilocus)”，其中比较完整的外源Ig基因座通过包含来自该Ig基因座的少量单个基因来模拟。此外，转基因动物可以被加工来表达编码改进的抗体的转基因，如单链抗体或嵌合抗体。

[0159] 用于本发明的方法的TWEAK激动剂或拮抗剂还可以是如本文所描述的TWEAK多肽或其片段、类似物、突变蛋白或模拟物。类似物区别于天然的TWEAK氨基酸序列，或以不涉及该序列的形式存在，或两者。在优选实施方案中，TWEAK多肽类似物是突变蛋白。制备突变蛋白的方法在分子生物学领域是熟知的，包括通过随机突变、定点突变、缺失和截断来改变DNA分子。用于突变DNA的技术在本领域是熟知的，并且包括聚合酶链式反应 (PCR) 突变、饱和 (即化学的或放射的) 突变、DNA化学合成、丙氨酸扫描突变、寡核苷酸介导的突变 (体外与DNA模板杂交随后通过酶催化延长)、表达盒 (重组的) 突变，和组合突变 (将随机降解的序列导入TWEAK DNA中)。

[0160] TWEAK多肽结合到TWEAK受体上，结合到其他TWEAK多肽上，或结合到其他TWEAK作用的配偶体上。TWEAK片段可以是膜结合的，并且可以在药物组合物中被传递，该组合物中包含脂质体或其他细胞的或拟细胞的传递系统。TWEAK片段还可以是可溶性的TWEAK多肽，其含有去除跨膜结构域的截断或内部缺失。此外，用于本发明的方法的TWEAK多肽可能不产

生TWEAK反应,或者导致改变的TWEAK反应。这种TWEAK多肽的例子是TWEAK蛋白类似物,包括缺失或截断的突变体、含有一个或多个氨基酸取代的肽、TWEAK模拟物,以及非氨基酸序列改进的TWEAK多肽。

[0161] 用于本发明的方法的TWEAK激动剂或拮抗剂还可以是如本文描述的TWEAK受体多肽,或其片段、类似物、突变蛋白或模拟物。TWEAK受体多肽可以被TWEAK多肽结合,或结合到其他TWEAK受体多肽,或结合到其他TWEAK受体作用配偶体上。TWEAK受体片段可以是膜结合的,并且可以在药物组合物中被呈递,该组合物包含脂质体或其他细胞的或拟细胞的呈递系统。TWEAK受体片段还可以是可溶性的TWEAK受体多肽,其含有去除跨膜结构域的截断或内部缺失。此外,用于本发明的方法的TWEAK受体多肽可能不产生TWEAK反应,或者产生改变的TWEAK反应。这种TWEAK受体多肽的例子是TWEAK受体蛋白类似物,包括缺失或截断的突变体、含有一个或多个氨基酸取代的肽、TWEAK受体模拟物,以及非氨基酸序列改进的TWEAK受体多肽。

[0162] 此外,用于本发明的方法中的TWEAK激动剂或拮抗剂可以是有机或无机的化合物。有机化合物可以是小的有机化合物,如在本领域熟知的化学文库中发现的化合物。其他有机化合物包括但是不限于核酸、多肽、糖、脂质和脂肪酸、类固醇,或者它们的衍生物。无机化合物可以是基于硅石(silica)的或其他矿物质和盐的。有机或无机的化合物可以结合到如本文描述的TWEAK多肽、TWEAK受体多肽或其他与TWEAK相互作用的配偶体上。

[0163] 对TWEAK或TWEAK受体的非序列修饰可以从体内或体外化学衍生该多肽中产生,包括但是不限于,乙酰化、甲基化、磷酸化、羧化、氧化态或糖基化的改变。此外,化学衍生可以包括偶联到有机多聚物上,如聚乙二醇(PEG)或医学领域已知的其他多聚物上。因此,TWEAK多肽类似物可以从非氨基酸序列修饰中产生。

[0164] TWEAK或TWEAK多肽可以作为融合蛋白被表达。融合蛋白在本领域是熟知的。本领域技术人员可以从大量不同融合配偶体成分中选择,包括那些来自原核生物和真核生物的。

[0165] 按照本发明,任何个体包括人和动物可以以药学上可接受的方式用药学上有有效量的TWEAK激动剂或拮抗剂或包含这种试剂的组合物处理一段时间,足以在被施用一段时间的个体中治疗TWEAK相关病症。可选择地,个体可以接受预防有效量的TWEAK激动剂或拮抗剂或者含有这种试剂的组合物,足以在被施用一段时间的个体中预防TWEAK相关病症。可以用于本发明的方法的TWEAK激动剂或拮抗剂可以通过本文公开的方法被配制在药物组合物中,并且可以通过胃肠外路径、注射、经粘膜、口服、吸入、眼部、直肠、长效埋植、体表、缓释或支架包被(stent coating)的方法。TWEAK激动剂或拮抗剂可以是各种用于施用的常规方式。包括例如固体、半固体的和液体的剂量形式,例如液体溶液和悬浮液、浆液、凝胶、面霜、香膏、乳剂、洗液、粉末、喷雾剂、泡沫、贴剂、油膏、药膏和滴剂。

[0166] 此外,TWEAK激动剂或拮抗剂可以通过基因治疗路径来呈递。简而言之,编码蛋白或表达反义分子的核酸分子可以采用任何本领域知晓的适合将核酸分子呈递到靶向组织或器官的载体呈递给机体。典型的载体包括脂质体、质粒和病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0167] TWEAK激动剂或拮抗剂或包含它们的组合物的最有效的施用模式和剂量方案将取决于期望的效果、先前的治疗方法,如果有的话,个体健康状况、病症本身的状况、对TWEAK

激动剂或拮抗剂的反应以及治疗医生的判断。TWEAK激动剂或拮抗剂,或者包含它们的组合物可以以医药或兽医制备物可接受的任何剂量形式一次或在一系列治疗中被施用。

[0168] 提供单一剂量时,TWEAK激动剂或拮抗剂,或者包含它们的组合物的量将依赖于特定的施用模式,特定TWEAK激动剂或拮抗剂,或组合物,剂量水平和剂量频率。典型的制备物将含有在约0.01%和约99%之间的,优选在约1%和约50%之间的TWEAK激动剂或拮抗剂或者它们的组合物(w/w)。

[0169] 治疗的或预防的有效量的TWEAK激动剂或拮抗剂的示例性的、非限定的范围在约0.005-10.00mg/kg体重之间,更加优选在约0.05-1.0mg/kg体重之间。

[0170] TWEAK激动剂或拮抗剂,或者包含它们的组合物可以被单独施用,或者作为制药的或兽医的制备物的一部分,或者作为预防性制备物的一部分,含有或不含佐剂。它们通过胃肠外或口服路径被施用。例如,可以通过口腔、肺、鼻腔、耳朵、肛门、真皮、眼部、静脉内、肌肉内、动脉内、腹腔内、粘膜、舌下、皮下、经皮、体表或颅骨内路径施用,或者被施用到口腔内。在医药或兽医上应用,TWEAK激动剂或拮抗剂可以被局部施用到任何上皮表面。这种表面包括口腔、眼部、耳朵、肛门和鼻腔表面。药物组合物可以通过常规的混合、溶解、制粒、制备糖衣、粉碎、乳化、装入胶囊、包载或冻干方法来制备。

[0171] 用于按照本发明的用途的药物组合物可以以常规的方式被配制,采用一种或多种生理上可接受的载体,包括赋形剂和辅剂,其方便将活性化合物加工到可以被药学上使用的制备物中。合适的制剂将取决于特定的施用路径。

[0172] 对于经粘膜的施用,在制剂中使用适合透过屏障的渗透剂。这种渗透剂在本领域通常是已知的。对于眼部施用,使用在适当的盐水溶液中的悬浮液,这在本领域是已知的。

[0173] 对于口服使用,TWEAK激动剂或拮抗剂很容易通过将活性试剂与常规的药学上可接受的载体结合来配制。TWEAK激动剂或拮抗剂可以被配制成药片、药丸、脂质体、颗粒、球体、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、果汁、糖浆、悬浮液等,给被处理的患者口服摄取。

[0174] TWEAK激动剂或拮抗剂或包含它们的组合物,还可以包含任何用于医药品或兽医制备物的常规载体或佐剂。这些载体或佐剂包括如Freund佐剂、离子交换物、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、缓冲物质,如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物性脂肪酸的不完全甘油酯混合物、水、盐或电解质,例如鱼精蛋白硫酸盐、磷酸二氢钠、氯化钠、锌盐、硅胶、镁、三硅酸盐、纤维素物质和聚乙二醇。用于体表或凝胶形式的佐剂可以包括,例如,羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸盐、聚氧乙烯-聚氧丙烯-阻断的聚合体、聚乙二醇和木蜡酒精(wood wax alcohol)。

[0175] 用于口服使用的药物组合物可以作为固体赋形剂获得,可选择地碾磨生成的混合物,并加工颗粒混合物,如果需要在加入合适的辅剂后进行,来获得片剂或糖衣丸的核心。合适的赋形剂包括填充物如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制备物如,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠,和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可以加入分解剂,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或褐藻酸或其盐,如藻酸钠。

[0176] 糖衣丸核心用合适的包被提供。为此,采用浓缩的糖溶液,其可选择地含有阿拉伯胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、carbopol胶、聚乙二醇、和/或二氧化钛、漆溶液(lacquer solution)、和合适的有机溶剂和溶剂混合物。染料或色素可以被加入到片剂或糖衣丸包被

中来用于辨认或者用于表征不同的活性化合物剂量的组合。

[0177] 可以口服使用的药物组合物包括由明胶制备的推入式(push-fit)胶囊,以及由明胶和可塑剂制备的软的密封胶囊,可塑剂如甘油和山梨醇。推入式的胶囊可以含有活性成分,其与填充物如乳糖、粘合剂如淀粉,和/或滑润剂如滑石粉或硬酯酸镁,以及可选择地,稳定剂混合。在软胶囊中,活性化合物可以被溶解或悬浮在合适的液体中,如脂肪性油、液体石蜡、或者液体聚乙二醇。此外,可以加入稳定剂。用于口服施用的所有组合物应当为适合这种施用的剂量。

[0178] 对于口腔施用,组合物采用以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0179] 对于通过吸入施用,TWEAK激动剂或拮抗剂通常以从加压包装或喷雾器中产生的气雾喷雾的方式方便递送,使用合适的推进剂,如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟甲烷、二氧化碳或其他合适的气体。在为加压的气雾剂时,剂量单位可以通过提供用于呈递测定量的阀门来决定。用于吸入器或吹入器中的胶囊和药筒如明胶的,可以配制成含有化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末状混合物。

[0180] TWEAK激动剂或拮抗剂可以被配制来用于通过注射的胃肠外施用,如通过大药丸注射,或连续灌注。该试剂可以被配制在水溶液中,水溶性悬浮液中,油性悬浮液中,或者乳状液中,并且可能含有配制试剂,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于注射的剂型可以单位剂量的形式呈递,如在安瓿中或在多剂量容器中,加入防腐剂。

[0181] 典型的水溶液制剂包括生理相容的缓冲液,如Hanks溶液、Ringer溶液或者生理盐水缓冲液。典型的油性悬浮液可以包括亲脂性溶剂或赋形剂,包括脂肪酸如芝麻油、或合成的脂肪酸酯,如乙基油酸酯或甘油三酯,或脂质体。水溶液注射悬浮液可以还有提高悬浮液粘度的物质,如羟甲基纤维素钠,山梨醇或葡聚糖。可选择地,悬浮液还可以含有合适的稳定剂或提高化合物溶解性的试剂,以制备高浓度的溶液。可选择地,在使用前,TWEAK激动剂或拮抗剂可以粉末的形式来与合适的赋形剂配制,例如灭菌的无致热原水。

[0182] TWEAK激动剂或拮抗剂还可以配制成直肠组合物,如栓剂或滞留灌肠剂,如含有常规的栓剂基质如可可油或其他甘油酯。

[0183] 除了所描述的剂型,TWEAK激动剂或拮抗剂还可以配制成存储制备物。这种长效制剂可以通过植入(例如皮下地或肌肉内地)或者通过肌肉内注射施用。因此,例如,该化合物可以与合适的聚合的或疏水的物质(例如作为可接受的油中的乳剂)或者离子交换树脂一起配制,或者配制成难溶(sparingly soluble)的衍生物,作为难溶的盐。

[0184] TWEAK激动剂或拮抗剂的药学上载体是疏水性的,是包含苯甲醇、非极性表面活性剂、易溶于水的有机聚合物和水相的共溶剂系统。共溶剂系统可以是VPD共溶剂系统。VPD是具有3%w/v苯甲醇、8%w/v非极性表面活性剂聚山梨醇酯80和65%w/v聚乙二醇300的溶液,加入无水乙醇到总体积。VPD共溶剂系统(VPD:5W)由VPD与5%葡聚糖水溶液以1:1稀释组成。这种共溶剂系统对疏水性化合物的溶解性高,并且其本身在系统施用时产生的毒性低。自然地,共溶剂系统的组成可以极大地改变而不破坏其溶解性和毒性特性。此外,对共溶剂成分的确定也是变化的:例如,其他的低毒性非极性表面活性剂可以被用来替代聚山梨醇酯80;聚乙二醇的含量多少也是可以变化的;其他生物相容的聚合物可以替换聚乙二醇,如聚乙烯吡咯烷酮;并且其他糖或多糖可以用于替代葡聚糖。

[0185] 可选择地,可以采用其他用于疏水性药物组合物的呈递系统。脂质体和乳剂是用

于疏水性药物的呈递赋形剂或载体的例子。某些有机溶剂,如二甲基亚砷也可以被使用,虽然它们具有较大的毒性。

[0186] 此外,TWEAK激动剂或拮抗剂可以采用缓释系统来呈递,如含有治疗剂的固体疏水性聚合物的半透性基质。各种缓释物质是可以获得的,并且是本领域技术人员熟知的。根据其化学性质,缓释胶囊可以释放化合物数周到超过100天。

[0187] 根据TWEAK激动剂或拮抗剂的化学性质和生物稳定性,还可以采用其他用于蛋白质稳定的策略。

[0188] 药物组合物还可以包含合适的固体或凝胶相载体或赋形剂。这种载体或赋形剂的例子包括但是不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物如聚乙二醇。

[0189] TWEAK激动剂或拮抗剂作为具有药学上相容的平衡离子的盐被提供。药学上相容的盐可以用许多酸加工形成,包括但是不限于盐酸、硫酸、乙酸、乳酸、酒石酸、苹果酸、琥珀酸等。盐倾向于更容易溶解在水或其他质子溶剂中,是相应的无碱基形式。

[0190] TWEAK激动剂或拮抗剂还可以被配制用于包被支架的药物组合物,来治疗与TWEAK相关的心脏病症。

[0191] 本发明还涉及用于鉴定TWEAK激动剂或拮抗剂的方法。这种TWEAK激动剂或拮抗剂可用于治疗TWEAK相关病症,即疾病,损伤状况或组织的其他病理状况,其中TWEAK受体如FN14被表达。这些病症包括纤维变性和心脏(如心肌病)、肾脏、肺部、肝脏、皮肤、骨骼肌、脂肪代谢(如肥胖症)、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经组织(包括神经退行性病变)、软骨、骨和结缔组织的疾病。这种TWEAK激动剂或拮抗剂还可以用于按照本发明通过体内或体外调节祖细胞的行为来促进组织替换。

[0192] 用于鉴定TWEAK拮抗剂的方法的一个实施例包括步骤:1) 将表达编码TWEAK多肽或其片段、类似物、突变蛋白或模拟物的外源DNA转基因试验动物暴露于候选的TWEAK拮抗剂的化合物;2) 将来自转基因试验动物的纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织与来自表达外源DNA但是不暴露于该化合物的参比动物的相同器官或组织相比较;和3) 确定该化合物是否影响纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织。在另一个实施方案中,转基因试验动物是哺乳动物或非哺乳动物,如本文所述。

[0193] 本文公开的转基因动物表达编码TWEAK多肽的外源DNA,其中该表达导致TWEAK相关病症。在该实施例中,产生表达截断的、可溶性形式或全长的、膜结合形式的外源TWEAK蛋白的转基因小鼠。表达外源TWEAK蛋白的小鼠具有表型,该表型包括非炎症性充血性心肌病,充血性心力衰竭,肝脏上皮细胞增生,肝细胞液泡化,肝脏损伤和炎症性肾脏病症,如多病灶炎症,非炎症性肾脏病症,如肾小管肾病、囊肿、肾小球肾病、肾小管增生、肾脏纤维变性和炎症性肺病。此外,用表达外源TWEAK蛋白的各种病毒载体感染的野生型小鼠表现为肾小管增生、肝细胞死亡、肝脏纤维变性和肝脏损伤等。

[0194] 有了这些动物,本领域技术人员便拥有用于发现药物的有力工具。特别地,表达外源TWEAK蛋白的动物可作为实现发现用于预防或治疗本文公开的TWEAK相关病症的TWEAK激动剂或拮抗剂的方法的模型系统。

[0195] 在优选实施方案中,用于动物模型系统的单位是哺乳动物或非哺乳动物。在更加

优选的实施方案中,哺乳动物是小鼠、大鼠、仓鼠、兔、狗、猫、奶牛、猪、山羊、马、绵羊、豚鼠和灵长类。在更加优选的实施方案中,非哺乳动物的动物是鸟、鱼、两栖类、昆虫和无脊椎动物。

[0196] 编码TWEAK多肽的外源DNA在转基因动物中通过表达控制序列被表达,表达控制序列在动物中控制外源DNA的表达。控制转录的表达控制序列包括,如启动子、增强子、转录终止位点、基因座控制区、RNA聚合酶持续合成信号和染色质重塑元件。控制转录后事件的表达控制序列包括剪接供体和受体位点和改变被转录的RNA的半衰期的序列,如指导poly(A)的添加序列或RNA结合蛋白的结合位点。控制翻译的表达控制序列包括核糖体结合位点,指引多肽靶向表达或在特定细胞区室中的序列,和改进翻译速率和效率的5'和3'非翻译区中的序列。

