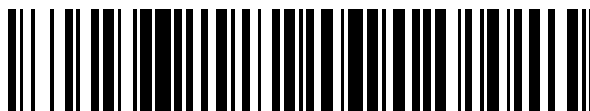


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 121**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12N 15/64 (2006.01)
A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2003 E 08104327 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2013 EP 1997512**

54 Título: **Procedimientos para tratar afecciones relacionadas con TWEAK**

30 Prioridad:

09.04.2002 US 371611 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2014

73 Titular/es:

**BIOGEN IDEC MA INC. (100.0%)
14 Cambridge Center
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**BURKLY, LINDA;
JAKUBOWSKI, ANIELA;
ZHENG, TIMOTHY y
HAHM, KYUNGMIN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 444 121 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para tratar afecciones relacionadas con TWEAK

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un antagonista de TWEAK para usar en el tratamiento de enfermedades cardíacas relacionadas con TWEAK.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los miembros de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF), llamados así por su similitud estructural con el TNF- α , son componentes clave en diferentes procesos, tales como respuesta inflamatorias, inmunidad celular y apoptosis. Los ligandos del TNF pueden actuar localmente como proteínas unidas a membrana de tipo II a través del contacto directo de célula a células o como proteínas secretadas que tienen funciones autocrina, paracrina o endocrina. Los miembros de la familia del TNF se unen a los miembros de la familia de receptores del TNF (TNF-R) por su dominio extracelular C-terminal. Diferentes miembros de la familia del TNF incluyen TNF, linfotoxinas (LT), Fas, CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX-40, TRAMP, CAR-1, TRAIL, GITR, HVEM, osteoprotegrina, NGF, TRAIL, Kay (BAFF), APRIL y TWEAK (relación con TNF y poca capacidad para inducir muerte celular).

[0003] Una característica que define a esta familia de receptores de citoquinas se encuentra en el dominio extracelular rico en cisteína, puesto de manifiesto inicialmente por la clonación molecular de dos receptores de TNF distintos. Esta familia de genes codifica glicoproteínas características de proteínas transmembrana de tipo I que tienen un dominio de unión a ligando extracelular, una sola región que se extiende en la membrana y una región citoplasmática implicada en la activación de funciones celulares. La región de unión al ligando rica en cisteínas presenta un dominio central unido por disulfuro estrechamente tejido, que dependiendo del miembro particular de la familia se repite múltiples veces. La mayoría de los receptores tienen 4 dominios, aunque puede haber tan pocos como 1, o tantos como 6.

[0004] Los miembros de la familia de TNF tienen una función en la regulación del sistema inmunitario, controlando la supervivencia y diferenciación celular, así como sistemas de defensa de hospedantes intensos, tales como la inflamación. Los esfuerzos continuados en la técnica por manipular los miembros de la familia del TNF para el beneficio terapéutico, pueden proporcionar medios únicos para controlar la enfermedad. Por ejemplo, algunos de los ligandos de esta familia pueden inducir directamente la muerte apoptótica de muchas células transformadas, p. ej., LT, TNF, ligando Fas y TRAIL. La activación de Fas y posiblemente TNF y el receptor CD30 pueden inducir la muerte celular en linfocitos no transformados que pueden presentar una función inmunorreguladora.

[0005] La capacidad para inducir la muerte celular programada es una característica importante y bien estudiada de varios miembros de la familia del TNF. Parece que la apoptosis mediada por Fas tiene una función en la regulación de los linfocitos autorreactivos en la periferia y posiblemente el timo. Además, el TNF y sistemas CD30 se han implicado en la supervivencia de linfocitos T y líneas de linfoma anaplásico de células grandes. La muerte en esta línea celular en respuesta a la señalización del receptor de TNF, Fas o LT- β tiene características de apoptosis.

[0006] La familia de ligandos de TNF se puede clasificar en 3 grupos basado en su capacidad para inducir la muerte celular. Primero, el TNF, ligando Fas y TRAIL pueden inducir eficazmente la muerte celular en muchas líneas y lo más probablemente sus receptores tienen dominios de muerte canónicos buenos. Es de suponer que el ligando de DR-3 (TRAMP/WSL-1) también esté en esta categoría. Después están los ligandos tales como TWEAK, ligando CD30 y LT α 2, que producen una señal de muerte más débil limitada a unas pocas células. Los estudios en estos sistemas han sugerido que existe un mecanismo de señalización de muerte más débil separado. Finalmente, están aquellos miembros que no pueden suministrar una señal de muerte eficazmente. Probablemente todos los grupos pueden ejercer efectos antiproliferativos en algunos tipos de células resultantes de la inducción de diferenciación celular, p. ej., CD40.

[0007] En general, la muerte se produce después de la agregación de dominios de muerte que residen en el lado citoplasmático de los receptores de TNF. El dominio de muerte orquesta el ensamblaje de diferentes componentes de la transducción de señales que conduce a la activación de la cascada de caspasa. Algunos receptores carecen de dominios de muerte canónicos, p. ej., el receptor LT β y CD30, aunque pueden inducir la muerte celular, pero de forma más débil. A la inversa, la señalización a través de otras rutas tales como CD40 es

necesaria para mantener la supervivencia celular. Sigue siendo necesario identificar y caracterizar mejor las funciones de los miembros de la familia del TNF, facilitando así el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades relacionadas con la familia del TNF.

5 **[0008]** TWEAK se aisló en una selección de ARN que hibridaran con una sonda de eritropoyetina. Chicheportiche y col., *J. Biol. Chem.* 272:32401-32410 (1997). Los péptidos de ratón y humano tienen un grado de conservación inusualmente alto, que incluye una identidad de 93% de aminoácidos en el dominio de unión al receptor. TWEAK, que se mostró que era secretado eficazmente de las células, es expresado de forma abundante en muchos tejidos, incluyendo corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, 10 bazo, glándulas linfáticas, timo, apéndice, y linfocitos de la sangre periférica.

[0009] Un receptor de TWEAK conocido es Fn14, un gen de respuesta inmediata temprana regulado por factor de crecimiento que disminuye la adhesión celular a la matriz extracelular y reduce el crecimiento y migración estimulados por suero (Meighan-Mantha y col., *J. Biol. Chem.* 274:33166-33176 (1999)). Se ha mostrado que Fn14 15 es inducido por tratamiento con FGF, suero de ternero y éster de forbol, y es expresado en niveles relativamente altos en tejidos del corazón, riñón, pulmón, piel, músculo esquelético, ovario y páncreas, así como en módulos de carcinoma hepatocelular y otras líneas celulares de cáncer, y con niveles menores en tejidos hepáticos normales.

[0010] TWEAK se ha implicado en muchos procesos biológicos. Por ejemplo, se mostró que las células HT29 20 tratadas con IFN- γ y TWEAK sufrían apoptosis; aunque la capacidad de TWEAK para inducir apoptosis es débil y solo un número pequeño de tipos de células son susceptibles. Chicheportiche y col., *J. Biol. Chem.* 272:32401-32410 (1997). En cambio, también se ha mostrado que TWEAK induce angiogénesis y proliferación de células endoteliales en una ruta independiente del VEGF. Lynch y col., *J. Biol. Chem.* 274:8455-8459 (1999). Los astrocitos se unen y son estimulados específicamente por TWEAK. TWEAK puede infiltrarse en el cerebro inflamado para 25 influir en el comportamiento de los astrocitos. Los astrocitos expuestos a TWEAK secretan niveles altos de IL-6 y IL-8, y también regulan por aumento la expresión de ICAM-1. Saas y col., *GLIA* 32:102-107 (2000).

[0011] TWEAK también se ha implicado en la regulación del sistema inmunitario. Tras la estimulación con IFN- γ , los monocitos expresan rápidamente TWEAK, y los anticuerpos dirigidos contra TWEAK inhibían parcialmente su 30 actividad citotóxica contra las células de carcinoma escamoso humano. Una combinación de anticuerpos dirigidos contra TWEAK y dirigidos contra TRAIL inhibía casi completamente la citotoxicidad. Nakayama y col., *J. Exp. Med.* 192:1373-1379 (2000). En cambio, el ARNm de TWEAK desaparecía rápidamente en ratones tratados con lipopolisacáridos (LPS), un inductor de las respuestas inmunoinflamatorias. Además, el ARNm de TWEAK también se reducía en la anemia hemolítica autoinmunitaria y lupus eritematoso sistémico en modelos de ratones. Estos 35 datos sugieren que la regulación por defecto de la expresión de TWEAK es un suceso importante en la inflamación aguda y crónica. Chicheportiche y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 279:162-165 (2000).

[0012] Actualmente, la técnica carece de la comprensión completa de qué afecciones o enfermedades están relacionadas con la expresión y función de TWEAK, incluyendo la función de TWEAK en las afecciones tanto 40 inflamatorias como no inflamatorias.

[0013] El documento WO 01/45730 describe agonistas y antagonistas del receptor de TWEAK y su uso para la modulación de la angiogénesis, es decir, el tratamiento de, p. ej., cáncer, curación de heridas, enfermedades 45 cardíacas, enfermedades inflamatorias y respuestas mediadas por TWEAKR en general. El documento WO 99/19490 describe el ligando apo-3 (= TWEAK), anticuerpos dirigidos contra el ligando apo-3 y proteínas de fusión ligando apo-3-Fc y el uso de los mismos para inducir la apoptosis para el tratamiento del cáncer. El documento US-B1-6207642 describe TREPA (= TWEAK), fragmentos del mismo (agonista o antagonista) y anticuerpos dirigidos contra TREPA y el uso de los mismos para el tratamiento, p. ej., de inflamación, cáncer, curación de heridas e injerto de tejido. El documento WO 00/42073 se refiere al uso de antagonistas de TWEAK (p. ej., anticuerpos, proteínas de 50 fusión de receptor de TWEAK-Ig solubles) para el tratamiento de trastornos inmunológicos como, p. ej., enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de injerto y afecciones inflamatorias. El documento WO 01/85193 se refiere al uso de agonistas de TWEAK para el tratamiento, p. ej., de afecciones isquémicas miocárdicas, curación de heridas, trasplante de tejidos y órganos, reparación ósea, úlceras gástricas y lesiones de la piel.

55 RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención se refiere a la función de TWEAK en la contribución a la gravedad y el avance de la miocardiopatía dilatada no inflamatoria y la insuficiencia cardíaca congestiva causada por miocardiopatía dilatada no

inflamatoria. La presente invención establece una unión causal entre la molécula TWEAK y determinadas enfermedades cardíacas. Basándose en la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un antagonista de TWEAK seleccionado del grupo que consiste en:

5 (a) un anticuerpo dirigido contra TWEAK;

(b) una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra TWEAK;

(c) un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, en el que el receptor de TWEAK es Fn14; y

10

(d) una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, en el que el receptor de TWEAK es Fn14;

15 para usar en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en miocardiopatía dilatada no inflamatoria e insuficiencia cardíaca congestiva causada por miocardiopatía dilatada no inflamatoria.

[0015] En una realización, la miocardiopatía dilatada no inflamatoria es miocardiopatía dilatada idiopática.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20

[0016] Figura 1: Se muestra la función de TWEAK en la miocardiopatía dilatada. A. Un ratón transgénico (Tg) FL-TWEAK muestra trombosis de aurícula y ventrículo derecho, así como dilatación grave. B. Se muestra el corazón normal para la comparación.

25 **[0017]** Figura 2: La expresión en exceso de TWEAK en el corazón induce el remodelado cardíaco. Se ve un corte transversal del corazón con 10X aumentos con tinción con hematoxilina/eosina el día 20 después de infección de ratones C57BL/6 adultos con un vector adenovírico que comprende ADN de sTWEAK murino con una construcción de control de adenovirus-GFP.

30 **[0018]** Figura 3: TWEAK induce hiperplasia ductal biliar y de células ovals, como se pone de manifiesto en ratones transgénicos (Tg) FL-TWEAK comparados con crías de la misma camada no transgénicas (NTg) a las 2 semanas de edad y 7 meses de edad.

35 **[0019]** Figura 4: TWEAK induce hiperplasia ductal biliar y de células ovals, como se pone de manifiesto por la mayor tinción con mAb A6 que es específico para un marcador de epitelio biliar y célula oval en ratones transgénicos (Tg) FL-TWEAK comparados con crías de la misma camada no transgénicas (NTg).

40 **[0020]** Figura 5: TWEAK induce hiperplasia de células ovals como se pone de manifiesto por la presencia de células ovals grandes en la región portal en ratones transgénicos (Tg) FL-TWEAK.

[0021] Figura 6: TWEAK causa vacuolización hepatocelular en ratones transgénicos (Tg) FL-TWEAK comparados con crías de la misma camada no transgénicas (NTg).

45 **[0022]** Figura 7: Niveles de TWEAK en el suero en ratones infectados con un vector adenovírico que comprende el ADN de sTWEAK murino.

50 **[0023]** Figura 8: El exceso de expresión de TWEAK en el hígado induce la muerte de hepatocitos e hiperplasia ductal. Los cortes transversales del hígado se ven con 20X aumentos con tinción con hematoxilina/eosina los días 3 y 11 después de infección de ratones C57BL/6 adultos con un vector adenovírico que comprende ADN de sTWEAK murino comparado con una construcción de control de adenovirus-GFP.

[0024] Figura 9: El receptor de TWEAK Fn14 es inducido después de daño hepático inducido por CCl₄ en ratones. La hibridación in situ para el ARNm de Fn14 en hígado de ratón normal y el daño hepático inducido por CCl₄ muestran poca, si hay alguna, expresión detectable en el hígado adulto normal e inducción notable de la expresión de Fn14 después del daño. Los cortes teñidos con hematoxilina y eosina (HyE) muestran el correspondiente hígado sano normal y el tejido hepático dañado con CCl₄.

[0025] Figura 10: La expresión de Fn14 es regulada por aumento en las células epiteliales biliares en un modelo murino de ligamiento de vías biliares, como se pone de manifiesto por la mayor tinción con la sonda de ARNm de

sentido contrario dirigida contra Fn14 usando hibridación in situ. El corte teñido con hematoxilina y eosina (HyE) muestra el correspondiente corte en microscopio de campo brillante.

[0026] Figura 11: Corte transversal de riñón de ratón transgénico (Tg) FL-TWEAK comparado con el riñón de ratón no transgénico (NTg) a las 2 semanas, 8 semanas y 7 meses de edad. Los resultados muestran basofilia tubular en el riñón Tg TWEAK a las 8 semanas y 7 meses de edad, y dilatación del espacio urinario en glomérulos, es decir, quistes glomerulares, con túbulos basófilos adyacentes a los 7 meses de edad.

[0027] Figura 12: Corte transversal de riñón de ratón transgénico (Tg) FL-TWEAK con tinción con HyE. A. Se muestra nefropatía glomerular con basofilia del epitelio tubular proximal adyacente. B. Hiper celularidad mesangial segmentaria, hipertrofia del epitelio capsular, y engrosamiento capsular.

[0028] Figura 13: Cortes transversales de dos riñones de ratón transgénico (Tg) FL-TWEAK teñidos con HyE (parte superior) y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (parte inferior). Los túbulos basófilos corresponden a los túbulos que expresan PCNA, es decir, túbulos que proliferan.

[0029] Figura 14: Cortes en serie de un riñón de ratón transgénico (Tg) FL-TWEAK teñido con HyE, una lectina de T. Purpureas (un marcador para túbulos proximales) y una lectina de A. Hypogaea (un marcador para túbulos distales). Los resultados muestran que los túbulos basófilos no expresan ninguno de los marcadores epiteliales.

[0030] Figura 15: El exceso de expresión de TWEAK en el riñón induce hiperplasia tubular y glomerulopatía. Se ve un corte transversal del riñón con 20X y 40X aumentos con tinción con hematoxilina/eosina el día 11 después de infección de ratones C57BL/6 adultos con un vector adenovírico que comprende ADN de sTWEAK murino comparado con una construcción de control de adenovirus-GFP.

[0031] Figura 16: El ARNm de TWEAK es expresado ampliamente por todo el riñón en un ratón adulto no manipulado genéticamente. Se ve un corte transversal del riñón con 5X aumentos con tinción con hematoxilina, o con microscopio de campo oscuro después de hibridación in situ con sondas de TWEAK del mismo sentido o sentido contrario.

[0032] Figura 17: El ARNm de Fn14 se expresa en los túbulos proximales de la médula externa en el riñón de ratón adulto no manipulado genéticamente. Se ve un corte transversal del riñón con 5X aumentos con tinción con hematoxilina, o con microscopio de campo oscuro después de hibridación in situ con sondas de Fn14 del mismo sentido o sentido contrario.

[0033] Figura 18: Se sugiere una función para TWEAK en la fibrosis renal por la regulación por aumento del ARNm de Fn14 en riñones Alport. Se muestra el número de veces de aumento de los niveles de ARNm de Fn14 en dos ratones individuales que llevan la mutación que conduce a la enfermedad de Alport, con respecto a los animales no manipulados genéticamente a las 4, 5, 6 7 semanas de edad. Los niveles de ARNm se determinaron por hibridación con un chip génico que contiene la secuencia de nucleótidos que corresponde a una parte del gen de Fn14. En los puntos de medición de 4 y 7 semanas, se muestran los resultados duplicados para cada uno de los dos ratones (indicados por las barras de repetición de ratón 1 y repetición de ratón 2, respectivamente). En el punto de medición de 7 semanas, se muestra que el ARNm de Fn14 se reduce en dos situaciones donde la enfermedad es inhibida, es decir tratamiento con sTGFβR-Fc y en ratones con gen VLA-1 inactivado (ilustrado en la figura 18 por cualquiera de los dos ratones independientes tratados con sTGFβR-Fc ("tratado con sTGFβR") o los dos ratones independientes Alport/VLA-1 KO ("Alport/VLA-1 KO").

[0034] Figura 19: El tratamiento con antagonista de TWEAK en la obstrucción uretral unilateral (UUO), un modelo murino de fibrosis renal, reduce significativamente la fibrosis renal. La cuantificación metamórfica del área de tinción azul (área fibrótica) en cortes de riñón en parafina teñidos con tinción tricrómica de Masson indica que el contenido de colágeno disminuía en muestras de riñón tratadas con AB.G11 (Ab monoclonal dirigido contra TWEAK) a niveles similares a los observados en las muestras de control positivas sTGF-βR-Ig. En cambio, los riñones tratados con anticuerpo (HA4/8) de hámster de control de isotipo no mostraron reducción de la fibrosis renal, similar a los riñones tratados con vehículo.

[0035] Figura 20: El transgén de TWEAK causa inflamación granulomatosa y linfocitocitaria en el pulmón. A. Un corte transversal de un pulmón de un ratón transgénico (Tg) FL-TWEAK teñido con HyE. B. Un corte transversal de un pulmón de un ratón transgénico Tg sTWEAK teñido con HyE.

[0036] Figura 21: El ARNm de TWEAK es expresado en las células que recubren los bronquiolos y alveolos en el pulmón de ratón no manipulado genéticamente. Se ve un corte transversal del pulmón con 10X aumentos con tinción con hematoxilina, o con microscopio de campo oscuro después de hibridación in situ con sondas de TWEAK del mismo sentido o sentido contrario.

[0037] Figura 22: El ARNm de Fn14 es expresado en bronquiolos y alveolos del pulmón de ratón no manipulado genéticamente. Se ve un corte transversal del pulmón con 10X aumentos con tinción con hematoxilina, o con microscopio de campo oscuro después de hibridación in situ con sondas de Fn14 del mismo sentido o sentido contrario.

[0038] Figura 23: Efecto inhibidor de TWEAK en la diferenciación de adipocitos de células 3T3-L1 in vitro. Las células 3T3-L1 se indujeron para dar diferenciación usando un protocolo estándar. Las células eran no tratadas, tratadas con un agente de control (CD40L-FLAG humano soluble recombinante 100 ng/ml) o diferentes versiones de TWEAK con TWEAK-FLAG humano soluble recombinante 100 ng/ml, TWEAK humano soluble recombinante, Fc-TWEAK humano) el día 0, junto con dexametasona e insulina, y se recargaron diariamente. En un grupo experimental, también se añadió el mAb AB.G11 dirigido contra TWEAK de bloqueo al mismo tiempo que Fc-hTWEAK. Las células se tiñeron con aceite rojo O el día 7.

[0039] Figura 24: Efecto inhibidor de TWEAK en la miogénesis in vitro. Se cultivaron mioblastos C2C12 hasta casi confluencia en un medio de crecimiento basado en DMEM y el día 0, se cambió a un medio de diferenciación bajo en suero que contenía suero de caballo al 2% para producir la diferenciación. Las células no se trataron o se trataron el día 0 con Fc-hTWEAK (100 ng/ml). La formación de miotubos se examinó usando un microscopio de contraste de fase y se tomaron fotos el día 6 de la diferenciación. En otros grupos experimentales, se añadieron Fn14-Fc o un anticuerpo dirigido contra TNF neutralizante al mismo tiempo que Fc-hTWEAK, demostrando así que el efecto inhibidor de Fc-hTWEAK era específico de TWEAK y no mediado por TNF.

[0040] Figura 25: TWEAK se puede unir a citoblastos mesenquimatosos humanos. Los citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSC) se adquirieron en BioWhittaker (Cambrex) y se cultivaron de acuerdo con el protocolo recomendado. Las células se recogieron por incubación con PBS que contenía EDTA 5 mM y se tiñeron según la capacidad para unir proteína Fc-TWEAK recombinante (línea negra). Brevemente, las hMSC se incubaron en tampón de FACS (PBS, FBS al 1%) con Fc-TWEAK 100 ng/ml durante 1 h. Después de lava dos veces con tampón de FACS, las células después se incubaron con Fc de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con PE o anticuerpos secundarios de cabra dirigidos contra Fc de ratón, con una dilución 1:200 (Jackson ImmunoResearch). La capacidad de Fc-TWEAK para unirse a hMSC se determinó usando análisis de separador de células activadas por fluorescencia (FACS). Se midió la tinción de fondo por tinción de anticuerpo secundario solo (línea de trazos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0041] Salvo que se defina de otra forma en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden normalmente los expertos en la materia. Además, salvo que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, virología y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son las conocidas y usadas habitualmente en la materia. Los procedimientos y las técnicas de la presente invención se llevan a cabo en general de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la materia y descritos en diferentes referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva salvo que se indique otra cosa. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), y Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realizan normalmente en la materia o como se describen en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son las conocidas y usadas normalmente en la materia. Se usan técnicas estándar para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de los pacientes.

