



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 830 T2** 2007.10.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 057 489 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 830.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP98/04299**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 944 236.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/016463**

(86) PCT-Anmeldetag: **25.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **08.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **03.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 38/17** (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

27943597 **26.09.1997** **JP**

(73) Patentinhaber:

Muramatsu, Takashi, Nagoya, Aichi, JP; Yoshida, Yoshihiro, Kagoshima, JP

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(72) Erfinder:

YOSHIDA, Yoshihiro, Kagoshima-shi Kagoshima 890-0032, JP; IKEMATSU, Meiji Milk Products Co., Shinya, Odawara-shi Kanagawa 250-0862, JP; SAKUMA, Meiji Milk Products Co., Sadatoshi, Odawara-shi Kanagawa 250-0862, JP; ODA, Meiji Milk Products Co., Munehiro, Odawara-shi Kanagawa 250-0862, JP

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON PROTEINEN DER MIDKINE-FAMILIE IN DER BEHANDLUNG VON ISCHÄMISCHEN KRANKHEITEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Fachgebiet

[0001] Diese Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Prävention oder Behandlung ischämischer Krankheiten mit Midkine (nachstehend als MK abgekürzt) als Wirkstoff.

Hintergrund des Fachgebiets

[0002] Ischämie ist ein Zustand, in dem der Blutfluss in örtlich begrenzten Körperteilen vollständig blockiert oder erheblich reduziert ist, was Anoxie, verminderte Bereitstellung von Substraten und Anhäufung von Stoffwechselprodukten zur Folge hat. Obwohl das Ausmaß der Ischämie vom akuten Stadium der Gefäßblockade, ihrer Dauer, der Gewebsempfindlichkeit ihr gegenüber und dem Entwicklungsgrad von Kollateralgefäßen abhängt, tritt in ischämischen Organen oder Geweben üblicherweise eine Dysfunktion auf und anhaltende Ischämie führt zu Atrophie, Denaturierung und Nekrose der betroffenen Gewebe.

[0003] Ischämische cerebrovaskuläre Schadens-Entstehungsmechanismen werden in drei Typen eingeteilt, thrombotisch, embolisch und hämodynamisch. Der hauptsächlich pathologische Zustand für alle drei Typen ist jedoch die cerebrale Ischämie, deren Schwere und Dauer das Ausmaß der cerebralen Gewebsschädigungen definiert. An der Stelle der schweren Ischämie erleiden Nerven- und Endothelzellen rasch irreversible Schäden und formen infolge von Nekrose typische Infarkt-Nidi. Obwohl der Blutfluss gemäßigt absinkt und Funktionen von Nervenzellen in der ischämischen Penumbra wiederaufgenommen werden, ist ihre Überlebenskapazität nicht verloren und das verbleibende cerebrovasculäre System kann seine Funktionen wiedererlangen, wenn die Blutzirkulation über kollaterale Gefäße wieder anfängt.

[0004] Bei der ischämischen Kardiopathie, die aus Krankheiten besteht, die die Koronararterie betreffen und eine myokardiale Ischämie verursachen, schreitet das Ausmaß des ischämischen myokardialen Zellschadens von reversibler Zellschädigung zu irreversiblen Zellschaden mit der Dauer der Blockade der Koronararterie voran.

[0005] Es ist denkbar, dass Arzneimittel zur Verhinderung einer solchen, durch Ischämie verursachten Cytopathie oder zur Stimulierung der Regeneration geschädigter Zellen eine grundlegende Therapie von cerebraler Ischämie und Herzerkrankungen bereitstellen können.

[0006] Basierend auf diesem Konzept wurden in letzter Zeit, Berichten zufolge, wirksame Arzneimittel zur Prävention und Behandlung von Nervenzell-Schädigungen nach einer vorübergehenden cerebralen Ischämie überprüft, indem Kandidaten-Substanzen für ischämische Hirnschutz-Faktoren in den Ventrikel oder die peripheren Blutgefäße injiziert und die Wirkung der Substanzen morphologisch und funktionell untersucht wurde. Die intraventrikuläre Verabreichung von z. B. Prosaposin an mongolische Wüstenrennmäuse linderte eine Lernschwäche nach Ischämie und die pathologische Betrachtung der hippocampalen CA1-Region zeigte, verglichen mit der Kontrolle, einen erheblichen Anstieg der Anzahl an Pyramidalzellen (Sand, A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 994–1000, 1994). Wie für Prosaposin wurde bewiesen, dass die intraventrikuläre Injektion von ciliarem neutropem Faktor (CNTF) und Interleukin 6 (IL-6) ebenfalls deutlich die Anzahl der Pyramidalzellen und Synapsen in der CA1-Region in Dosis abhängiger Weise erhöhte (Wen, T-C et al.: Neurosci. Lett. 191: 55–58, 1995) (Matsuda, S. et al.: Neurosci. Lett. 204: 109–112, 1996). Von der intraventrikulären Injektion von Haupt-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) wurde außerdem berichtet, gegen ischämischen Hippocampus zu schützen, obgleich nicht in der gleichen Weise wie Prosaposin, CNTF und IL-6 (Wen, T-C et al.: Neuroscience, 65: 513–521, 1995). Der Wirkungsmechanismus dieser Schutzfaktoren für ischämische Hirnerkrankungen wurden jedoch nicht im Detail geklärt.

Offenbarung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Erfindung stellt ein neues Arzneimittel, das ein Protein der Midkine (MK)-Familie als Wirkstoff umfasst, zur Behandlung und zur Prävention verschiedener, durch Zelltod, verursachter Krankheiten, bereit.

[0008] Diese Erfindung stellt im besonderen: (1) ein, ein Protein der Midkine (MK)-Familie als einem Wirkstoff umfassendes Arzneimittel zur Behandlung und Prävention von durch Ischämie verursachter Cytopathie; (2) das Arzneimittel gemäß (1), wobei die, durch Ischämie verursachte Cytopathie, im Hirnparenchym stattfindet., (3) das Arzneimittel gemäß (2), wobei das Hirnparenchym aus Pyramidalzellen in der hippocampalen CA1-Re-

gion besteht; (4) ein Arzneimittel zur Behandlung und Prävention von, durch Cythopathie infolge von Ischämie verursachten Krankheiten, das als Wirkstoff ein Protein der Midkine (MK)-Familie umfasst, wobei die durch Ischämie verursachte Krankheit ein Hirninfarkt ist.

[0009] Midkine (MK) ist ein Heparin-bindendes sekretorisches Protein, reich an basischen Aminosäuren und Cysteinen. Es wurde als Genprodukt, das vorrübergehend im, durch Retinolsäure induzierten Differenzierungsprozess embryonaler Tumorzellen, exprimiert wird, entdeckt (Kdomatsu, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 1312–1318, 1988; Tomomura, M. et al.: *J. Biol. Chem.* 265: 10765–10770, 1990; Tomomura, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 603, 1990). MK teilt mit dem später entdeckten Pleiotropin (PTN) (Merenimies, J. & Rauvala, H.: *J. Biol. Chem.* 265: 16721–16724, 1990) 45 % Homologie und MK und PTN bilden somit die MK-Familie (Muramatsu, T.: *Dev. Growth Differ.*, 36: 1–8, 1994).