[0197] 在转基因动物中TWEAK表达的优选表达控制序列包括指导高水平蛋白表达的病毒元件,如来自反转录病毒LTR的、巨细胞病毒(CMV)(如CMV启动子/增强子)的、猿猴病毒40(SV40)(如SV40启动子/增强子)、腺病毒(如腺病毒晚期启动子(AdMLP))的、多瘤病毒的启动子和/或增强子,以及强大的哺乳动物启动子如天然的免疫球蛋白和肌动蛋白启动子。在一个实施方案中,编码TWEAK多肽的DNA由 α 抗胰蛋白酶(AAT)启动子起始。对病毒表达控制元件及其序列的进一步描述,参见如美国专利5,168,062;4,510,245和4,968,615。

[0198] 外源DNA还可以在转基因动物中从组织特异性表达控制元件包括启动子中被表达。组织特异性表达控制元件在本领域是已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性例子包括肝脏特异性白蛋白启动子(Pinkert等,Genes Dev.1:268-277(1987))、淋巴特异性启动子(如Calame和Eaton,Adv.Immunol.43:235-275(1988);Winoto和Baltimore,EMBO J.8:729-733(1989);Banerji等,Cell 33:729-740(1983);以及Queen和Baltimore,Cell 33:741-748(1983))、神经细胞特异性启动子(如Byrne和Ruddle Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:5473-5477(1989))、胰腺特异性启动子(如Edlund等,Science 230:912-916(1985))、乳腺特异性启动子(如美国专利4,873,316和欧洲专利申请264,166),和发育调节启动子(如Kessel和Gruss,Science 249:374-379(1990);Campes和Tilghman,Genes Dev.3:537-546(1989))。组织特异性启动子的其他非限制性例子包括心脏组织启动子 α 肌浆球蛋白重链启动子(MHC)、皮肤组织启动子角蛋白-14(K14)、肺组织启动子表面活性蛋白C(SPC),以及肾脏组织启动子Ksp钙粘着蛋白和肾脏雄激素调控蛋白(KAP)。外源DNA还可以从可诱导的真核启动子中被表达,如金属硫蛋白(MT)启动子,或本领域已知的其他可诱导的真核启动子。

[0199] 在本发明的一个实施方案中,在本发明的转基因动物中被表达的TWEAK多肽可以是全长的TWEAK多肽。在另一个实施方案中,在转基因动物中表达的多肽是TWEAK多肽片段。在优选实施方案中,TWEAK多肽片段是可溶性TWEAK多肽。

[0200] 在另一个实施方案中,本发明涉及在组织中表达编码TWEAK多肽的外源DNA的转基因动物,该组织选自:心脏;血液、血管;肺;肝脏;肾脏;脑;胎盘;骨骼肌;胰腺;脾;淋巴;胸腺;阑尾;外周血液淋巴细胞;胃肠道;神经元;皮肤;脂肪细胞;软骨;骨;结缔组织。在一个实施方案中,TWEAK DNA由组成型启动子启动表达。在另一个实施方案中,该DNA由诱导型启动子启动表达。在另一个实施方案中,DNA由组织特异性启动子启动表达。

[0201] 本发明还涉及鉴定TWEAK激动剂化合物的方法,该化合物作为治疗剂来治疗TWEAK

相关病症或用于按照本发明通过体内或体外调节祖细胞行为来促进组织替换。激动剂候选化合物可以被施用给正常的动物中,并且评价它们对器官系统的作用。然后,来自被处理的动物的纤维变性的、心脏、肝脏、肾脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织与未处理的动物的相同组织比较;从而确定该化合物是否已经在任何所述组织中产生生物学作用。

[0202] 本发明还涉及用于调控TWEAK的基因的鉴定方法,这种基因可能作为治疗靶点来治疗TWEAK相关病症。例如,可以在TWEAK转基因动物的各种组织中确定RNA模式,并且与正常动物比较,从而确定药物靶点。

[0203] 本发明的另一个目的是提供影响祖先干细胞增生或分化的方法,包括产生肌肉细胞、软骨、骨或结缔组织细胞类型的间质干细胞类型,例如基质细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和真皮细胞。本发明的还有一个目的是提供影响卵形细胞的增生或分化能力的方法,卵形细胞产生胆汁上皮细胞或肝细胞和肾脏祖细胞,其产生小管的上皮。

实施例

[0204] 为了更好地理解本发明,给出如下的实施例。这些实施例仅仅是用于阐述目的,而无论如何不被解释为限定本发明的保护范围。

[0205] 实施例1

[0206] 制备TWEAK转基因小鼠

[0207] 为了鉴定TWEAK活性的靶向器官和TWEAK体内信号的生物学结果,构建两种小鼠TWEAK表达构建体,并采用标准的转基因技术用于在正常(C57B1/6x DBA/2)F1和(C57B1/6x SJL/J)F2小鼠中过度表达TWEAK。R.S.Williams和P.D.Wagner, J. Applied Physiology 88: 1119-1126 (2000)。所用的TWEAK表达构建体如下:(1)来自SEQ ID NO:1的氨基酸101-249的TWEAK cDNA编码可溶性形式的鼠TWEAK(命名为sTWEAK),位于小鼠IgG信号序列的下游,被插入到CH269表达载体(载体PCDEP4衍生物(Invitrogen),含有SV40poly A附加序列),位于人 α 抗胰蛋白酶(AAT)启动子和 β -球蛋白内含子的下游,位于人生长激素(hGH)poly A序列的上游;和(2)编码全长的、跨膜形式的蛋白质(命名为FL-TWEAK)的cDNA,对应于SEQ ID NO:1的氨基酸1-249,被插入到pBlueScript表达载体上(如Desplat-Jego等, J. Neuroimmunology 133:116-123 (2002)所描述),含有SV40poly A添加位点。然后FL-TWEAK序列加上poly A添加位点被分离,并克隆到另一个载体上;然后,含有ApoE增强子-人AAT启动子调控区域的片段被插入到上游来构建表达载体CA300。已经证明AAT启动子主要在肝脏中引导转录,而在其他组织中水平较低,包括肾脏。P.Koopman等, Genes Dev. 3:16-25 (1989)。

[0208] 对于sTWEAK转基因构建体,采用对应于SEQ ID NO:2的核苷酸468-488(5'引物)和核苷酸693-713的互补链序列(3'引物)的探针通过尾(tail)DNA PCR确定23种独立的转基因建立者(founder)。此外,TWEAK的血清ELISA显示这23只建立者动物中的10只在其血清中具有可检测的TWEAK,范围在0.06-3.0mg/ml。剩下的13只建立者不具有可检测的血清TWEAK,即<10ng/ml。10只PCR+中的9只,血清TWEAK+的建立者在约4-5月龄时开始发病。表现为体重下降,弓背,毛皮蓬乱和眼镜凸出。这些建立者中的5只意外地死亡,具有发病病症的剩下的4只被处死。相反,13只PCR+而血清阴性的建立者中仅1只发病或死亡。此外,4只PCR

阴性的同窝仔畜中没有一只发病/死亡。

[0209] 对于FL-TWEAK转基因构建体,通过尾DNA PCR和Northern印迹分析肝脏组织中的TWEAK mRNA的表达来确定两只独立的转基因建立者。此外,检测TWEAK的血清ELISA显示这两只建立者动物在其血清中都没有可检测水平的TWEAK,即少于10ng/ml。FL-TWEAK Tg建立者小鼠都没有显示临床可观察到的表型。

[0210] 实施例2

[0211] 用传递编码aTWEAK的外源DNA的腺病毒载体感染的小鼠中TWEAK的过度表达

[0212] 为了体内确定过度表达TWEAK的生物学作用,采用如在Tao等,Molecular Therapy 3:28-35 (2001)中描述的标准腺病毒技术用复制缺陷的腺病毒载体感染8-10周龄的C57BL/6雌性成年小鼠,该腺病毒具有驱动小鼠TWEAK (“Adeno-TWEAK”)或水母绿色荧光蛋白 (“GFP”)的巨细胞病毒 (CMV) 启动子。包含GFP的腺病毒载体 (“Adeno-GFP”)用作阴性对照。为了确定小鼠是否成功地用Adeno-TWEAK构建体感染,血清中的TWEAK蛋白质水平被测定,并且采用标准ELISA检测在不同时间点监控。

[0213] 在成年小鼠中系统地过度表达小鼠sTWEAK至少在三种主要器官:肝脏、肾脏和心脏中导致组织变化。参见表1。这些表达腺病毒构建体的小鼠的表型与表1中来自实施例1的TWEAK Tg小鼠的表型比较。这些观察值将在如下实施例中更加详细地讨论。

[0214] 表1:在成年小鼠中TWEAK过度表达导致组织重塑

器官	表型	TWEAK Tg	成年小鼠中的 Adeno-TWEAK	成年小鼠中的 Adeno-GFP
[0215]	肝脏	胆管增生	+	+
		肝细胞死亡	-	-
	肾脏	肾小管增生	+	+
	心脏	充血性心脏病	+	-

[0216] 实施例3

[0217] sTWEAK和FL-TWEAK导致充血性心脏病

[0218] 来自实施例1的4只存活的PCR+血清TWEAK+的建立者被处死,并检测大体的形态异常。参见,表2。尸检时肉眼观察的结果表明心脏扩大,与正常动物的心脏相比扩大约2-3倍。由于扩大的心脏表型出现在多个独立的sTWEAK转基因建立者中,这极不可能是由于个别的插入事件。而且,对sTWEAK转基因小鼠的血清化学的分析表明心脏特异性肌酸激酶升高。

[0219] 表2:sTWEAK转基因小鼠

建立者	血清 TWEAK	表型
[0220]	10 PCR+	0.06-3.0 µg/ml
		9/10 在 4-5 月死亡 4/5 进行组织病理分析检查具有扩大的心脏
	13 PCR+	<10 ng/ml
	4 PCR-	---

[0221] 扩大的心脏的表型还在来自一个FL-TWEAK转基因小鼠品系的个别小鼠中观察到,

该品系通过连续与C57BL/6品系回交建立。参见,表3。FL-TWEAK阴性的同窝小鼠不表现心脏异常。

[0222] 表3:FL-TWEAK转基因小鼠

[0223]

个体	血清 TWEAK	表型
7 PCR+	---	7/7 在 5 个月时表现为扩大的心脏

[0224]

4 PCR-	<10 ng/ml	0/4 在 5 个月时死亡
--------	-----------	---------------

[0225] 总之,这些数据有力地表明,扩大的心脏表型是TWEAK依赖的。

[0226] 对来自sTWEAK转基因小鼠和FL-TWEAK转基因小鼠的心脏的组织病理学分析具有相似的结果。低倍显微镜观察FL-TWEAK转基因心脏("Tg")与来自转基因阴性("NTg")的同窝小鼠的正常心脏比较,结果显示在附图1中。所示的FL-TWEAK转基因心脏还代表了来自sTWEAK转基因小鼠的TWEAK转基因心脏(PCR+,血清TWEAK+)。转基因心脏显示充血性心肌病,表现为心室和心房扩张。与这种缺陷一致,在许多这些动物中观察到心房和心室血栓症(附图1)。对肺和肝脏的分析表明在一些动物中的血管充血。

[0227] 高倍显微镜观察结果显示了心脏中的其他组织病理学发现,包括心肌细胞增生和核过大。特别地,在TWEAK转基因小鼠中对心室的组织病理学分析表明没有炎症迹象。因此,观察到的TWEAK相关心肌病实质上是非炎症性的。

[0228] 对从sTWEAK转基因小鼠(3只建立者和1只后代小鼠)的末端采血的血清化学分析表明,肌酸激酶(CK)水平异常高,特别在心脏中(即MB型的CK),证明高水平的心脏应激/损伤。

[0229] 8-10周龄的感染Adeno-TWEAK的C57BL/6雌性小鼠(参见实施例2)表现为充血性心肌病,与用阴性对照Adeno-GFP病毒感染的小鼠相比,其在感染3周后明显。在TWEAK感染的小鼠中,心脏表现为腔室扩张,如组织病理学所示(附图2)。

[0230] 总之,TWEAK被证明在心肌病中起重要作用,包括充血性心肌病和充血性心力衰竭(CHF)。

[0231] 实施例4

[0232] TWEAK引起肝脏上皮细胞增生、肝细胞液泡化、肝细胞死亡

[0233] 胆管增生、肝脏纤维变性和肝脏损伤

[0234] TWEAK在肝脏上皮增生和肝细胞液泡化中的作用在TWEAK和FL-TWEAK转基因小鼠以及用含有表达sTWEAK多肽的DNA的腺病毒感染的野生型小鼠的损伤中被显示。

[0235] 与NTg小鼠相比,来自实施例1的TWEAK Tg小鼠的肝脏在2周龄时表现出大量的胆管和卵形细胞增生。参见,附图3、如表4所示,甚至在血清TWEAK水平<10ng/ml时,两只FL-TWEAK转基因小鼠建立者的肝脏表现出轻微的胆管和卵形细胞增生。FL-TWEAK转基因小鼠回交C57BL/6背景显示出大量的胆管和卵形细胞增生(表4)。

[0236] 表4:FL-TWEAK转基因小鼠

[0237]

小鼠	血清TWEAK	表型
----	---------	----

2只建立者	<10ng/ml	轻微的胆管和卵形细胞增生
1只建立者回交C57BL/6	---	显著的胆管和卵形细胞增生

[0238] 类似地,TWEAK血清水平在0.2和3.0 μ g/ml之间的sTWEAK转基因建立者表现出显著的胆管和卵形细胞增生(表5)。

[0239] 表5:sTWEAK转基因小鼠

[0240]

小鼠	血清TWEAK	表型
9只建立者	0.2—3.0 μ g/ml	显著的胆管和卵形细胞增生
1只建立者	0.06 μ g/ml	轻微的胆管和卵形细胞增生

[0241] 这些胆汁和卵形的导管增生通过用A6mAb免疫组织化学(IHC)染色FL-TWEAK Tg肝脏切片来证实,这些切片取自实施例1的Tg小鼠,A6mAb将胆管上皮细胞和卵形细胞与肝细胞区别开(Engelhardt等,Differentiation 45:29-37(1990))。附图4表明,A6阳性细胞增加,其与门区相关,并且与NTg小鼠相比,其延伸到FL-TWEAK Tg的肝实质。较高的放大倍数的来自FL-TWEAK Tg的小鼠的苏木精和曙红染色切片表明,在门区邻近胆管的卵形细胞显著增加(附图5)。扩增细胞核抗原(PCNA)的免疫组织化学证实,早在2周龄时,与NTg小鼠相比,TWEAK Tg小鼠中胆管和卵形细胞的扩增频率升高。在较晚的时间点上,即在8周龄到7月龄之间,也观察到TWEAK Tg小鼠中肝细胞的扩增频率与NTg小鼠相比升高了(未显示)。此外,与NTg同窝小鼠相比,FL-TWEAK和sTWEAK都在来自实施例1的7月龄Tg小鼠中诱导肝细胞液泡化(附图6)。

[0242] 使用如实施例2的Adeno-TWEAK病毒的过度表达sTWEAK的8-10周龄的C57BL/6和BALB/c SCID小鼠显示相当高的血清TWEAK水平。参见,附图7,其展示呈递不同剂量的腺病毒对测定的血清TWEAK水平的影响。小鼠用 10^{11} 腺病毒颗粒/只小鼠静脉内感染(用“B”线表示)、用 10^{10} 腺病毒颗粒/只小鼠静脉内感染(用“J”线表示),或者用 10^{11} 腺病毒颗粒/只小鼠肌肉内感染(用“H”线表示)。Adeno-sTWEAK感染的小鼠表现为肝脏损伤,在第3天和第7天在C57BL/6小鼠背景中观察到血清黄疸,在第3天和第4天在BALB/c SCID小鼠背景中观察到血清黄疸。一些BALB/c SCID小鼠在第4天死亡。

[0243] 此外,如实施例2所述的Adeno-sTWEAK感染的小鼠还发生肝细胞死亡,早在施用后的2-3天就出现,这通过第3天与对照GFP感染的肝脏(Adeno-GFP)相比,在TWEAK-感染的肝脏(Adeno-sTWEAK)中存在高水平的天门冬氨酸转氨酶(“AST”)和丙氨酸转氨酶(“ALT”)的肝脏酶标记得到证实(参见,表6和附图8)。在感染后7天,在Adeno-GFP处理的小鼠中两种肝脏酶也升高,这是可预期的,由于单独由腺病毒载体引起炎症。肝细胞死亡也出现在TWEAK感染的肝脏中,这通过组织形态学证实,表现为集聚的肝细胞和收缩、固缩、强烈的嗜曙红的含有核碎片的“聚集体”(附图8)。Adeno-sTWEAK处理的小鼠还产生强烈的增生性胆管反应,在感染后的7天达到峰值,在第11天还很明显(附图8)。在TWEAK感染的肝脏中,还观察到增生性的结构,其表达特异于胆管上皮和卵形细胞的A6标记,这通过亮视野显微镜确定。

[0244] 表6:Ad-TWEAK和Ad-GFP动物中的肝脏酶数值

[0245]

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

[0246] Fn14被证明是细胞的TWEAK受体,在暴露于肝脏毒素如半乳糖胺 (GalN) 和四氯化碳 (CC14) 后被诱导。附图9表明,采用Fn14的放射性标记探针和暗视野显微镜通过原位杂交 (ISH),在正常成年小鼠肝脏中是检测不到Fn14。但是,在CC14损伤后,Fn14被高度诱导。类似结果在GalN损伤后得到(未显示)。

[0247] 如实施例2所述的Adeno-TWEAK感染的C57BL/6小鼠也表现出在肝细胞和某些增生性结构中Fn14的上调,如在与Adeno-GFP对照肝脏相比的Adeno-sTWEAK肝脏中观察到的(数据未显示)。