[0042] Con el fin de que la invención descrita en el presente documento se entienda de forma más completa, se expone la siguiente descripción detallada. En la descripción se usan los siguientes términos:

- [0043]** “Anticuerpo” se refiere a una inmunoglobulina intacta o a una parte de unión al antígeno de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Las partes de unión al antígeno se pueden producir por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las partes de unión al antígeno incluyen, entre otras, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, y fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), anticuerpos quiméricos, fragmentos bivalentes y polipéptidos que contienen al menos una parte de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión específica del antígeno al polipéptido. Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo del anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward y col., *Nature* 341:544-546, 1989) consiste en un dominio VH. Un anticuerpo monocatenario (scFv) es un anticuerpo en el que una región VL y VH se emparejan para formar una molécula monovalente mediante un conector sintético que les permite convertirse en una sola cadena de proteína (Bird y col., *Science* 242:423-426 (1988) y Huston y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, (1988)). Los fragmentos bivalentes son anticuerpos biespecíficos en los que dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir que se emparejen entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno (véase p. ej., Holliger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), y Poljak y col., *Structure* 2:1121-1123 (1994)). Se pueden incorporar una o más CDR en una molécula de forma covalente o no covalente para convertirla en inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar la o las CDR como parte de una cadena de polipéptido más larga, puede unir de forma covalente la o las CDR a otra cadena de polipéptido, o puede incorporar la o las CDR de forma no covalente. Las CDR permiten a la inmunoadhesina unirse específicamente a un antígeno particular de interés.
- [0044]** Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser iguales entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo “biespecífico” o “bifuncional” tiene dos sitios de unión diferentes.
- [0045]** “Repertorio de anticuerpos” se refiere a la suma de cada especie de anticuerpo diferente en un animal o ser humano. La diversidad en los repertorios de anticuerpos resulta, entre otros, de la recombinación de genes de inmunoglobulina, la diversidad de unión de genes de inmunoglobulina, actividad de desoxitransferasa terminal e hipermutación somática.
- [0046]** “Anticuerpos quiméricos” son anticuerpos que se han alterado de su forma original para comprender secuencias de aminoácidos de otra proteína. Los anticuerpos quiméricos retienen al menos una parte de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo original, típicamente la parte que comprende la región de unión al antígeno (Fab). Los ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos biespecíficos y fusiones con otras secuencias de proteína no inmunoglobulina.
- [0047]** “Elementos reguladores en cis” se refiere en general a secuencias que regulan la expresión inducible o constitutiva de secuencias de genes en condiciones específicas o en células específicas. Los ejemplos de procedimientos celulares que secuencias de control de la expresión regulan incluyen, pero no se limitan a transcripción génica, traducción de proteínas, corte y empalme de ARN mensajero, cambio de isotipo de inmunoglobulina, glicosilación de proteínas, escisión de proteínas, secreción de proteínas, localización de proteínas intracelulares y movimiento dirigido de proteínas extracelulares.
- [0048]** “Citoquinas” se refiere en general a moléculas de señalización del sistema inmunitario. Las citoquinas incluyen, pero no se limitan a interleuquinas (IL), factores de crecimiento transformante (TGF), factores de necrosis tumoral (TNF), linfotoxinas (LT), interferones, factores estimuladores de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), CSF de macrófagos, CSF de granulocitos, y factores de inhibición de la migración.
- [0049]** “Embriocitoblasto (ES)” se refiere a células pluripotentes o multipotentes que cuando se inyectan en un blastocito, pueden contribuir a muchos o todos los tejidos de un animal prenatal, posnatal o adulto. Los animales que resultan de inyecciones de blastocitos se denominan con frecuencia animales “quiméricos” puesto que sus células somáticas y/o germinales a menudo derivan tanto de blastocitos donantes como de células ES inyectadas. Una propiedad importante de las células ES es su capacidad para contribuir a la línea germinal de los animales, que da como resultado que pese cualquier característica heredable deseada a la progenie del animal quimérico. Las células ES inmortalizadas son una herramienta poderosa para generar animales con alteraciones dirigidas de secuencias de

genes endógenos o para generar animales con genes extraños (transgenes).

- [0050]** “Secuencias de control de la expresión” se refiere a secuencias que permiten la expresión constitutiva o inducible de secuencias de genes en condiciones específicas o en células específicas. Los ejemplos de procesos celulares que secuencias de control de la expresión regulan incluyen, pero no se limitan a transcripción génica, traducción de proteínas, corte y empalme de ARN mensajero, cambio de isotipo de inmunoglobulina, glicosilación de proteínas, escisión de proteínas, secreción de proteínas, localización de proteínas intracelulares y movimiento dirigido de proteínas extracelulares.
- 10 **[0051]** “Proteínas de fusión” se refiere a proteínas quiméricas que comprenden secuencias de aminoácidos de dos o más proteínas diferentes. Típicamente, las proteínas de fusión son resultado de técnicas de recombinación in vitro bien conocidas en la materia. Sin embargo, las proteínas de fusión pueden ser resultado de entrecruzamiento in vivo u otros sucesos de recombinación.
- 15 **[0052]** “Moléculas de inmunoglobulina humana” se refiere a proteínas de inmunoglobulina que son codificadas por secuencias de genes de inmunoglobulina humana. Las secuencias de genes de inmunoglobulina se pueden expresar en cualquier célula o animal, humano o no humano.
- 20 **[0053]** “Anticuerpos humanizados” son anticuerpos que derivan de una especie no humana, en la que determinados aminoácidos en dominios de la región armazón y constantes de las cadenas pesadas y ligeras han mutado para así evitar o eliminar una respuesta inmunitaria en seres humanos. Alternativamente, los anticuerpos humanizados se pueden producir por fusión de dominios constantes de un anticuerpo humano a los dominios variables de una especie no humana. Los ejemplos de cómo hacer anticuerpos humanizados se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293.
- 25 **[0054]** “Inflamación” o “enfermedad inflamatoria” se refiere al proceso patológico fundamental que consiste en reacciones citológicas e histológicas que se producen en los vasos sanguíneos y tejidos adyacentes en respuesta a daño, estimulación anormal o agentes biológicos. Igualmente, “afecciones no inflamatorias” o “enfermedades no inflamatorias” se refiere a cualquier afección o enfermedad que no es de naturaleza inflamatoria, como se describe en el presente documento.
- 30 **[0055]** “Proteína aislada” o “polipéptido aislado” se refieren en general a una proteína o polipéptido que en virtud de su origen o fuente del que derivan: (1) no está asociado con componentes asociados naturales que lo acompañan en su estado natural, (2) carece de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente, se sintetiza en un sistema biológico exento de células (p. ej., un lisato de reticulocitos de conejo), o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina de forma natural, estará “aislado” de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también se puede hacer sustancialmente exenta de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas bien conocidas en la materia.
- 40 **[0056]** “Miméticos” o “miméticos de péptidos” son análogos no peptídicos que se usan normalmente en la industria farmacéutica como fármacos con propiedades análogas a las del péptido molde. Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber y Freidinger, *TINS* pág. 392 (1985); y Evans y col., *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Los miméticos se desarrollan con frecuencia con la ayuda de modelización molecular computarizada. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los miméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica deseada), tal como TWEAK, pero tiene uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--,-CH=CH--(cis y trans), --COCH₂--,-CH(OH)CH₂--,-CH₂SO--, por procedimientos bien conocidos en la materia. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por D-aminoácidos del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) también se puede usar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de la secuencia consenso sustancialmente idéntica se pueden generar por procedimientos conocidos en la materia (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); por ejemplo, añadiendo restos de
- 55 cisteína internos capaces de formar enlaces disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.
- [0057]** “Análogos de polipéptido” se refiere a polipéptidos que derivan de polipéptidos naturales per difieren de estos en sus secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos con cambios en sus secuencias de aminoácidos pueden

ser muteínas, proteínas de fusión o miméticos. Análogos de polipéptidos también se refiere a polipéptidos que tienen diferencias que no son de secuencia de aminoácidos comparados con los polipéptidos naturales. Estas diferencias pueden ser químicas o bioquímicas, e incluyen, pero no se limitan a los tipos de modificaciones descritos específicamente en el presente documento.

5

[0058] “Fragmentos de polipéptidos” se refiere a polipéptidos que tienen una eliminación amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero donde el resto de la secuencia de aminoácidos es idéntica a las correspondientes posiciones en la secuencia natural. Los fragmentos típicamente tienen al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, normalmente al menos 50 aminoácidos de longitud, e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de longitud.

[0059] “Células progenitoras” se refiere a células que pueden dar lugar a uno o más linajes celulares. Están incluidos los citoblastos, células totipotentes, células pluripotentes, células multipotentes, células bipotentes, células embrionarias o células adultas. También están incluidas las células específicas de tejidos, incluyendo, pero sin limitar a células comprometidas con un linaje particular capaz de experimentar diferenciación terminal, células que derivan de células residentes de tejidos y células de la circulación que tienen movimiento dirigido a tejidos específicos.

[0060] “Sujetos” son sujetos humanos y no humanos. Un ejemplo de un sujeto es un paciente.

[0061] “Afecciones relacionadas con TWEAK” se refiere a cualquier afección que resulte de la función o regulación aberrante de TWEAK. La expresión también se puede referir a cualquier afección que no resulte directamente de la función o regulación aberrante de TWEAK, sino que más bien surja de otro mecanismo en el que el deterioro, aumento o alteración de otra forma de la actividad de TWEAK tendrá un resultado detectable en la afección. Las afecciones relacionadas con TWEAK pueden ser de naturaleza inflamatoria o no inflamatoria, e incluyen, pero no se limitan a afecciones y enfermedades descritas específicamente en el presente documento.

[0062] “Vectores” se refiere a moléculas de ADN que permiten que la secuencia de ADN de interés sea clonada, propagada, recombinada, mutada o expresada fuera de sus células naturales. A menudo los vectores tienen secuencias de control de la expresión que permiten la expresión inducible o constitutiva de secuencias de genes en condiciones específicas o en células específicas. Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a plásmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), episomas derivados de virus de Epstein Bar (EBV), bacteriófagos, cósmidos y yagémidos.

35

[0063] “Animales xenogénicos” se refiere a animales que llevan partes sustanciales de locus de inmunoglobulina humana. A menudo los animales xenogénicos llevan locus de inmunoglobulina endógena dirigidos homológamente, convirtiéndolos en incapaces de expresar sus genes de inmunoglobulina endógenos. Los ejemplos incluyen los ratones de la línea XenoMouse™ (Abgenix, Inc., Fremont, California), que son capaces de reordenación somática de genes de inmunoglobulina humana transgénicos, hipermutación de genes variables humanos, expresión de genes de inmunoglobulina y cambio de isotipo de inmunoglobulina. Los animales xenogénicos son capaces de montar respuestas humorales eficaces contra la estimulación antigénica usando secuencias de genes de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos producidos en los animales xenogénicos son completamente humanos y se pueden aislar de los propios animales o de la progenie de los mismos, de células cultivadas extraídas de los animales o progenie de los mismos, y de hibridomas creados de líneas linfocíticas B xenogénicas o progenie de las mismas. Además, las secuencias de genes humanos reordenadas que codifican inmunoglobulinas producidas contra estimulaciones antigénicas específicas, se pueden aislar por técnicas recombinantes convencionales.

[0064] “Anticuerpos xenogénicos” se refiere a anticuerpos que son codificados por locus de inmunoglobulinas extrañas. Por ejemplo, en ratones de la línea XenoMouse™, los locus de anticuerpos humanos codifican anticuerpos xenogénicos.

[0065] “Anticuerpos monoclonales xenogénicos” se refiere a poblaciones homogéneas de anticuerpos que se producen en células inmortalizadas clonadas, p. ej., hibridomas, derivadas de animales xenogénicos. Por ejemplo, los hibridomas hechos a partir de ratones de la línea XenoMouse™ producen anticuerpos xenogénicos.

[0066] La comprensión y el tratamiento de enfermedades avanzan fundamentalmente por la determinación de los mecanismos moleculares o rutas bioquímicas subyacentes. De esta forma, los médicos e investigadores pueden diseñar agentes terapéuticos y formular composiciones farmacéuticas que se dirijan específicamente a esos

mecanismos moleculares o rutas bioquímicas.

[0067] Algunas de las enfermedades más complejas y debilitantes que afectan a seres humanos incluyen las del corazón. La presente invención proporciona ventajosamente importantes avances en la comprensión de estas enfermedades. Más en particular, la descripción proporciona animales transgénicos no humanos que expresan proteínas TWEAK exógenas y demuestran por primera vez, una correlación entre la expresión de la proteína TWEAK y determinadas afecciones patológicas cardíacas. Por consiguiente, la invención proporciona antagonistas de TWEAK para usar en el tratamiento o prevención de la miocardiopatía dilatada no inflamatoria y la insuficiencia cardíaca congestiva causada por miocardiopatía dilatada no inflamatoria.

[0068] Los antagonistas de TWEAK son capaces de alterar la actividad de TWEAK o alterar la interacción entre una forma unida a membrana o de longitud completa de polipéptidos TWEAK con sus receptores celulares. Alternativamente, los agentes terapéuticos alteran la interacción entre una forma unida a membrana o de longitud completa de polipéptidos TWEAK con otro polipéptido TWEAK. Dicha interferencia puede ocurrir en la superficie de una célula, de forma intracelular, extracelular o in vitro unido a una fase sólida o en disolución. En otra alternativa, los agentes terapéuticos alteran la interacción entre las formas unida a membrana o de longitud completa de polipéptidos TWEAK y las parejas de interacción de TWEAK. Dichas parejas de interacción pueden ser proteínas, ácidos nucleicos, sacáridos, lípidos, ácidos grasos y esteroides.

[0069] La enfermedad cardíaca es la causa predominante de discapacidad y muerte en países industrializados. En Estados Unidos, la enfermedad cardíaca causa aproximadamente 40 % de toda la mortalidad, dando cuenta de aproximadamente 750.000 muertes anuales. Lo más básico de la función del corazón es el miocardio, compuesto principalmente de células musculares ramificadas y estriadas que forman anastomosis (miocitos cardíacos). Los miocitos cardíacos son mucho mayores que las células intersticiales intermedias, dando cuenta de más de 90 % del volumen del miocardio. Las células inflamatorias son raras y el colágeno es escaso en un miocardio normal.

[0070] La enfermedad miocárdica es común pero ocurre de forma secundaria en una serie de afecciones cardíacas diferentes. Los ejemplos de enfermedad miocárdica incluyen trastornos inflamatorios (p. ej., miocarditis) y afecciones cardíacas no inflamatorias tales como la miocardiopatía dilatada, trastornos metabólicos sistémicos, distrofias musculares y anomalías genéticas en células musculares cardíacas.

[0071] Los tipos principales de miocardiopatías incluyen las miocardiopatías dilatada, hipertrófica y restrictiva. Un objeto de la invención es proporcionar antagonistas de TWEAK para usar en el tratamiento de la miocardiopatía dilatada, que es de naturaleza no inflamatoria. En el caso de la miocardiopatía dilatada no inflamatoria, que da cuenta de aproximadamente 90 % de los casos clínicos de enfermedad miocárdica, el corazón se caracteriza por la hipertrofia cardíaca progresiva, dilatación y disfunción contráctil (sistólica). La miocardiopatía dilatada puede ocurrir a cualquier edad, pero es más común en personas en el intervalo de edad de 20 a 60 años. El diagnóstico se hace a menudo mediante generación de imágenes cardíacas no invasiva, en particular mediante ecocardiografía bidimensional. La histopatología de la miocardiopatía dilatada se caracteriza por miocitos que degeneran con hipertrofia de leve a moderada, una ausencia de células inflamatorias y fibrosis intersticial.

[0072] Clínicamente, la miocardiopatía dilatada se presenta con insuficiencia cardíaca congestiva progresiva lenta, pero los pacientes pueden deslizarse precipitadamente de un estado funcional compensado a uno descompensado. Con frecuencia se requiere trasplante cardíaco. El 50 % de los pacientes muere en el espacio de 2 años, y el 75 % en el espacio de 5 años. La causa de la muerte típicamente es la insuficiencia cardíaca progresiva o arritmia, sin embargo, se puede producir la embolia causada por el desalojo de un trombo intracardiaco.

[0073] Los corazones caracterizados por miocardiopatía dilatada están agrandados, flácidos y pesan dos o tres veces más que los corazones normales. Todas las cámaras están dilatadas, con adelgazamiento de paredes, fibrosis, y típicamente trombos murales. En una minoría de miocardiopatías dilatadas se produce regurgitación mitral o tricuspídea por la dilatación de la cámara ventricular izquierda. Las células musculares cardíacas están hipertrofiadas con núcleos agrandados. Algunas de las causas de la miocardiopatía dilatada incluyen la miocarditis, alcoholismo u otras adicciones a toxinas, embarazo (miocardiopatía periparto), isquemia, enfermedad arterial coronaria, hipertensión e influencias genéticas.

[0074] La miocardiopatía dilatada idiopática (IDC), una enfermedad de etiología desconocida, se caracteriza por la dilatación de uno o ambos ventrículos, disfunción sistólica, y a menudo avance a la insuficiencia cardíaca congestiva. Hay que indicar que el término "IDC" lo usan algunos expertos en la materia de forma intercambiable con el término "miocardiopatía dilatada", sugiriendo que la IDC es de hecho una categoría amplia de miocardiopatías

dilatadas que no son el resultado de alcoholismo, agresión tóxica o miocarditis.

[0075] Microscópicamente la IDC se caracteriza por hipertrofia miocardiocítica, cardiomegalia y fibrosis intersticial y perivascular. A diferencia de la miocarditis, la necrosis y la infiltración celular típicamente no son destacadas en los
5 pacientes con IDC, una indicación de su etiología no inflamatoria. Está de acuerdo con la etiología el hecho de que fármacos antiinflamatorios, tales como la prednisona, son en gran media ineficaces en el tratamiento de la IDC.

[0076] Un objeto de esta invención es proporcionar antagonistas de TWEAK para usar en el tratamiento o prevención de la miocardiopatía dilatada asociada con la actividad de TWEAK, que es no inflamatoria. Debido a que
10 la causa de la miocardiopatía dilatada (p. ej., IDC) es desconocida en gran medida, no se han desarrollado terapias específicas. Los pacientes típicamente se tratan de la insuficiencia cardíaca usando intervenciones físicas, de la dieta y farmacológicas (p. ej., antagonistas de receptores beta-adrenérgicos, antagonista de calcio y anticoagulantes) para controlar los síntomas. Además, se usa el trasplante cardíaco cuando está disponible.

[0077] Los expertos en la materia no han podido identificar ningún marcador inmunológico, histoquímico, morfológico, ultraestructural o microbiológico que se pueda usar para diagnosticar la IDC. Sin embargo, los datos epidemiológicos sugieren que la predisposición a la IDC puede tener base genética. En el 20 % de los pacientes con IDC, un pariente de primer grado también presenta signos de IDC, sugiriendo la frecuente transmisión familiar. Los
15 expertos en la materia han reconocido la necesidad de determinar marcadores genéticos moleculares para la IDC en
20 pacientes con enfermedad cardíaca subclínica y clínica.

[0078] Hasta la fecha, la lista de genes asociados con la miocardiopatía dilatada incluyen troponina T cardíaca, d-sarcoglicano, cadena pesada de la b-miosina cardíaca, actina cardíaca, a-tropomiosina, lámina A/C, desmina, receptor de rianodina cardíaca, desmoplacina, placoglobina distrofina y tafazina. Todavía sigue siendo necesario
25 encontrar factores genéticos adicionales que contribuyen a la miocardiopatía dilatada y diseñar productos terapéuticos que se dirijan a ellos. La presente invención ha demostrado por primera vez una unión causal entre TWEAK y la miocardiopatía dilatada no inflamatoria. Por lo tanto, la descripción proporciona un procedimiento para identificar la miocardiopatía dilatada en un paciente, detectando cambios en la expresión de la proteína TWEAK, la función de la proteína TWEAK, la expresión del ARNm de TWEAK o una alteración cromosómica. Los
30 procedimientos y reactivos para detectar dichos marcadores moleculares de la enfermedad son bien conocidos en la materia, e implican análisis inmunológicos o inmunohistoquímicos, ensayos enzimáticos u otros ensayos de función de proteínas, y ensayos basados en hibridación estándar tales como las transferencias Northern, transferencias Southern, análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), y análisis de hibridación in situ por fluorescencia (FISH).

[0079] Debe indicarse que la miocardiopatía dilatada no inflamatoria se caracteriza por la hipertrofia cardíaca progresiva, dilatación y disfunción contráctil. En cambio, la enfermedad de Chagas es una forma rara de miocarditis, que es una enfermedad cardíaca inflamatoria que se desarrolla en seres humanos y animales experimentales después de infección crónica por tripanosoma cruzi. Los estudios de la enfermedad de Chaga, que es prevalente en
40 América del Sur y Central, han identificado anticuerpos dirigidos contra sí mismos en los sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas. Joshua Wynne y Eugene Braunwald, *Heart Disease, A Textbook of Cardiovascular Medicine*, Volumen 2, capítulo 41, pág. 1442-1444 (5ª ed. 1997). Los procedimientos descritos en el presente documento se dirigen al tratamiento de la miocardiopatía dilatada no inflamatoria más común asociada con la actividad de TWEAK.

[0080] Los procedimientos de tratamiento de una afección relacionada con TWEAK de acuerdo con la presente invención, usan antagonistas de TWEAK o composiciones que los comprenden. Los antagonistas de TWEAK útiles en el tratamiento de afecciones relacionadas con TWEAK de acuerdo con esta invención se describen en el presente documento y son conocidos en la materia. Dichos agentes incluyen los descritos, p. ej., en las
50 publicaciones internacionales PCT nº WO 98/05783, WO 98/35061, WO 99/19490, WO 00/42073 y WO 01/45730. Los antagonistas de TWEAK útiles en los procedimientos de la invención incluyen anticuerpos dirigidos contra TWEAK, tales como anticuerpos que son humanos, no humanos, humanizados o xenogénicos, como se describe en el presente documento, y son policlonales, monoclonales o sintéticos. Además, los anticuerpos pueden ser de longitud completa, fragmentos de los mismos, o proteínas de fusión que incluyen secuencias de reconocimiento de
55 antígeno.

[0081] Los antagonistas de TWEAK útiles en los procedimientos de la invención también incluyen anticuerpos dirigidos contra receptores de TWEAK. Aquí, el receptor de TWEAK es FN14. Los anticuerpos contra el receptor de TWEAK pueden ser humanos, no humanos, humanizados o xenogénicos, como se describe en el presente

documento, y son policlonales, monoclonales o sintéticos. Además, los anticuerpos pueden ser de longitud completa, fragmentos de los mismos, o proteínas de fusión que incluyen secuencias de reconocimiento de antígeno.

[0082] La inmunización de animales con antígenos TWEAK o receptor de TWEAK se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en la materia. Véase, p. ej., Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Los procedimientos para inmunizar animales no humanos, tales como ratones, ratas, ovejas, cabras, cerdos, ganado, caballos y similares, son bien conocidos en la materia. Véase, p. ej., Harlow y Lane y patente de Estados Unidos 5.994.619. En una realización preferida, el antígeno se administra con o sin un adyuvante para estimular la respuesta inmunitaria. Dichos adyuvantes incluyen, entre otros, adyuvante completo o incompleto de Freund, RIBI (dipéptidos de muramilo) o ISCOM (complejos inmunoestimuladores).

[0083] El antígeno elegido para la inmunización puede ser uno cualquiera de los siguientes: un polipéptido TWEAK; un fragmento de polipéptido TWEAK; una muteína TWEAK; un mimético de TWEAK; una proteína de fusión de TWEAK; un polipéptido receptor de TWEAK; un fragmento de receptor de TWEAK; una muteína de receptor de TWEAK; un mimético de receptor de TWEAK; una proteína de fusión de receptor de TWEAK; una célula que expresa un polipéptido de TWEAK, fragmento, muteína o proteína de fusión del mismo; o una célula que expresa un polipéptido receptor de TWEAK, fragmento, muteína o proteína de fusión del mismo. Las inmunoglobulinas producidas en los animales por inmunización se pueden recuperar de diferentes tejidos o fluidos de los animales, incluyendo suero, leche, ascitis, bazo, timo, células de la sangre periférica, hígado fetal, médula ósea, peritoneo y cualquier otro tejido o fluido que tenga concentraciones significativas de inmunoglobulina. Además, se pueden hacer y aislar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales secretados en el medio.

[0084] En realizaciones preferidas de esta invención, los anticuerpos son anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales o anticuerpos humanizados. En una realización más preferida, los anticuerpos humanizados comprenden regiones constante y/o armazón del anticuerpo humano. En otra realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos xenogénicos. En realizaciones más preferidas, los anticuerpos xenogénicos son anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales.

[0085] Los anticuerpos xenogénicos son anticuerpos completos de una especie, que son expresados en una especie completamente diferente. Por ejemplo, si un ratón expresa el ADN requerido para producir anticuerpos humanos completos, los anticuerpos resultantes son xenogénicos (es decir, anticuerpos humanos producidos en un ratón). La tecnología de inactivación dirigida (inactivación de genes) proporciona la oportunidad de alterar la expresión normal de genes de inmunoglobulina endógena. La tecnología de animales transgénicos proporciona la oportunidad de producir animales no humanos que producen proteínas de inmunoglobulina xenogénicas. Dichos animales xenogénicos se pueden emparejar con los animales con inmunoglobulina inactivada descritos anteriormente, dando como resultado animales que producen solo las inmunoglobulinas xenogénicas y no inmunoglobulinas endógenas.