[0010] Zur Funktion von MK wurden viele Daten angesammelt und seine neueren wichtigen Funktionen werden nun sehr wahrscheinlich entdeckt werden. Die Hauptfunktionen von MK schließen die folgenden fünf Funktionen ein: 1) Neurotrope Faktor-Aktivität (MK stimuliert das Überleben und den Nervenwuchs von Neurocyten (Muramatsu, H. et al.: *Dev. Biol.*, 159: 392, 1993; Michikawa, M. et al.: *J. Neurosci. Res.*, 35: 530, 1993; Kikuchi, S. et al., 160, 1993); 2) Wundheilung (MK mindert und verhindert Retinaldenaturierung durch anhaltende Bestrahlung mit weißem Licht (Unoki, K. et al.: *Ophthalmol. Vis.*, 35: 4063, 1994) und die Expression von MK wird im frühen Stadium experimentellen Hirn- und Myokard-Infarkts in Ratten in der Nähe von Infarkt-Nidi induziert (Yoshida, Y. et al.: *Dev. Brain Res.*, 85: 25–30, 1995; Obama, H. et al.: *Anticancer Research*, 18: 145–152, 1998)); 3) Ontogenese (MK wird vorübergehend mit einem Höchstwert in der mittleren Embryonalphase exprimiert und häuft sich meistens in der späten Phase in der Niere an); 4) Aktivierung des fibrinolytischen Systems (MK erhöht bei einer Konzentration von 10 ng/ml die Plasminogen-Aktivator-Wirksamkeit von, aus Rinderaorta stammenden vaskulären Endothelzellen, um das drei- bis fünffache (Kojima, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 270: 9590, 1995)); und 5) Krebs (MK wird mit hoher Frequenz im Wilms' Tumor, Brustkrebs, Lungenkrebs, Neuroblastom, Ösophagus-Krebs, Magenkrebs, Darmkrebs und Leberkrebs exprimiert (Tsutsui, J. et al.: *Cancer Res.*, 53: 1291, 1993; Garver, R. I., et al.: *Cancer*, 74: 1584, 1994; Garver, R. I., et al.: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 9:463, 1993; Nakagawa, A. et al.: *Cancer Res.*, 55: 1792, 1995; Aridome, K. et al.: *Jpn. Cancer Res.*, 86: 655, 1995).

[0011] Wie vorstehend beschrieben, wird die Expression von MK nahe den Infarkt-Nidi im frühen Stadium nach experimentellem Hirninfarkt in Ratten, exprimiert und es wurde gezeigt, dass es ausschließlich in Astrocyten exprimiert wurde (Yoshida, A., et al.: *Dev. Brain Res.*, 85: 25–30, 1995). PTN, das zusammen mit MK die Familie bildet, wird ebenso stark im Hippocampus exprimiert, hauptsächlich in der CA1-Region und meist in Astrocyten von Ratten, am vierten Tag nach Entstehung der vorrübergehenden Ischämie im Rattenvorderhirn (Takeda, A. et al.: *Neuroscience*, 68: 57–64, 1995). Üblicherweise wurde die Aktivierung der die Ischämie begleitenden Astrocyten als zellschützend verstanden. MK und PTN können eine Rolle im Reparatur-Prozess des Zentralnervensystems nach der Entwicklung einer Ischämie spielen.

[0012] Die hier genannten Erfinder nahmen an, dass MK in menschlichen Patienten mit Hirninfarkt nach Ausbruch der Erkrankung vorrübergehend exprimiert werden könnte und bestimmten MK-Konzentrationen in Serum von 150 gesunden Personen und 36 Hirninfarkt-Patienten. Für die durchschnittliche Serumkonzentration von MK findet man 0,3 ng/ml, verglichen mit 0,9 ng/ml in Patienten. Außerdem tendierten die MK Konzentrationen in den, von den Patienten, direkt nach Entwicklung der Krankheit und von Patienten, die größere Infarktbereiche aufweisen, gesammelten Serumproben, höher zu sein. Es wird angenommen, dass diese Phänomene auf die Zirkulation von, vorrübergehend nahe der ischämischen Region exprimierten MK, zurückzuführen sind.

[0013] Kürzlich wurde von der gesteigerten Expression verschiedener neurotroper Faktoren in, durch Trauma, Ischämie etc. verursachten Nervenschädigungen, berichtet (Frautschy, S. A. et al.: *Brain Res.*, 553: 291, 1991; Haynes, L. W.: *Neurobiol.*, 2: 263, 1988). Diese neurotrophen Faktoren sind wahrscheinlich in Reparaturmechanismen von Nervenschädigungen involviert und agieren auf Nervenzellen entweder direkt oder indirekt über Gliocyten, um eine wichtige Rolle in ihrem Überleben und ihrer Reparatur zu spielen.

[0014] Basierend auf diesen Berichten, untersuchten die hier genannten Erfinder unter Verwendung eines experimentellen Modells der cerebralen Ischämie, ob MK, wie andere neurotrope Faktoren, in Reparaturmechanismen von Nervenschädigungen involviert ist. MK wurde mongolischen Wüstenrennmäusen, einem solchen Modell, intraventrikulär vor und nach der Operation injiziert um Ischämie zu entwickeln, um die unterdrückenden Effekte von MK auf die Abstoßung (Deciduation) von hippocampalen CA1 Nervenzellen morphologisch zu untersuchen. Weil die Anastomose des inneren Carotis-Arterien- und des Vertebral-Arterien-Systems in mongolischen Wüstenrennmäusen im Alter von acht Wochen rückgängig gemacht wird, kann ein ausgezeichnetes

Modell für eine unvollständige Vorderhirn-Ischämie leicht durch die Blockierung der bilateralen gemeinen Carotis-Arterien durch Klemmen für drei bis fünf Minuten hergestellt werden, sodass eine bestimmte Denaturierung von Nervenzellen (verzögerter Tod von Neurocyten) in einer spezifischen Region (hippocampale CA1-Region) innerhalb von 48 bis 72 Stunden durch auf Ischämie folgende Rückperfusion, hervorgerufen wird. Daher ist ein vorübergehendes Vorderhirn-Ischämie-Modell der mongolischen Wüstenrennmäuse nützlich, um schützende Faktoren für das ischämische Hirn zu untersuchen (Kirino, T. et al.: Brain Res. 237: 57–69, 1982; Mitani, A. et al.: Neurosci. Lett. 131: 171–174, 1991).

[0015] MK wurde intraventrikulär in mongolische Wüstenrennmäuse vor der ischämischen Operation injiziert, um seine schützenden Wirkungen auf das ischämische Hirn zu untersuchen. Es wurde ein 2 mm tiefes Loch, 2 mm von der Bregma einer mongolischen Wüstenrennmaus aus gemacht und MK (0,063, 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0 µg), PTN (0,5, 1,0 und 2,0 µg) oder zum Vergleich bFGF (1,0 und 2,0 µg), der bekannt dafür ist, schützende Effekte auf das ischämische Hirn zu haben, enthaltende Kochsalzlösung den Tieren intraventrikulär injiziert.