[0248] Fn14的作用进一步在胆管模型中被证实,在该模型中,10周龄的C57BL/6中的肝脏损伤通过结扎胆管造成,如Liu等,Hepatology 28:1260-1268 (1999);Olynyc等,Am.J.Pathol.152:347-352 (1998) 所描述。在第0天通过手术结扎胆管,并5只10周龄的C57BL/6小鼠在手术后第4和第8天被无痛处死。然后制备肝脏的石蜡切片,并且使用放射性标记的鼠TWEAK和包含完整的FN14基因的FN14反义探针通过原位杂交检测TWEAK和Fn14的表达。如附图10所示,在第4天,Fn14在胆管的上皮细胞中强烈地表达,而不在肝细胞中表达。第8天,胆管上皮细胞中Fn14的表达显著下降,但是在一些小鼠中仍然以低水平被检测到(数据未显示)。但是,TWEAK的表达没有改变,并且在这种胆管结扎的模型中检测不到。这些结果表明,在对某些肝脏损伤反应时Fn14表达在胆管上皮细胞中被上调,因此在肝脏纤维变性中起重要作用。

[0249] 总之,这些观察结果表明,TWEAK是肝脏上皮细胞增生、肝细胞液泡化、肝脏损伤、肝细胞死亡、胆管增生和肝脏纤维变性的重要因素。

[0250] 实施例5

[0251] FL-TWEAK和sTWEAK引起肾脏疾病

[0252] 来自实施例1的FL-TWEAK转基因小鼠表现为显著的肾脏疾病,包括轻微的多病灶炎症、肾小管肾病、囊肿、肾小球肾病、肾小管嗜碱性、肾小管扩张、肾小管液泡化和透明管型。

[0253] 如实施例2中所描述的10周龄的Adeno-TWEAK感染的C57BL/6小鼠与阴性对照Adeno-GFP感染的小鼠相比,表现为肾小球肾病和肾小管增生。此外,TWEAK在Alports综合症中的作用通过在Alports疾病的小鼠模型中的Fn14表达升高来证明。而且,TWEAK在肾脏纤维变性中的作用是通过TWEAK拮抗剂处理在由单侧尿路阻塞引起的肾脏纤维变性的小鼠模型中证明。

[0254] 皮层间质的扩大典型地是由于水肿或急性或慢性炎症细胞和纤维性组织的浸润。来自实施例1的FL-TWEAK转基因小鼠表现为肾小管肾病和轻微的、多病灶的间质炎症。更加

特别地,比较非转基因小鼠和FL-TWEAK转基因小鼠的肾脏横截面表明,在8周龄时具有显著肾小管嗜碱性(附图11,中间组)。

[0255] 肾小球肾病表现为白细胞浸润,即嗜中性粒细胞和单核细胞都浸润,内皮细胞、上皮细胞和肾小球膜细胞增生。实施例1所述的FL-TWEAK转基因小鼠具有显著的肾小球肾病,表现为肾小球膜细胞的细胞过多和肾小囊上皮肥大和轻微的肾小囊增厚,邻近的肾小管上皮嗜碱性(附图12)。此外,与正常小鼠肾小球的形态学状况相比(附图11,上面右组),FL-TWEAK转基因小鼠表现为储尿腔(urinary space)扩张,导致形成轻微肾小球周围纤维变性的肾小球囊肿(附图11,下面右组)。

[0256] 在FL-TWEAK Tg小鼠中观察到的肾小管嗜碱性指示在这些肾小管细胞的胞质中的RNA增多,即转录活性升高,表明它们是增生性细胞。增生性细胞核抗原(PCNA)染色证实,一些肾小管细胞在实施例1所述TWEAK-Tg小鼠的肾脏中增生,这对应于嗜碱性的肾小管(附图13)。为了确定嗜碱性肾小管是近端肾小管还是远端肾小管,三个连续的来自TWEAK Tg小鼠的组织切片被染色(1)用苏木精和曙红(H&E)来定位嗜碱性肾小管,(2)使用特异于近端肾小管的凝集素(来自T.Purpureas的凝集素)和(3)使用特异于远端肾小管的凝集素。附图14表明,实施例1所述的TWEAK Tg小鼠中的嗜碱性(增生的)肾小管都不表达近端或远端肾小管上皮标记。

[0257] 在TWEAK Tg小鼠中存在缺乏至少某些上皮标记的增生性肾小管与具有肾脏损伤的模型一致,在该模型中,来自近端肾小管的S3部分的细胞具有祖细胞特性,即,它们开始增生和表达指示去分化的间质细胞标记。这些细胞后来的分化可能在组织修复中通过再生新的肾小管起作用(Witzgall等,J.Clin.Invest.93:2175-2188(1994))。可选择地,居住在S3区的已经存在的祖细胞群体可能发生增生和分化。

[0258] 在TWEAK Tg转基因小鼠中存在缺乏某些上皮标记的增生细胞还与肾脏发育模型一致,在肾脏发育模型中,上皮肾小管从进行分化的间质祖细胞形成,从而得到上皮标记和肾小管特定的特征。

[0259] 类似地,如实施例2所述,用Adeno-sTWEAK病毒感染10周龄的C57BL/6小鼠,在感染后11天引起肾小球肾病和肾小管上皮嗜碱性以及偶尔的肾小球囊增厚和增生(附图15)。这与在阴性对照Adeno-GFP感染的小鼠中观察到的正常组织学相反。此外,指示上皮细胞增生的嗜碱性在第3天很明显,而约在给药后1周达到峰值。

[0260] 与TWEAK在肾脏疾病中的作用一致,TWEAK mRNA被证明在成年C57BL/6小鼠肾脏中被广泛地表达(附图16),并且Fn14mRNA被证明在内皮层/或外髓质的近端小管中表达(附图17),这通过使用放射标记的TWEAK和Fn14反义探针原位杂交(ISH)表示,通过暗视野显微镜显示。此外,Fn14mRNA被证明在Alport综合症的小鼠模型中被诱导。这在附图18中以在两只单独的Alport小鼠的Fn14mRNA相对于野生型动物的倍数增加表示,作为4-7周龄的Alport小鼠的疾病进展。

[0261] TWEAK在Alport疾病小鼠模型中的作用直接通过用TWEAK拮抗剂、鼠Fn14-Fc融合蛋白处理来检测。两个5只Alport敲除(KO)的小鼠按照Cosgrove等,Genes Dev.10(23):2981-2992(1996)制备,用对照IgG2a(muP1.17)或muFN14-Fc融合蛋白(由Biogen制备(Cambridge))处理。所用的对照IgG2a是鼠骨髓瘤蛋白P1.17,从杂交瘤中制备并通过标准mAb纯化方法纯化.muFN14-Fc是鼠Fn14细胞外结构域和鼠IgG2a的Fc区域的融合蛋白。该融

合蛋白在人293胚胎肾脏细胞或在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中制备,通过标准mAb纯化方法纯化。第一次处理在三周龄时进行,以100mg蛋白的剂量通过腹膜内(IP)路径施用。在随后4周内持续用相同剂量处理,每周两次。小鼠在第7周结束时处死(7周龄)。收集肾脏,包埋在石蜡中并冷冻。肾脏纤维变性和炎症的严重程度通过得自H&E染色的石蜡切片的肾小球外形评分,用平滑肌肌动蛋白染色激活肌成纤维细胞,并用CD11b染色冷冻切片激活单核细胞。平滑肌肌动蛋白和CD11b染色切片分别被用于量化阳性染色区域来评价纤维变性和炎症的严重程度,通过MetaMorph计算程序。分析结果表明在FN14-Fc处理的小鼠中的肾小球的健康状况显著地提高(在对照Ig处理组中有59%肾小球患病,相对于Fn14-Fc处理组中仅39%患病,P值=0.03)。肾小球疾病表现为出现新月体和/或肾小球纤维变性。此外,通过 α 平滑肌肌动蛋白染色检测,被处理的小鼠的肾脏皮质区中的纤维变性显著降低,p值=0.04。在FN14-Fc处理小鼠中,单核细胞浸润也大体上趋向降低。这些结果清楚地表明, FN14-Fc处理Alports小鼠降低肾脏皮质区的纤维变性,并改进肾小球的一般形态。

[0262] TWEAK的作用还在单侧尿路阻塞诱导的肾脏纤维变性的小鼠模型中用TWEAK拮抗剂、仓鼠抗TWEAK单克隆抗体处理来检测。在肾脏纤维化渐进的小鼠模型中,输尿管被结扎,导致单侧尿路阻塞(UUO)。(Klahr等,Am J Kidney Dis 18:689-699(1991);Moriyama等, Kidney Int 54(1):110-119(1998)。由于畅通的肾脏可以相对地维持正常肾脏功能,UUO在小鼠中引起渐进的肾硬化,而不是近期肾衰竭。而被阻塞的肾脏迅速完全纤维变性,未被阻塞的肾脏发生适应性的肥大。

[0263] TWEAK拮抗剂处理对UUO诱导的纤维变性的影响通过外形量化。四组8只8-10周龄的无病毒抗原的C57BL/6雄性小鼠(Jackson Laboratories,Bar Harbor ME)被使用。这些小鼠被分成如下四组:仅PBS(VEH)、对照仓鼠抗匙孔血蓝蛋白(KLH)抗体(HA4/8;购自BD Biosciences(San Jose)),仓鼠抗小鼠TWEAK抗体(AB.G11;由Biogen制备(Cambridge))、可溶性小鼠TGF- β 受体Ig(TGF- β R,阳性对照;由Biogen制备(Cambridge))和未被操作的(UNOP)。

[0264] 为了诱导肾脏纤维变性,第0天,左侧输尿管被无菌分离,并如Hammad等,Kidney Int 58:242-250(2000)所描述在手术侧结扎肾脏。如下组:PBS、HA4/8和AB.G11(抗TWEAK mAb)在手术后第2、6和9天额外被处理,而sTGF- β R-Ig组在第1,3,6和8天被处理。在手术后第10天,去除左侧被结扎的肾脏,从肾盂的中间对半切开,准备用于石蜡切片。

[0265] 石蜡处理的肾脏切片用特异于胶原的三色-马森(Trichrome-Masson)染色剂染色。使用Metamorph程序,三色-马森玻片上的蓝色染色区域被测定来量化胶原含量,以评价被手术的肾脏中纤维变性的程度(附图19)。

[0266] 令人惊奇地,来自抗TWEAK单克隆(AB.G11)抗体处理的动物的肾脏切片证明,与PBS处理的动物相比胶原含量下降42%,而与对照(HA4/8)抗体处理的动物相比胶原含量下降30%。相反,来自可溶性TGF- β 受体Ig处理(TGF- β R)的动物的肾脏,与PBS处理的动物相比胶原含量仅下降33%,而与对照(HA4/8)抗体处理的动物相比胶原含量下降19%。这些结果清楚地表明用TWEAK拮抗剂如抗TWEAK单克隆抗体处理,肾脏纤维变性的降低显著地大于可溶性TGF- β 受体Ig(TGF- β R)。

[0267] 总之,本文给出的结果表明,TWEAK在炎症性肾脏病症如多病灶炎症和在非炎症性肾脏病症如肾小管肾病、囊肿、肾小球肾病、Alports综合征、肾小管嗜碱性、肾小管扩张、肾

小管液泡化、透明管型、肾小管增生和肾脏纤维变性中发挥极其重要的作用。

[0268] 实施例6

[0269] TWEAK引起肺部炎症

[0270] 在来自实施例1所述的FL-TWEAK转基因和对照小鼠的肺的横截面中,显著的肉芽肿性和淋巴组织细胞性炎症出现在FL-TWEAK和sTWEAK Tg小鼠中(附图20)。此外,内源TWEAK表达显示在里衬正常小鼠的支气管和肺泡的肺细胞中,这通过采用放射标记TWEAK反义探针原位杂交(ISH)证明和通过暗视野显微镜(ISH)显示(附图21)。

[0271] 与TWEAK在肺部疾病中作用一致,通过采用放射标记Fn14反义探针ISH证明并通过暗视野显微镜显示,Fn14mRNA在成年C57BL/6小鼠肺部被广泛地表达(附图22)

[0272] 总之,这些数据表明在介导炎症性肺部病症中TWEAK是重要的因素,所述病症包括肉芽肿性和淋巴组织细胞性炎症。

[0273] 实施例7

[0274] TWEAK抑制脂肪生成和肌肉生成

[0275] TWEAK对细胞分化的影响通过使用两种本领域已知的脂肪生成和肌肉生成的体外模型来研究(Green和Meuth,Cell 3:127-133(1974);Yaffe和Saxel,Nature 270:725-727(1977))。

[0276] 对于脂肪生成,3T3-L1细胞首先在Dulbecco's Modified Eagles Media(DMEM)生长液中生长到汇合,然后按照本领域已知的方法诱导进行脂肪生成.Green和Kehinde,Cell 5:19-27(1976)。简而言之,细胞在第0天用基于DMEM的MDI培养液刺激两天,该培养液含有地塞米松、胰岛素和IBMX,接着用仅含胰岛素的基于DMEM的培养液再刺激两天。在第5天,细胞在常规的生长培养液中培养,在第7天通过Oil-Red染色来评价脂肪生成。

[0277] 对于肌肉生成,在第0天,C2C12细胞在基于DMEM的生长培养液中生长到接近汇合,转换到含有2%马血清的低血清分化培养液中来起始分化(Yaffe和Saxel,Nature 270:725-727(1977))。用相差显微镜检测肌管形成,在分化的第6天拍摄照片。

[0278] 为了检测TWEAK对这两种分化路径的作用,各种形式的重组TWEAK(TWEAK-FLAG、TWEAK或Fc-TWEAK)以100ng/ml最终浓度在第0天被加入,并且每天补充。TWEAK抑制这两个系统中的脂肪生成和肌肉生成(附图23和24)。TWEAK抑制作用的特异性用仓鼠抗TWEAK单克隆抗体AB.G11或hFn14-Fc作为中和剂来证实。

[0279] 这些结果表明TWEAK在细胞分化中起重要作用。因此,本发明提供采用本文公开的TWEAK多肽、肽、激动剂或拮抗剂影响本文公开的祖细胞的细胞分化的方法。

[0280] 实施例8

[0281] TWEAK结合人间质干细胞

[0282] 人间质干细胞(hMSCs)(Cambrex Corp.,East Rutherford,NJ)被培养在MSCGM培养液中(Cambrex),并通过用含有5mM EDTA的PBS培养来收获,用于荧光激活细胞分选(FACS)分析。

[0283] 细胞在冰上在含有PBS以及1%FBS和100ng/mL Fc-TWEAK的FACS缓冲液培育1h。在用FACS缓冲液洗涤两次后,然后细胞用以1:200稀释的藻红蛋白-偶联的山羊抗人Fc或山羊抗小鼠Fc第二抗体(Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)培育(附图25)。通过单独用第二抗体染色来测定背景染色,用虚线表示。

[0284] 如附图25所示,TWEAK结合到人间质细胞上,这通过与单独第二抗体比较,Fc-TWEAK的染色模式发生改变来证明。因此,TWEAK能够结合间质细胞(能够分化成肌肉细胞以及软骨、骨、结缔组织细胞类型如基质细胞、成纤维细胞、脂肪细胞和真皮细胞的祖细胞类型)表明,在正常和疾病模型中,TWEAK在这些细胞类型的分化中起重要作用。

[0285] 实施例9

[0286] Fn14在神经干细胞中被表达

[0287] 在C57BL/6和129/Sve背景混合物中检测胚胎期第13.5天小鼠的大脑中的Fn14的表达。这些脑组织用Fn14反义探针进行原位杂交。在胚胎腔的下腹侧区域可以检测到阳性信号,与神经干细胞的位置相关(数据未显示)。这些结果表明,Fn14在神经细胞分化中起重要作用。

[0288] 实施例10

[0289] 鉴定用于治疗TWEAK相关病症的治疗剂的方法

[0290] 为了确定作为按照本发明用于治疗TWEAK相关病症的治疗剂的TWEAK拮抗剂化合物,获得一种试验动物,如小鼠,其表达编码TWEAK多肽或其片段、类似物、突变蛋白和模拟物的外源DNA。然后该动物被暴露于候选化合物中,该化合物可能作为TWEAK相关病症的治疗剂。然后来自试验动物的纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织与来自表达外源DNA但是不被暴露于该化合物的参比动物的相同组织比较;和确定该化合物是否影响纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏、肺、皮肤、骨骼肌、脂肪、胃肠道、胰腺、生殖器官、神经、软骨、骨或结缔组织的任何TWEAK相关病症。

[0291] 为了鉴定用于按照本发明治疗TWEAK相关病症的治疗剂的TWEAK激动剂化合物,一种表达或不表达编码TWEAK多肽或其片段、类似物、突变蛋白和模拟物的外源DNA的动物被暴露于候选的化合物,该化合物可能作为TWEAK相关病症的治疗剂。然后来自试验动物的纤维变性的、心脏、肾脏、肝脏或肺组织与未被暴露于该化合物的参比动物的相同组织比较;和确定该化合物是否如本文所述由于体内TWEAK的信号已在所述组织中诱导了任何生物学变化。

[0292] 在本说明书中引用的所有出版物和专利申请在此引入作为参考,如同各个出版物和专利申请被特别地和单独地指出来引入作为参考。

[0293] 尽管前述的方面已经略为详细地通过阐明和实施例被描述,以达到清楚理解的目的,对于本领域技术人员来说,在不背离本文的公开,包括附随的权利要求书的精神和范围情况下,在本发明的教导下对本发明进行特定的变化和改变,对本领域普通技术人员是显而易见的。

序 列 表

<110> 比奥根公司 (BIOGEN, INC.)

<120> 用于治疗 TWEAK 相关病症的方法

<130> A140PCT

<140>

<141>

<150> 60/371, 611

<151> 2002-04-09

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 249

<212> PRT

<213> 鼠科 (Murine sp.)