[0086] La expresión de genes de inmunoglobulina xenogénica permite la producción de un repertorio muy diverso de anticuerpos humanos, incluyendo anticuerpos monoclonales. Esto se debe a que (1) los genes de inmunoglobulina endógena retienen sus elementos reguladores en cis y están sujetos a los sucesos de recombinación normales variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) del animal hospedante; (2) los genes de inmunoglobulina exógena son expresados de una forma similar a los locus de inmunoglobulina endógena; y (3) los anticuerpos resultantes aparentemente respaldan las respuestas de desarrollo linfocítico B y humores normales.

[0087] Los genes de inmunoglobulina exógena se pueden introducir en los animales como un locus de inmunoglobulina entero, una parte de un locus de inmunoglobulina, o como un "minilocus" en el que se imita un locus de Ig exógena más completo mediante la inclusión de unos cuantos de los genes individuales para ese locus de Ig. Además, se pueden diseñar animales transgénicos para expresar transgenes que codifican anticuerpos modificados tales como anticuerpos monocatenarios o anticuerpos quiméricos.

[0088] De acuerdo con esta invención, cualquier individuo, incluyendo seres humanos y animales, se puede tratar de una forma farmacéuticamente aceptable con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un antagonista de TWEAK o composiciones que comprenden dicho agente, durante un periodo de tiempo suficiente para tratar una afección relacionada con TWEAK en el individuo al que se administran a lo largo de algún periodo de tiempo. Alternativamente, los individuos pueden recibir una cantidad profilácticamente eficaz de un antagonista de TWEAK o composiciones que comprenden dicho agente, que es eficaz para prevenir una afección relacionada con TWEAK en un individuo al que se administran a lo largo de algún periodo de tiempo. Los antagonistas de TWEAK útiles en los procedimientos de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas por los procedimientos

descritos en el presente documento, y se pueden suministrar por una vía parenteral, inyección, transmucosa, oral, inhalación, ocular, rectal, implantación de acción prolongada, tópica, de liberación sostenida o mediante endoprótesis vascular recubierta. Los antagonistas de TWEAK pueden estar en una variedad de formas convencionales usadas para la administración. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas sólidas, semisólidas y líquidas, tales como disoluciones o suspensiones líquidas, suspensiones, geles, cremas, bálsamos, emulsiones, lociones, polvos, pulverizadores, espumas, pastas, pomadas, ungüentos y gotas.

[0089] Además, los antagonistas de TWEAK se pueden suministrar por una ruta de terapia génica. Brevemente, se suministran a un sujeto moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas usando cualquier de los vectores conocidos en la materia como adecuados para suministrar moléculas de ácido nucleico a los tejidos u órganos diana. Los vectores típicos incluyen liposomas, plásmidos y vectores víricos (p. ej., retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados).

[0090] El modo de administración y régimen de dosificación más eficaces de antagonistas de TWEAK, o composiciones que los comprenden, dependerá del efecto deseado, la terapia previa, si existe, el estado de salud del individuo, el estado de la propia afección, la respuesta a los antagonistas de TWEAK y el criterio del médico que hace el tratamiento. Los antagonistas de TWEAK, o composiciones que los comprenden, se pueden administrar en cualquier forma farmacéutica aceptable para preparaciones farmacéuticas o veterinarias, en una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

[0091] La cantidad de los antagonistas de TWEAK, o composiciones que los comprenden, que proporciona una dosificación única variará dependiendo del modo de administración particular, los antagonistas de TWEAK específicos, o composición, nivel de dosis y frecuencia de la dosis. Una preparación típica contendrá entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 99 %, preferiblemente entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 50 % (p/p) de antagonistas de TWEAK, o composiciones de los mismos.

[0092] Un intervalo de ejemplo, no limitante, para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un antagonista de TWEAK es entre aproximadamente 0,005-10,00 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre aproximadamente 0,05-1,00 mg/kg de peso corporal.

[0093] Los antagonistas de TWEAK, o composiciones que los comprenden, se pueden administrar solos, o como parte de una preparación farmacéutica o veterinaria, o como parte de una preparación profiláctica, con o sin adyuvante. Se pueden administrar por vía parenteral u oral. Por ejemplo, se pueden administrar por las vías oral, pulmonar, nasal, aural, anal, dérmica, ocular, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intraperitoneal, mucosa, sublingual, subcutánea, transdérmica, tópica o intracraneal, o en la cavidad oral. En las aplicaciones farmacéuticas o veterinarias, los antagonistas de TWEAK se pueden administrar por vía tópica a cualquier superficie epitelial. Dichas superficies incluyen superficies oral, ocular, aural, anal y nasal. Las composiciones farmacéuticas se pueden producir mediante procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

[0094] Las composiciones farmacéuticas para usar de acuerdo con la presente invención se pueden formular de una manera convencional, usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar en farmacia. La formulación adecuada dependerá de la vía de administración prevista.

[0095] Para la administración transmucosa, se usan penetrantes adecuados en la formulación para la filtración a través de la barrera. Dichos penetrantes se conocen en general en la materia. Para la administración ocular, se usan suspensiones en una disolución salina adecuada, como se conoce en la materia.

[0096] Para la administración oral, los antagonistas de TWEAK se pueden formular fácilmente combinando los agentes activos con vehículos farmacéuticamente aceptables convencionales. Los antagonistas de TWEAK se pueden formular como comprimidos, píldoras, liposomas, gránulos, esferas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente que se va a tratar.

[0097] Los antagonistas de TWEAK, o composiciones que los comprenden, también pueden comprender cualquier vehículo o adyuvante convencional usado en preparaciones farmacéuticas o veterinarias. Estos vehículos y adyuvantes incluyen, por ejemplo, adyuvante de Freund, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sustancias de tamponamiento, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos saturados vegetales, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de

protamina, hidrogenofosfato disódico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, magnesio, trisilicato, sustancias basadas en celulosa y polietilenglicol. Los adyuvantes para formas tópicas o base de geles pueden incluir, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, polímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de lanolina.

5

[0098] Las composiciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener como un excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después añadiendo agentes auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa
10 tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

15 **[0099]** Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar disoluciones concentradas de azúcar, que opcionalmente pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carboxipol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

20

[0100] Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener los principios activos mezclados con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones y/o lubricantes tales como talco o estearato magnésico y, opcionalmente,
25 estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las composiciones para la administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para dicha administración.

30 **[0101]** Para la administración bucal, las composiciones pueden tener forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

[0102] Para la administración por inhalación, los antagonistas de TWEAK se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, usando un
35 propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono, u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, p. ej., de gelatina, para usar en un inhalador o insuflador, se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

40

[0103] Los antagonistas de TWEAK se pueden formular para la administración parenteral por inyección, p. ej., por inyección de bolo, o infusión continua. Los agentes se pueden formular en disoluciones acuosas, suspensiones acuosas, suspensiones en aceite, o emulsiones, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma
45 farmacéutica unitaria, p. ej., en ampollas o en envase de múltiples dosis, con un conservante añadido.

[0104] Las formulaciones en disolución acuosa típicas incluyen tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hanks, disolución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Las suspensiones en aceite típicas pueden incluir disolventes o vehículos lipófilos que incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos
50 grasos sintéticos tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, las suspensiones también pueden contener estabilizantes adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas. Alternativamente, los antagonistas de TWEAK pueden estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo
55 adecuado, tal como agua estéril exenta de pirógenos, antes de usar.

[0105] Los antagonistas de TWEAK también se pueden formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[0106] Además de las formulaciones descritas, los antagonistas de TWEAK también se pueden formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, los compuestos se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados muy poco solubles, por ejemplo, como una sal muy poco soluble.

[0107] Un vehículo farmacéutico para los antagonistas de TWEAK que son hidrófobos, es un sistema de codisolvente que comprende alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible con el agua, y una fase acuosa. El sistema de codisolvente puede ser un sistema de codisolvente de VPD. VPD es una disolución de alcohol bencílico al 3% en p/v, el tensioactivo no polar polisorbato 80 al 8% en p/v y polietilenglicol 300 al 65% en p/v, con el volumen completado en etanol absoluto. El sistema de codisolvente de VPD (VPD:5W) consiste en el VPD diluido 1:1 con dextrosa al 5% en disolución acosa. El sistema de codisolvente disuelve bien compuestos hidrófobos, y él mismo produce toxicidad baja tras la administración sistémica. Naturalmente, las proporciones de un sistema de codisolvente se pueden variar considerablemente sin destruir sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes del codisolvente puede variar: por ejemplo, se pueden usar otros tensioactivos no polares de baja toxicidad en lugar del polisorbato 80; el tamaño de la fracción del polietilenglicol puede variar; otros polímeros biocompatibles pueden sustituir al polietilenglicol, p. ej. polivinilpirrolidona; y la dextrosa se puede sustituir por otros azúcares o polisacáridos.

[0108] Alternativamente, se pueden usar otros sistemas de suministro para compuestos farmacéuticos hidrófobos. Los liposomas y las emulsiones son ejemplos de vehículos de suministro para fármacos hidrófobos. También se pueden usar algunos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, aunque pueden presentar una mayor toxicidad.

[0109] Además, los antagonistas de TWEAK se pueden suministrar usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente terapéutico. Están disponibles diferentes materiales de liberación sostenida y son bien conocidos para los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida, dependiendo de su naturaleza química, pueden liberar los compuestos durante algunas semanas hasta a lo largo de 100 días.

[0110] Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica del antagonista de TWEAK, se pueden usar estrategias adicionales para la estabilización de proteínas.

[0111] Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero sin limitar, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diferentes azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina, y polímeros tales como polietilenglicoles.

[0112] Los antagonistas de TWEAK se pueden proporcionar en forma de sales con contraiones farmacéuticamente compatibles. Las sales farmacéuticamente compatibles se pueden formar con muchos ácidos, incluyendo pero sin limitar a clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros próticos que son las correspondientes formas de base libre.

[0113] Los antagonistas de TWEAK también se pueden formular en composiciones farmacéuticas útiles para el recubrimiento de endoprótesis vasculares, para el tratamiento de afecciones cardíacas relacionadas con TWEAK.

[0114] La presente descripción también se refiere a un procedimiento para identificar un antagonista de TWEAK. Dichos antagonistas de TWEAK son útiles para el tratamiento de afecciones relacionadas con TWEAK, es decir, enfermedades cardíacas (p. ej., miocardiopatías).

[0115] Un ejemplo de un procedimiento para identificar un antagonista de TWEAK comprende las etapas de: 1) exponer un animal de ensayo transgénico no humano que expresa un ADN exógeno que codifica un polipéptido TWEAK, o un fragmento, análogo, muteína o mimético del mismo, a un compuesto que es un candidato de antagonista de TWEAK; 2) comparar el tejido fibrótico, cardíaco, renal, hepático, pulmonar, de piel, músculo esquelético, lípido, tracto gastrointestinal, páncreas, órganos reproductores, neural, cartílago, hueso o conjuntivo del animal de ensayo transgénico con el mismo órgano o tejido de un animal de referencia que expresa el ADN exógeno pero no se ha expuesto al compuesto; y 3) determinar si el compuesto ha afectado al tejido fibrótico, cardíaco, renal, hepático, pulmonar, de piel, músculo esquelético, lípido, tracto gastrointestinal, páncreas, órganos reproductores, neural, cartílago, hueso o conjuntivo. En otra realización, el animal de ensayo transgénico es un mamífero no

humano o un no mamífero, como se describe en el presente documento.

[0116] Los animales transgénicos no humanos descritos en el presente documento expresan ADN exógenos que codifican polipéptidos TWEAK, en los que la expresión produce una afección relacionada con TWEAK. En los ejemplos, se generaron ratones transgénicos que expresan proteínas TWEAK exógenas en una forma soluble truncada o en una forma de longitud completa, unida a membrana. Los ratones que expresan proteínas TWEAK exógenas presentaron fenotipos que incluyen miocardiopatía dilatada no inflamatoria, insuficiencia cardíaca congestiva, hiperplasia de células epiteliales hepáticas, vacuolización de hepatocitos, daño hepático y afecciones inflamatorias renales, tales como inflamación multifocal, afecciones renales no inflamatorias, tales como nefropatía tubular, quistes, nefropatía glomerular, hiperplasia tubular renal, fibrosis renal y afecciones inflamatorias del pulmón. Además, los ratones no manipulados genéticamente que se infectaron con vectores víricos que expresaban proteínas TWEAK exógenas mostraron hiperplasia ductal, muerte de hepatocitos, fibrosis hepática y también daño hepático.

[0117] Teniendo estos animales en cuestión, los expertos en la materia tienen un procedimiento poderoso para el descubrimiento de fármacos. Específicamente, los animales que expresan proteínas TWEAK exógenas representan un sistema modelo para poner en práctica un procedimiento para el descubrimiento de antagonistas de TWEAK útiles para la prevención o tratamiento de las afecciones relacionadas con TWEAK descritas en el presente documento.

[0118] En realizaciones preferidas, los animales útiles en estos sistemas modelo son mamíferos no humanos o no mamíferos. En realizaciones más preferidas los animales mamíferos son ratones, ratas, hámsteres, conejos, perros, gatos, vacas, cerdos, cabras, caballos, ovejas, cobayas y primates. En otras realizaciones más preferidas, los animales no mamíferos son aves, peces, anfibios, insectos e invertebrados.

[0119] El ADN exógeno que codifica el polipéptido TWEAK se expresa en animales transgénicos no humanos mediante secuencias de control de la expresión que controlan la expresión del ADN exógeno en el animal. Las secuencias de control de la expresión que controlan la transcripción incluyen, p. ej., promotores, potenciadores, sitios de terminación de la transcripción, regiones de control de locus, señales de procesividad de la ARN polimerasa y elementos de remodelado de cromatina. Las secuencias de control de la expresión que controlan los sucesos postranscripcionales incluyen empalme de sitios de donante y aceptor y secuencias que modifican la semivida del ARN transcrito, p. ej., secuencias que dirigen la adición de poli(A) o sitios de unión para proteínas que se unen al ARN. Las secuencias de control de la expresión que controlan la traducción incluyen sitios de unión al ribosoma, secuencias que dirigen la expresión dirigida del polipéptido a o dentro de compartimentos celulares particulares, y secuencias en las regiones 5' y 3' no traducidas que modifican la velocidad o eficacia de la traducción.

[0120] Las secuencias de control de la expresión preferidas para la expresión de TWEAK en animales transgénicos no humanos incluyen elementos víricos que dirigen niveles altos de expresión de proteína, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovírico, citomegalovirus (CMV) (tal como promotor/potenciador de CMV). Virus del simio 40 (tal como promotor/potenciador de SV40), adenovirus (p. ej., promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP)), polio y promotores fuertes de mamífero tales como inmunoglobulina natural y promotores de actina. El ADN que codifica un polipéptido TWEAK puede estar dirigido por el promotor alfa 1-antitripsina (AAT). Para más descripciones de elementos de control de la expresión víricos y secuencias de los mismos, véase, p. ej., las patentes de Estados Unidos 5.168.062; 4.510.245; y 4.968.615.

[0121] El ADN exógeno también se puede expresar en animales transgénicos no humanos a partir de elementos de control de la expresión específicos de tejidos, incluyendo promotores. Los elementos de control de la expresión específicos de tejidos son conocidos en la materia. Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejidos adecuados incluyen el promotor de albúmina específica del hígado (Pinkert y col., *Genes Dev.* 1: 268-277 (1987)), promotores linfoides específicos (p. ej., Calame y Eaton, *Adv. Immunol.* 43:235-275(1988); Winoto y Baltimore, *EMBO J.* 8:729-733 (1989); Banerji y col., *Cell* 33:729-740 (1983); y Queen y Baltimore, *Cell* 33:741-748. (1983)), promotores específicos de neuronas (p. ej., Byrne y Ruddle *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477(1989)), promotores específicos del páncreas (p. ej., Edlund y col., *Science* 230:912-916 (1985)), promotores específicos de glándula mamaria (p. ej., patente de Estados Unidos 4.873.316 y solicitud de patente europea 264.166), y promotores regulados en el desarrollo (p. ej., Kessel y Gruss, *Science* 249:374-379 (1990); Campes y Tilghman, *Genes Dev.* 3:537-546 (1989)). Otros ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejidos incluyen el promotor de tejido cardíaco, promotor de la cadena pesada de alfa miosina (α MHC), el promotor de tejido de piel queratina-14 (K14), el promotor de tejido pulmonar proteína tensioactiva C (SPC), y los promotores de tejido renal Ksp-cadherina y proteína regulada por andrógeno renal (KAP). El ADN exógeno también se puede expresar a partir

de un promotor eucariota inducible, tal como el promotor metalotionina (MT), u otros promotores eucariotas inducibles conocidos en la materia.

[0122] El polipéptido TWEAK expresado en animales transgénicos no humanos puede ser un polipéptido TWEAK de longitud completa. En otro caso, los polipéptidos expresados en animales transgénicos son fragmentos del polipéptido TWEAK. En un caso preferido, los fragmentos del polipéptido TWEAK son polipéptidos TWEAK solubles.

[0123] En otro caso, la descripción se refiere a animales transgénicos no humanos que expresan un ADN exógeno que codifica un polipéptido TWEAK en un tejido seleccionado del grupo que consiste en: tejido de corazón; sangre; vasos; pulmones; hígado; riñón; cerebro; placenta; músculo esquelético; páncreas; bazo; ganglios linfáticos; timo; apéndice; linfocitos de sangre periférica; tracto gastrointestinal; neuronas; piel; adipocitos; cartílago; hueso; conjuntivo. El ADN de TWEAK se puede expresar a partir de un promotor constitutivo. En otro caso, el ADN se expresa a partir de un promotor inducible. En otro caso, el ADN se expresa a partir de un promotor específico de tejido.

EJEMPLOS

[0124] Con el fin de que esta invención se pueda entender mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen el propósito de ilustrar solo, y no deben considerarse limitantes del alcance de la invención de ninguna forma.

EJEMPLO 1

Generación de ratones transgénicos TWEAK

[0125] Con el fin de identificar el o los órganos diana para la actividad de TWEAK y las consecuencias biológicas de la señalización de TWEAK in vivo, se crearon dos construcciones de expresión de TWEAK murinas y se usaron para la expresión en exceso de péptidos TWEAK en ratones normales (C57B1/6 x DBA/2)F1 y (C57B1/6 x SJL/J)F2 usando técnicas transgénicas estándar. R. S. Williams and y.D. Wagner, *J. Applied Physiology* 88:1119-1126 (2000). Las construcciones de expresión de TWEAK se usaron como sigue: (1) Se insertó un ADNc de TWEAK de los aminoácidos 101-249 de la SEQ ID NO: 1, que codifica una forma soluble de TWEAK murino (denominada sTWEAK) en la dirección 3' de una secuencia señal de IgG murina, en el vector de expresión CH269 (un derivado del vector PCDEP4 (Invitrogen) que contiene la secuencia de adición poli A de SV40) en la dirección 3' del promotor de alfa 1-antitripsina (AAT) humana y un intrón de beta-globina y en la dirección 5' de la secuencia poli A de la hormona del crecimiento humana (hGH); y (2) Se insertó un ADNc que codifica la forma de transmembrana de longitud completa de la proteína (denominada FL-TWEAK) que corresponde a los aminoácidos 1-249 de la SEQ ID NO: 1 en el vector de expresión pBlueScript (como se describe en Desplat-Jego y col., *J. Neuroimmunology* 133:116-123 (2002)) que contiene el sitio de adición de poli A de SV40. Después, la secuencia FL-TWEAK más el sitio de adición poli A se aislaron y se clonaron en otro vector; después se insertó un fragmento que contenía la región reguladora del potenciador de ApoE-promotor de AAT humana en la dirección 5' para crear el vector de expresión CA300. El promotor de AAT se ha mostrado que dirige la transcripción principalmente en el hígado y con niveles menores en otros tejidos incluyendo el riñón. P. Koopman y col., *Genes Dev.* 3:16-25 (1989).

[0126] Para la construcción transgénica de sTWEAK, se identificaron 23 fundadores transgénicos independientes por la PCR de cola de ADN usando sondas que corresponden a la secuencia de nucleótidos 468 a 488 (cebador 5') y la secuencia de la cadena complementaria para los nucleótidos 693 a 713 (cebador 3') de la SEQ ID NO: 2. Además un ELISA del suero para TWEAK puso de manifiesto que 10 de estos 23 animales fundadores tenían niveles detectables de TWEAK en su suero, en el intervalo de 0,06-3,0 µg/ml. Los 13 fundadores restantes no tenían TWEAK detectable en el suero, es decir, < 10 ng/ml. Nueve de los 10 fundadores PCR+, TWEAK+ en suero empezaron a presentar mala salud aproximadamente a los 4-5 meses de edad. Se observaron pérdida de peso, postura encorvada, pelaje descuidado y ojos saltones. Cinco de estos fundadores murieron inesperadamente y por lo tanto los 4 restantes que mostraban signos de enfermedad se sacrificaron con signos de mala salud. En cambio, solo 1 de los 13 fundadores PCR+ negativos en suero presentaron mala salud o murieron. Además, 0 de 4 crías de la misma camada PCR negativas presentaron mala salud/murieron.

[0127] Para la construcción del transgén FL-TWEAK, se identificaron 2 fundadores transgénicos independientes por PCR de cola de ADN y análisis de transferencia Northern para la expresión del ARNm de TWEAK en el tejido hepático. Además, un ELISA del suero para TWEAK puso de manifiesto que ninguno de estos 2 animales fundadores tenía niveles detectables de TWEAK en su suero, es decir, menos de 10 ng/ml. El ratón fundador Tg FL-

TWEAK no presentaba un fenotipo clínicamente observable.

EJEMPLO 2

- 5 Exceso de expresión de TWEAK en ratones infectados con un vector adenovírico que suministra ADN exógeno que codifica sTWEAK

10 **[0128]** Con el fin de identificar los efectos biológicos del exceso de expresión de TWEAK in vivo, ratones C57BL/6 adultos hembra de 8-10 semanas de edad se infectaron con un vector adenovírico defectuoso para la replicación con un promotor de citomegalovirus (CMV) que dirige el ADNc para sTWEAK murino ("Adeno-TWEAK") o proteína verde fluorescente de medusa ("GFP") usando técnicas de adenovirus estándar descritas en Tao y col., *Molecular Therapy* 3:28-35 (2001). Se usó un vector adenovírico que comprendía GFP ("Adeno-GFP") como control negativo. Para determinar si los ratones se habían infectado con éxito con la construcción Adeno-TWEAK, se determinaron los niveles de proteína TWEAK en el suero y se controlaron en diferentes tiempos de medición usando ensayos ELISA estándar.

20 **[0129]** El exceso de expresión sistemático de sTWEAK murino en los ratones adultos inducía cambios tisulares en al menos 3 órganos principales: hígado, riñón y corazón. Véase la tabla 1. Los fenotipos de estos ratones que expresan la construcción adenovírica se compararon con los fenotipos de ratones Tg TWEAK del ejemplo 1 en la tabla 1. Estas observaciones se discuten con más detalle en los siguientes ejemplos más adelante.

Tabla 1: El exceso de expresión de TWEAK induce remodelado tisular en ratones adultos

ÓRGANO	FENOTIPO	TWEAK Tg	Adeno-TWEAK en ratones adultos	Adeno-GFP en ratones adultos
Hígado	Hiperplasia ductal biliar	+	+	-
	Muerte de hepatocitos	-	+	-
Riñón	Hiperplasia tubular	+	+	-
Corazón	Miocardiopatía dilatada	+	+	-

EJEMPLO 3

sTWEAK y FL-TWEAK inducen miocardiopatía dilatada

30 **[0130]** Cuatro de los fundadores PCR+ sTWEAK+ en suero que sobrevivieron del ejemplo 1, se sacrificaron y se examinaron las anomalías morfológicas macroscópicas. Véase la tabla 2. La observación macroscópica en el momento de la necropsia puso de manifiesto corazones agrandados, algunos con un tamaño 2-3 veces mayor comparado con los de los animales normales. Puesto que el fenotipo de corazón agrandado se observaba en múltiples fundadores transgénicos sTWEAK independientes, es muy improbable que se deba a sucesos de inserción independientes. Además, un análisis de la química del suero de los ratones transgénicos sTWEAK mostró creatina 35 quinasa cardíaca específica elevada.