[0016] Nach vier Minuten wurden die bilateralen gemeinen Carotis-Arterien abgebunden, um den Kreislauf für fünf Minuten zu blockieren, um so ein vorübergehend ischämisches Vorderhirn-Modell herzustellen. 96 Stunden oder sieben Tage nach Wiederaufnahme der Blutzirkulation, wurde das Hirn ausgeschnitten und unter Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Vom so präparierten Paraffinblock, wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um die Anzahl lebensfähiger Neurocyten pro 1 mm der linken hippocampalen CA1-Region zu zählen. Wie in den Tabellen 1 und 2 gezeigt, wurde die Abstoßung von hippocampalen CA1-Neurocyten in der MK (0,5 µg und mehr) verabreichten Gruppe und in der PTN (2,0 µg oder mehr) verabreichte Gruppe signifikant unterdrückt, verglichen mit der Kontrollgruppe (Injektion von physiologischer Kochsalzlösung) Im Vergleich zur Kontrollgruppe, unterdrückt bFGF signifikant die Abstoßung von hippocampalen CA1-Neurocyten bei einer Konzentration von 2,0 µg oder mehr. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die vorherige Verabreichung von MK oder PTN in den Ventrikel, durch Ischämie und die nachfolgende Perfusion verursachte Hirnzellschädigungen, unterdrücken kann.

[0017] Außerdem wurde MK mongolischen Wüstenrennmäusen nach der ischämischen Operation intraventrikulär verabreicht, um seine schützenden Effekte auf das ischämische Hirn zu untersuchen. Nach der, wie vorstehend beschrieben konstruierten vorübergehenden Vorderhirn-Ischämie, wurde die Blutzirkulation wieder aufgenommen und 48 Stunden später wurde MK intraventrikulär, in der gleichen, wie vorstehend beschrieben Weise, injiziert. Am Tag sieben nach Injektion wurden 5 µm dicke Schnitte ähnlich wie vorstehend beschrieben hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, um die Anzahl lebensfähiger Neurocyten pro Millimeter der Region der linken hippocampalen CA1 Nervenzellen zu zählen. Es wurden etwa 160 lebensfähige Nervenzellen pro mm des Hippocampus beobachtet (Beispiel 1.2). Diese Anzahl lebensfähiger Zellen ist in etwa die gleiche, wie bei Verabreichung von 0,5 µg MK unmittelbar vor der ischämischen Operation.

[0018] Gehirnaktivität auf hoher Ebene, wie Gedächtnis oder Lernen ist definitiv die Basis geistiger Aktivität beim Menschen. Deshalb ist die Entwicklung von Medikamenten, die in der Lage sind, Gedächtnis- und Lern-Behinderungen zu reduzieren zu einem der meistinteressierenden Aufgaben der Neurowissenschaft geworden. Viele experimentelle Modelle für Gedächtnis- und Lern-Behinderung sind bekannt und die Testverfahren dafür sind extrem verschieden. Ein solcher Test, der passive Vermeidungs-Lern-Test wird häufig mit Mäusen verwendet.

[0019] Ankommend bei dieser Erfindung, wurden sich die hier genannten Erfinder klar, dass die intraventrikuläre Verabreichung von MK oder PTN innerhalb einer bestimmten Periode vor oder nach einer vorübergehenden Vorderhirn-Ischämie-Operation, verglichen mit der Kontrollgruppe, die Abstoßung von hippocampalen CA1 Neurocyten signifikant unterdrückt. Außerdem korreliert die Anzahl der hippocampalen Neurocyten, Berichten zufolge, gut mit der Verbesserung der Antwort-Verzögerungszeit im passiven Vermeidungs-Lern-Test vom Step-Down-Typ (Araki, H. et al.: Physiol. Behav. 38: 89–94, 1986; Sano, A. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 994–1000; Wen, T.-C. et al.: Neuroscience, 65: 513–521; Wen, T.-C. et al.: Neurosci. Lett. 191: 55–58). Deshalb kann die Antwort-Verzögerungszeit durch intraventrikuläre Injektion von MK oder PTN vor oder nach ischämischer Belastung verbessert werden.

[0020] Die Tatsache, dass hippocampale CA1 Neurocyten am leichtesten durch cerebrale Ischämie geschädigt werden können und die nachfolgende Perfusion die experimentellen Ergebnisse, dass die Abstoßung von hippocampalen CA1 Neurocyten in, vor oder nach Ischämie mit MK oder PTN injizierten Tiergruppen, verglichen mit Kontrollgruppen, signifikant unterdrückt wurde und der Bericht, der andeutet, dass MK oder PTN die Antwort-Verzögerungszeit im passiven Vermeidungs-Lern-Test vom Step-Down-Typ verbessert, all das deutet

darauf hin, dass von MK oder PTN erwartet werden kann, sowohl für die Prävention, als auch für die Behandlung von, durch cerebrale Ischämie und nachfolgende Perfusion verursachter Neurocyten-Schädigung und zur Verbesserung geistiger Krankheiten nützlich zu sein, was der endgültige Zweck dieser Heilmittel ist.

[0021] Außerdem enthüllt nachstehendes Beispiel 3, dass im Fall einer Nervenzellschädigung, die sowohl durch ischämischen Stress, als auch durch anderen Stress, wie traumatischen Stress, verursacht wird, MK als Antwort auf das frühe Stadium solch einer Schädigung nahe der geschädigten Stellen exprimiert wird. Deshalb kann MK oder PTN verwendet werden, um verschiedene craniale Nerverkrankungen zu verhindern oder zu behandeln, durch direkte Verhinderung der Dysfunktion und dem Zelltod von Neurocyten insgesamt oder in spezifischen Regionen fundamentaler Ursachen wie Ischämie, Trauma, Alterung oder nicht erklärbarer Ursachen und durch die Stimulation der Regeneration der geschädigten Neurocyten. Außerdem kann die Verwendung von MK in Kombination mit anderen neurotrophen Faktoren, wie bFGF, die verschiedene Wirkungsmechanismen besitzen, einen synergistischen oder zusätzliche schützende Effekte produzieren, um den, durch Ischämie oder Stress verursachten Tod von Neurocyten zu verhindern. Spezifische Krankheiten, die behandelt werden sollen, können Hirninfarkt, vorübergehende cerebrale Ischämie, auf cerebrovaskulären Krampf zurückzuführende Encephalopathie, wie als Folge subarachnoider Hämorrhagie, senile Demenz und Encephalopathie zum Zeitpunkt der Anabiose nach Herzstillstand.