<400> 1

[0001]

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

Gly Thr Ala Leu Leu Ala Pro Leu Val Leu Ser Leu Gly Leu Ala Leu
20 25 30

Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Val Val Val Ser Leu Gly Ser Trp Ala
35 40 45

Thr Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ser Gln Glu Glu Leu Thr Ala Glu Asp
50 55 60

Arg Arg Glu Pro Pro Glu Leu Asn Pro Gln Thr Glu Glu Ser Gln Asp
65 70 75 80

Val Val Pro Phe Leu Glu Gln Leu Val Arg Pro Arg Arg Ser Ala Pro
85 90 95

Lys Gly Arg Lys Ala Arg Pro Arg Arg Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu
100 105 110

Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly
115 120 125

Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu Thr Lys Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu
130 135 140

Arg Tyr Asp Arg Gln Ile Gly Glu Phe Thr Val Ile Arg Ala Gly Leu
145 150 155 160

Tyr Tyr Leu Tyr Cys Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr
165 170 175

Leu Lys Leu Asp Leu Leu Val Asn Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu
180 185 190

Glu Glu Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Pro Gly Pro Gln Leu Arg
195 200 205

Leu Cys Gln Val Ser Gly Leu Leu Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu
210 215 220

Arg Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
225 230 235 240

Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
245

<210> 2

<211> 1239

[0002]

<212> DNA

<213> 鼠科 (Murine sp.)

<400> 2

```
atggcgcgcc gtcggagcca gaggcggagg gggcgccggg gggagccggg caccgccctg 60
ctggccccgc tgggtgtgag cctgggcctg gcgtggcct gccttggcct cctgtgtgtc 120
gtggtcagcc tggggagctg ggcaacgtg tctgccagg agccttctca ggaggagctg 180
acagcagagg accgcccggg gccccctgaa ctgaatcccc agacagagga aagccaggat 240
gtggtaccit tcttgaaca actagtcgg cctcgaagaa gtgtctctaa aggccggaag 300
gcgcggcctc gccgagctat tgcagcccat tatgaggttc atctcggcc aggacaggat 360
ggagcacaag caggigigga lgggacagtg agtggciggg aagagaccaa aatcaacagc 420
tccagccctc tgcgtacga cgcagagatt ggggaattta cagtcatcag ggctgggctc 480
tactacctgt actgtcaggt gcactttagt gagggaaagg ctgtctacct gaagctggac 540
ttgtgtgtga acggtgtgtt ggccctgcgc tgcctggaag aattctcagc cacagcagca 600
agctctcctg ggecccagct cgttttgtgc caggtgtctg ggcgtttgcc gctgcggcca 660
gggtcttccc ttcggatccg caccctcccc tgggtcctc ttaaggctgc ccccttctta 720
acctactttg gactctttca agttcaciga ggggccttgc tctcccagat tctttaaact 780
ttccctggct ccaggagcat caccacacct cctacccca ccccactcc tccacccct 840
cgctgtctct tgggtccagc ctgtctctcc tcaaaggcag ccagagcttg ttcacatgtt 900
tccatccac agaegtatcc ttgtcttct taacatccca tcccaccaca actatccacc 960
tcactagctc ccaaageccc tacttatccc tgactcccc acccactcac ccgaccagct 1020
gtttattgac ttgtgcacc aggcacigag atgggctgga cctgggtggc ggaagccaga 1080
gaacctggga ctaggccaga agttcccaac tgtgaggggg aagagctggg gacaagctcc 1140
tccctggatc cctgtggatt ttgaaaagat actattttta ttattattgt gacaaaatgt 1200
taaatggata ttaaagagaa taaatcatga ttctcttc 1239
```

TWEAK在心脏中的作用: TWEAK转基因心脏中的扩张



A. 右侧心房和心室栓塞和扩张FL-Tweak转基因

B. 正常心脏, H&E.

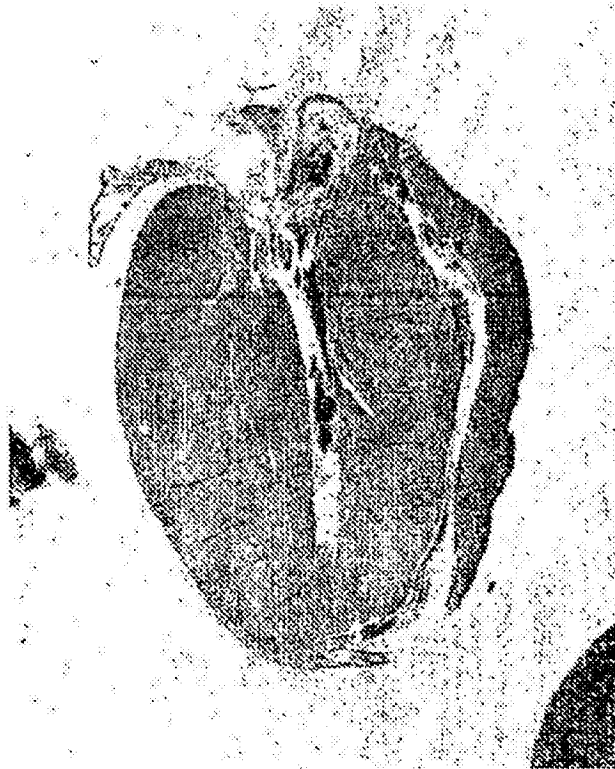
图1

TWEAK诱导成年小鼠中的心脏重建

Adeno-TWEAK



Adeno-GFP



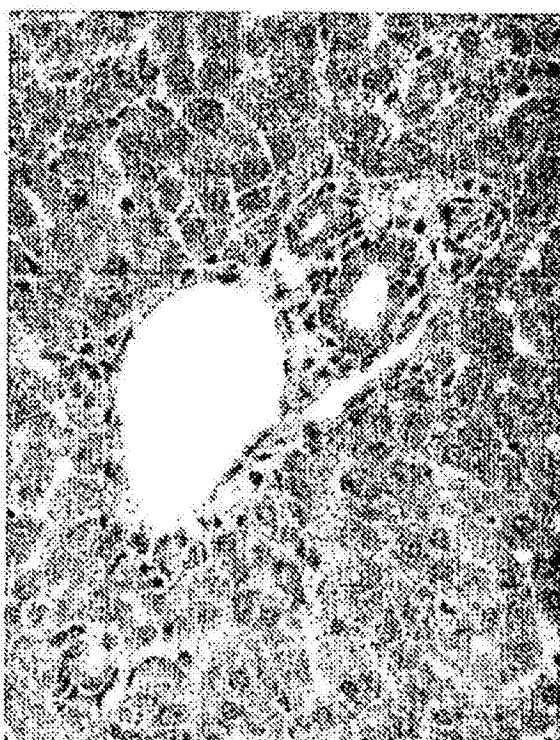
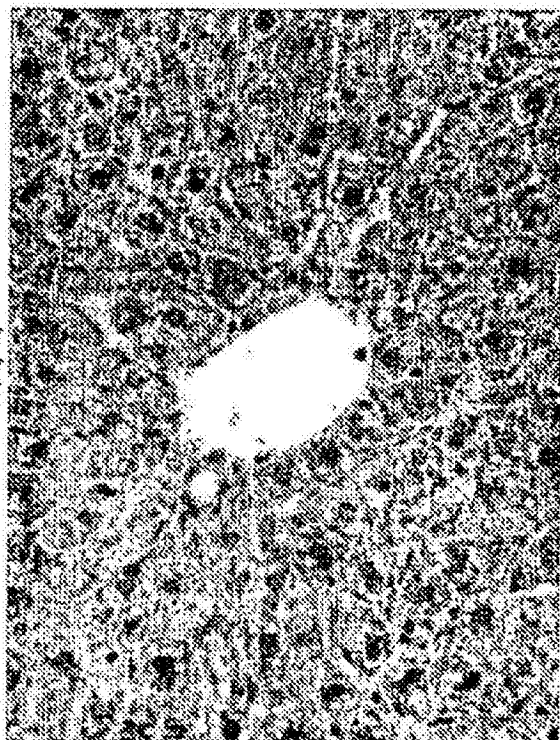
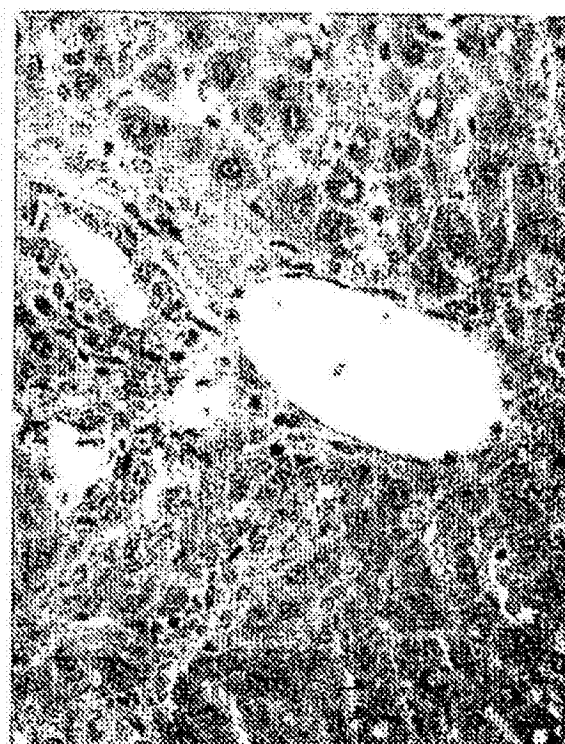
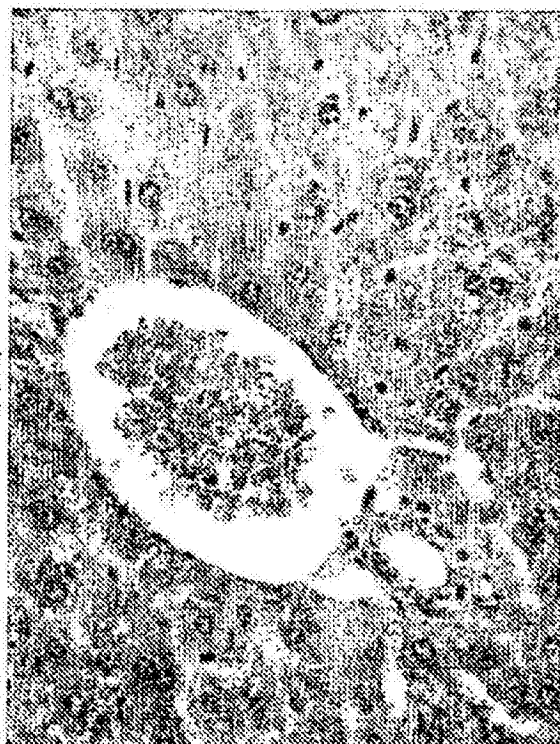
第20天

图2

在2周龄TWEAK Tg小鼠中胆管和卵形细胞增生明显

7月龄

2周龄



NTg

Tg

图3

用A6 mAb(抗角蛋白)染色BEC和卵形细胞

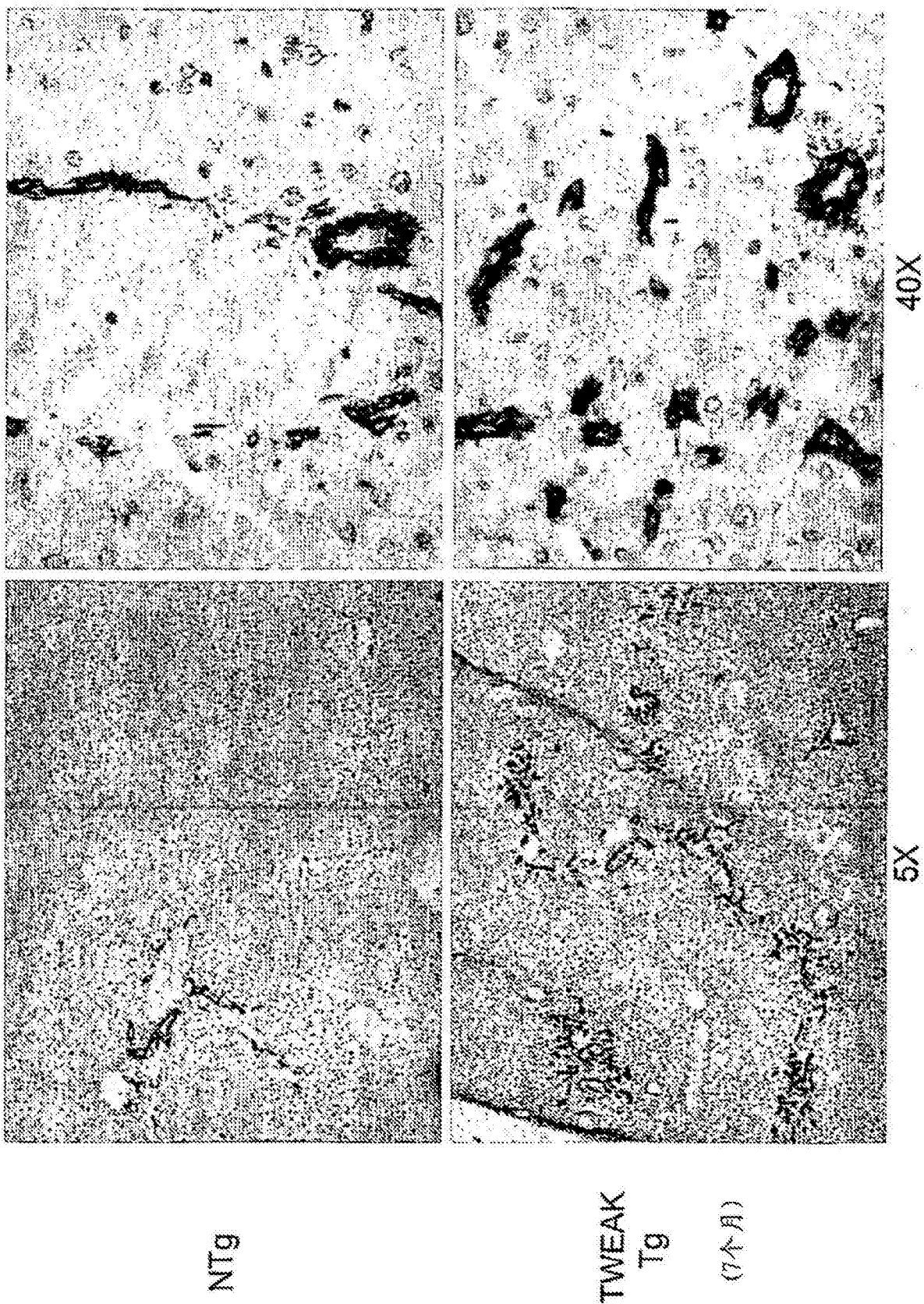


图4

TWEAK Tg小鼠中的胆管和卵形细胞增生

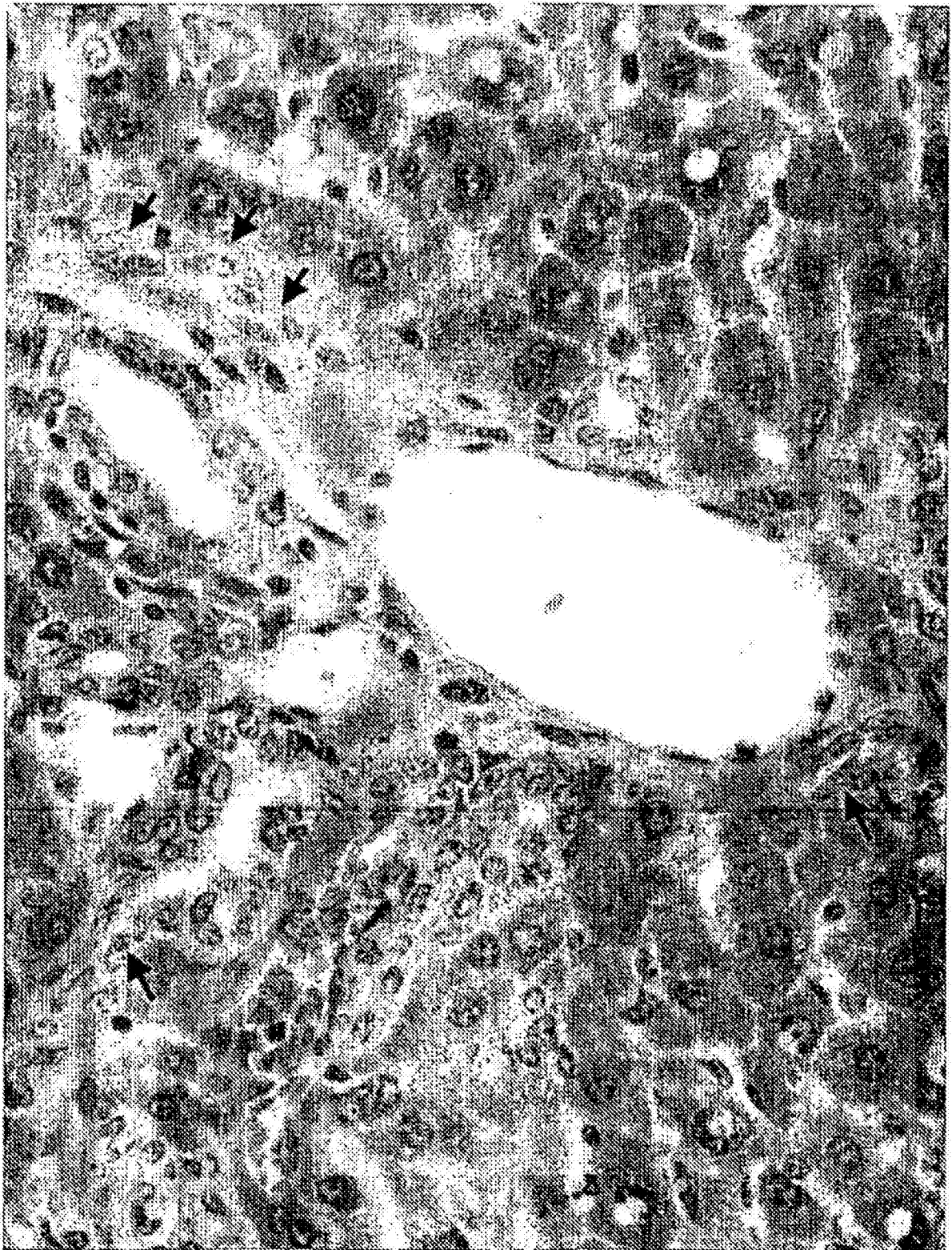


图5

TWEAK Tg小鼠中肝细胞液泡化(7个月)