Tabla 2: Ratones transgénicos sTWEAK

FUNDADORES	TWEAK EN SUERO	FENOTIPO
10 PCR+	0,06-3,0 µg/ml	9/10 murieron a los 4-5 meses 4/5 enviados a examen histopatológico tenían corazón agrandado
13 PCR+	< 10 ng/ml	1/13 murió a los 6 meses con corazón agrandado
4 PCR-	-	0/4 murieron a los 6 meses

40 **[0131]** El fenotipo de corazón agrandado también se observó en ratones individuales de una línea transgénica FL-TWEAK que se había establecido mediante retrocruzamiento sucesivo en la cepa C57BL/6. Véase la tabla 3. Las crías de la misma camada transgénicas negativas FL-TWEAK no mostraron anomalías cardíacas.

Tabla 3: Ratones transgénicos FL-TWEAK

45

INDIVIDUOS	TWEAK EN SUERO	FENOTIPO
7 PCR+	-	7/7 mostraron corazones agrandados a los 5 meses
4 PCR-	< 10 ng/ml	0/4 murieron a los 5 meses

[0132] Considerados juntos, estos datos indican firmemente que el fenotipo de corazón agrandado es dependiente de TWEAK.

5

[0133] Los análisis histopatológicos de los corazones de los ratones transgénicos sTWEAK y transgénicos FL-TWEAK mostraron descubrimientos similares. La microscopía de baja potencia de un corazón transgénico ("Tg") FL-TWEAK comparado con un corazón normal de una cría de la misma camada transgénica negativa ("NTg") se muestra en la figura 1. El corazón transgénico FL-TWEAK mostrado también es representativo de corazones transgénicos TWEAK de ratones transgénicos sTWEAK (PCR+, TWEAK+ en suero). Los corazones transgénicos presentaban miocardiopatía dilatada caracterizada por la dilatación de los ventrículos y aurículas. De acuerdo con este defecto, se observó trombosis auricular y ventricular en muchos de los animales (figura 1). El análisis del tejido de pulmón e hígado puso de manifiesto congestión de los vasos sanguíneos en algunos animales.

[0134] La microscopía de mayor potencia puso de manifiesto otros descubrimientos histopatológicos en el corazón, incluyendo hipertrofia miocardiocítica y cardiomegalia. Es de destacar que el análisis histopatológico de los ventrículos en ratones transgénicos TWEAK no mostró signos de inflamación. Por lo tanto, la miocardiopatía relacionada con TWEAK observada es de naturaleza no inflamatoria.

[0135] El análisis químico del suero en las extracciones de sangre terminales de los ratones transgénicos TWEAK (3 fundadores y 1 ratón de la progenie) mostraron de forma anómala altos niveles de creatina quinasa (CK) específicamente en el corazón (es decir, el tipo MB de CK), confirmando un nivel significativo de estrés/daño cardíaco.

[0136] Ratones C57BL/6 hembra de 8-10 semanas de edad infectados con adeno-TWEAK (véase el ejemplo 2) mostraron miocardiopatía dilatada que era evidente 3 semanas después de infección comparado con ratones infectados con el virus adeno-GFP de control negativo. En los ratones infectados con TWEAK, los corazones se caracterizaron por cámaras dilatadas, como muestra la histopatología (figura 2).

[0137] Considerados juntos, TWEAK mostró una función crítica en las miocardiopatías, incluyendo la miocardiopatía dilatada y la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF).

EJEMPLO 4

TWEAK produce hiperplasia de células epiteliales hepáticas, vacuolización de hepatocitos, muerte hepatocelular, hiperplasia ductal biliar, fibrosis hepática y daño hepático

[0138] Se puso de manifiesto una función de TWEAK en la hiperplasia epitelial hepática y vacuolización de hepatocitos en ratones transgénicos sTWEAK y FL-TWEAK, así como daño en ratones no manipulados genéticamente infectados con un adenovirus que alberga un ADN que expresa un polipéptido sTWEAK.

[0139] Los hígados de los ratones Tg TWEAK del ejemplo 1 mostraron sustancial hiperplasia ductal biliar y de células ovals a las 2 semanas de edad comparados con los ratones NTg. Véase la figura 3. Como se muestra en la tabla 4, incluso con niveles de TWEAK en el suero <10 ng/ml, los hígados de dos fundadores de ratones transgénicos FL-TWEAK mostraron hiperplasia ductal biliar y de células ovals leve. Los retrocruzamientos de ratones transgénicos FL-TWEAK con C57BL/6 parental pusieron de manifiesto hiperplasia ductal biliar y de células ovals sustancial (Tabla 4).

Tabla 4: Ratones transgénicos FL-TWEAK

50

RATONES	TWEAK EN SUERO	FENOTIPO
2 Fundadores	< 10 ng/ml	hiperplasia ductal biliar y de células ovals leve
1 Fundador retrocruzado con C57BL/6	-	hiperplasia ductal biliar y de células ovals importante

[0140] De forma similar, los fundadores transgénicos sTWEAK que tienen niveles en el suero de TWEAK entre 0,2

y 3,0 µg/ml mostraron hiperplasia ductal biliar y de células ovals considerable (tabla 5).

Tabla 5: Ratones transgénicos sTWEAK

RATONES	TWEAK EN SUERO	FENOTIPO
9 Fundadores	0,2-3,0 µg/ml	hiperplasia ductal biliar y de células ovals importante e hiperplasia de células ovals
1 Fundador	0,06 µg/ml	hiperplasia ductal biliar y de células ovals leve

5

[0141] Esta hiperplasia ductal biliar y de células ovals se confirmó mediante tinción inmunohistoquímica (IHC) de cortes de hígado FL-TWEAK Tg tomados de ratones Tg del ejemplo 1 con el mAb A6, que distingue células epiteliales biliares y células ovals de hepatocitos (Engelhardt y col., *Differentiation* 45:29-37 (1990)). La figura 4 muestra un aumento de las células A6 positivas que están asociadas con regiones portales así como la extensión al parénquima hepático en ratones Tg FL-TWEAK comparado con NTg. Un mayor aumento de un corte teñido con hematoxilina y eosina de un ratón Tg FL-TWEAK también muestra claramente un notable aumento en la presencia de células ovals adyacentes a las vías biliares en la región portal (figura 5). La inmunohistoquímica para el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) confirmó un aumento de la frecuencia de las células biliares y ovals proliferantes en ratones Tg TWEAK comparados con ratones NTg, tan pronto como a las 2 semanas de edad. En

10

15

20

25

30

35

40

[0142] Ratones C57BL/6 y BALB/c SCID de 8-10 semanas de edad que expresaban en exceso sTWEAK usando el virus Adeno-TWEAK como en el ejemplo 2, mostraron niveles de TWEAK sustanciales en el suero. Véase la figura 7, que presenta el efecto de suministrar diferentes dosis de adenovirus en los niveles medidos de TWEAK en el suero. Los ratones se infectaron con 10^{11} partículas de adenovirus por ratón por vía intravenosa (representado por la línea "B"), 10^{10} partículas de adenovirus por ratón por vía intravenosa (representado por la línea "J"), o 10^{11} partículas de adenovirus por ratón por vía intramuscular (representado por la línea "H"). Los ratones infectados con adeno-sTWEAK mostraron daño hepático, con ictericia en suero observado los días 3 y 7 en los ratones C57BL/6 parentales y los días 3 y 4 en los ratones BALB/c SCID parentales. Algunos de los ratones BALB/c SCID murieron el día 4.

[0143] Además, los ratones C57BL/6 infectados con adeno-sTWEAK como se describe en el ejemplo 2, también desarrollaron muerte hepatocelular que aparecía tan pronto como a los 2-3 días después de administración, demostrado por el alto nivel de los marcadores enzimáticos hepáticos aspartato aminotransferasa ("AST") y alanina aminotransferasa ("ALT") en hígados infectados con TWEAK (adeno-sTWEAK) comparado con hígados infectados con GFP de control (adeno-GFP) el día 3 (véase la tabla 6 y la figura 8). El día 7 después de infección, aumentaron ambas enzimas hepáticas en los ratones tratados con adeno-GFP, como se esperaba debido a la inflamación inducida por el vector adenovírico solo. La muerte de hepatocitos también aparecía en los hígados infectados con TWEAK, como se muestra por la morfología histológica caracterizada por hepatocitos redondeados y "cuerpos de Councilman" intensamente eosinofílicos, picnóticos, encogidos que contienen núcleos fragmentados (figura 8). Los ratones tratados con adeno-sTWEAK desarrollaron además una respuesta hiperplásica ductal fuerte, que tenía el máximo el día 7 después de infección y todavía era evidente el día 11 (figura 8). En los hígados infectados con TWEAK, se observaron estructuras hiperplásicas que expresaban el marcador A6 específico para células epiteliales biliares y ovals, identificadas por microscopio de campo brillante.

Tabla 6: Valores de enzimas hepáticas en animales Ad-TWEAK y Ad-GFP

45

DÍA	Adeno-GFP		Adeno- sTWEAK	
	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

[0144] Fn14, que se mostró que era un receptor de TWEAK celular, fue inducido después de exposición a toxinas hepáticas, tales como galactosamina (Ga1N) y tetracloruro de carbono (CCl₄). La figura 9 muestra que Fn14 no es

detectable en el hígado de ratón adulto normal, medido por hibridación in situ (ISH) usando una sonda radiomarcada para Fn14 y microscopio de campo oscuro. Sin embargo, Fn14 es altamente inducido después de daño con CCl₄. Se obtuvieron resultados similares después de daño con GalN (no se muestra):

- 5 **[0145]** Los ratones C57BL/6 infectados con adeno-TWEAK como se describe en el ejemplo 2, también pusieron de manifiesto la regulación por aumento de Fn14 en los hepatocitos y algunas estructuras hiperplásicas, como se observó en los hígados adeno-STWEAK comparado con los hígados de control adeno-GFP (no se muestran los datos).
- 10 **[0146]** La función de Fn14 se demostró además en un modelo de vías biliares en el que se indujo daño hepático en ratones C57BL/6 de 10 semanas de edad por ligamiento de las vías biliares como describen Liu y col., *Hepatology* 28:1260-1268 (1999); Olynyc y col., *Am. J. Pathol.* 152:347-352 (1998). La vía biliar común se ligó el día 0 mediante cirugía y después 5 ratones C57BL/6 de 10 semanas de edad se sacrificaron el día 4 y día 8 después de cirugía. Después, se prepararon cortes del hígado en parafina y se determinaron las expresiones de TWEAK y Fn14 por hibridación in situ usando una sonda de sentido contrario de TWEAK y FN14 murino radiomarcada que abarcaba el gen de FN14 completo. Como se muestra en la figura 10, el día 4, Fn14 era fuertemente expresado en células epiteliales biliares en vías biliares pero no en hepatocitos. El día 8, la expresión de Fn14 en células epiteliales biliares disminuyó significativamente pero todavía era detectable en niveles bajos en algunos ratones (no se muestran los datos). Sin embargo, la expresión de TWEAK no cambió y no era detectable en este modelo de ligamiento de vías biliares. Estos resultados muestran que la expresión de Fn14 es regulada por aumento en células epiteliales biliares en respuesta a determinados daños hepáticos, y, por lo tanto, tiene una función importante en la fibrosis hepática.
- 25 **[0147]** Consideradas juntas, estas observaciones muestran que TWEAK es un factor importante en la hiperplasia de células epiteliales hepáticas, vacuolización de hepatocitos, daño hepático, muerte hepatocelular, hiperplasia ductal biliar y fibrosis hepática.

EJEMPLO 5

- 30 FL-TWEAK y STWEAK causan enfermedad renal

- [0148]** Los ratones transgénicos FL-TWEAK del ejemplo 1, mostraron enfermedad renal notable, incluyendo inflamación multifocal leve, nefropatía tubular, quistes, nefropatía glomerular, basofilia tubular, dilatación tubular, vacuolización tubular y cilindros hialinos.
- 35 **[0149]** Ratones C57BL/6 infectados con adeno-TWEAK de 10 semanas de edad, como se describen en el ejemplo 2, pusieron de manifiesto nefropatía glomerular e hiperplasia tubular cuando se compararon con ratones infectados con adeno-GFP de control negativo. También se mostró una función de TWEAK en el síndrome de Alport por una mayor expresión de Fn14 en un modelo de ratón de la enfermedad de Alport. Además, se demostró una función de TWEAK en la fibrosis renal en el modelo murino de fibrosis renal inducida por obstrucción uretral unilateral por tratamiento con un antagonista de TWEAK.
- 40 **[0150]** La expansión del intersticio cortical típicamente se debe a edema o infiltración con células inflamatorias agudas o crónicas y tejido fibroso. Ratones transgénicos FL-TWEAK del ejemplo 1, mostraron nefropatía tubular e inflamación intersticial multifocal leve. Más específicamente, cortes transversales de riñón que comparaban un ratón no transgénico con ratones transgénicos FL-TWEAK mostraron basofilia tubular pronunciada a las 8 semanas de edad (figura 11, panel central).
- 45 **[0151]** La nefropatía glomerular se puede caracterizar por una infiltración de leucocitos, tanto neutrófilos como monocitos, y proliferación de células endoteliales, epiteliales y mesangiales. Los ratones transgénicos FL-TWEAK, como se describen en el ejemplo 1, mostraron nefropatía glomerular notable puesta de manifiesto por hiperplasia de las células mesangiales e hipertrofia del epitelio capsular y engrosamiento capsular leve con basofilia del epitelio tubular adyacente (figura 12). También los ratones transgénicos FL-TWEAK mostraron dilatación del espacio urinario que conducía a la formación de quistes glomerulares con fibrosis periglomerular leve (figura 11, panel derecho inferior), comparado con la morfología glomerular murina normal (figura 11, panel derecho superior).
- 50 **[0152]** La basofilia tubular observada en ratones Tg FL-TWEAK es indicativa del ARN aumentado en el citoplasma de estas células tubulares, es decir, actividad transcripcional, y sugería que estas eran células proliferantes. La tinción del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) confirmó que había un subconjunto de células
- 55

proliferantes en los riñones de ratones Tg TWEAK como se describe en el ejemplo 1, y que este corresponde a los túbulos basófilos (figura 13). Con el fin de determinar si los túbulos basófilos eran túbulos proximales o distales, se tiñeron tres cortes tisulares seriados de ratones Tg TWEAK (1) con hematoxilina y eosina (HyE) para localizar los túbulos basófilos, (2) con una lectina específica para túbulos proximales (lectina de T. Purpureas), y (3) con una lectina específica de túbulos distales. La figura 14 muestra que los túbulos basófilos (proliferantes) en ratones Tg TWEAK como se describen en el ejemplo 1, no expresan el marcador epitelial tubular proximal o distal.

[0153] La presencia de túbulos proliferantes que carecen de al menos algunos marcadores epiteliales en ratones Tg TWEAK está de acuerdo con un modelo para casos de daño renal donde células derivadas del segmento S3 del túbulo proximal presentan las propiedades de células progenitoras, es decir, empiezan a proliferar y expresar marcadores celulares mesenquimatosos indicativos de desdiferenciación. La posterior diferenciación de estas células puede tener una función en la reparación tisular a través de la regeneración de nuevos túbulos (Witzgall y col., *J. Clin. Invest.* 93:2175-2188 (1994)). Alternativamente, puede haber proliferación y diferenciación de una población progenitora preexistente que reside en la región S3.

[0154] La presencia de células proliferantes que carecen de algunos marcadores epiteliales en ratones Tg TWEAK también está de acuerdo con un modelo para el desarrollo renal, en el que los túbulos epiteliales se forman a partir de progenitores mesenquimatosos que sufren diferenciación, adquiriendo así marcadores epiteliales y propiedades características de los túbulos.

[0155] Igualmente, la infección de ratones C57BL/6 de 10 semanas de edad con virus adeno-sTWEAK, como se describe en el ejemplo 2, inducía nefropatía glomerular y basofilia del epitelio tubular así como engrosamiento ocasional e hiperplasia de la cápsula glomerular el día 11 después de infección (figura 15). Esto contrastaba con la histología normal observada en los ratones infectados con adeno-GFP de control negativo. Además, la basofilia, que es indicativa de proliferación celular epitelial, era evidente el día 3 pero tenía el máximo alrededor de 1 semana después de administración.

[0156] De acuerdo con una función de TWEAK en la enfermedad renal, se mostró que el ARNm de TWEAK era expresado ampliamente en el riñón de ratón C57BL/6 adulto (figura 16), y se mostró que el ARNm de Fn14 era expresado en los túbulos proximales de la corteza interna/médula externa (figura 17), como se muestra por hibridación in situ (ISH) usando sondas de sentido contrario de TWEAK y de Fn14 radiomarcadas, y revelado por microscopio de campo oscuro. También se mostró que el ARNm de Fn14 era inducido en los riñones de modelos de ratón para el síndrome Alport. Esto se muestra en la figura 18 como el número de veces de aumento del ARNm de Fn14 en dos ratones Alport individuales con respecto a animales no manipulados genéticamente, al avanzar la enfermedad en ratones Alport de 4 a 7 semanas de edad.

[0157] La función de TWEAK en un modelo murino de enfermedad de Alport se ensayó directamente por tratamiento con un antagonista de TWEAK, una proteína de fusión de Fn14-Fc murina. Se prepararon dos grupos de 5 ratones con genes inactivados (KO) para Alport de acuerdo con Cosgrove y col., *Genes Dev.* 10(23):2981-2992 (1996), se trataron con IgG2a de control (muP1.17), o proteína de fusión muFN14-Fc (preparada por Biogen (Cambridge)). La IgG2a de control usada es la proteína de mieloma murina P1.17 producida a partir de un hibridoma y purificada por procedimiento de purificación con mAb estándar. La muFN14-Fc es una proteína de fusión del dominio extracelular de Fn14 murino y la región Fc de la IgG2a murina. La proteína de fusión se produjo en células embrionarias de riñón humano 293 o en células de ovario de hámster chino (CHO), y se purificó por procedimientos de purificación con mAb estándar. El primer tratamiento era a la edad de 3 semanas con una dosis de 100 µg de proteína por una vía intraperitoneal (IP). Los tratamientos continuaron durante las siguientes 4 semanas, con la misma dosis administrada dos veces por semana. Los ratones se sacrificaron al final de la 7ª semana (7 semanas de edad). Los riñones se recogieron y se insertaron en parafina y se congelaron. La extensión de la fibrosis e inflamación renal se puntuó por la morfología glomerular a partir de la tinción con HyE de cortes de parafina, miofibroblastos activados con tinción de la actina del músculo liso, y monocitos activados por tinción de CD11b de cortes congelados. Los cortes teñidos de actina del músculo liso y CD11b se usaron para cuantificar las áreas teñidas positivamente para evaluar la extensión de la fibrosis e inflamación, respectivamente, mediante el programa de ordenador MetMorph. Los resultados del análisis muestran que la salud de los glomérulos en los ratones tratados con FN14-Fc mejoró mucho (59% de glomérulos con patología en los tratados con Ig de control comparado con solo 39% con patología en los tratados con Fn14-Fc, P valor = 0,03). La patología glomerular se caracteriza por la presencia de medialunas y/o fibrosis glomerular. Además, la fibrosis de la zona cortical del riñón en ratones tratados se redujo significativamente medido por la tinción de la alfa actina del músculo liso, p valor = 0,04. También había una tendencia general a la reducción de la infiltración de monocitos en los ratones tratados con FN14-Fc. Estos resultados muestran claramente que el tratamiento con FN14-Fc de ratones Alport reduce la fibrosis en la zona

cortical del riñón y mejora la morfología general de los glomérulos.

[0158] También se ensayó la función de TWEAK en el modelo murino de fibrosis renal inducida por obstrucción uretral unilateral por tratamiento con un antagonista de TWEAK, un anticuerpo monoclonal de hámster dirigido contra TWEAK. En el modelo de ratón para el avance fibrótico renal, se liga un uréter dando como resultado la obstrucción uretral unilateral (UUO). (Klahr y col., *Am. J. Kidney Dis.* 18:689-699 (1991); Moriyama y col., *Kidney Int* 54(1):110-119 (1998). La UUO causa nefroesclerosis progresiva sin insuficiencia renal a corto plazo en ratones debido a que el riñón no obstruido puede mantener la función renal relativamente normal. Mientras que el riñón obstruido sufre fibrosis global rápida, el riñón no obstruido sufre hipertrofia adaptativa.

[0159] El impacto del tratamiento con antagonista de TWEAK en la fibrosis renal inducida por WHO se cuantificó morfométricamente. Se usaron 4 grupos de 8 ratones C57BL/6 macho exentos de antígeno vírico (Jackson Laboratories, Bar Harbor ME), de 8-10 semanas de edad. Los ratones se dividieron en los siguientes grupos: solo PBS (VEH), anticuerpo de hámster dirigido contra hemocianina de lapa californiana de control (KLH) (HA4/8; adquirido en BD Biosciences (San Jose)), anticuerpo de hámster dirigido contra TWEAK de ratón (AB.G11; preparado por Biogen (Cambridge)), receptor Ig de TNF- β murino soluble (TGF- β R, control positivo; preparado por Biogen (Cambridge)) y no operado (UNOP).

[0160] Para inducir fibrosis renal, el uréter izquierdo se aisló de forma aséptica y se ató en el riñón del lado operado el día 0 como describen Hammad y col., *Kidney Int* 58:242-250 (2000). Los siguientes grupos: PBS, HA4/8 y AB.G11 (mAb dirigido contra TWEAK) se trataron adicionalmente los días 2, 6 y 9 después de cirugía y el grupo de sTGF- β R-Ig los días 1, 3, 6 y 8. El día 10 después de cirugía, el riñón izquierdo ligado se retiró y se dividió por la mitad de forma transversal a través del centro de la pelvis renal y se preparó para los cortes en parafina.

[0161] Los cortes de riñón tratados en parafina se tiñeron con tinción tricrómica de Masson específica para colágeno. Usando el programa MeraMorph, se midieron las zonas de tinción azul en las láminas de tinción tricrómica de Masson para cuantificar el contenido de colágeno con el fin de evaluar la extensión de la fibrosis en los riñones operados (figura 19).

[0162] Sorprendentemente, los cortes de riñón de los animales tratados con anticuerpos monoclonal dirigido contra TWEAK (AB.G11) demostraron una disminución de 42% del contenido de colágeno comparado con los animales tratados con PBS y una disminución de 30% del contenido de colágeno comprado con los animales de control tratados con anticuerpo (HA4/8). En cambio, los riñones de los animales tratados con el receptor Ig de TNF- β soluble (TGF- β R) presentaron solo una disminución de 33% del contenido de colágeno comparado con los animales tratados con PBS y una disminución de 19% del contenido de colágeno comprado con los animales de control tratados con anticuerpo (HA4/8). Estos resultados muestran claramente que el tratamiento con un antagonista de TWEAK, tal como un anticuerpo monoclonal dirigido contra TWEAK, reducía significativamente la fibrosis renal en una mayor extensión que la mostrada por el receptor Ig de TNF- β soluble (TGF- β R).

[0163] Considerados juntos, los resultados presentados en el presente documento, muestran que TWEAK tiene una función importante en las afecciones renales inflamatorias, tales como inflamación multifocal y afecciones renales no inflamatorias, tales como nefropatía tubular, quistes, nefropatía glomerular, síndrome de Alport, basofilia tubular, dilatación tubular, vacuolización tubular, cilindros hialinos, hiperplasia tubular y fibrosis renal.

EJEMPLO 6

TWEAK causa inflamación pulmonar

[0164] En los cortes transversales de pulmones de ratones transgénicos FL-TWEAK y de control, como se describen en el ejemplo 1, se mostró inflamación granulomatosa y linfocitosis notable en ratones Tg tanto FL-TWEAK como sTWEAK (figura 20). También se puso de manifiesto la expresión de TWEAK endógena en células pulmonares que recubren los bronquiolos y alveolos de ratones normales, como se muestra por la hibridación in situ (ISH) usando sondas de sentido contrario de TWEAK radiomarcadas, y observado por microscopía de campo oscuro (ISH) (figura 21).