[0022] Die hier genannten Erfinder konstruierten auch ein experimentelles Herzinfarkt-Modell durch Abbinden der linken absteigenden Koronar-Arterie einer Ratte, um die MK-Expression in Herzzellen durch immunhistochemische Färbung zu detektieren (Obama, H., et al.: *Anticancer Research*, 18: 145-152, 1998). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von MK in den meisten Herzzellen in einem normalen Herzen nicht beobachtet wurde, aber in Herzzellen an mehreren, den Ventrikel überziehenden Stellen beobachtet wurde ([Fig. 4](#) und [Fig. 5](#)). Im Gegenteil dazu wurde eine starke Expression von MK in dem Herzinfarkt-Modell an der Wand des rechten Ventrikels (RV), dem Septum und dem Endokard der, dem rechten Ventrikel (LV) zugewandten Wand des linken Ventrikels, beobachtet ([Fig. 6](#)). Andere Regionen der linken ventrikulären Wand, die mit der Region des Zelltods korrespondiert, wurden nicht gefärbt. Die Spezifität dieser MK-Färbung wurde bekräftigt, weil die MK-Färbung verschwand, nachdem MK durch einen Anti-MK-Antikörper absorbiert wurde ([Fig. 7](#)). So zeigten die hier genannten Erfinder immunhistochemisch die deutliche Expression von MK bei Herzinfarkt. Überraschenderweise wurde die bemerkenswert intensive MK-Färbung nicht nur in dem an die Infarktstelle des linken Ventrikels angrenzenden Bereich, sondern auch im gesamten RV und den meisten Regionen des Septums ([Fig. 6](#)) beobachtet.

[0023] Gefärbte und ungefärbte Bereiche sind durch eine klare Linie geteilt, die mit der Grenze zwischen den Bereichen der Koronararterien übereinstimmt. Interessanterweise unterscheidet sich das Expressionsmuster von MK in einem Herzinfarkt-Modell von dem von bFGF im gleichen Modell (in der Figur nicht gezeigt).

[0024] Die detailliertere Untersuchung der MK-Expression in einem Infarkt-Modell zeigte das Auftreten von MK-Färbung in dem RV ([Fig. 8](#)) und Septum ([Fig. 9](#)) (durch einen Pfeil und eine Pfeilspitze angedeutet). Das Septum wurde extensiv vergrößert und intensive Färbung wurde an Kapillaren oder der Penumbra von, das Kapillarendothel überziehenden Myokardzellen, beobachtet ([Fig. 10](#)). Das Innere der Myokardzellen ist auch intensiv gefärbt (angezeigt durch ein Sternchen). Der gefärbte Bereich war deutlich von der ungefärbten Region durch die Grenze zwischen dem Septum und LV getrennt ([Fig. 10](#)). Wie vorstehend beschrieben wurde im LV nur eine schwache und ungleichmäßige MK-Färbung beobachtet, außer für Endomyokardzellen ([Fig. 12](#)).

[0025] Ein Vergleich der mRNA-Expression im RV und Septum des Infarktmodells und normalen Ratten durch Northern-Blot-Analyse, machte deutlich, dass der gesteigerte mRNA Spiegel in Ratten des Infarktmodells nachweisbar ist. Zusätzlich zu der 1,0 kb MK-mRNA, wurde eine 1,8 kb Bande, die mit der MK-cDNA reagiert, detektiert. Diese 1,8 kb Bande könnte eine Isoform von MK-mRNA sein. Diese Ergebnisse deuten an an, dass die gesteigerte MK Immunreaktivität im Herzen kurz nach dem Infarkt durch eine stabile Erhöhung der Transkriptionsaktivität von mRNA verursacht wird.

[0026] Die MK-Expression wird im, durch Abbinden der linken vorderen Koronararterie (LAD) einer Ratte verursachten Myokard-Infarkt, beachtlich gesteigert. Diese Steigerung wird vermehrter MK-mRNA zugeschrieben und wird im frühen Stadium, innerhalb von sechs Stunden nach Infarkt, hervorgerufen. Trotz einer MK-Expression in einem breiten Bereich eines Infarkttherzens, wird seine Expression in, für den Zelltod bestimmten Regionen, nicht detektiert, was darauf hindeutet, dass MK an der Reparatur von geschädigtem Herzgewebe beteiligt ist.

[0027] Unter Einbeziehung der Tatsache dass, wie vorstehend beschrieben, MK im ödematösen Bereich

nahe nekrotischen Stellen kurz nach einem Hirninfarkt, exprimiert wird, deutet die Expression von MK auf seine mögliche Beteiligung an der Reparatur oder dem Heilungsprozess unter verschiedenen pathologischen Bedingungen hin. In der Tat wurde gezeigt, dass eine vorherige Verabreichung von MK die, durch kontinuierliches Aussetzen von Lichteinstrahlung, verursachte retinale Denaturierung verhindert (Unoki, K., et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35: 4063–4068, 1994).

[0028] Die bFGF-Expression ist mit dem Myokardinfarkt assoziiert und besitzt eine herzschützende Wirkung (Speir, E., et al.: *Circ. Res.*, 71: 215–259, 1992). Die hier genannten Erfinder konnten jedoch klar zeigen, dass, unter den von uns gewählten experimentellen Bedingungen, MK stärker exprimiert wurde als bFGF. MK und bFGF erhöhen gemeinschaftlich die Wirksamkeit des Plasminogen-Aktivators in Endothelzellen der Aorta (Kojima, S., et al.: *J. Biol. Chem.*, 270: 9590–9596, 1995). Sie steigern auch die Proliferation von mesenchymalen Zellen des Zahnes (Mitssiadis, T. A., et al.: *J. Cell Biol.*, 129: 267–281, 1995). Deshalb können sie auch gemeinsam bei der Reparatur beschädigter Herzgewebe wirken.

[0029] Zusätzlich haben die hier genannten Erfinder gefunden, dass MK auch schwach in Myokardzellen und stark im Endokard normaler Herzen exprimiert wird. Diese örtlich beschränkte Expression von MK ähnelt der von bFGF (Speir, E., et al.: *Circ. Res.*, 71: 215–259, 1992), aber ihre erhöhten Expressionsmuster nach Infarkt, unterscheiden sich voneinander. Es wird vermutet, dass bFGF an der Förderung der DNA-Synthese, der Überlebensstimulierung, Verzögerung der Alterung und der Regulierung der Wanderung und Produktion der extrazellulären Matrix in normalen Myokardzellen beteiligt ist (Speir, E., et al.: *Circ. Res.*, 71: 215–259, 1992). MK könnte ähnliche Rollen im Herzen spielen. Die MK-Expression wird nach einem Herzinfarkt in Bereichen, die nicht nur proximal, sondern auch distal zu der Infarktregion liegen, gesteigert. Diese gesteigerte Expression von MK wird nicht nur in den Ventrikeln, sondern auch in den Wänden der Arterie, nachgewiesen.

[0030] Aus diesen Tatsachen wird offensichtlich, dass MK sowohl in der Entwicklung, als auch bei der Reparatur des Herzens wichtige Rollen spielt, was auf die Möglichkeit hinweist, dass eine Abnormalität in der Expression von MK oder des Signal-Transduktions-Systems verschiedene Krankheiten, einschließlich Herzerkrankungen, verursachen kann. MK ist deshalb vermutlich als Medikament zur Prävention oder Behandlung ischämischer Herzerkrankungen, wie dem Myokardinfarkt, die zu myokardialer Nekrose, die auf die Blockierung der Koronararterie oder akute Reduktion der Blutzirkulation, zurückzuführen ist, nützlich. Außerdem können MK oder PTN als Medikament zur Prävention oder Behandlung einer Gruppe anderer, durch, auf Ischämie und Stress, wie ischämische Colitis oder Verschluss der Mesenterialarterie, verursacht durch Störungen der Blutzirkulation im Verdauungstrakt, zurückzuführende Cythopathie verursachte Erkrankungen, verwendet werden.