NTg

TWEAK Tg

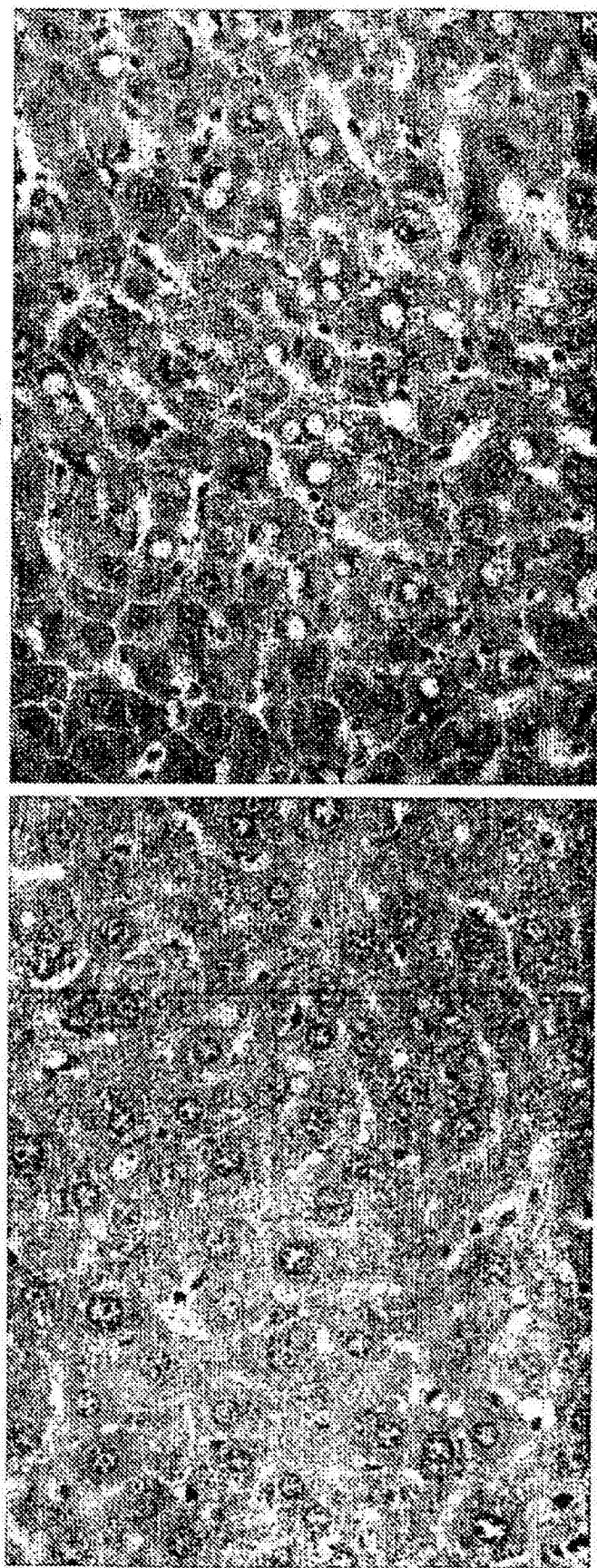


图6

TWEAK在肝脏中的作用：腺病毒呈递

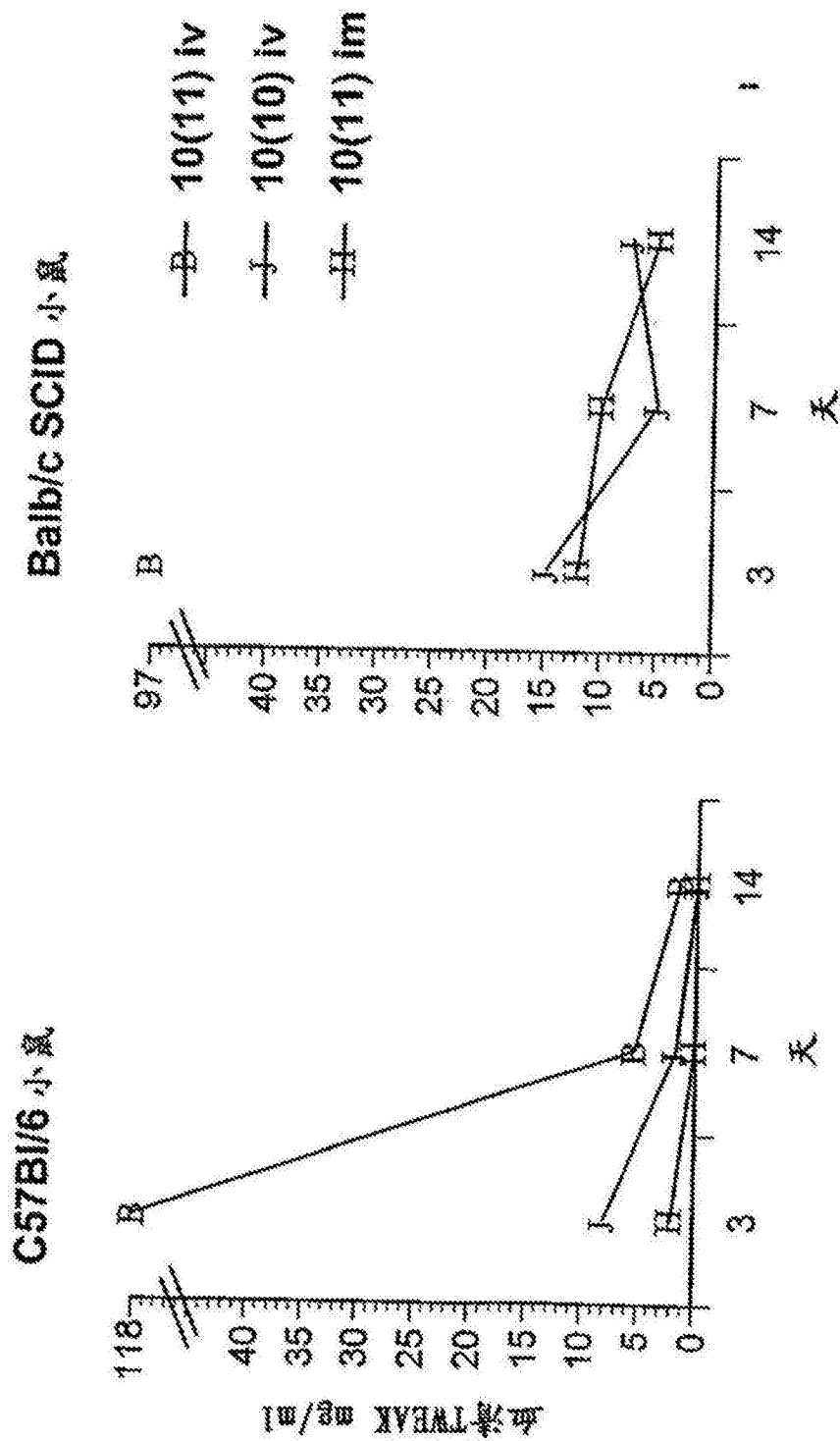
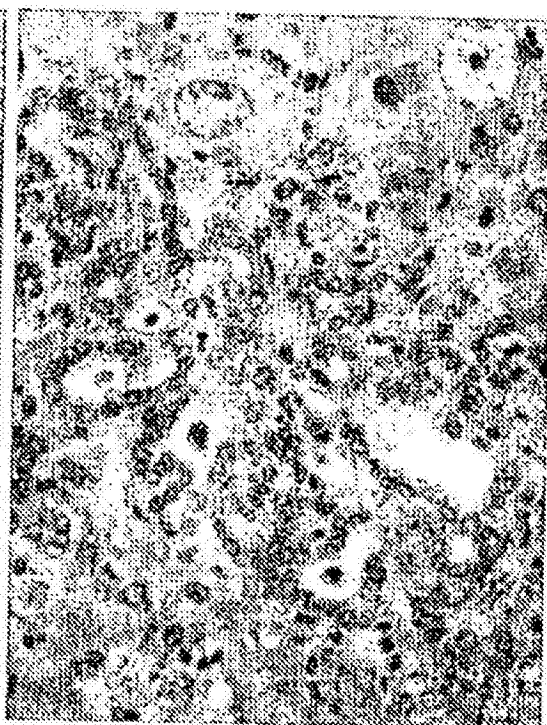
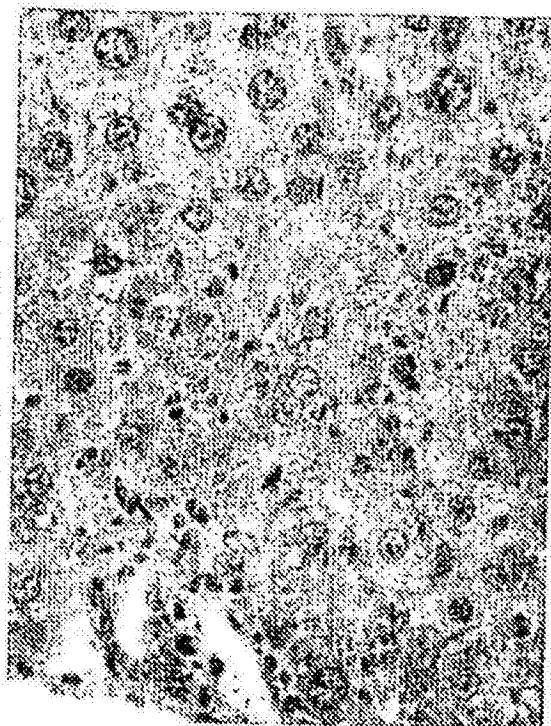


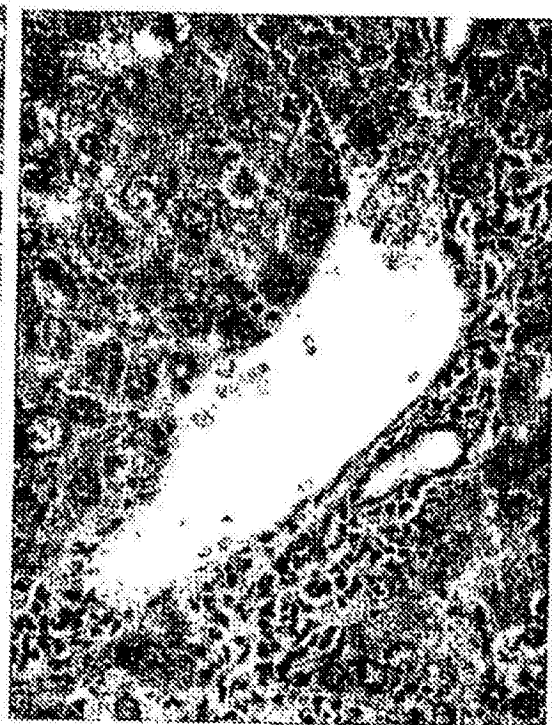
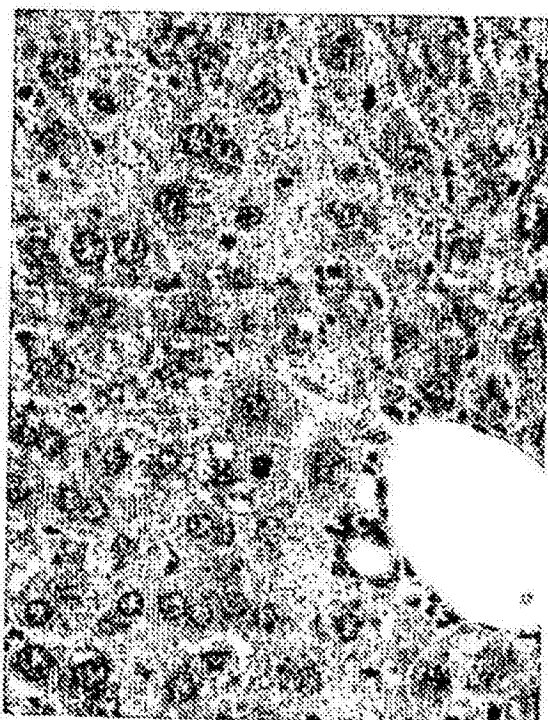
图7

TWEAK在成年小鼠中诱导肝细胞死亡和胆管增生

Adeno-TWEAK



Adeno-GFP



第3天
20x

第11天
20x

图8

FN14 mRNA的表达在正常肝脏中是检测不到的，
但是急性肝脏损伤高度诱导FN14 mRNA的表达

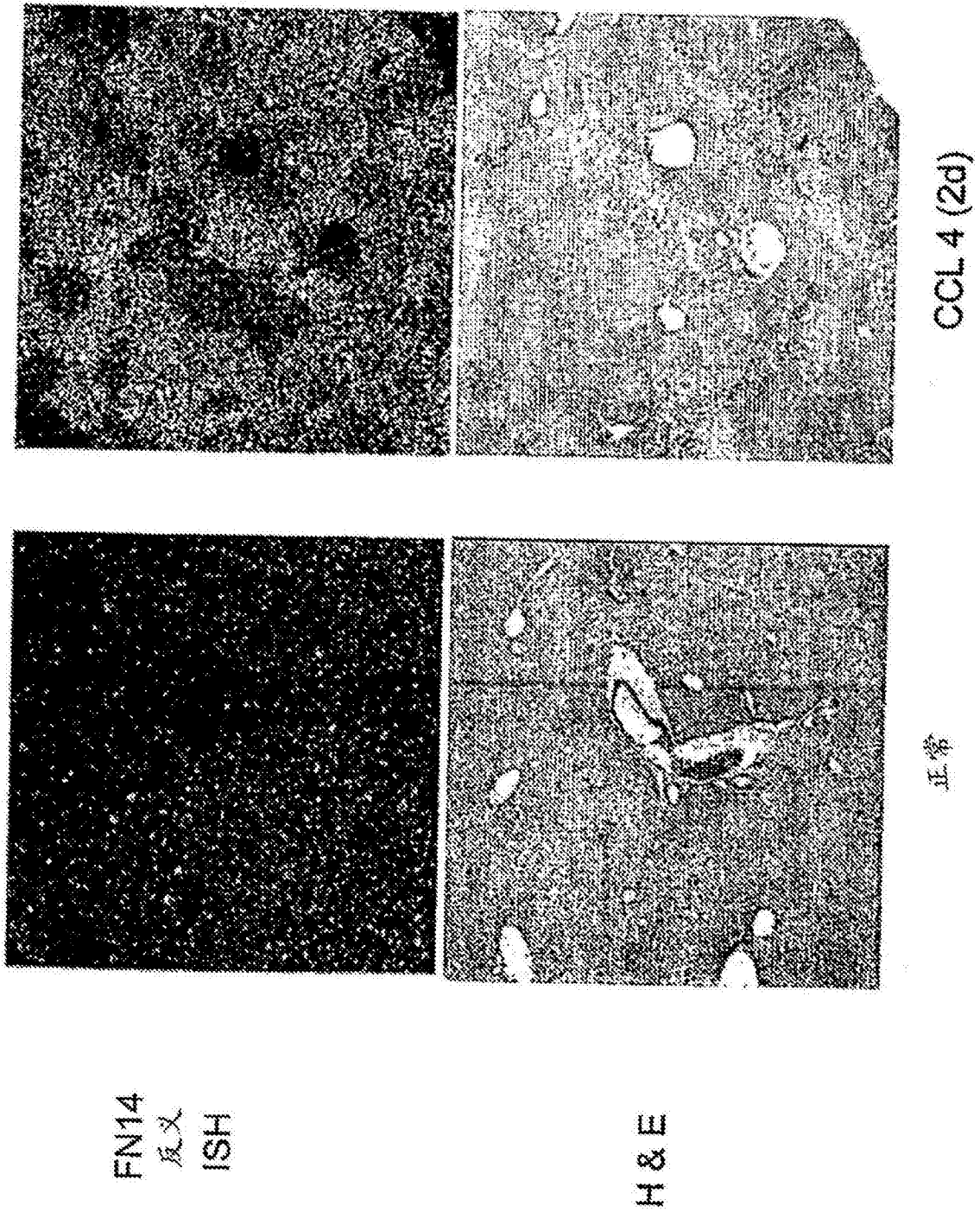
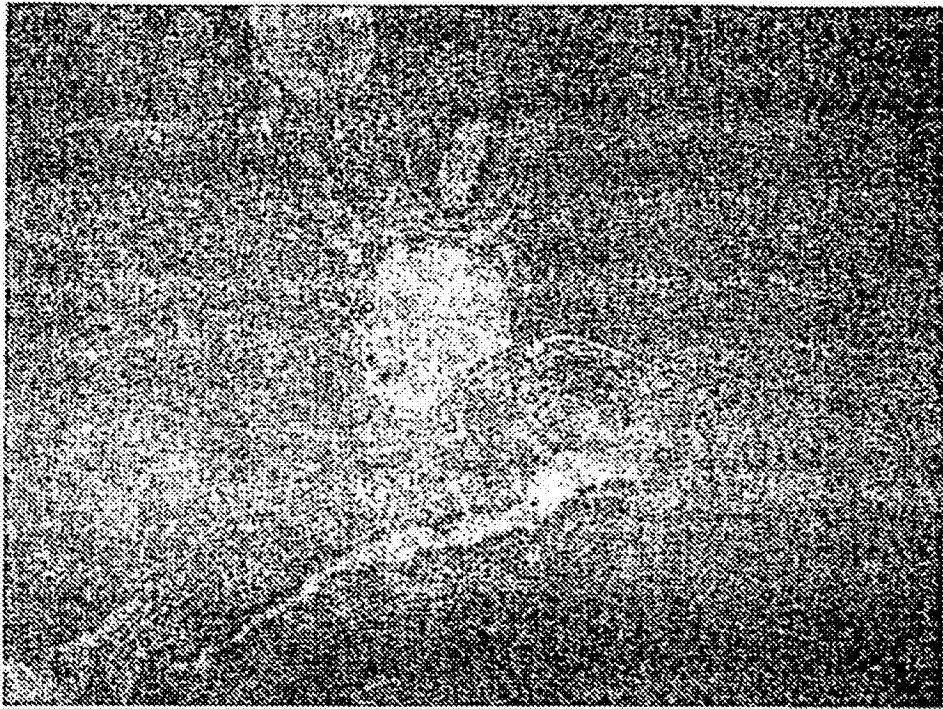