[0165] De acuerdo con una función de TWEAK en la enfermedad pulmonar, se mostró que el ARNm de Fn14 era expresado ampliamente en el pulmón de ratón C57BL/6 adulto (figura 22) por ISH usando sondas de sentido contrario de Fn14 radiomarcadas y observado por microscopía de campo oscuro.

[0166] Considerados juntos, estos datos muestran que TWEAK tiene una función importante en la mediación de las afecciones pulmonares inflamatorias, incluyendo la inflamación granulomatosa y linfocitocitaria.

EJEMPLO 7

5

TWEAK inhibe tanto la adipogénesis como la miogénesis

[0167] El efecto de TWEAK en la diferenciación celular se investigó usando dos modelos in vitro de adipogénesis y miogénesis bien conocidos en la materia (Green y Meuth, *Cell* 3:127-133 (1974); Yaffe y Saxel, *Nature* 270: 725-727 (1977)).

[0168] Para la adipogénesis, primero se cultivaron células 3T3-L1 hasta confluencia en un medio de crecimiento basado en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y después se indujeron para dar adipogénesis de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia. Green y Kehinde, *Cell* 5:19-27 (1976). Brevemente, las células se estimularon el día 0 con medio MDI basado en DMEM que contenía dexametasona, insulina y IBMX, durante 2 días seguido de medio DMEM solo-insulina durante otros 2 días. El día 5, las células se cultivaron en el medio de crecimiento basado en DMEM normal y se evaluó la adipogénesis el día 7 mediante tinción con aceite rojo.

[0169] Para la miogénesis, se cultivaron células C2C12 hasta casi confluencia en un medio de crecimiento basado en DMEM y el día 0 se cambió a un medio de diferenciación con bajo contenido en suero que contenía suero de caballo al 2% para producir la diferenciación (Yaffe y Saxel, *Nature* 270: 725-727 (1977)). La formación de miotubos se examinó usando un microscopio de contraste de fase y se tomaron fotos el día 6 de la diferenciación.

[0170] Para examinar el efecto de TWEAK en estas 2 rutas de diferenciación, se añadieron diferentes versiones de TWEAK recombinante humano (TWEAK-FLAG, TWEAK o Fc-TWEAK) el día 0 con una concentración final de 100 ng/ml y se recargaron diariamente. TWEAK inhibía tanto la adipogénesis como la miogénesis en ambos sistemas (figuras 23 y 24). La especificidad del efecto inhibidor de TWEAK se confirmó usando el anticuerpo monoclonal de hámster dirigido contra TWEAK AB.G11 o hFn14-Fc como reactivo neutralizante.

[0171] Estos resultados muestran que TWEAK tiene una función importante en la diferenciación celular.

EJEMPLO 8

TWEAK se une a citoblastos mesenquimatosos humanos

35

[0172] Se cultivaron citoblastos mesenquimatosos humanos (hMSCs) (Cambrex Corp., East Rutherford, NJ) en medio MSCGM (Cambrex) y se recogieron por incubación de los mismos con PBS que contenía EDTA 5 mM, y se prepararon para el análisis de separador de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0173] Las células se incubaron en tampón de FACS que contenía PBS y FBS al 1% junto con 100 ng/ml de Fc-TWEAK durante 1 h sobre hielo. Después de lavado 2 veces con tampón de FACS, las células después se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra dirigido contra Fc humano o de cabra dirigido contra Fc de ratón conjugados con ficoeritrina, con una dilución de 1:200 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) (figura 25). La tinción de fondo se midió mediante tinción de anticuerpo secundario solo, como se muestra con la línea de trazos.

45

[0174] Como se muestra en la figura 25, TWEAK se une a células mesenquimatosas humanas, como se demuestra por el desplazamiento del perfil de tinción de Fc-TWEAK comparado con anticuerpo secundario solo. Por lo tanto, la capacidad de TWEAK para unirse a células mesenquimatosas (un tipo de células progenitoras capaces de diferenciación en células musculares así como en tipos de células de cartílago, hueso, tejido conjuntivo tales como células del estroma, fibroblastos, adipocitos y células dérmicas) muestra que TWEAK tiene una función importante en la diferenciación de estos tipos de células tanto en modelos normales como de enfermedad.

EJEMPLO 9

Fn14 es expresado en citoblastos neurales

[0175] La expresión de Fn14 se examinó en cerebros de ratones embrionarios de 13,5 días en una mezcla de C57BL/ 6 y 129/Sve parentales. Los cerebros se sometieron a hibridación in situ con la sonda de sentido contrario de Fn14. Era detectable una señal positiva en la zona subventricular de los ventrículos embrionarios, que se

correlacionaba con la posición de citoblastos neurales (no se muestran los datos). Estos resultados muestran que Fn14 tiene una función importante en la diferenciación celular neural.

EJEMPLO 10

5

Procedimientos para identificar agentes terapéuticos para tratar afecciones relacionadas con TWEAK

[0176] Con el fin de identificar los compuestos antagonistas de TWEAK que actúan como agentes terapéuticos para el tratamiento de afecciones relacionadas con TWEAK de acuerdo con la presente invención, se obtiene un
 10 animal de ensayo, tal como un ratón, que expresa un ADN exógeno que codifica un polipéptido TWEAK, o un fragmento, análogo, muteína o mimético del mismo. Después el animal se expone a un compuesto candidato que puede funcionar como un agente terapéutico para una afección relacionada con TWEAK. Después se compara el tejido cardíaco del animal de ensayo con el mismo tejido de un animal de referencia que expresa el ADN exógeno, pero que no se ha expuesto al compuesto; y se determina si el compuesto ha afectado a alguna afección
 15 relacionada con TWEAK de los tejidos cardíacos.

LISTA DE SECUENCIAS

[0177]

20

<120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR AFECCIONES RELACIONADAS CON TWEAK

<130> P26996EP-D1-PCT

25

<140> Todavía no asignado

<141> 09-04-2003

<150> EP03721647.0

<151> 09-04-2003

30

<150> 60/371.611 <151> 09-04-2002

<160> 2

35

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 249

<212> PRT

40

<213> Mus musculus

<400> 1

Met₁ Ala Ala Arg Arg₅ Ser Gln Arg Arg Arg₁₀ Gly Arg Arg Gly₁₅ Glu Pro
 Gly Thr Ala Leu₂₀ Leu Ala Pro Leu Val₂₅ Leu Ser Leu Gly₃₀ Ala Leu
 Ala Cys Leu₃₅ Gly Leu Leu Leu Val₄₀ Val Val Ser Leu Gly₄₅ Ser Trp Ala
 Thr Leu₅₀ Ser Ala Gln Glu Pro₅₅ Ser Gln Glu Glu Leu₆₀ Thr Ala Glu Asp
 Arg Arg Glu Pro Pro Glu₇₀ Leu Asn Pro Gln Thr₇₅ Glu Glu Ser Gln Asp₈₀
 Val Val Pro Phe Leu₈₅ Glu Gln Leu Val Arg₉₀ Pro Arg Arg Ser Ala Pro₉₅
 Lys Gly Arg Lys₁₀₀ Ala Arg Pro Arg Arg₁₀₅ Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu
 Val His Pro₁₁₅ Arg Pro Gly Gln Asp₁₂₀ Gly Ala Gln Ala Gly₁₂₅ Val Asp Gly
 Thr Val₁₃₀ Ser Gly Trp Glu Glu₁₃₅ Thr Lys Ile Asn Ser₁₄₀ Ser Ser Pro Leu
 Arg Tyr Asp Arg Gln Ile₁₅₀ Gly Glu Phe Thr Val₁₅₅ Ile Arg Ala Gly Leu₁₆₀
 Tyr Tyr Leu Tyr Cys₁₆₅ Gln Val His Phe Asp₁₇₀ Glu Gly Lys Ala Val Tyr₁₇₅
 Leu Lys Leu Asp₁₈₀ Leu Leu Val Asn Gly₁₈₅ Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu₁₉₀
 Glu Glu Phe₁₉₅ Ser Ala Thr Ala Ala₂₀₀ Ser Ser Pro Gly Pro₂₀₅ Gln Leu Arg
 Leu Cys₂₁₀ Gln Val Ser Gly Leu₂₁₅ Leu Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu₂₂₀
 Arg Ile Arg Thr Leu Pro₂₃₀ Trp Ala His Leu Lys₂₃₅ Ala Ala Pro Phe Leu₂₄₀
 Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His

245

<210> 2

<211> 1239

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 2

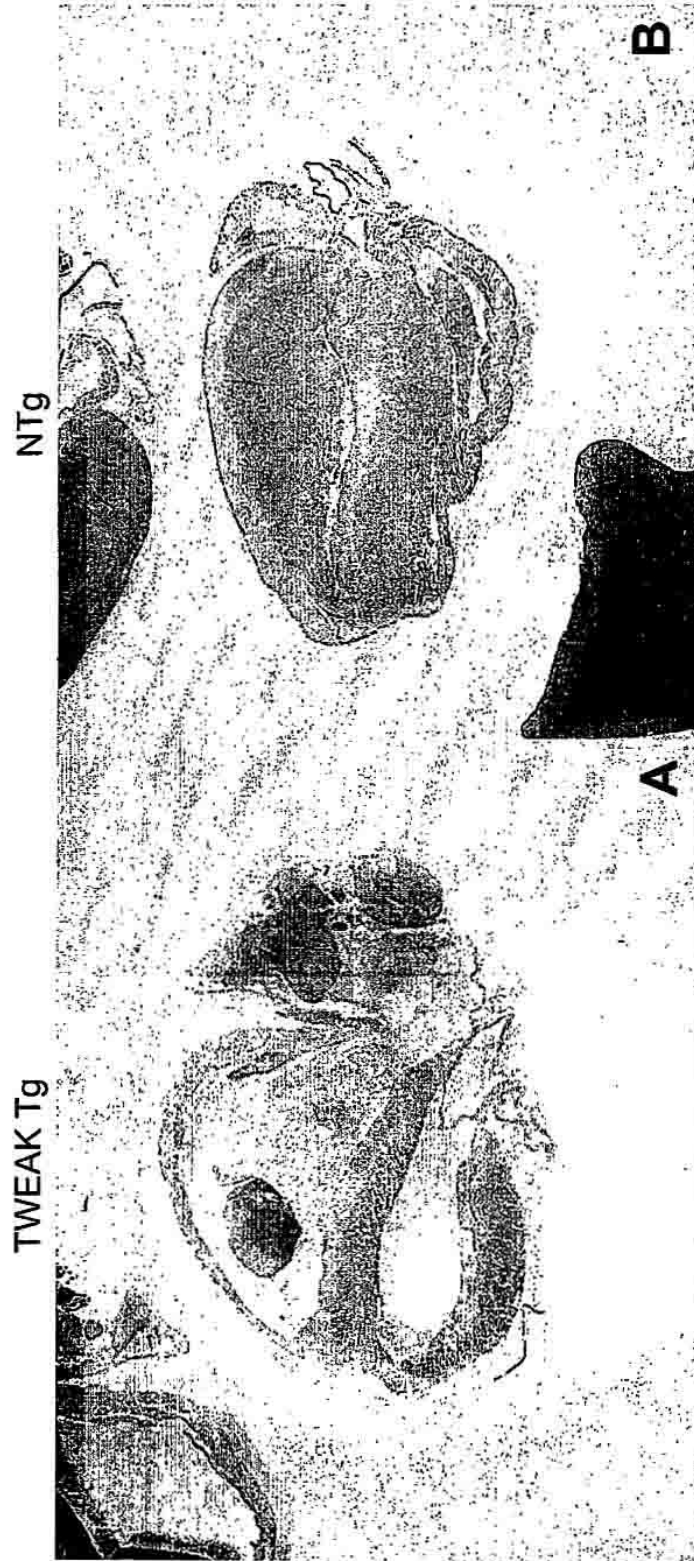
atggccgccc	gtcggagcca	gagggcgagg	gggcgcccgg	gggagccggg	caccgcccctg	60
ctggccccgc	tgggtgctgag	cctgggcctg	gcgctggcct	gccttggcct	cctgctggtc	120
gtggtcagcc	tggggagctg	ggcaacgctg	tctgcccagg	agccttctca	ggaggagctg	180
acagcagagg	accgccggga	gccccctgaa	ctgaatcccc	agacagagga	aagccaggat	240
gtggtacctt	tcttggaaca	actagtccgg	cctcgaagaa	gtgctcctaa	aggccggaag	300
gcgcggcctc	gccgagctat	tgcagcccat	tatgagggtc	atcctcggcc	aggacaggat	360
ggagcacaag	caggtgtgga	tgggacagtg	agtggctggg	aagagaccaa	aatcaacagc	420
tccagccctc	tgcgctacga	ccgccagatt	ggggaattta	cagtcatcag	ggctgggctc	480
tactacctgt	actgtcaggt	gcactttgat	gagggaaagg	ctgtctacct	gaagctggac	540
ttgctgggtga	acggtgtgct	ggccctgcgc	tgcctggaag	aattctcagc	cacagcagca	600
agctctcctg	ggccccagct	ccgtttgtgc	caggtgtctg	ggctgttgcc	gctgcggcca	660
gggtcttccc	ttcggatccg	caccctcccc	tgggtcatc	ttaaggctgc	cccccttcta	720
acctactttg	gactctttca	agttcactga	ggggccttgc	tctcccagat	tccttaaact	780
ttccctggct	ccaggagcat	caccacacct	ccctacccca	ccccactcc	tccaccccct	840
cgctgctcct	tggtcagtc	ctgtctctcc	tcaaaggcag	ccagagcttg	ttcacatggt	900
tccattccac	agacgtatcc	ttgctcttct	taacatccca	tcccaccaca	actatccacc	960
tcactagctc	ccaaagcccc	tacttatccc	tgactcccc	accactcac	ccgaccacgt	1020
gtttattgac	tttgtgcacc	aggcactgag	atgggctgga	cctgggtggca	ggaagccaga	1080
gaacctggga	ctaggccaga	agttcccaac	tgtgaggggg	aagagctggg	gacaagctcc	1140
tccctggatc	cctgtggatt	ttgaaaagat	actattttta	ttattattgt	gacaaaatgt	1200
taaatggata	ttaaagagaa	taaatcatga	tttctcttc			1239

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista de TWEAK seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 (a) un anticuerpo dirigido contra TWEAK;
- (b) una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra TWEAK;
- (c) un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, en el que el receptor de TWEAK es Fn14; y
- 10 (d) una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, en el que el receptor de TWEAK es Fn14;
- para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en
- 15 (i) miocardiopatía dilatada no inflamatoria y (ii) insuficiencia cardíaca congestiva causada por miocardiopatía dilatada no inflamatoria.
2. Un antagonista de TWEAK seleccionado del grupo que consiste en:
- 20 (a) un anticuerpo dirigido contra TWEAK;
- (b) una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra TWEAK;
- (c) un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, en el que el receptor de TWEAK es Fn14; y
- 25 (d) una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, en el que el receptor de TWEAK es Fn14;
- para usar en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en (i) miocardiopatía dilatada no
- 30 inflamatoria y (ii) insuficiencia cardíaca congestiva causada por miocardiopatía dilatada no inflamatoria.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el antagonista de TWEAK para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la miocardiopatía dilatada no inflamatoria es miocardiopatía dilatada idiopática.
- 35 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 3, o el antagonista de TWEAK para usar de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que el antagonista de TWEAK es un anticuerpo dirigido contra TWEAK.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 3, o el antagonista de TWEAK para usar de
- 40 acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que el antagonista de TWEAK es una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra TWEAK.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 3, o el antagonista de TWEAK para usar de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que el antagonista de TWEAK es un anticuerpo dirigido
- 45 contra el receptor de TWEAK, y en el que receptor de TWEAK es Fn14.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 3, o el antagonista de TWEAK para usar de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en el que el antagonista de TWEAK es una parte de unión al antígeno de un anticuerpo dirigido contra el receptor de TWEAK, y en el que receptor de TWEAK es Fn14.
- 50

Fig. 1

Función TWEAK en el corazón: dilatación en corazones Tg TWEAK

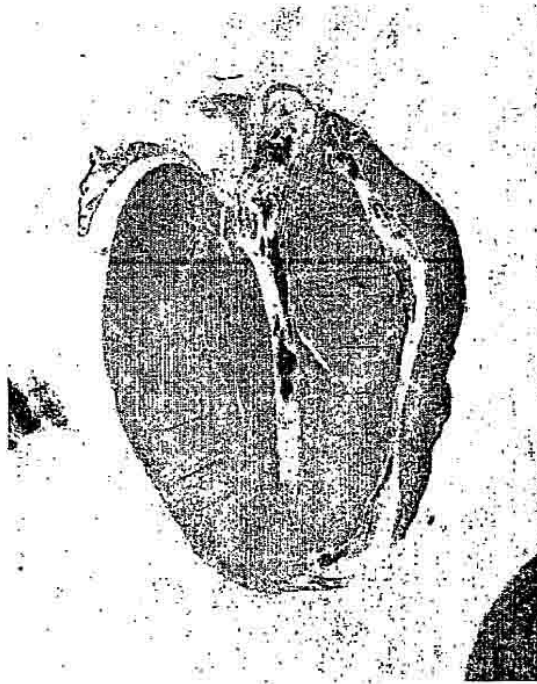


A. Trombosis de aurícula y ventrículo derechos y dilatación en transgénico FL-Tweak
B. Corazón normal. HyE.

Fig. 2

TWEAK induce remodelado cardiaco en ratones adultos

Adeno-GFP



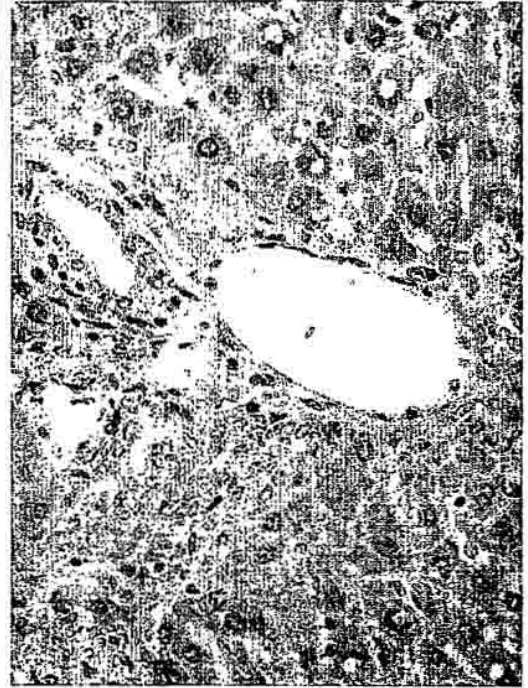
Adeno-TWEAK



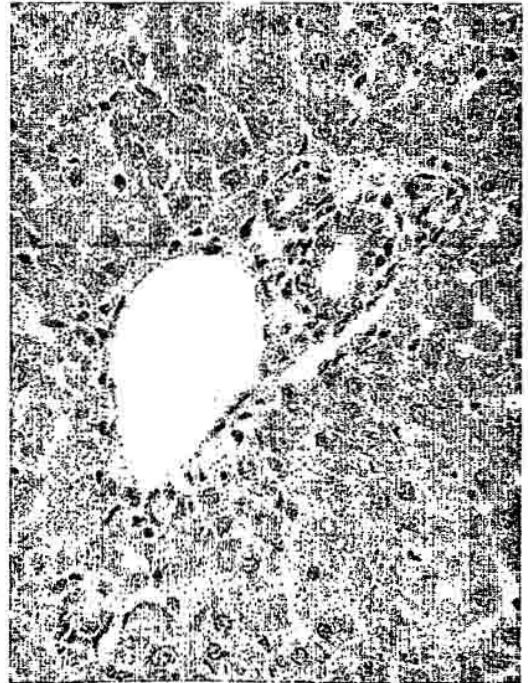
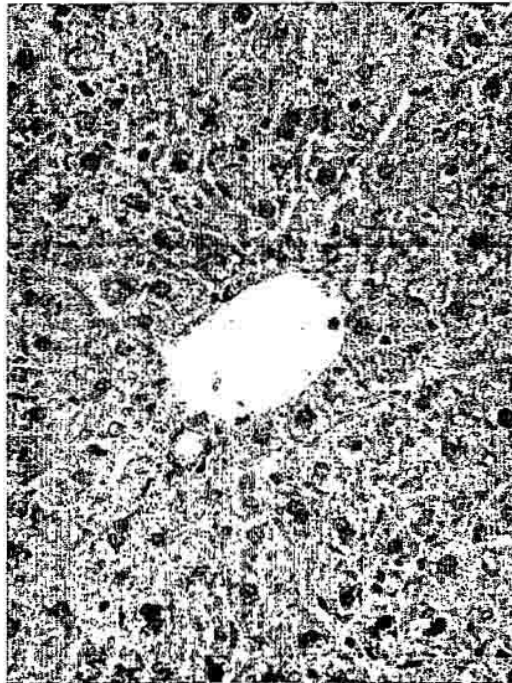
Día 20

La hiperplasia ductal biliar y de células ovals es visible en ratones Tg TWEAK de 2 semanas de edad **Fig. 3**

7 meses de edad



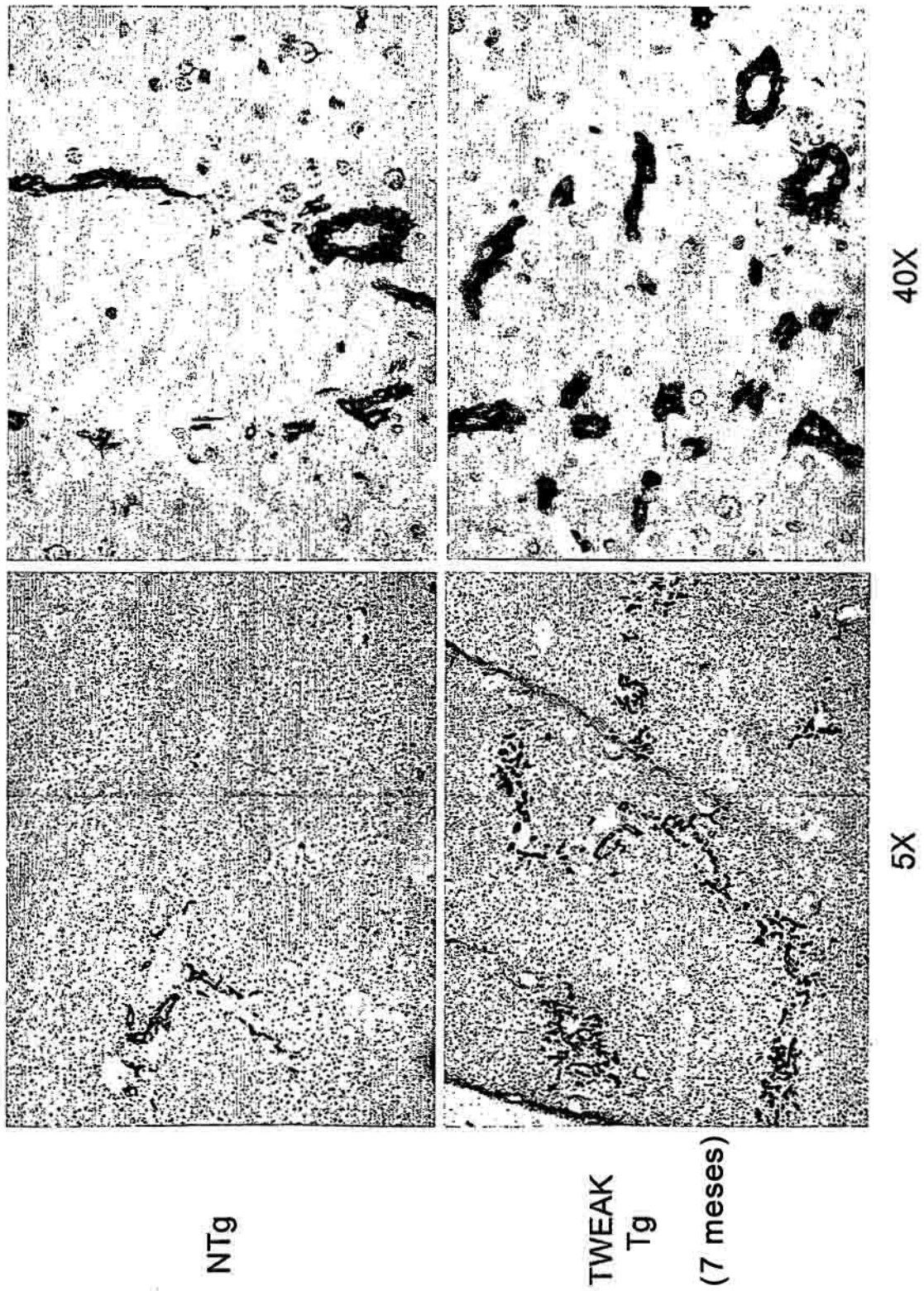
2 semanas de edad



NTg

Tg

Fig. 4
Tinción de BEC y células ovales con mAb A6 (contra queratina)