[0031] Das zur Behandlung oder zur Prävention von Krankheiten, die auf durch Ischämie verursachte Cythopathie zurückzuführen sind verwendete MK oder PTN dieser Erfindung, ist vorzugsweise ein humanes rekombinantes MK oder PTN oder partielle Peptidfragmente davon, die ihre biologischen Wirkungen aufweisen. Natives MK ist nicht glykosiliert, daher wird nicht glykosiliertes MK in der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Solch ein MK schließt humanes MK, das aus 121 Aminosäureresten besteht, ein, aber seine Aminosäuresequenz ist nicht darauf beschränkt (Muramatsu, T.: *Develop. Growth & Differ.* 36: 1–8, 1994).

[0032] Im MK der Maus wird ein Signalpeptid von einem, aus 139 Aminosäureresten bestehendem Vorläuferprotein, abgespalten, um das reife MK zu ergeben (bestehend aus 118 Aminosäureresten mit einem Molekulargewicht von 13 kDa). 30 dieser Aminosäurereste sind basische Aminosäuren und 10 sind Cysteinreste. Fünf, durch die Cysteinreste gebildete Disulfid-Brücken, formen zwei Domänen an den N- und C-Enden. Diese zwei Domänen unterscheiden sich in ihren biochemischen und biologischen Eigenschaften und können vielleicht verschiedene Rollen in der funktionellen Expression in vivo spielen. Die Heparin bindende Fähigkeit ist an der C-terminalen Seite höher, als auf der N-terminalen Seite (Muramatsu, H., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203: 1131, 1994). Die Fähigkeiten zum Neurit-Auswuchs und Stimulation der Fibrinolyse sind hauptsächlich an den C-Terminus gebunden (Muramatsu, H., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203: 1131, 1994; Kojima, S., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206: 468, 1995). Deshalb werden auch partielle Polypeptidfragmente, die dem MK innewohnenden biologischen Wirkungen besitzen, in diese Erfindung eingeschlossen.

[0033] In der Aminosäuresequenz des humanen MK können spezifische Aminosäure(n) unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken leicht deletiert, inseriert oder substituiert werden, um die Wirkungen der Medikamente dieser Erfindung zu steigern, oder um ihre Sicherheit zu verbessern. Eine Aminosäure an einer spezifischen Stelle kann z. B. durch seine gleichwertige Aminosäure chemisch substituiert werden. Eine hydrophobe Aminosäure (wie Ala) kann spezifisch sowohl durch eine andere Aminosäure mit vergleichbarer Hy-

drophobizität (wie Gly), als auch durch eine Aminosäure höherer Hydrophobizität (wie Val, Leu oder Ile) ersetzt werden. In gleicher Weise kann ein negativ geladener Aminosäurerest durch eine andere Aminosäure (z. B. Ersatz von Asp durch Glu), oder ein positiv geladener Aminosäurerest durch eine andere Aminosäure (z. B. Ersatz von Lys gegen Arg) ersetzt werden. Da die C-terminale Hälfte von MK, z. B. die Positionen 60–121 (C-Hälfte 60-121) oder die Positionen 62-104 des C-Endes (C-Hälfte 62-104) (Muramatsu, H. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 1131–1139, 1994) die Fähigkeit zum Neurit-Auswuchs trägt und die Heparin-Bindungsstelle enthält, können sie zusätzlich nützlich für die Medikamente dieser Erfindung sein. Es ist auch wünschenswert, eine hydrophobe Aminosäure in eine geladene Aminosäure abzuändern, solange solch eine Änderung keine unerwünschte Wirkung auf die biologische Aktivität von MK hat. Fachleute können die vorstehenden Modifizierungen durchführen, sodass MK die bevorzugten biologischen Aktivitäten besitzt. Wie proteinöse Medikamente oft, können MK und PTN aufgrund des Angriffs durch Proteasen und Wechselwirkungen mit unnötigen Rezeptoren ihre Effizienz nicht zeigen. Deshalb kann die Stabilität von MK und PTN in vivo durch Konjugation mit Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylpyrrolidon, Dextran etc., erhöht werden. Die Hybridisierung von II-6 mit PEG verlängerte z. B. den Aufenthalt von II-6 im Blutstrom. Diese Erfindung schließt solch chemisch modifiziertes MK und PTN ein. Der hier verwendete Begriff „Midkine“ oder „MK“ schließt alle solchen modifizierten und veränderten MKs ein, so lange sie die ursprünglichen biologischen Wirkungen von MK beibehalten. Der hier verwendete Begriff „MK-Familie“ umfasst alle, zu dieser Familie gehörenden, modifizierten und veränderten Proteine (MK und PTN), so lange sie ihre innewohnenden biologischen Aktivitäten aufweisen.

[0034] Ein Protein der MK-Familie der vorliegenden Erfindung kann direkt verabreicht werden, um einen Hirninfarkt, Myokardinfarkt, ischämische Colitis, Verschluss der oberen Mesenterialarterie etc. zu verhindern oder zu behandeln. Alternativ kann es auch in einem, den Wirkstoff enthaltenden Arzneimittel, durch bekannte präparative Methoden formuliert werden. Es kann z. B. in pharmazeutische Präparate, die für eine effektive Verabreichung an menschliche Probanden geeignet sind, formuliert werden. Das schließt eine Injektion, Präparate für eine Naseninhalation, perkutane Absorption, orale Verabreichung, etc., vorzugsweise Injektion ein. Die Präparate werden zusammen mit pharmazeutisch verträglichen Trägern oder Medien, wie sterilisiertem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung, Pflanzenöl (z. B. Sesamöl, Olivenöl etc.), Farbstoff, Emulgator (z. B. Cholesterin), Dispergiemittel (z. B. Gummi arabicum), oberflächenaktivem Mittel (z. B. hydriertes Polyoxyethylen-Castoröl Tensid), Lösungsmittel (z. B. Natriumphosphat), Stabilisator (z. B. Zucker, Zuckeralkohol und Albumin), Konservierungsmittel (Paraben) etc. verabreicht. Injizierbare Präparate können in Form von Lyophilisaten, wässriger Lösung und Produkten, die in einer osmotischen Pumpe versiegelt sind, geliefert werden. Arzneimittel dieser Erfindung enthalten MK oder PTN, die direkt mit dem Hirnparenchym und den Myokardzellen agieren, um ihre Wirksamkeit zu zeigen. So können die Präparate dieser Erfindung im Gegensatz zu nosotropen Medikamenten, so wie konventionell verwendeten Stimulatoren des Hirnstoffwechsels und die Hirndurchblutung verbessernden Mitteln, verwendet werden, um verschiedene craniale Nervenerkrankungen durch direkte Verhinderung der Dysfunktion, Denaturierung und Nekrose von Nervenzellen insgesamt oder in spezifischen Regionen, die auf grundlegende Ursachen wie Ischämie, Trauma und Alterung oder nicht erklärbare Ursachen zurückzuführen sind und durch Stimulierung der Regeneration von geschädigten Nervenzellen, behandelt werden.