图9

A. 肝脏切片的H&E染色



B. FN14反义mRNA原位杂交

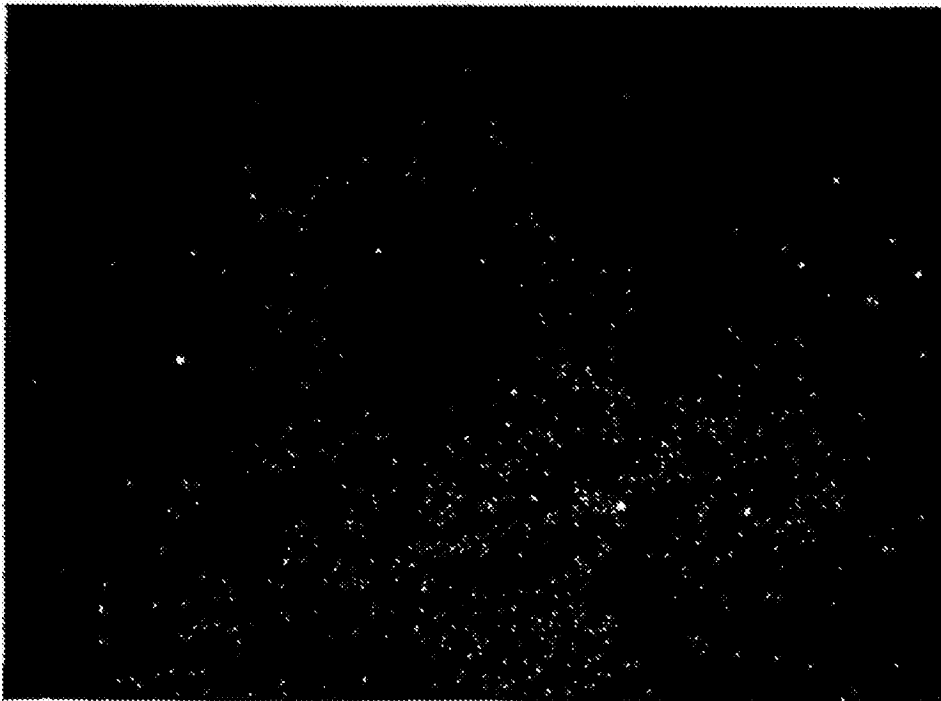


图10

TWEAK Tg小鼠中的肾小管嗜碱性性和肾小球肾病

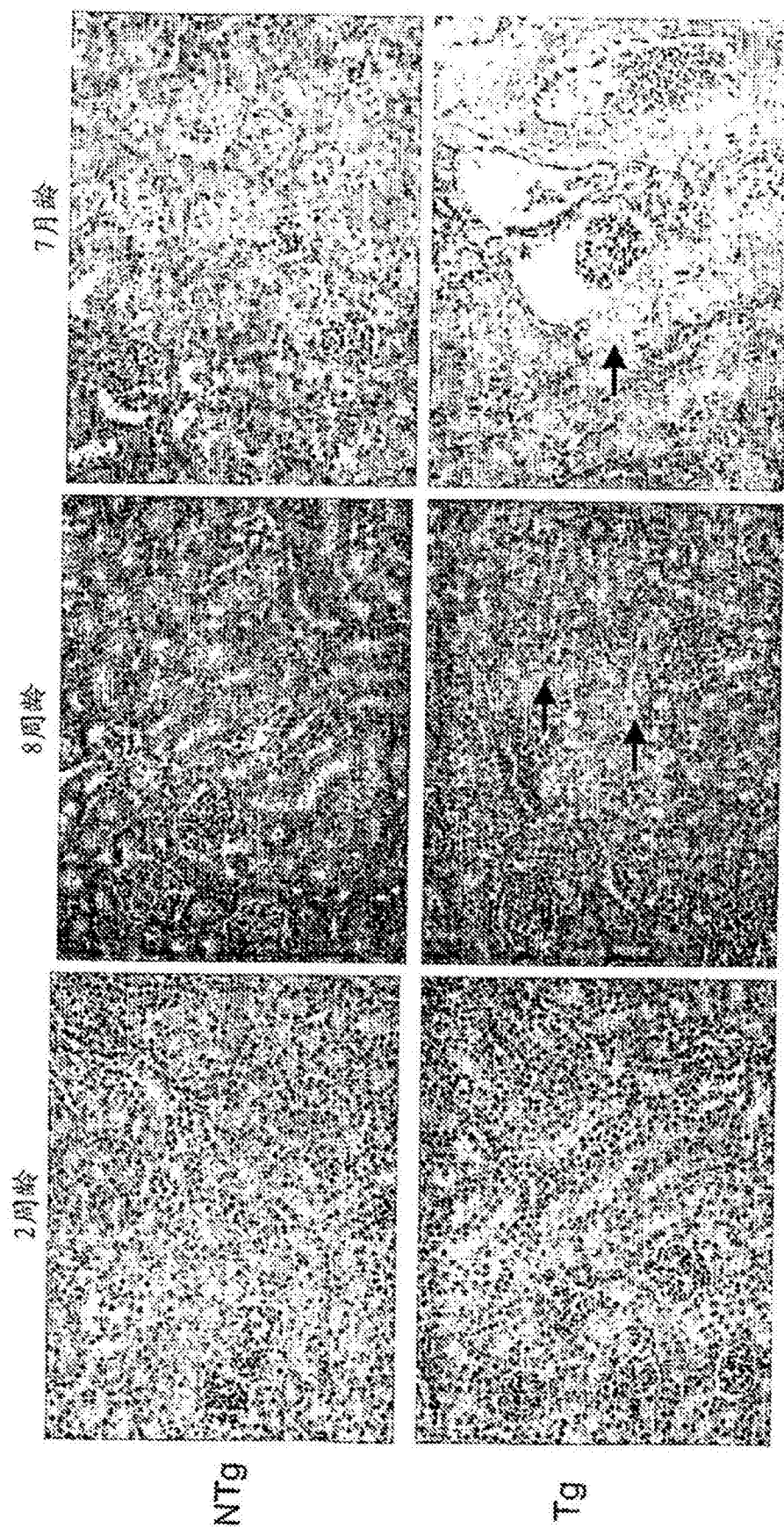
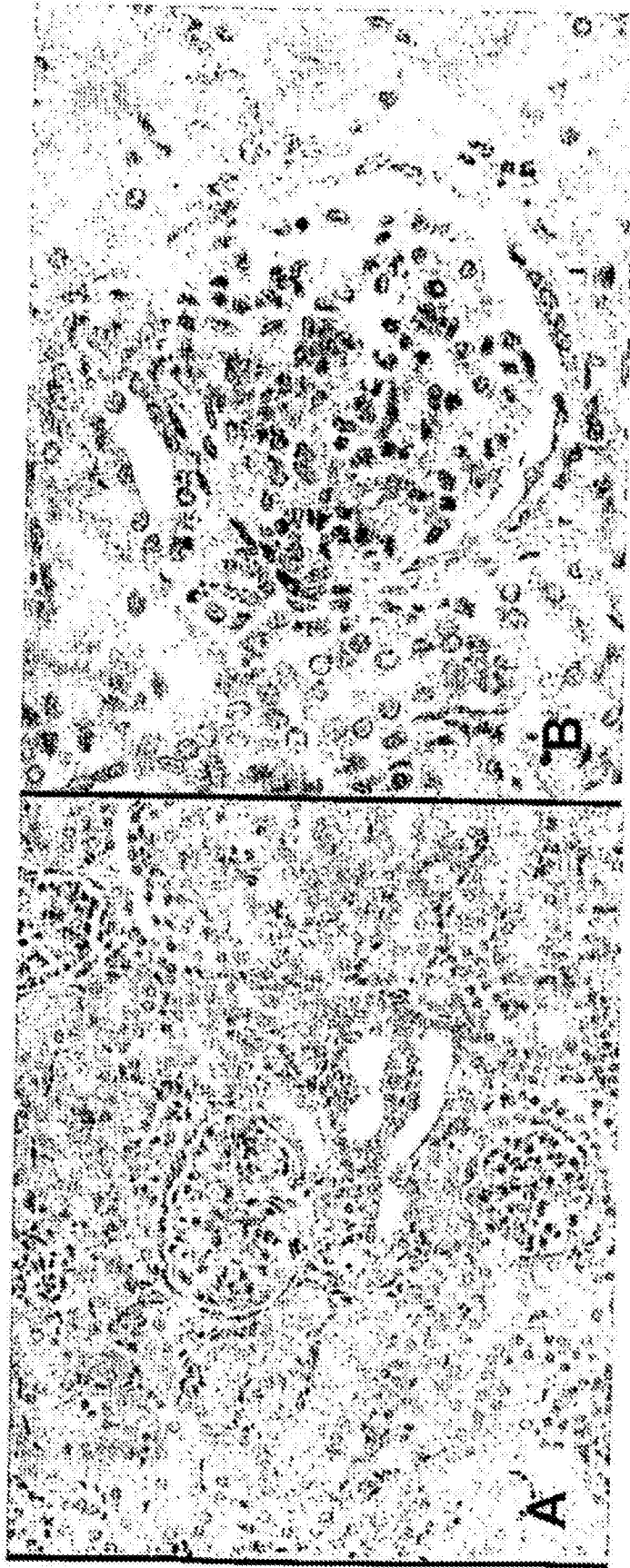


图11

TWEAK在肾脏中的作用: FL-TWEAK Tg小鼠回交 (4x) B6



- A. 邻近的近端肾小管上皮嗜碱性的肾小球肾病。
B. 节段性肾小球膜细胞过多, 肾小囊上皮肥大和轻度肾小囊增厚。H&E。

图12

TWEAK Tg小鼠中的嗜碱性肾小管对应于PCNA+区域

(2只8周龄的个体TWEAK Tg)