Hiperplasia ductal biliar y de células ovals en el hígado de ratones Tg TWEAK Fig. 5

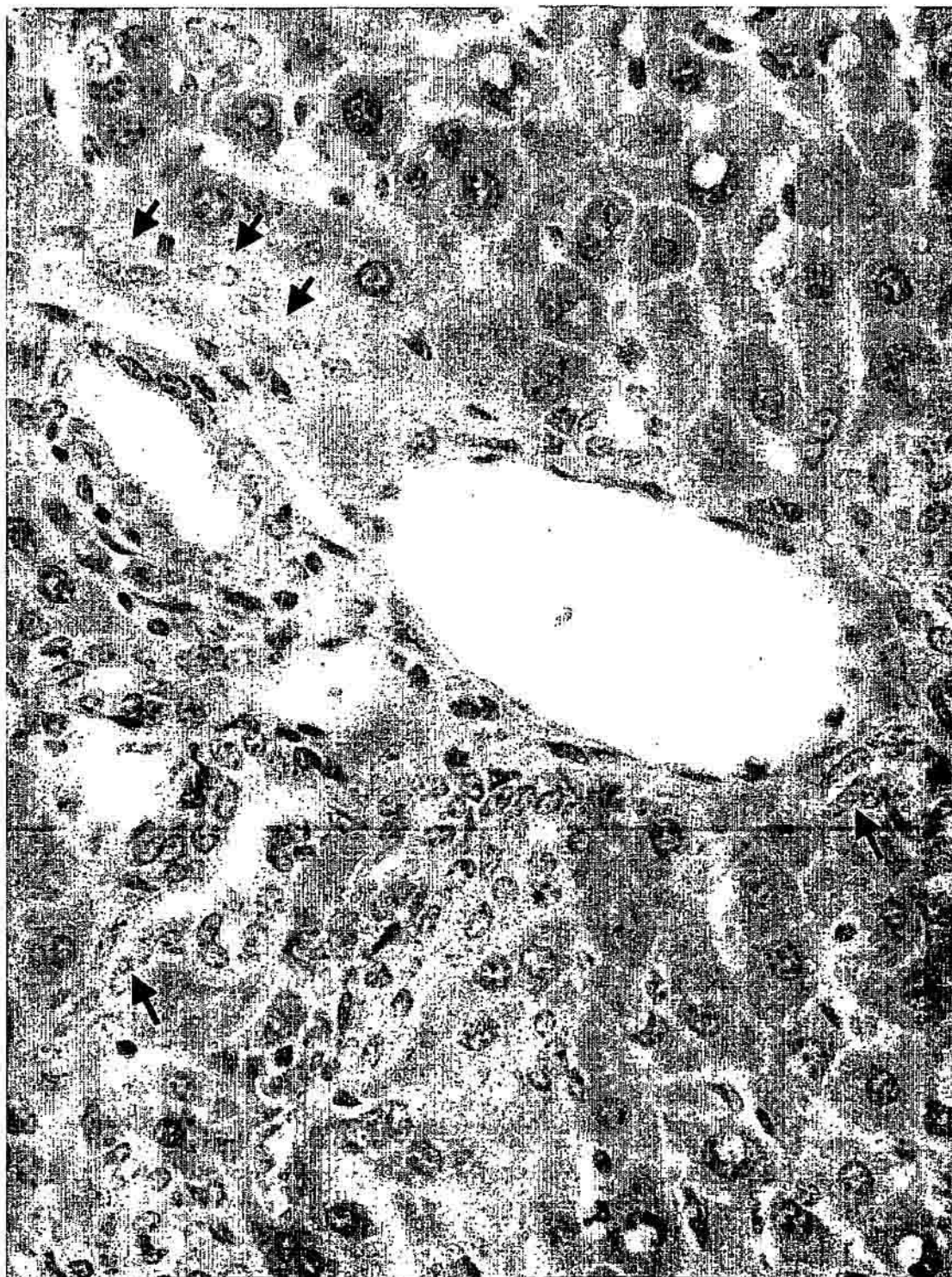


Fig. 6

Vacuolización hepatocelular en ratones Tg TWEAK (7 meses)

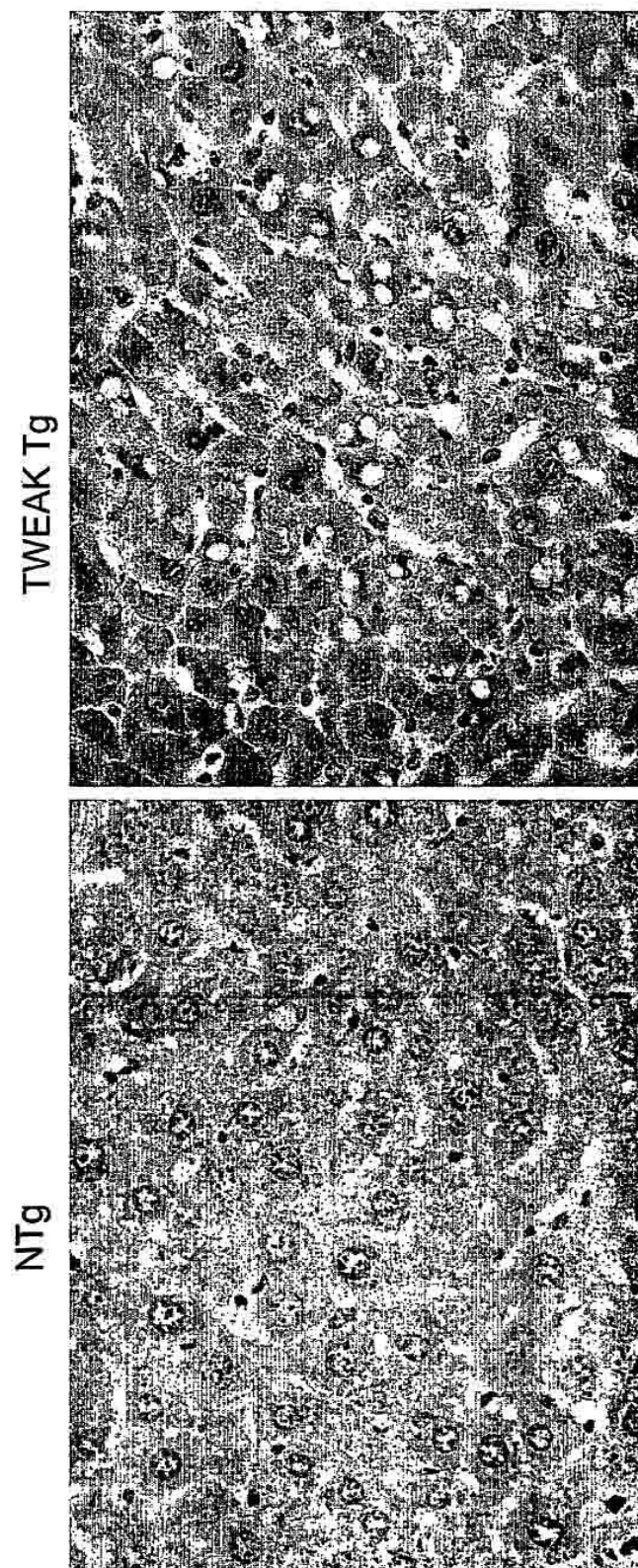


Fig.7

Función de TWEAK en el hígado: suministro adenovirico

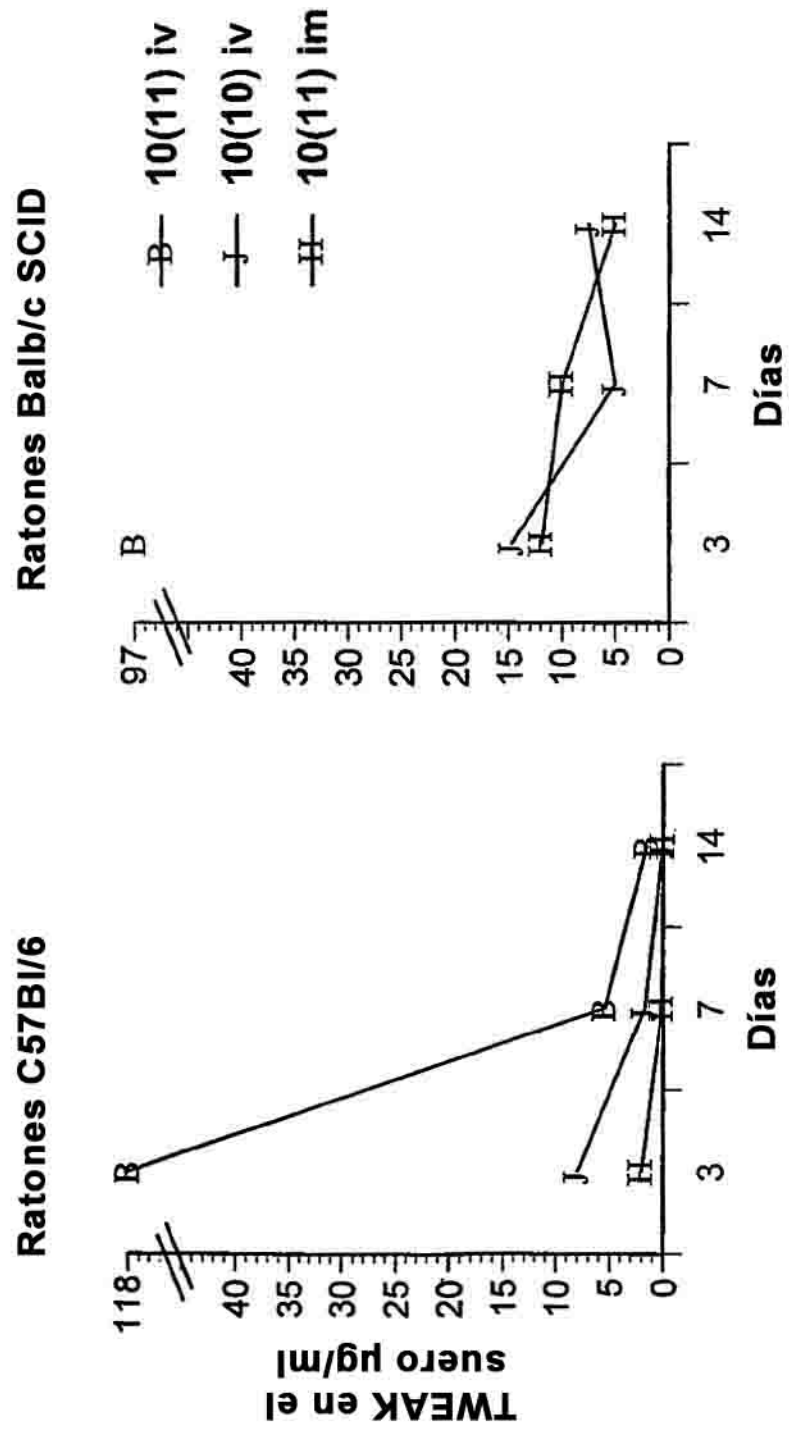


Fig. 8

TWEAK induce la muerte de hepatocitos e hiperplasia ductal en ratones adultos

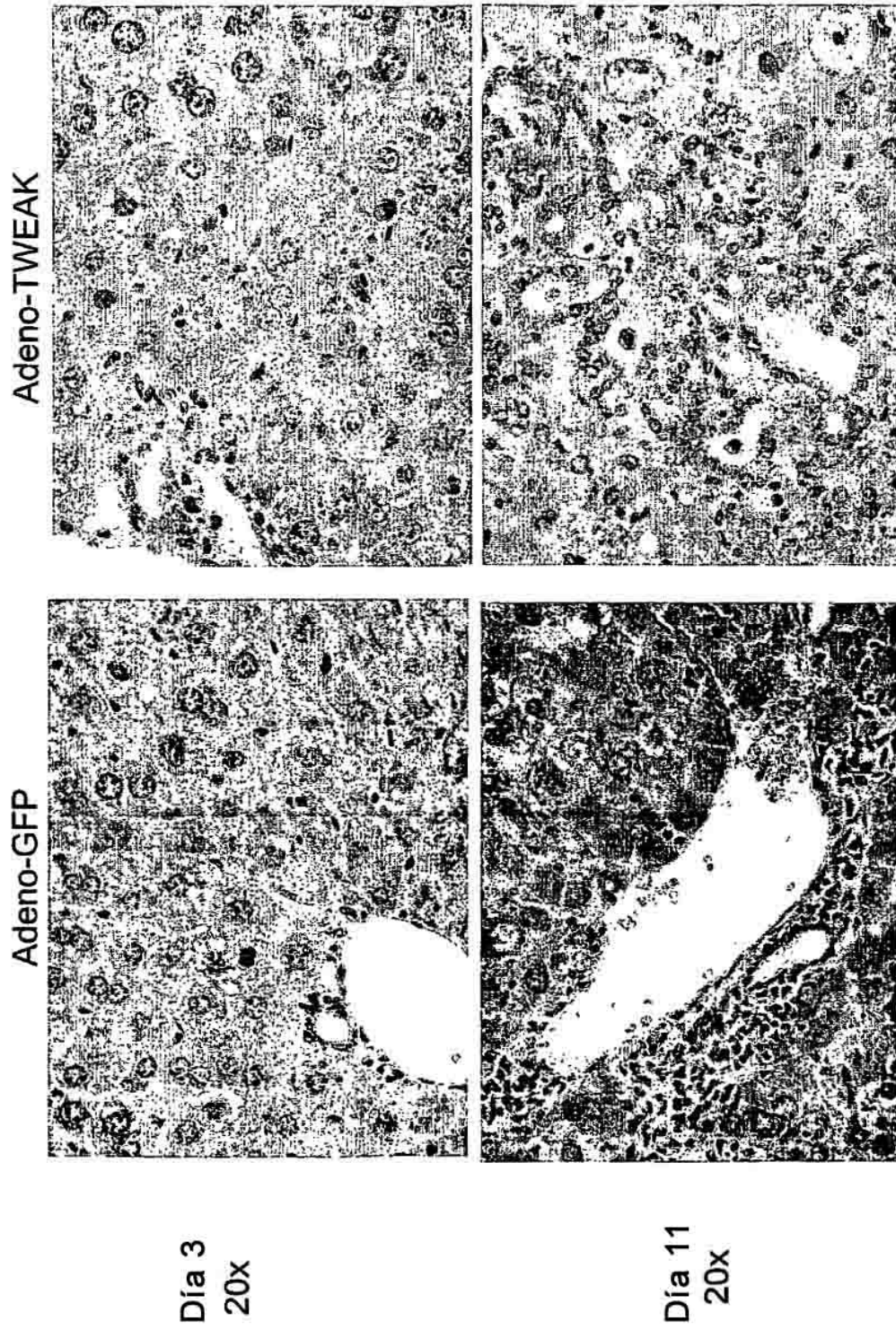


Fig. 9

La expresión del ARNm de FN14 es indetectable en el hígado normal pero es muy inducida por daño hepático agudo

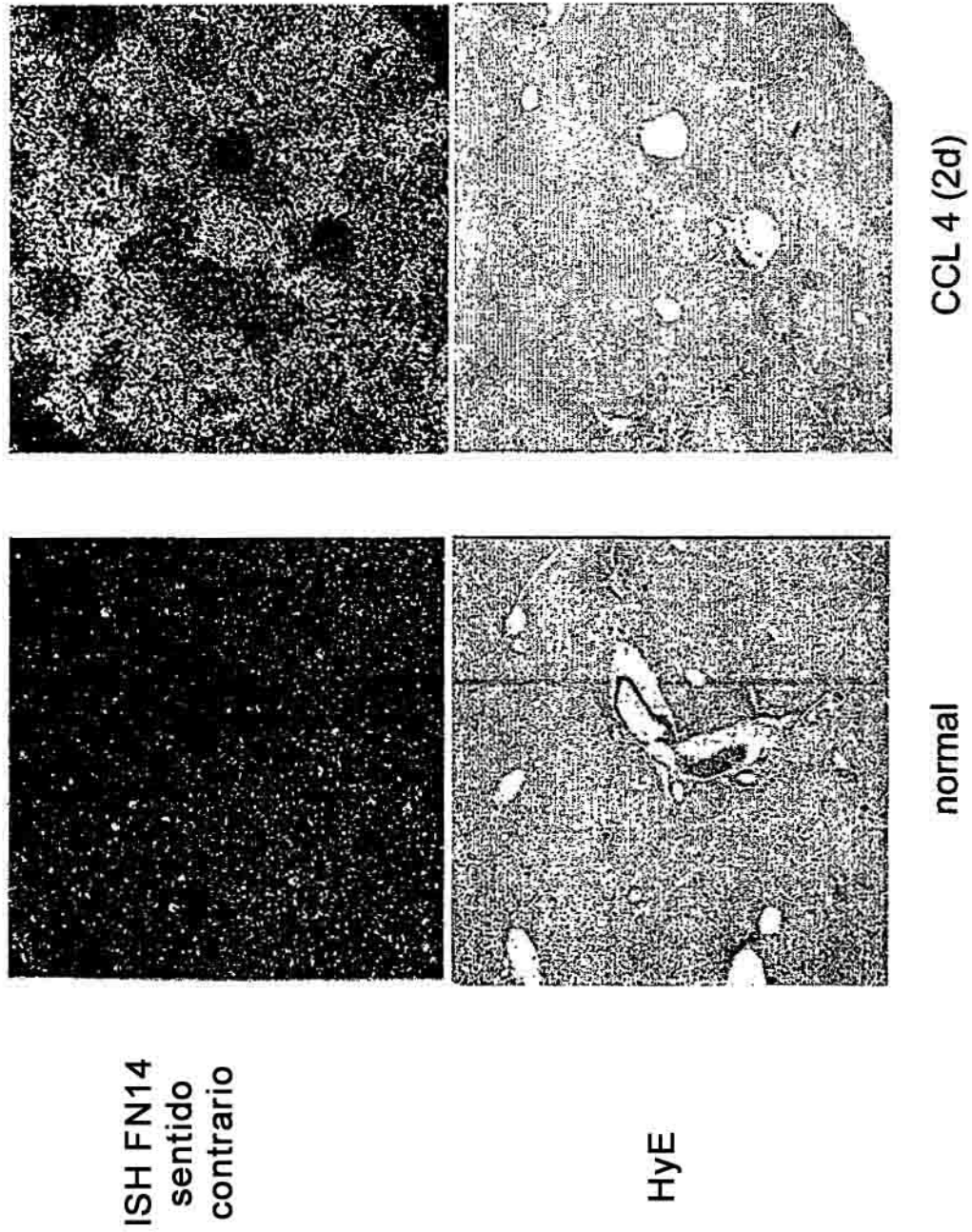
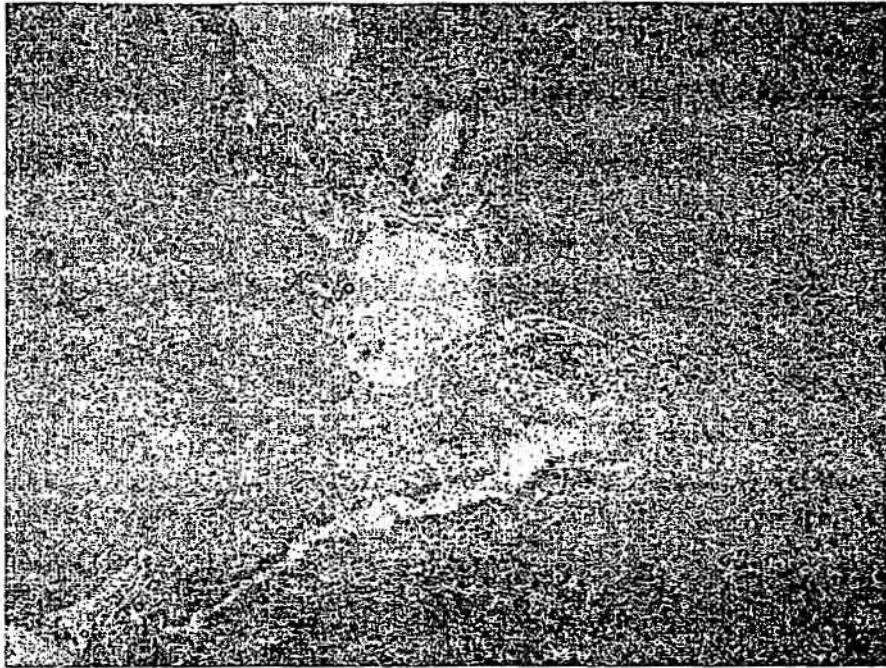