[0035] Die vorstehenden Erkrankungen können durch Genterapie, durch die Steigerung der Expression von MK- oder PTN-Protein an ischämisch erkrankten Stellen unter Verwendung der Promotor-Region des MK- oder PTN-Gens, behandelt werden.

[0036] Die Arzneimittel dieser Erfindung können injiziert werden, z. B. bei einer Tagesdosis von etwa 0,001 bis 100 µg/kg MK- oder PTN-Protein, eingeteilt in eine bis sechs Dosen, intraarteriell, intravenös, intramuskulär, subkutan, intraventrikulär oder intraspinal. Die Zusammensetzung kann auch direkt in den Ventrikel und die Meninx mittels eines dort eingesetzten Katheters zugeführt werden. Alternativ kann es in eine osmotische Druckpumpe aufgenommen werden und kontinuierlich mittels der in den Körper implantierten Pumpe verabreicht werden.

[0037] Es wurde berichtet, dass die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke vorübergehend durch Infusion einer hypotonen Lösung aus Mannitol, Harnstoff etc. über die Karotisarterie aufgehoben wird (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 481–485, 1979) und dass einige Substanzen (das heißt Alkyglycerol) den intracerebralen Transfer von anderen Medikamenten fördern. Das Arzneimittel dieser Erfindung kann ebenfalls unter Verwendung dieser Techniken verabreicht werden. Außerdem wurde von der Möglichkeit der intracerebralen Aufnahme von kationisiertem Albumin durch einige Mechanismen berichtet (J. Clin. Invest. 70: 289–295, 1982). MK- oder PTN-Proteine können, nach chemischer Modifikation durch eine solche Methode verabreicht werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0038] [Fig. 1](#) zeigt Mikrofotografien ($\times 10$) von Hirnzellen zwei Tage nach dem sie mit Trockeneis behandelt wurden. A zeigt die Zellen in dem Infarktbereich durch die Trockeneisbehandlung und seine mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Umgebung (H-E Färbung). B zeigt ein Bild eines H-E gefärbten, stark geschädigten Infarkt-bereichs. C zeigt ein Bild eines ähnlichen Bereichs wie B, gefärbt mit einem Anti-MK-Antikörper.

[0039] [Fig. 2](#) zeigt eine Mikrofotografie von Hirnzellen zwei Tage nach Behandlung mit Trockeneis. D ist ein vergrößertes ($\times 50$) Bild von Zellen nahe des Infarktbereichs, die mit einem Anti-MK-Antikörper reagieren. E zeigt einen ähnlichen Bereich wie D, Apoptose-gefärbt durch die TUNEL-Methode (unter Verwendung eines TaKaRa In situ Apoptose Detektions Kits). Es werden auf die TUNEL-Reaktion positive Zellen beobachtet, die mit Apoptose enden, gefolgt von Fragmentierung des Nukleus.

[0040] [Fig. 3](#) zeigt Fotos von Hirnzellen einer Kopftrauma-Modellratte. A, C und E sind mit H-E gefärbt. B, D und F sind Bilder, die A, C und E entsprechen, gefärbt mit einem Anti-MK-Antikörper. Die Vergrößerungen sind 25-fach für A und B und 100-fach für C, D, E und F.

[0041] [Fig. 4](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK in einem normalen Herzen zeigt.

[0042] [Fig. 5](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK in einem normalen Herzen zeigt.

[0043] [Fig. 6](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK in einem Rattenherzen nach der Obstruktion der linken vorderen absteigenden Koronararterie zeigt.

[0044] [Fig. 7](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK in einer Kontrolle des Rattenherzens nach der Obstruktion der linken vorderen absteigenden Koronararterie zeigt.

[0045] [Fig. 8](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK an der rechten ventrikulären Wand eines Rattenherzens zeigt, sechs Stunden nach der Erzeugung eines Myokardinfarkts.

[0046] [Fig. 9](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK im Septum eines Rattenherzens sechs Stunden nach der Erzeugung des Myokardinfarkts, zeigt.

[0047] [Fig. 10](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK im Grenzbereich des Septums und der ventrikulären Wand und der linken ventrikulären Wand mit der Infarktstelle eines Rattenherzens sechs Stunden nach der Erzeugung eines Myokardinfarkts, zeigt.

[0048] [Fig. 11](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK im Septum eines Rattenherzens sechs Stunden nach der Erzeugung eines Myokardinfarkts zeigt.

[0049] [Fig. 12](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK in der linken ventrikulären Wand eines Rattenherzens, sechs Stunden nach der Erzeugung eines Myokardinfarkts zeigt.

[0050] [Fig. 13](#) ist eine Mikrofotografie, die die Verteilung von MK im Endokard des linken Ventrikels eines Rattenherzens, sechs Stunden nach der Erzeugung eines Myokardinfarkts zeigt.

[0051] [Fig. 14](#) ist eine graphische Darstellung, die das Ergebnis periodischer Messungen der MK-Konzentration im Serum eines Myokardinfarkt-Patienten zeigt.

[0052] [Fig. 15](#) ist eine graphische Darstellung, die das Ergebnis periodischer Messungen der MK-Konzentration im Serum eines Hirninfarkt-Patienten zeigt.

Die beste Methode zur Ausführung der Erfindung

Beispiel 1 Bewertung von Faktoren, die das ischämische Hirn schützen in einem vorübergehenden Vorderhirn-Ischämie-Modell