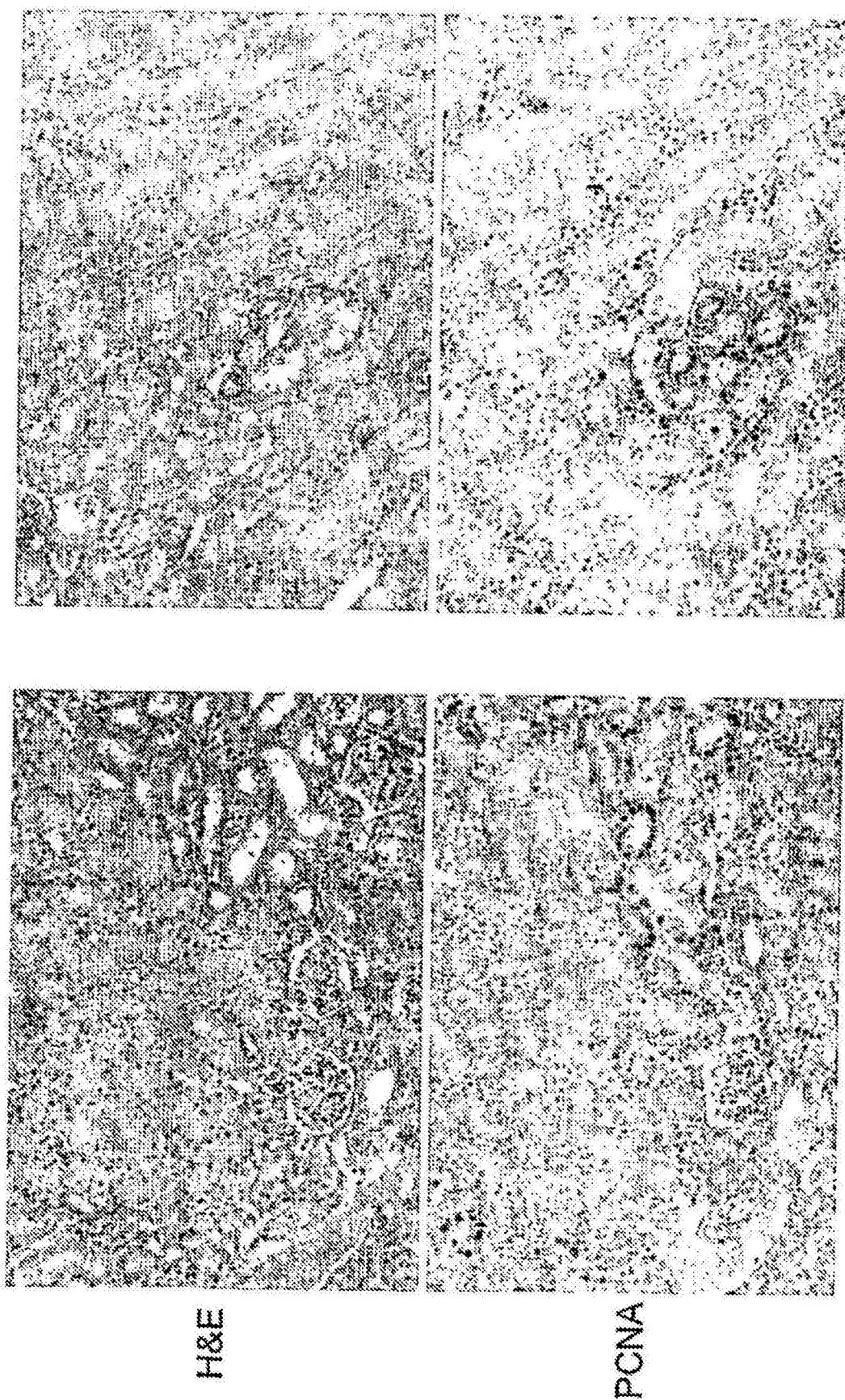


图13

TWEAK Tg小鼠中的嗜碱性肾小管不表达近端或远端肾小管的特征性凝集素结合标记

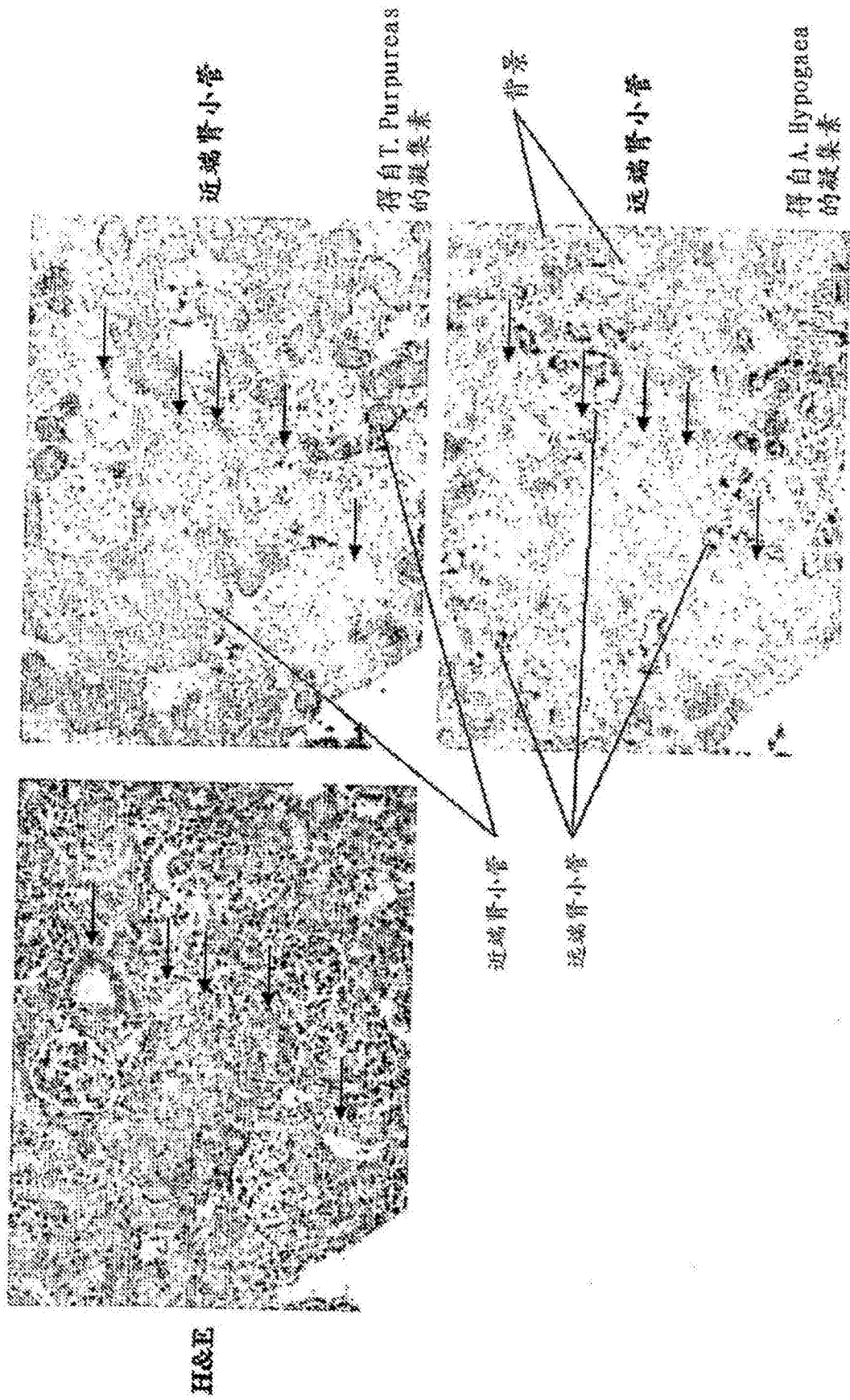


图14

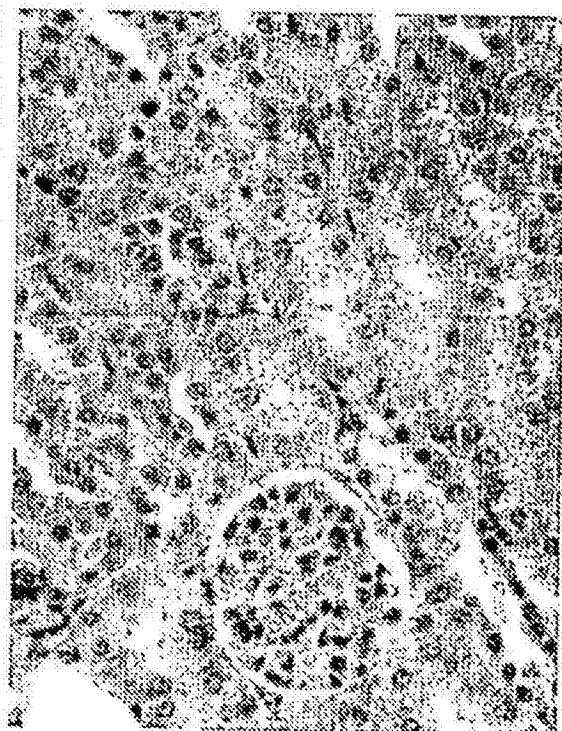
TWEAK在成年小鼠中诱导肾小管增生和肾小球肾病

Adeno-GFP

Adeno-TWEAK



第11天
20x



第11天
40x

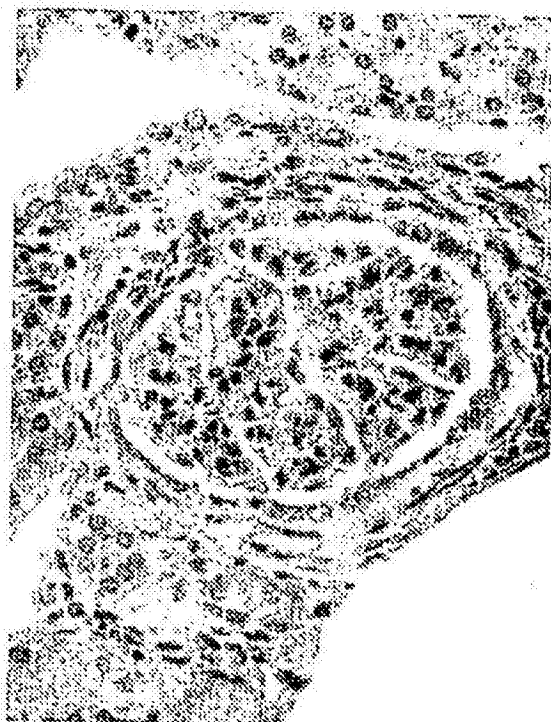


图15

Tweak mRNA在成年小鼠的整个肾脏中被广泛表达

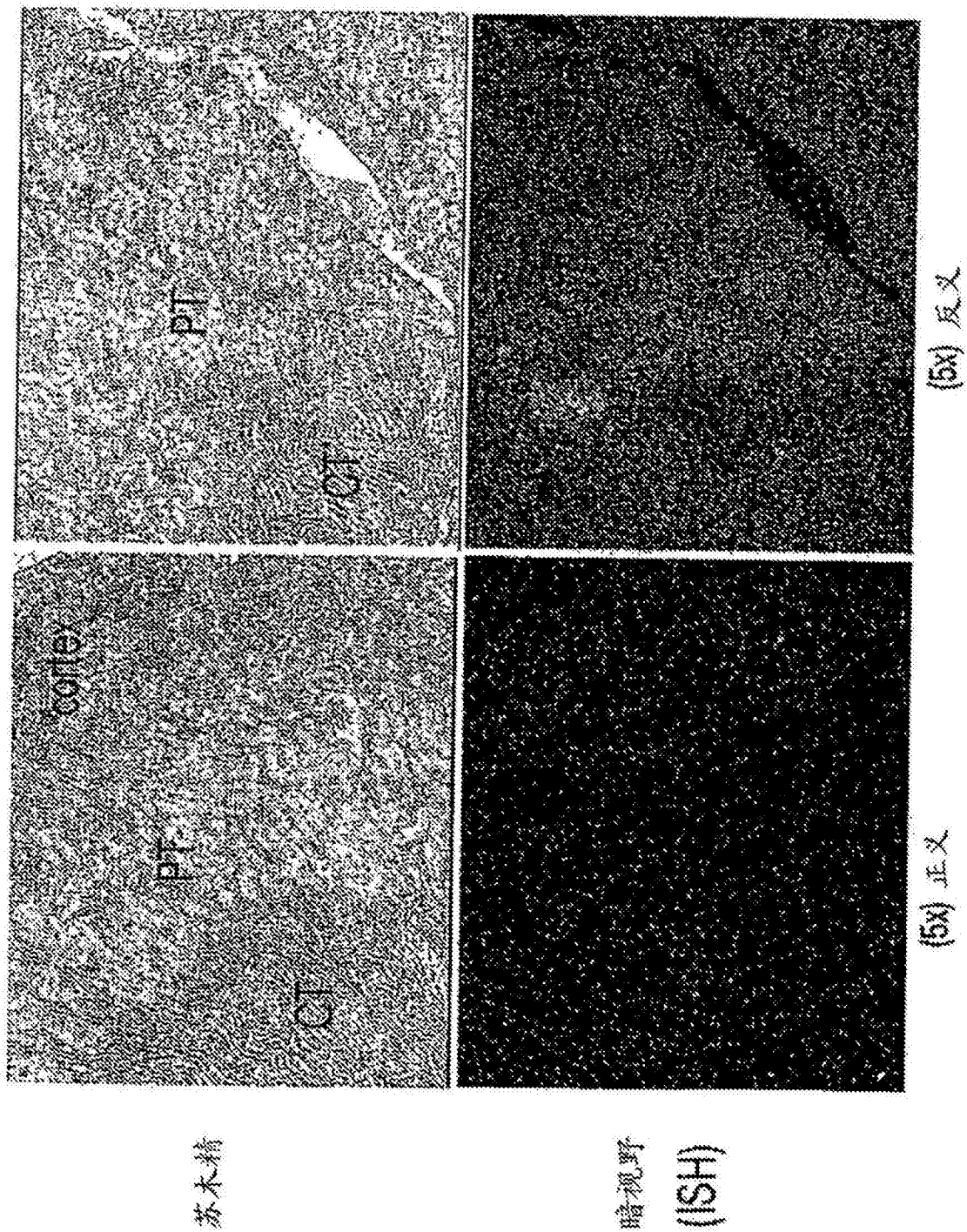


图16

Fn14 mRNA在肾脏外层髓质的近端肾小管中的表达

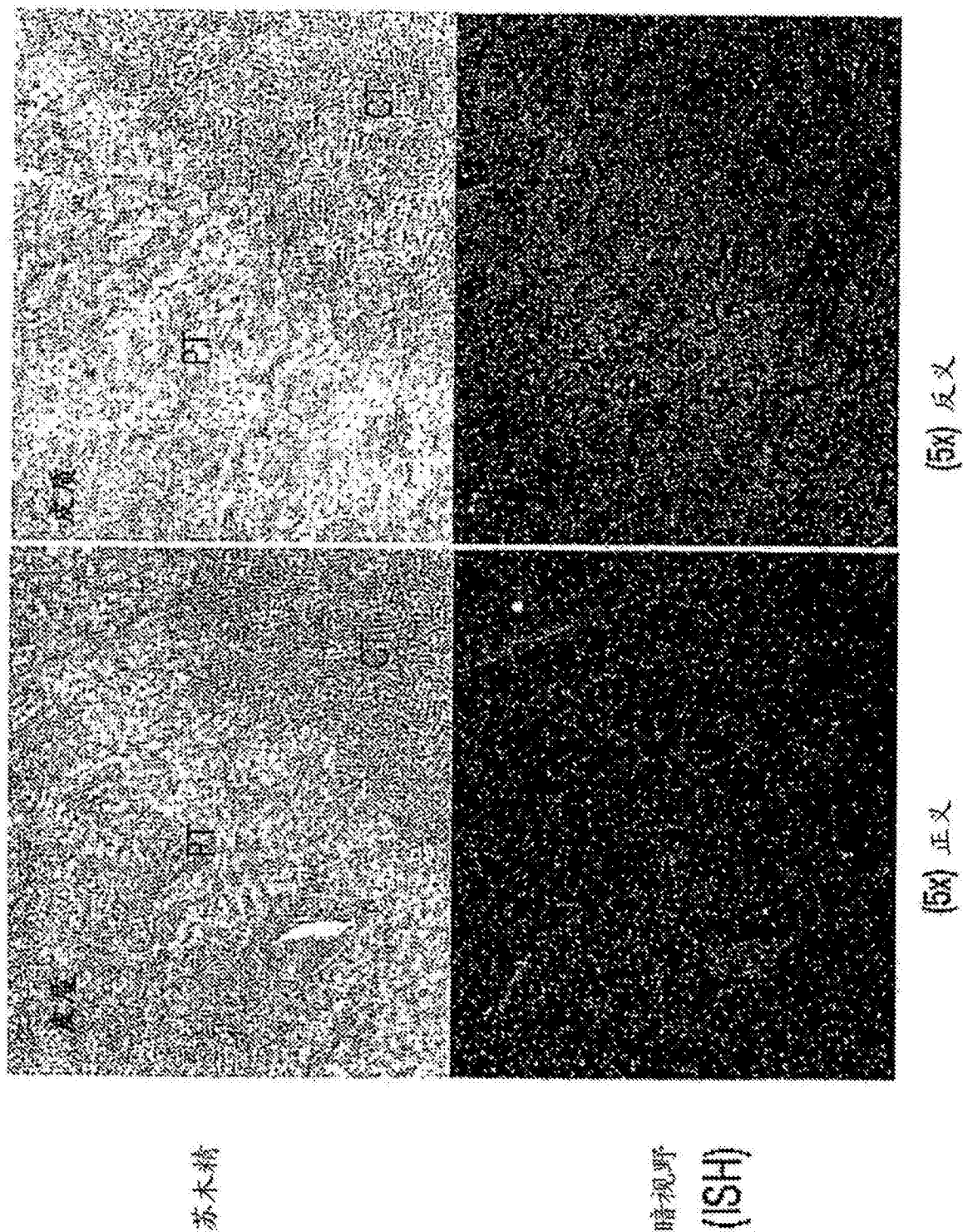


图17

在Alports肾脏纤维病变中上调Fn14 mRNA

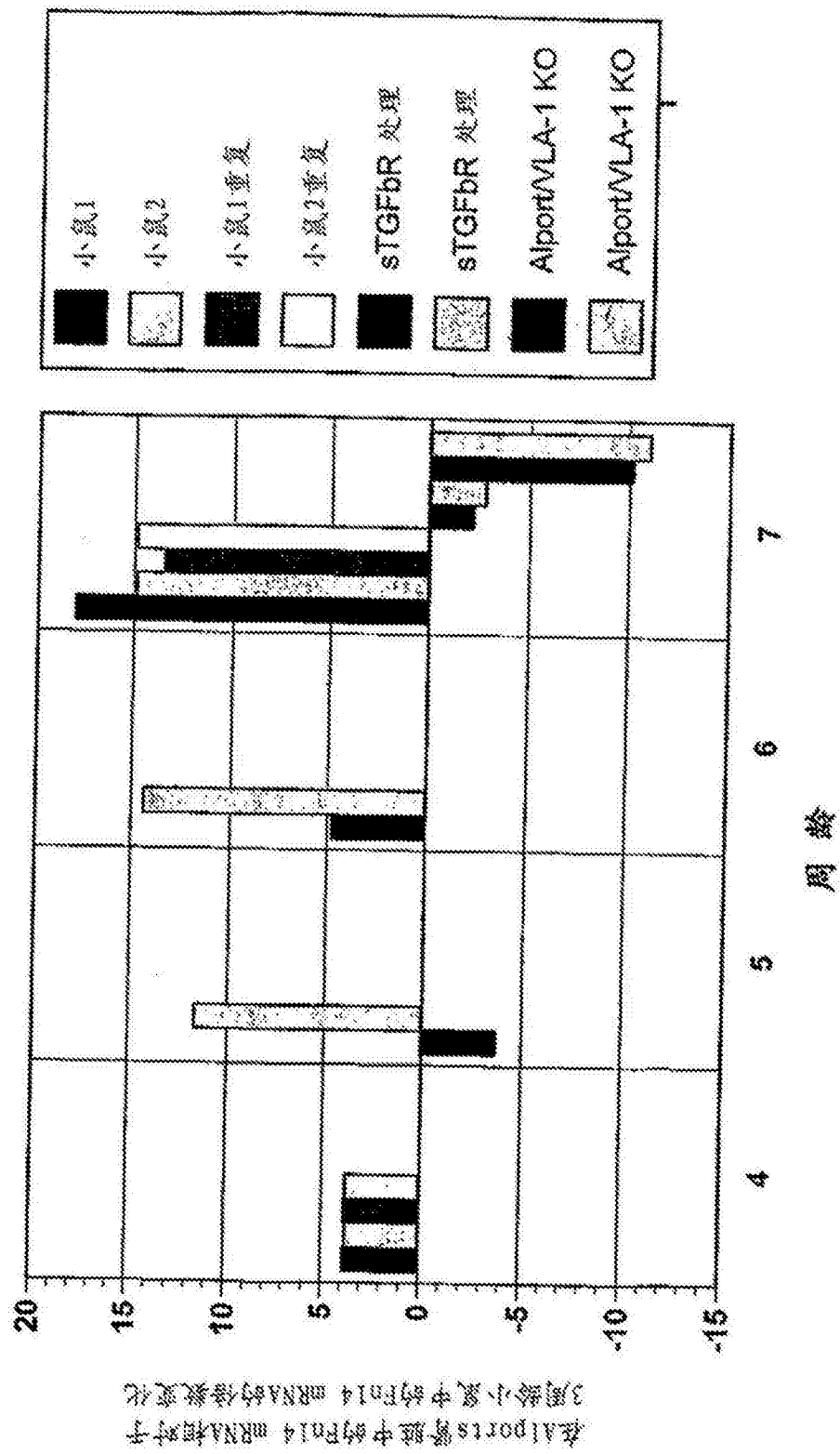


图18

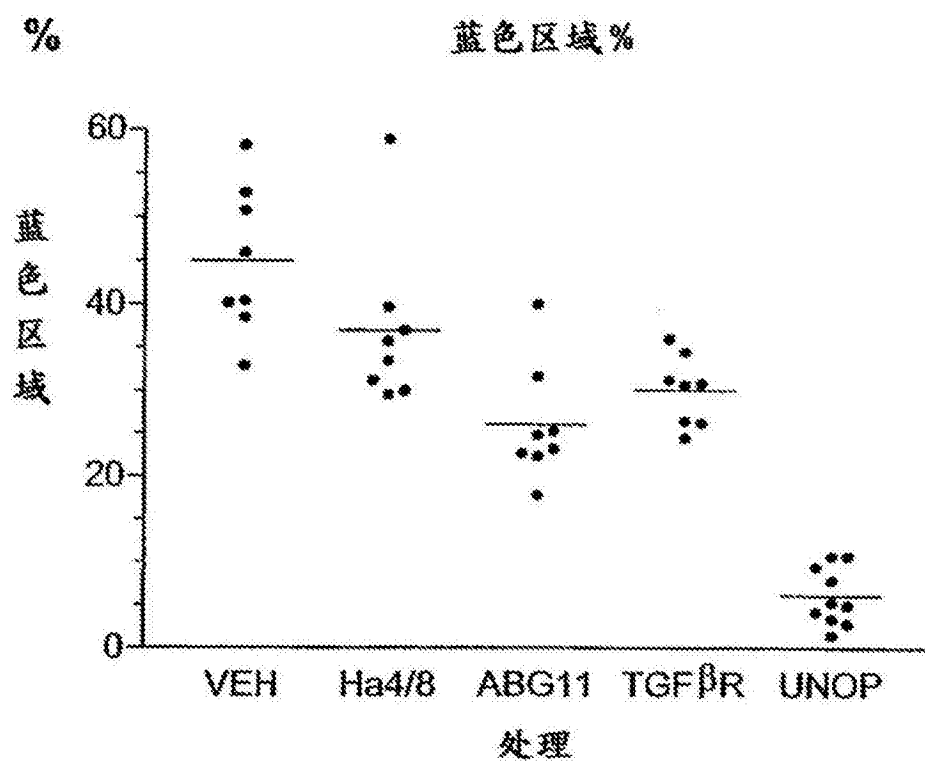
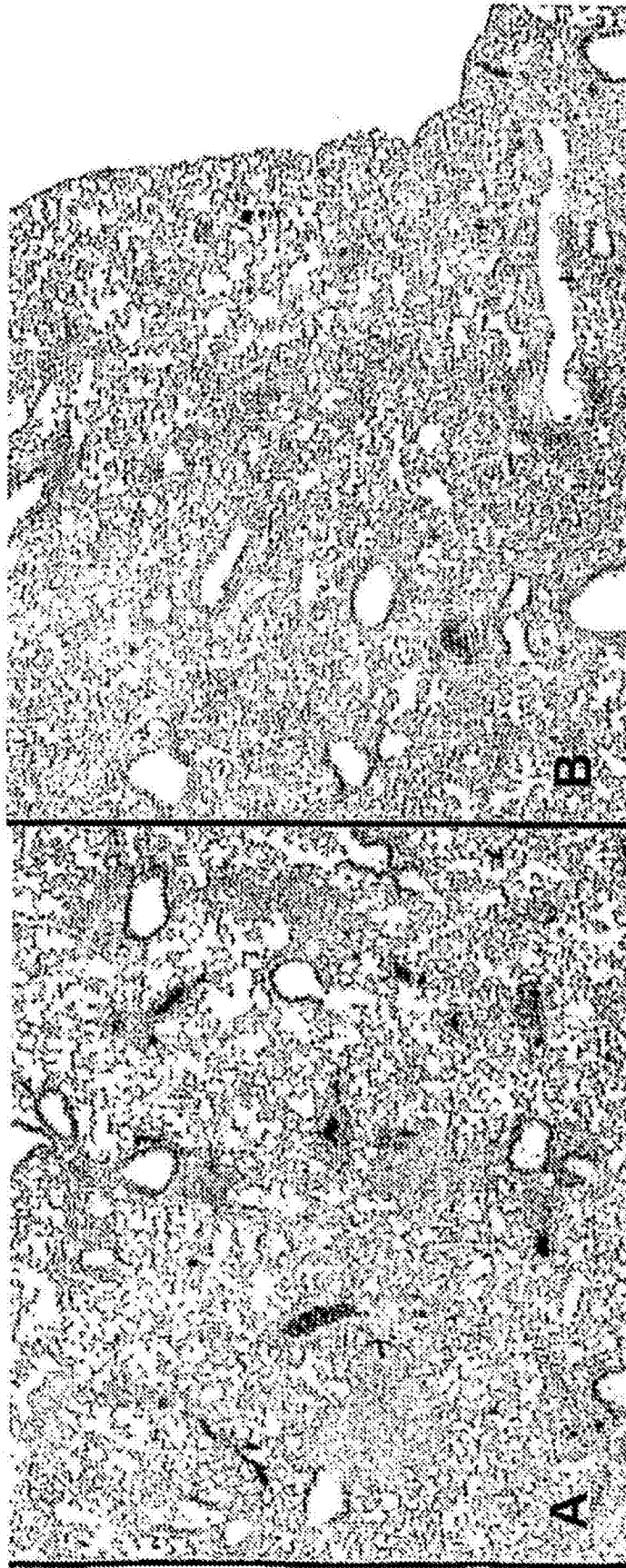