Fig. 10

A. Tinción con HyE de cortes de hígado



B. Hibridación in situ de ARNm de sentido contrario de FN14



Basofilia tubular y nefropatía glomerular en ratones Tg TWEAK Fig. 11

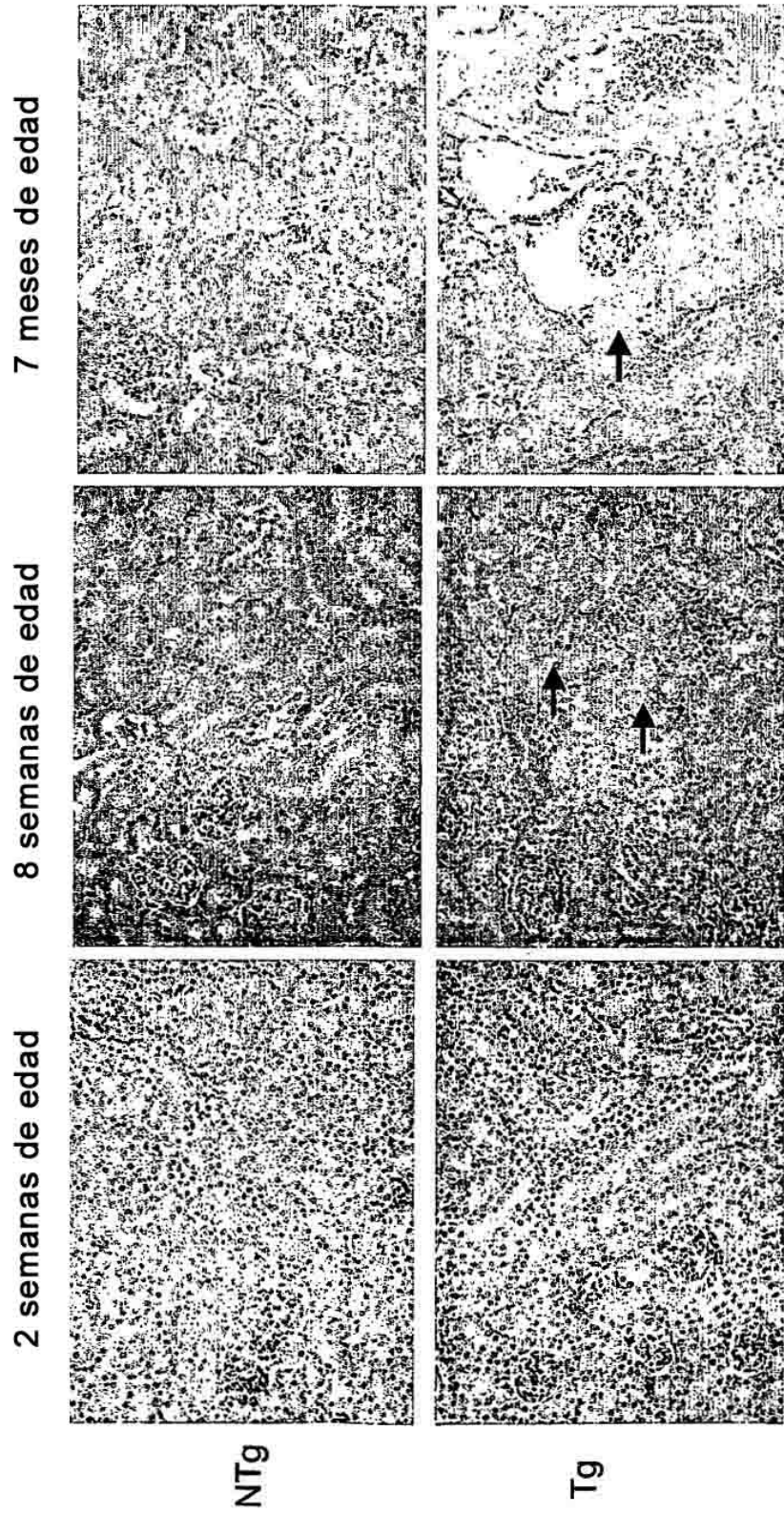
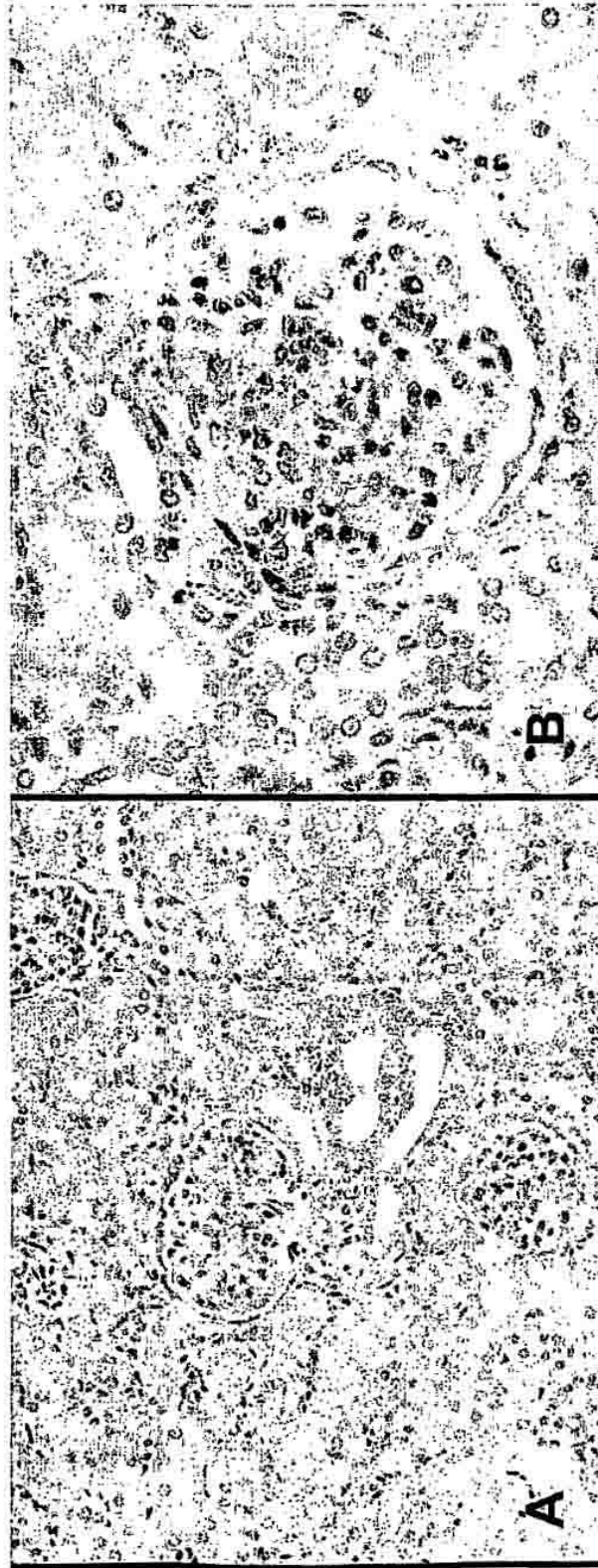


Fig. 12

Función de TWEAK en el riñón: ratones Tg FL-TWEAK retrocruzados (4x) con B6



- A. Nefropatía glomerular con basofilia del epitelio tubular proximal adyacente.
- B. Hiper celularidad mesangial segmentaria, hipertrofia del epitelio capsular y engrosamiento capsular leve. HyE.

Fig. 13

Túbulos basófilos en ratones Tg TWEAK que corresponden a regiones PCNA+

(dos Tg TWEAK individuales a las 8 semanas de edad)

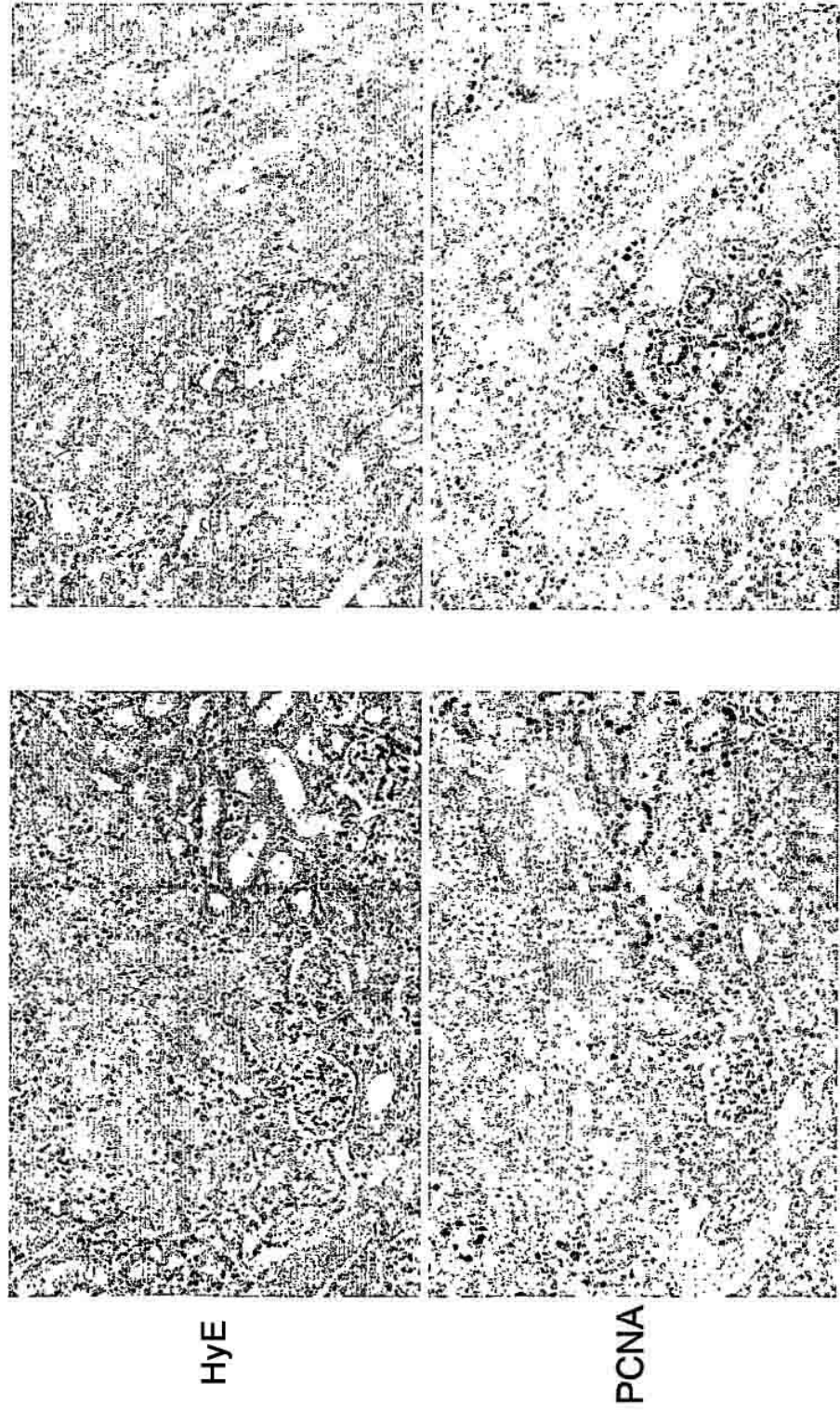


Fig. 14

Los túbulos basófilos de ratones Tg TWEAK no expresan marcadores de unión a lectina característicos de túbulos proximales o distales

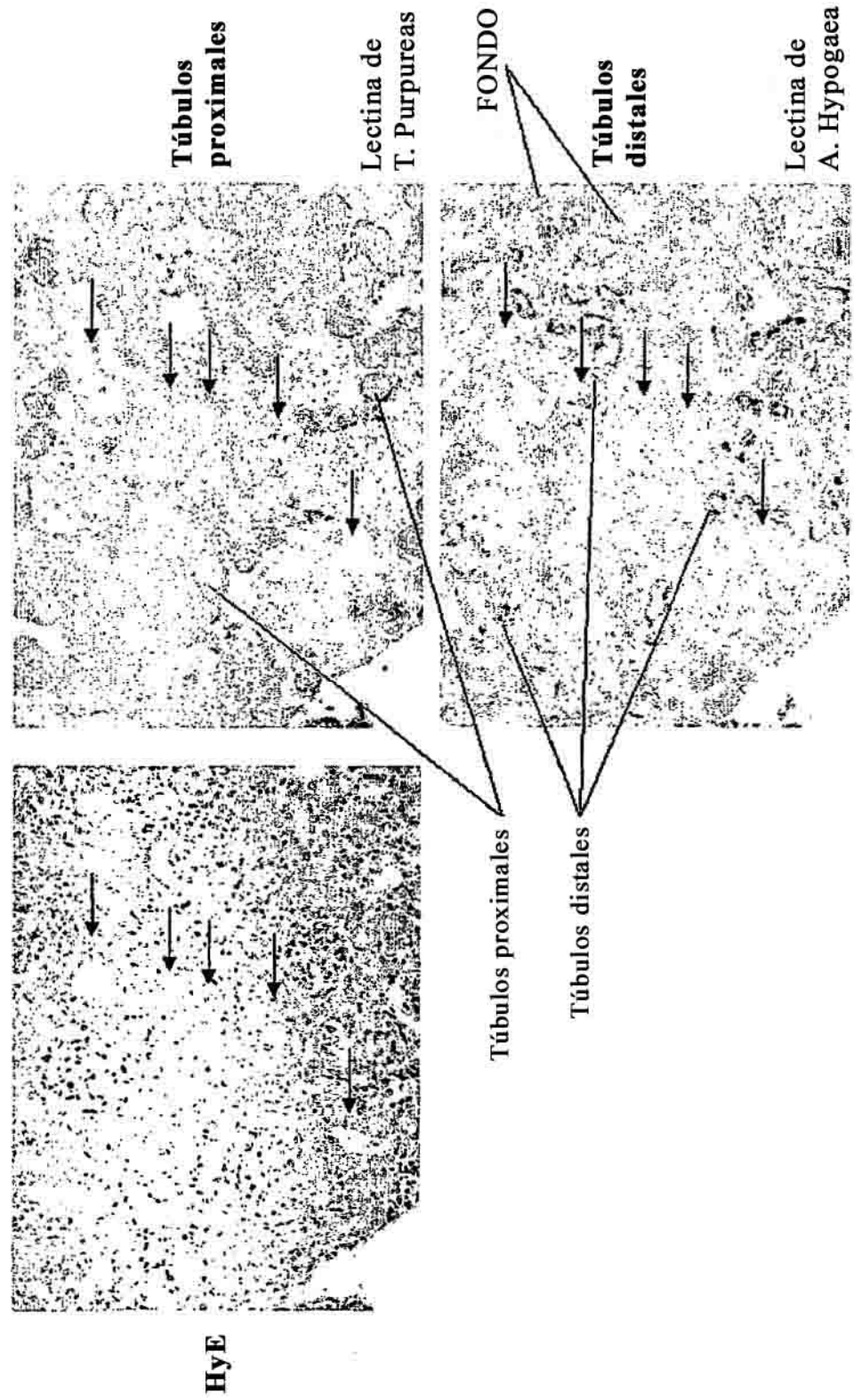


Fig. 15

TWEAK induce hiperplasia tubular y glomerulopatía en ratones adultos

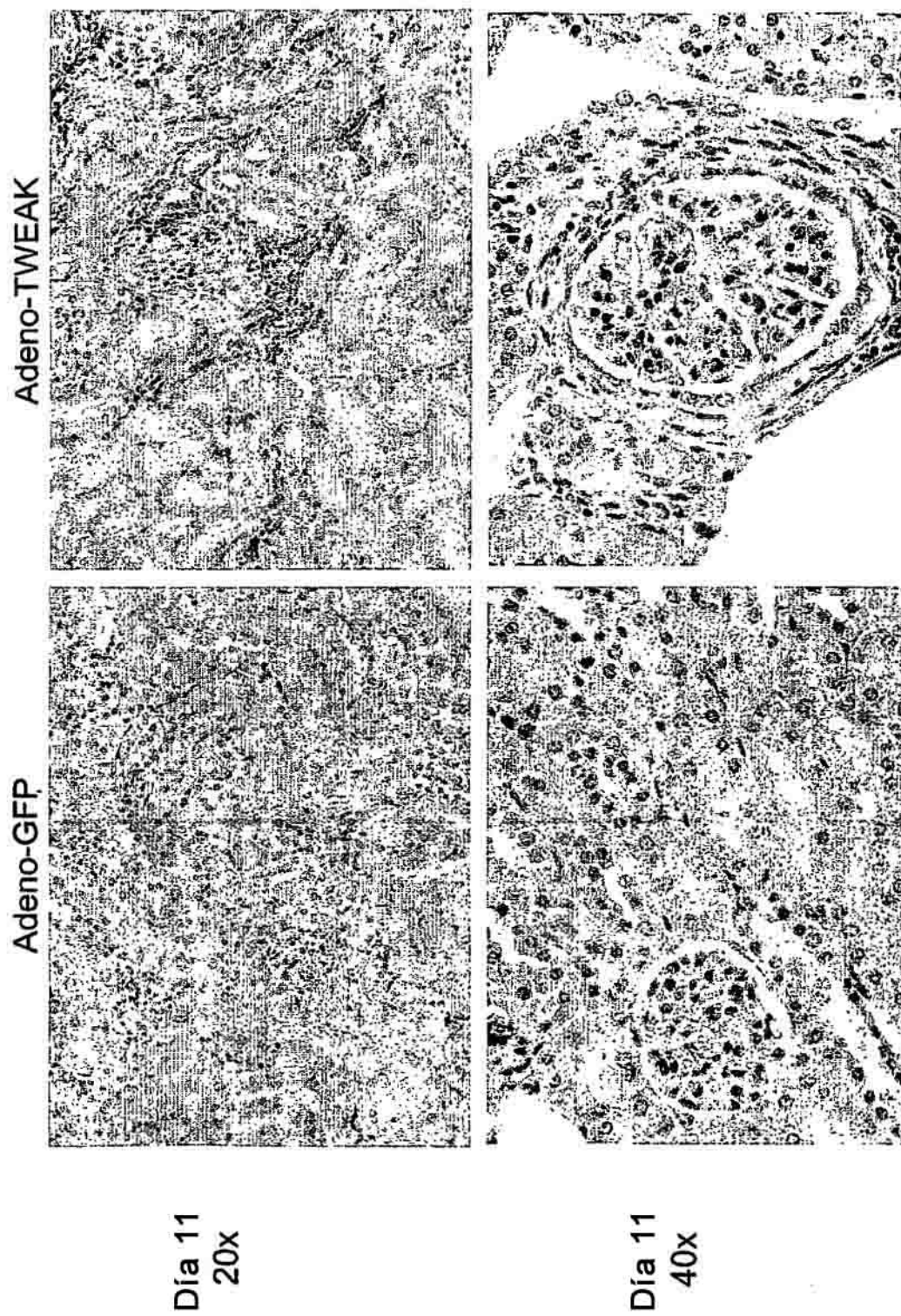


Fig. 16

ARNm de TWEAK es ampliamente expresado por todo el riñón en el ratón adulto

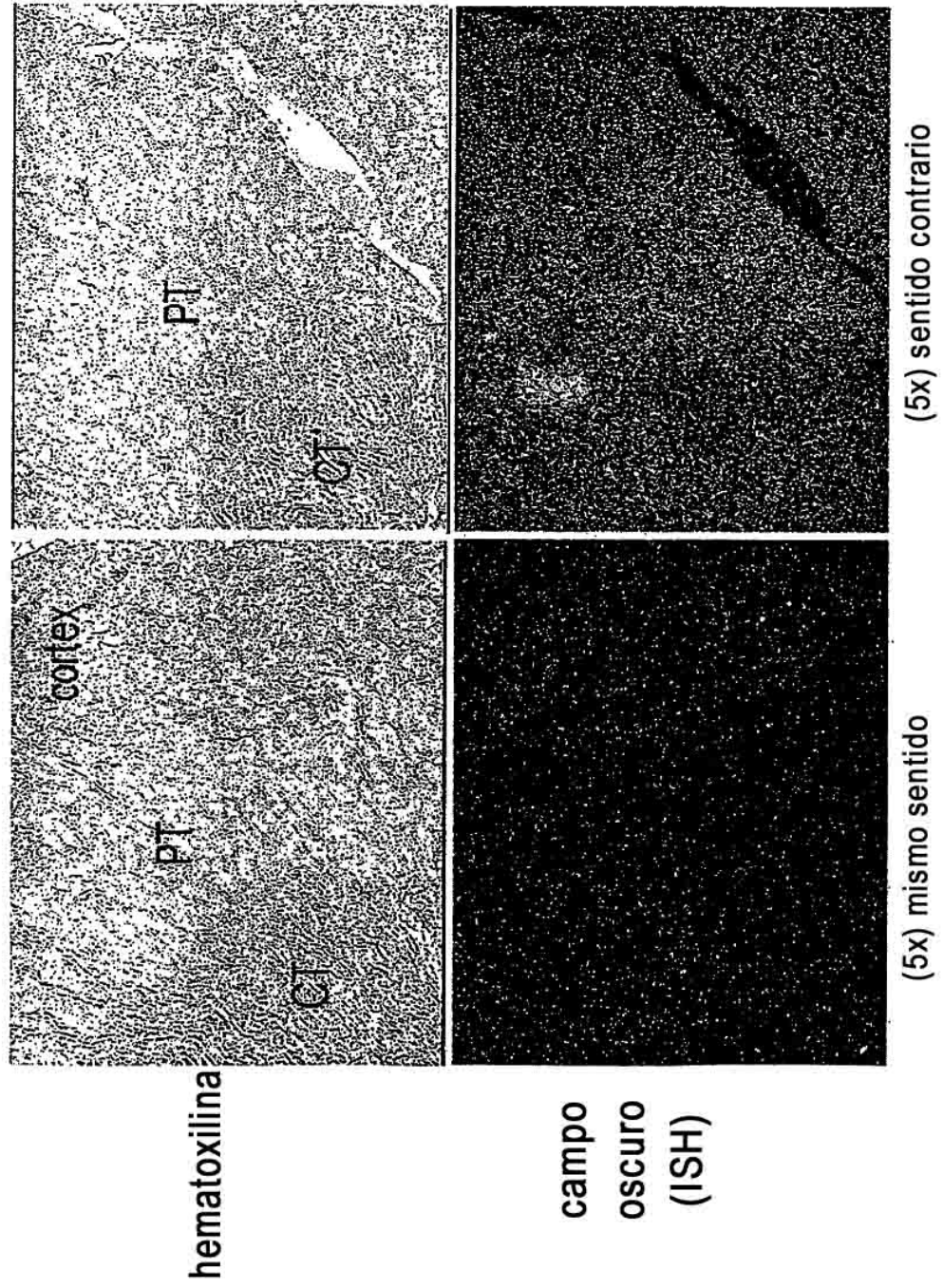


Fig. 17
Expresión de ARNm de Fn14 en los túbulos proximales de la médula externa del riñón