1.1 Verabreichung von Faktoren, die das ischämische Hirn schützen vor einer ischämische Operation

1.1.1 Schutz des ischämischen Hirns durch MK

[0053] Rekombinantes humanes MK wurde nach der in Beispiel 1 der ungeprüften veröffentlichten japanischen Patentanmeldung (JP-A), Nr. Hei 9-95454 beschriebenen Methode hergestellt und in Beispiel 1.1.2 und Beispiel 1.2. verwendet. Sechs bis 16 männliche mongolische Wüstenrennmäuse (sechs bis acht Wochen alt, 60 bis 80 g schwer) für jede Gruppe wurden in ein „HONEYMATIC M-3“ (KIMURA MEDICAL INSTRUMENT LTD.), ein Betäubungsmittel-Fütterungssystem für Fluothan (Halothan in der japanischen Pharmakopöe) gesetzt und durch angemessene Befüllung des Behälters mit einem Inhalations-Anästhetikum, Fluothan, anästhesiert. Eine mongolische Wüstenrennmaus wurde auf einem, mit einer Einblaseapparatur NARISHIGE SCIENTIFIC INSTRUMENT LAB.:TYP SR-5N, Nr. 97924) ausgestatteten Operationstisch fixiert. Nachdem der Kopf einem Mittellinien-Einschnitt unterworfen wurde, wurde ein Loch zur Einsetzung einer Spritze geeigneter Größe durch einen Dentalbohrer, 2 mm von der Stelle der Bregma in Richtung des linken Augapfels, erzeugt. Durch dieses Loch wurden mit einer Mikrospritze (HAMILTON MIKROLITER #701) 2 µl MK-Lösung 0,5 mg/ml, 1 mg/ml oder 2 mg/ml (0,5 µg, 1,0 µg, 2,0 µg) (in physiologischer Kochsalzlösung) in den Ventrikel injiziert. Eine Kochsalzlösung (japanische Pharmakopöe, physiologisches Kochsalz, Otsuka physiologische Kochsalzinjektion, Otsuka Arzneimittel) verabreichte Gruppe und die Imitations-Operationsgruppe (Sham-op) wurden als Kontrollgruppen bereitgestellt. Nachdem diese Lösungen in den Ventrikel injiziert wurden, wurden die Tiere für 4 Minuten liegen gelassen und die Operationsstelle genäht. Der Brustkorb wurde einem Mittellinienschnitt unterworfen, um sowohl die rechte, wie auch die linke gemeine Arteria carotis bloß zu legen. Beide Arterien wurden mit „Nr. 23 artery Kremmer straight“ abgebunden, um den Blutfluss für 5 Minuten zu stoppen, danach ließ man das Blut wieder zirkulieren. Während der ischämischen Belastung, wurden die Hirn- und Körpertemperatur konstant gehalten ($37 \pm 0,2$ °C). Das Einzelwesen wurde gekennzeichnet und nach dem Erwachen aus der Narkose im Pflegekäfig untergebracht. Die Tiere wurden gefüttert und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Nach 96 Stunden wurden die Tiere durch Perfusion mit 0,2 % Heparin (Novo Heparin Injection 100; Japan Hoechst Marion Russell, LTD.) und 4 % Paraformaldehyd-Lösung enthaltender Kochsalzlösung, fixiert. Das Hirn wurde vom enthaupteten Kopf unter Verwendung von Scheren ausgeschnitten und in 4 % Paraformaldehyd-Fixativ für einen Tag eingetaucht. Dorsalen Hippocampus enthaltende Gewebe wurden getrocknet und durchgebrochen, dann in Paraffin eingebettet.

[0054] Die Erfinder stellten von diesem Paraffinblock 5 µm Schnitte her, entsprechend von 0,5 bis 1,0 mm von der Spitze des Hippocampus oder 1,4 bis 1,9 mm hinter der sagittalen Naht und färbten mit Hämatoxylin-Eosin (H-E-Färbung). Unter Verwendung dieses Gewebepreparats wurde die Länge der hippocampalen CA1, unter Verwendung eines Kurvimeters vom einseitigen Typ fünfmal gemessen und der Durchschnittswert daraus wurde berechnet. Pyramidalzellen (Neurocyten) des linken Hippocampus in der hippocampalen Region wurden unter 200-facher Vergrößerung gezählt und das Ergebnis wurde durch den vorstehend beschriebenen Durchschnittswert geteilt, um die Anzahl der lebensfähigen Neurocyten pro mm der hippocampalen CA1 zu berechnen. Die Ergebnisse werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

	Dosis (μg)	Anzahl Tiere	Anzahl CA1 Neurocyten (Zellen/mm) \pm S.E.
Gruppe, Imitations-Op.	-	4	237.5 \pm 34.59*
Gruppe, physiologische Kochsalzlösung verabreicht	-	6	9.6 \pm 10.31
Gruppe, MK verabreicht	0.5	4	232.4 \pm 17.75*
Gruppe, MK verabreicht	1.0	5	221.6 \pm 11.04*
Gruppe, MK verabreicht	2.0	4	236.2 \pm 40.02*

*p<0,05 (multipler Dunnett Vergleich)

[0055] Wie in Tabelle 1 deutlich gezeigt, verhinderte MK, verabreicht in einer Einzel-Dosis von 0,5 μg oder mehr den verzögerten Tod von Neurocyten in der hippocampus-CA1-Region erheblich.

1.1.2 Vergleich der schützenden Wirkung von MK auf das ischämische Hirn mit der anderer Hirn-Schutzfaktoren

[0056] Jeder schützende Faktor für das ischämische Hirn wurde intraventrikulär bei einer Dosis von je 2 μl verabreicht. Die bilaterale gemeine Karotisarterie wurde jeweils unter Verwendung von Sugita Hirn-Aneurysma-Klemmen (Standard-Typ; MIZUHO) an zwei Stellen abgebunden. Das Hirn wurde eine Woche später durch Perfusion fixiert. Mit Ausnahme dieser drei Modifikationen, wurde das Experiment in der gleichen Weise wie in 1.1.1. durchgeführt. Rekombinantes humanes Pleiotropin (PTN) und rekombinanter humaner Haupt-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) wurden von R & D Systems (Funakoshi) käuflich erworben. Ihre Dosen waren 2 μg , 1 μg und 0,5 μg für PTN und 2 μg und 1 μg für bFGF. Die Ergebnisse werden in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

	Dosis (μg)	Anzahl Tiere	Anzahl CA1 Neurocyten (Zellen/mm \pm S.E.)
Gruppe, Imitations-Op.	-	4	237.5 \pm 34.59
Gruppe, physiologische Kochsalzlösung verabreicht	-	16	15.7 \pm 24.43
Gruppe, MK verabreicht	0.063	6	12.6 \pm 6.41
	0.125	10	83.4 \pm 111.9
	0.25	15	28.3 \pm 57.70
	0.5	6	199.5 \pm 99.03*
	1.0	8	200.5 \pm 60.18***
	2.0	10	219.0 \pm 73.07***
	Gruppe, PTN verabreicht	0.5	2
1.0		2	43.8 \pm 0.78
2.0		2	179.4 \pm 33.02*
Gruppe, bFGF verabreicht	1.0	3	28.8 \pm 28.69
	2.0	7	90.3 \pm 74.66*

*p<0.95, ***p<0,001 (multipler Dunnett Vergleich)

[0057] Die Dosis, bei der MK eine statistisch signifikante schützende Wirkung auf das ischämische Hirn aus-

übt, wird auch in diesem Beispiel als 0,5 µg oder mehr angenommen, was circa die gleiche ist, wie die in 1.1.1. erhaltene. Obwohl mehr Neurocyten bei einer Dosis von 0,125 µg überlebten, als in der Gruppe, der physiologische Kochsalzlösung verabreicht wurde, war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Die PTN-Dosis, die benötigt wurde, um eine statistisch signifikante Schutzwirkung auf das ischämische Hirn auszuüben, betrug etwa 2 µg, was etwa viermal höher ist als für MK. bFGF, welches Berichten zufolge effektiv das ischämische Hirn schützt (Nakata, N. et al.: Brain Res., 605: 354–356, 1993), übte eine statistisch signifikante Schutzwirkung auf ein ischämisches Hirn bei einer Dosis von 2 µg aus, aber die Anzahl überlebensfähiger Neurocyten bei dieser Dosis war weniger als etwa der bei der gleichen Dosis MK beobachteten. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass MK, als einem Unterdrücker des, durch Ischämie verursachten Todes cranialer Nervenzellen, in einem Modell der mongolischen Wüstenrennmaus für vorübergehende Vorderhirn-Ischämie eine Schutzwirkung auf das ischämische Hirn zeigt, die vergleichbar zu der unter Verwendung bekannter ischämischer Hirnschutzfaktoren, wie Prosaposin, ciliarem neurotrophen Faktor (CNTF) oder Interleukin 6 (IL-6) erhaltenen, ist.