图19

TWEAK在肺中的作用: TWEAK Tg小鼠中的炎症



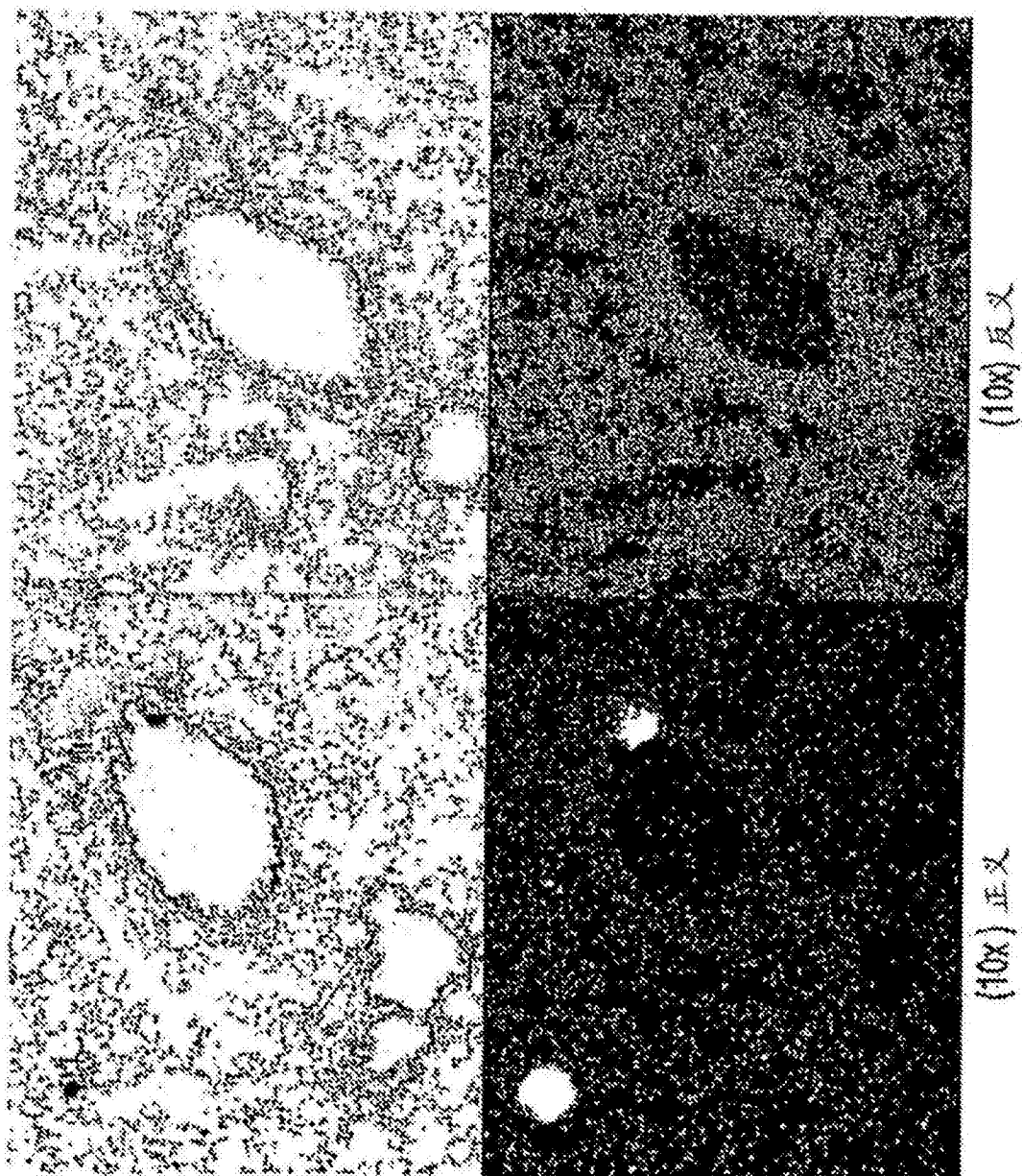
肉芽肿性/淋巴细胞性炎症

A. 小鼠回交4xB6

B. s TWEAK Tg 小鼠 H&E

图20

Tweak mRNA在内衬支气管肺泡的肺细胞中表达

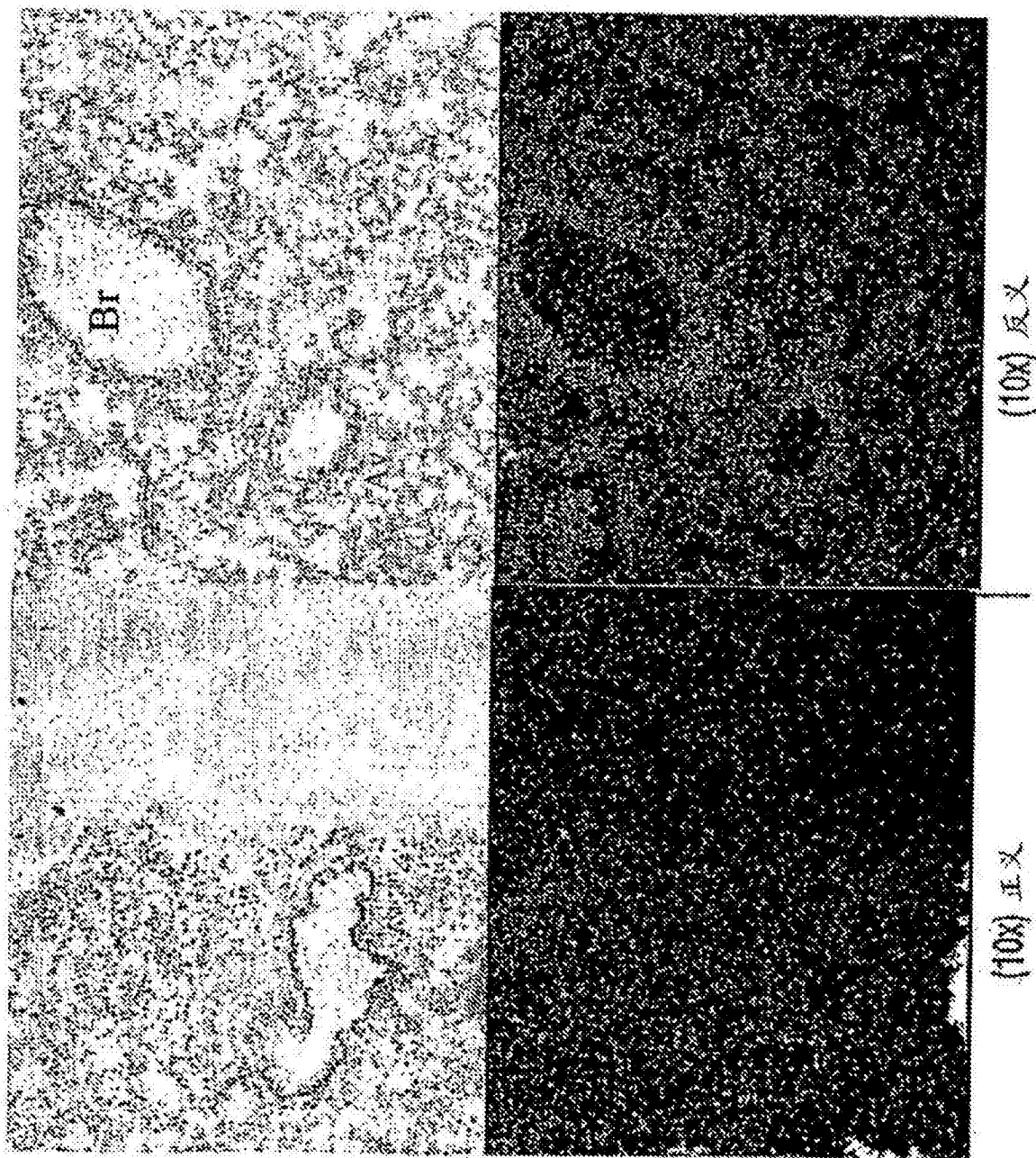


苏木精

暗视野
(ISH)

图21

在内衬支气管肺泡的细胞中的Fn14 mRNA表达



苏木精

暗视野
(ISH)

图22

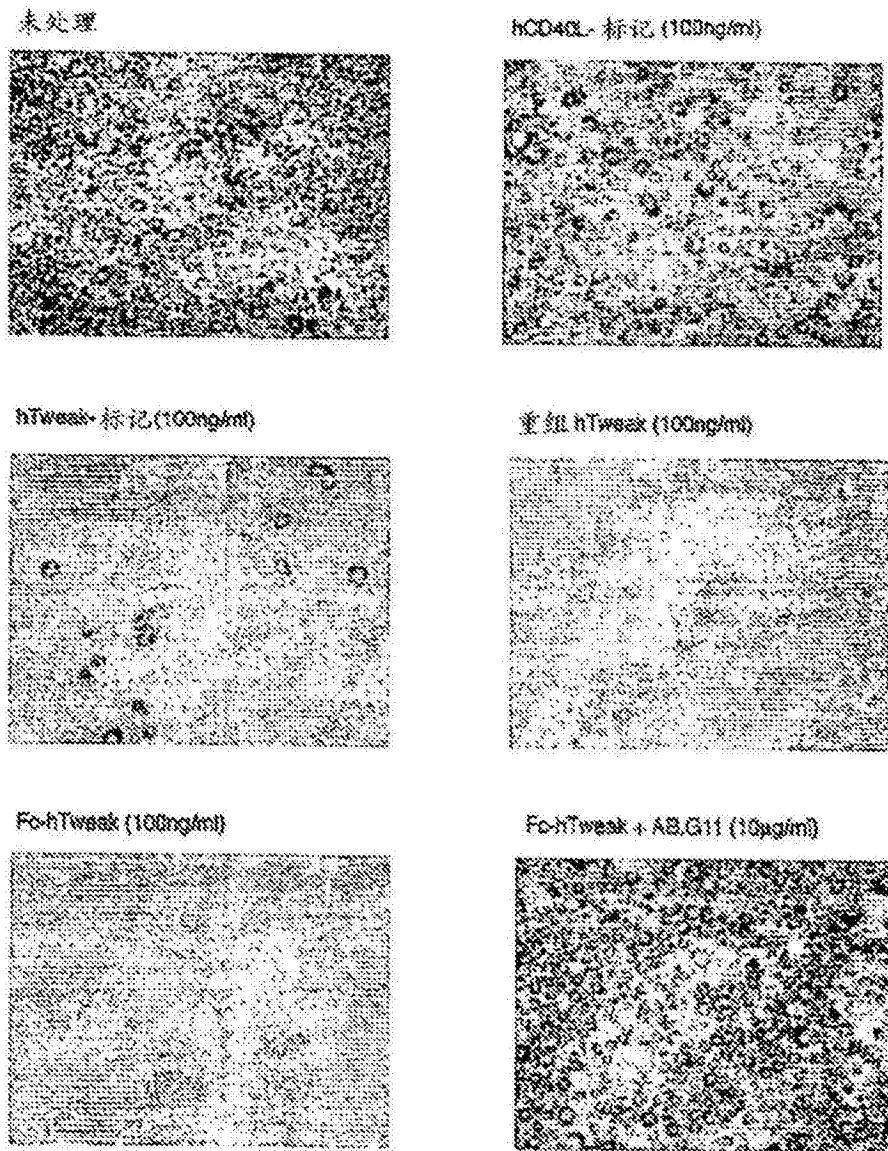


图23

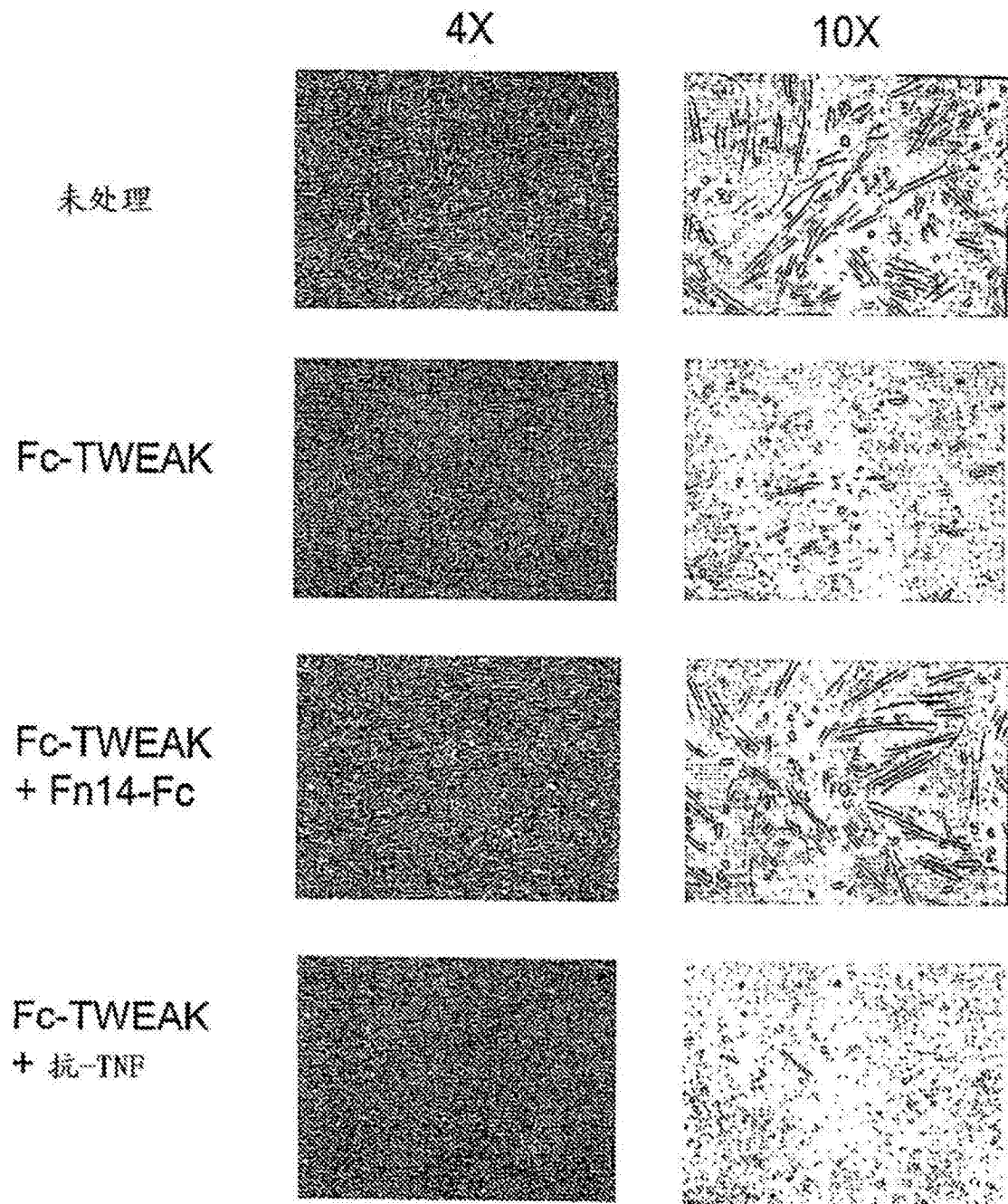


图24

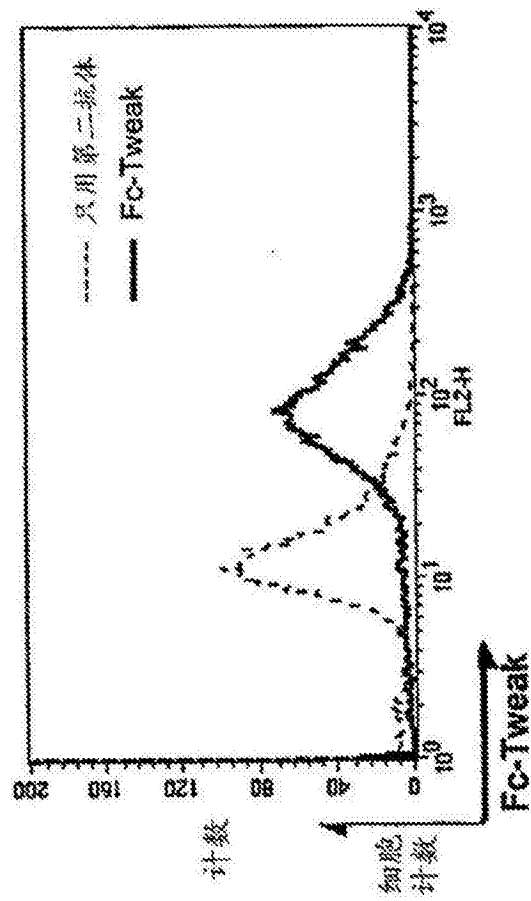


图25