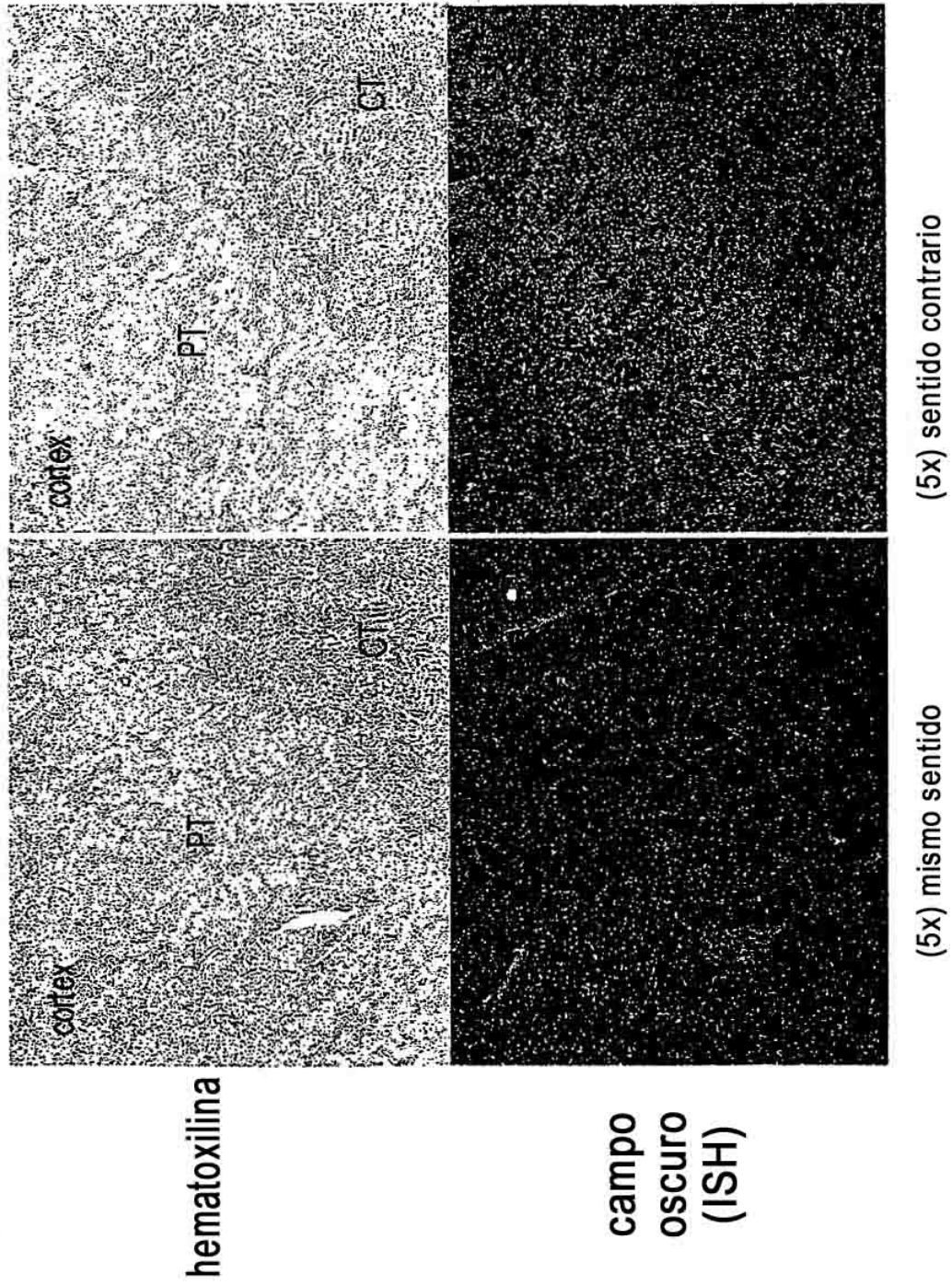


Fig. 18

Regulación por aumento de ARNm de Fn14 en fibrosis de riñón Alports

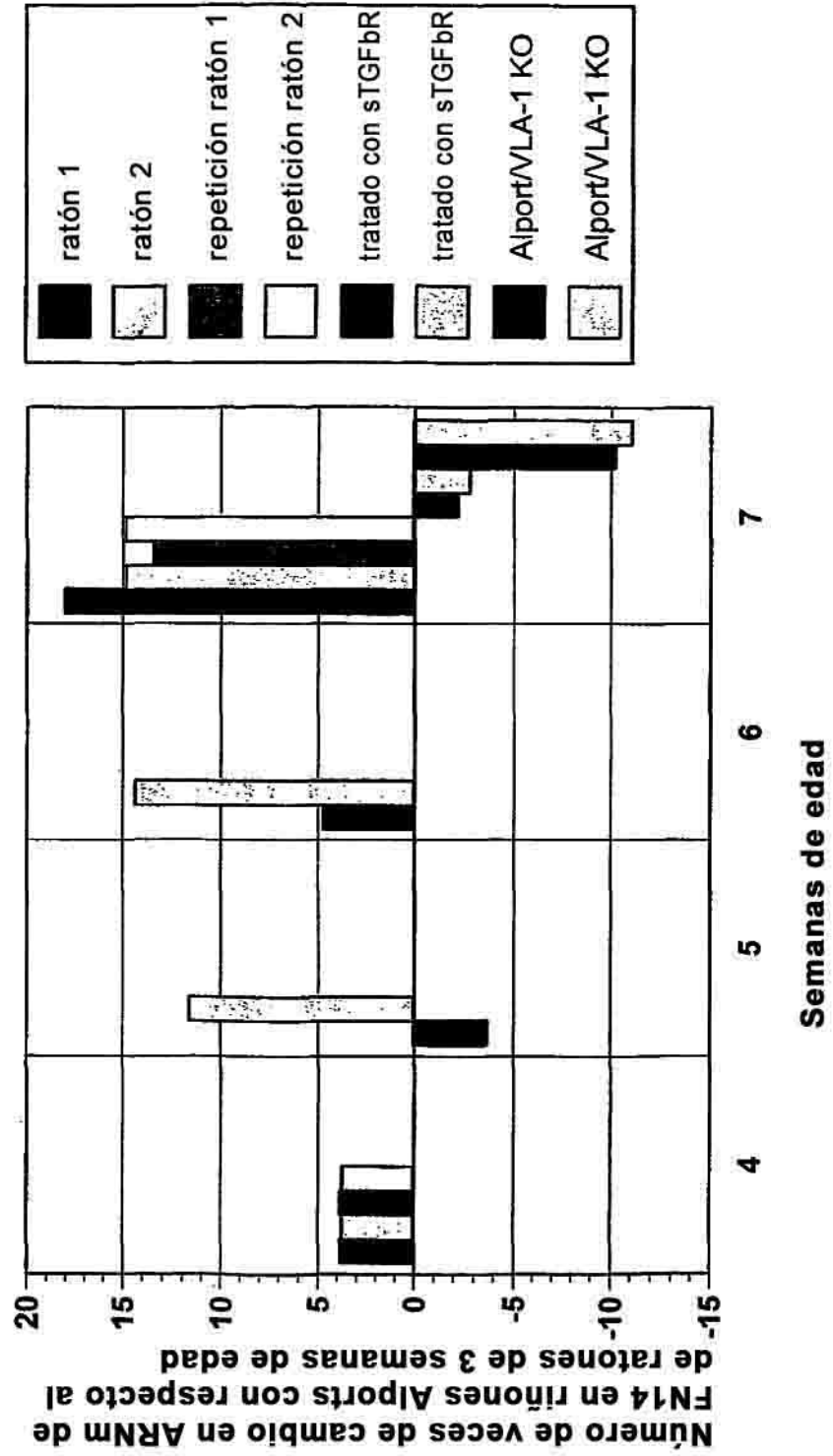


Fig. 12.

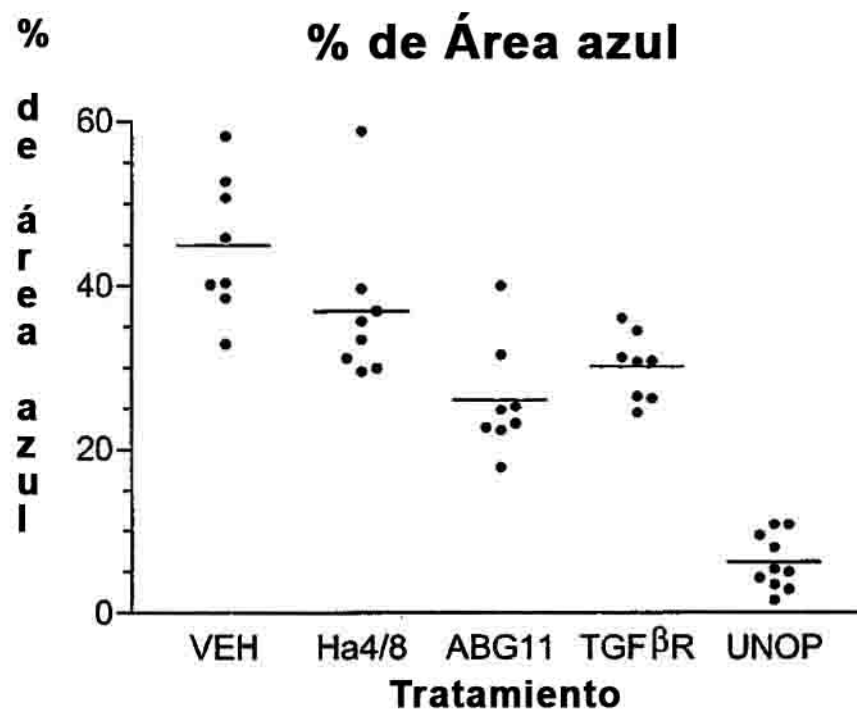
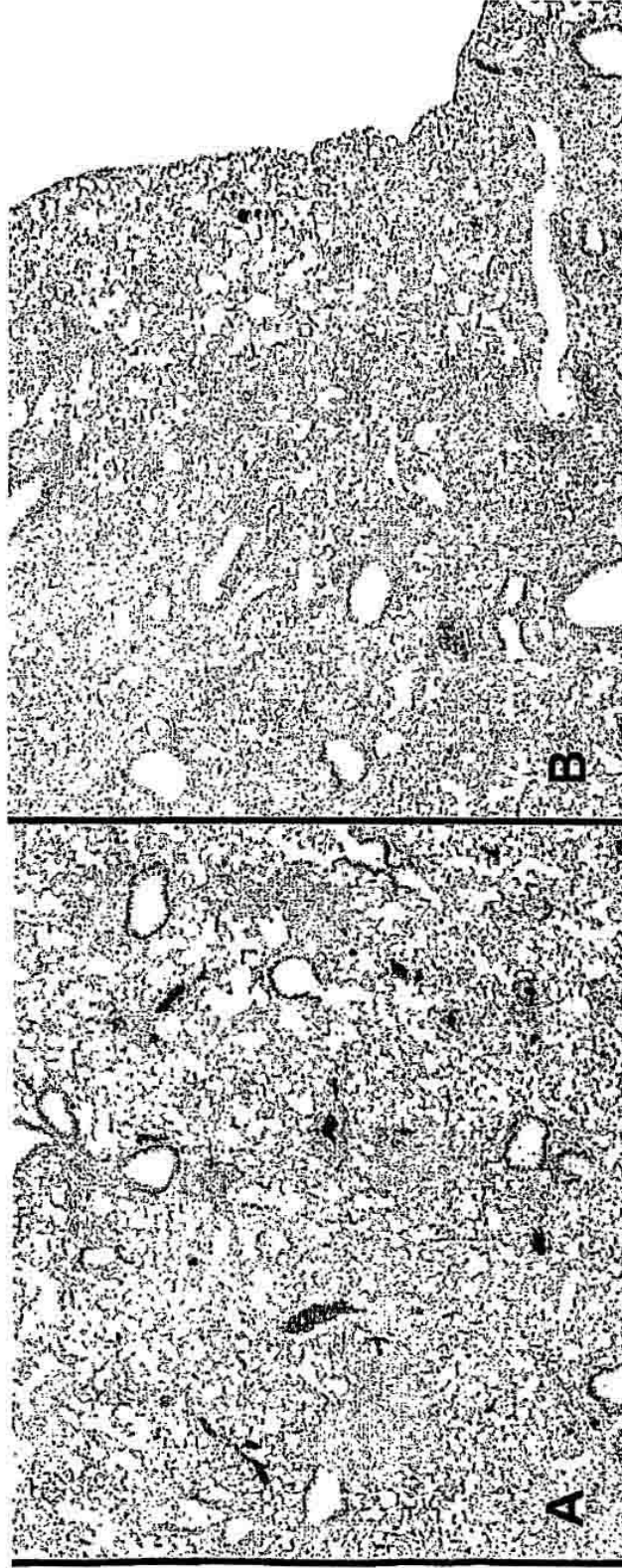


Fig. 20

Función de TWEAK en el pulmón: inflamación en ratones Tg TWEAK



Inflamación granulomatosa/infocitocitaria

A. ratón Tg FL- TWEAK

retrocruzado 4x con B6

B. ratón Tg sTWEAK HyE.

Fig. 21
ARNm de TWEAK es expresado en células de pulmón que recubren bronquiolos y alveolos

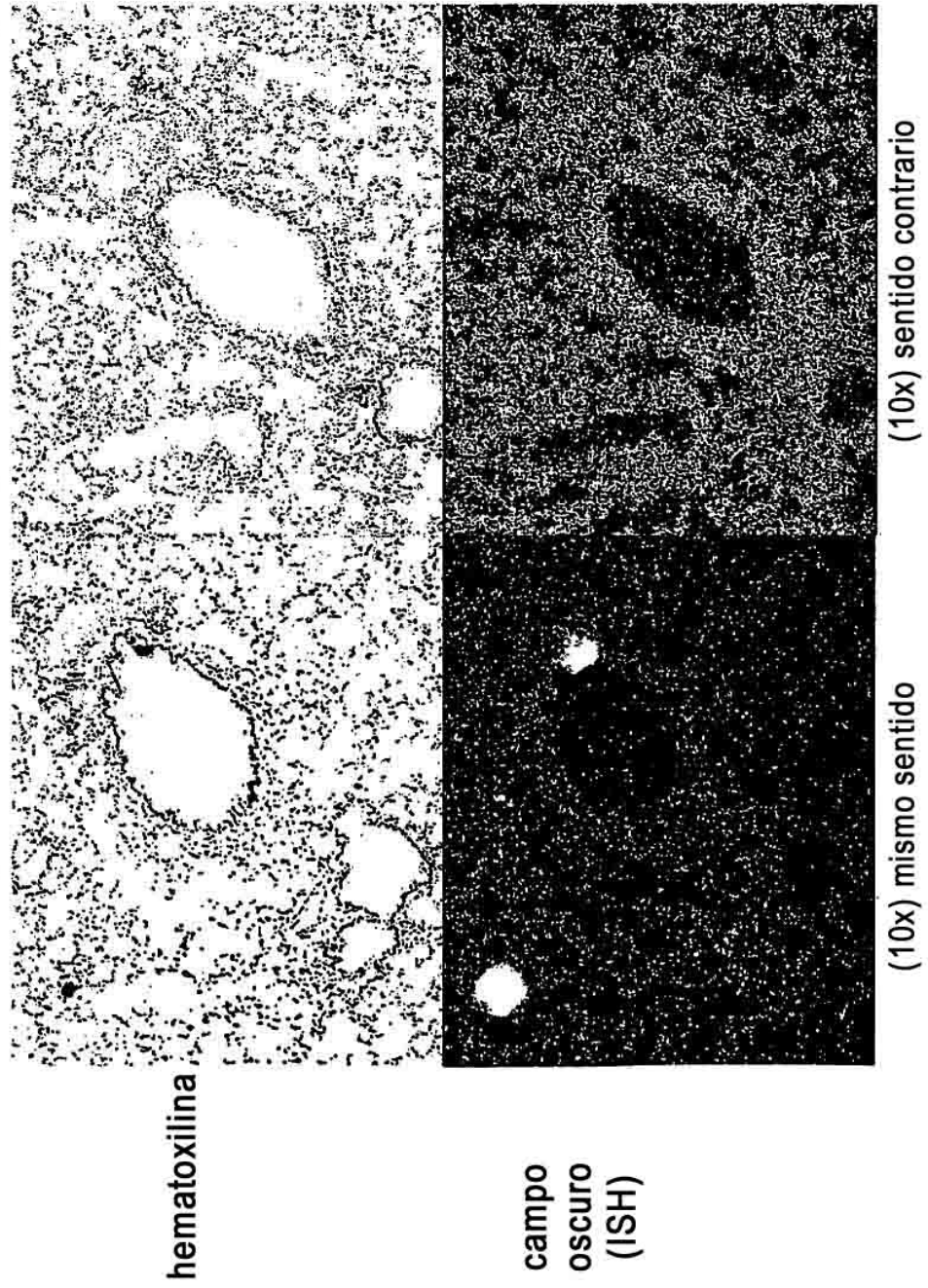


Fig. 22
Expresión de ARNm de Fn14 en células que recubren bronquiolos y alveolos

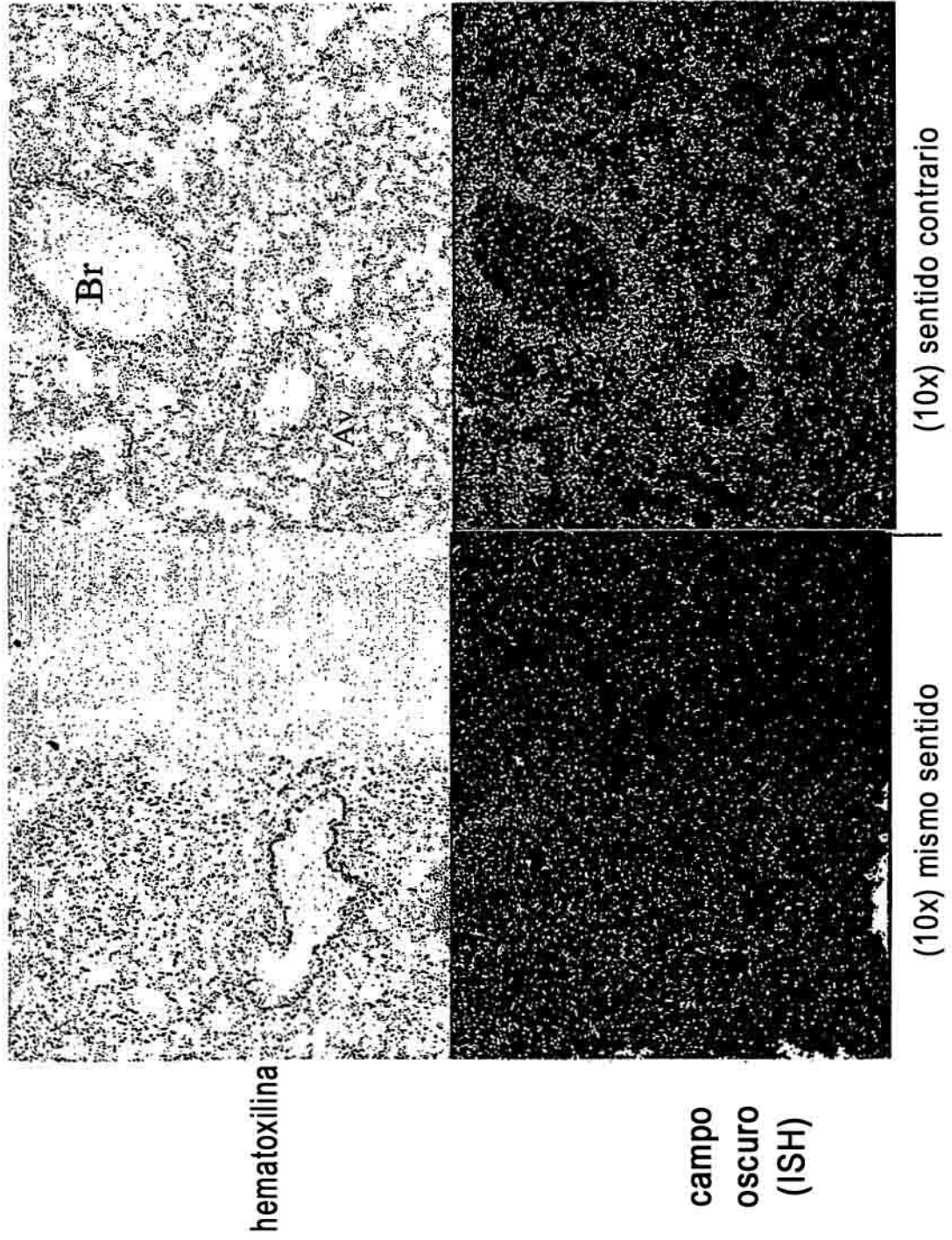


Fig. 23

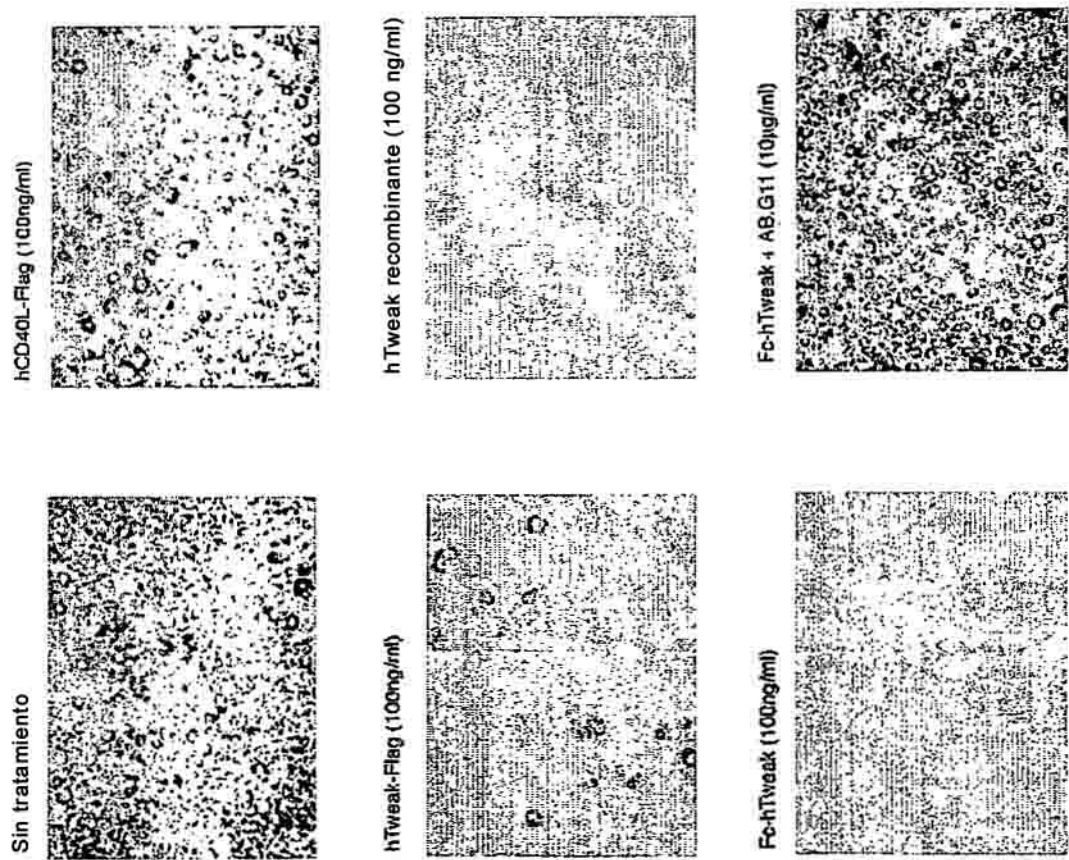


Fig. 24

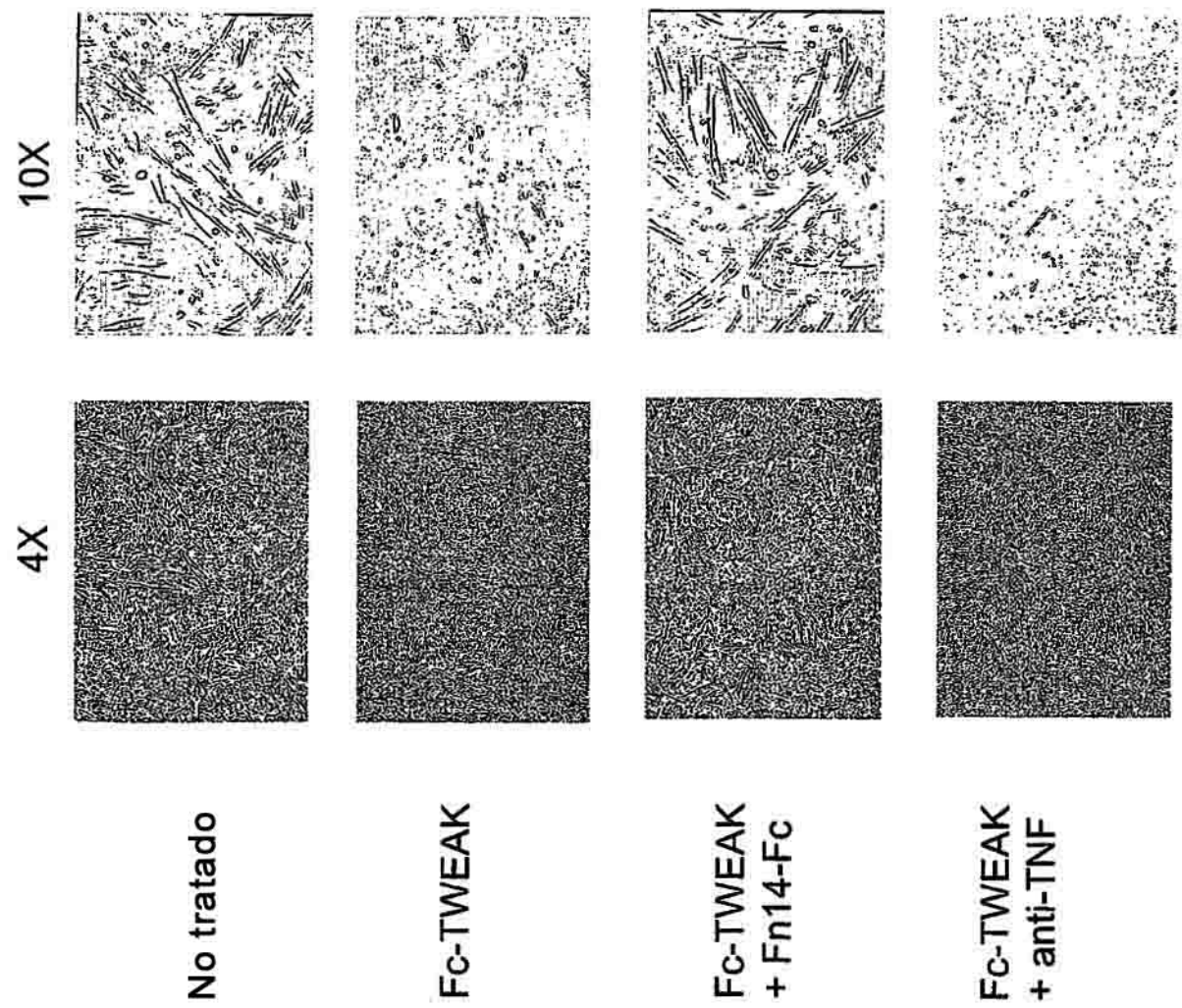


Fig. 25