1.2 Verabreichung von Schutzfaktoren für das ischämische Hirn nach vorbestimmter Rückperfusionsdauer nach ischämischer Operation.

[0058] Mit Ausnahme der Verabreichung von MK 48 Stunden nach Rückperfusion nach einer ischämischen Operation, wurde das Experiment genau in der gleichen Weise wie 1.1.2. durchgeführt. Wenn 2 µg MK verabreicht wurde, betrug die Anzahl lebensfähiger hippocampaler CA1 Neurocyten nach 48 Stunden 160 Zellen/mm Hippocampus. Dies war annähernd gleich wie die Zahl bei einer Dosis von 0,5 µg in 1.1.2. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Verabreichung von MK innerhalb einer bestimmten Zeit nach Rückperfusion nach einer vorübergehenden Hirn-Ischämie ein ischämisches Hirn effektiv schützen kann.

[0059] Wie vorstehend gezeigt, können die Proteine der MK-Familie vielleicht, das ischämische Hirn schützende Wirkungen ausüben, basierend auf einem anderen Wirkungsmechanismus, als dem von den bekannten proteinösen Schutzfaktoren für das ischämische Hirn. Von der Expression und dem Anstieg verschiedener neurotroper Faktoren auf Nervenschädigungen, infolge Trauma, Ischämie etc., wurde kürzlich berichtet. Es wird angenommen, dass diese neurotrophen Faktoren an Reparaturmechanismen einer Nervenschädigung beteiligt sind und auf Neurocyten direkt oder indirekt über Gliocyten wirken, um wichtige Rollen in ihrem Überleben und Wiederherstellung zu spielen. Deshalb können synergistische oder zusätzliche Effekte durch die Verwendung von MK in Kombination mit anderen neurotrophen Faktoren erwartet werden.

Beispiel 2 Expression von MK in einem Trockeneis-Hirnschädigung (Kälteschaden)-Modell

[0060] Es wurden zehn männliche Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) (Körpergewicht, 160 g) verwendet. Sie wurden durch intraperitoneale Injektion von 4 % Chloralhydrat (10 ml/kg) narkotisiert. Die Kopfhaut wurde mit Scheren eingeschnitten und in ein 7 mm × 10 mm großes Stück (etwa 2 mm dick) geschnittenes Trockeneis wurde für 10 Sekunden auf den Schädel gedrückt. Die Kopfhaut wurde dann vernäht und die Tiere wieder gefüttert und freier Zugang zu Wasser und Futter erlaubt. An den Tagen 1, 2, 4, 7 und 14 nach der Trockeneis-Behandlung, wurden zwei Ratten durch intraperitoneale Injektion von 4 % Chloralhydrat (10 ml/kg) anästhesiert und durch Perfusion von physiologischer, 0,2 % Heparin (Novo Heoarininjektion 100, Japan Hoechst Marion Russel) und 4 % Paraformaldehyd-Fixativ enthaltender Kochsalzlösung (Japanische Pharmakopöe, physiologisches Kochsalz, Otsuka physiologische Kochsalzinjektion, Otsuka Arzneimittel), fixiert. Nach gründlicher Fixierung wurden die Tiere enthauptet. Ihre Hirne wurden unter Verwendung von Scheren entnommen und mit 4 % Paraformaldehyd-Fixativ durchtränkt. Nach 24 stündiger Fixierung, wurde das ausreichend erstarrte Hirn unter Verwendung eines zweischneidigen Rasiermessers (FEATHER) in vier Stücke von der Stirnseite geteilt. Die Gewebestücke, in denen der Infarktbereich beobachtet werden konnte, wurden getrocknet, durchgebrochen und unter Verwendung eines automatischen Einbettungsgeräts in Paraffin gebettet. Von diesem Paraffinblock wurden 5 µm Schnitte hergestellt. Diese Paraffin-Scheiben wurden 1) einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H-E-Färbung), 2) einer Anti-MK-Antikörper-Färbung (Kaninchen Anti-Maus MK polyclonaler Antikörper) und 3) einem Apoptose-Nachweis unterworfen.

[0061] [Fig. 1](#) ist eine Mikrofotografie (×10) von Hirnzellen zwei Tage nach der Behandlung mit Trockeneis, gefärbt mit H-E oder dem Anti-MK-Antikörper. A stellt durch Trockeneis hergestellte Infarkt-Nidi und Zellen nahe daran, dar, B stellt beträchtlich geschädigte Infarkt-Nidi dar und C stellt einen ähnlichen Bereich wie B dar, gefärbt mit dem Anti-MK-Antikörper. In C (Anti-Mk-Antikörper-Färbung), wird ein hoher Spiegel der MK-Expression nahe des Infarktbereichs beobachtet.

[0062] [Fig. 2](#) ist eine Mikrofotografie (×10) von Hirnzellen zwei Tage nach der Trockeneisbehandlung, gefärbt

mit dem Anti-MK-Antikörper oder gefärbt für den Nachweis von Apoptose. D stellt ein vergrößertes ($\times 50$) Bild von Zellen nahe des Infarktbereichs dar, die mit dem Anti-MK-Antikörper reagierten. E stellt eine Mikrofotografie von Zellen nahe des Infarktbereichs ähnlich wie D dar, die durch die TUNEL Methode (unter Verwendung eines TaKaRa In situ Apoptose Nachweis Kits) untersucht wurden, um zu bestimmen, ob sie Apoptose verursachten. Zellen mit Kernfragmentierung und positiv gegenüber der TUNEL-Reaktion, können detektiert werden. Wie in [Fig. 2](#) gezeigt, erlitten die Zellen höhere Schäden, je schwächer die Infarkt-Nidi gefärbt wurden.

Beispiel 3 Expression von MK im Hirnschädigungs-Rattenmodell

[0063] In Beispiel 2 wurde die MK-Expression in einem Modell von durch Ischämie verursachtem Hirninfarkt, untersucht. In diesem Beispiel wurde ein Modell eines, durch mechanischen Stress verursachten Infarkt vorbereitet, um hierin die MK-Expression zu untersuchen. Es wurden zehn männliche SD-Ratten (Körpergewicht, 320 g) verwendet. Sie wurden durch intraperitoneale Injektion von 4 % Chloralhydrat (10 ml/kg) anästhesiert. Die Großhirnrinde wurde abgetragen, um ein Hirnschädigungs-Modell vorzubereiten. Die Kopfhaut wurde mit Scheren eingeschnitten und ein im Durchmesser 4 mm, 3 mm dickes Stück der Großhirnrinde wurde bei 3 mm in Richtung des linken Auges entlang der koronalen Naht und weiter 3 mm in Richtung des Hinterkopfes entlang der sagittalen Naht, abgetragen. Ein Einwegstanzer (wegwerfbarer Hautbohrer) (Siefel Laboratorien) wurde für die Abtragung verwendet. Nachdem die vollständige Abtragung abgesichert war, wurde die Kopfhaut genäht und die Tiere wurden wieder gefüttert mit freiem Zugang zu Wasser und Futter. An jedem der Tage 1, 2, 4, 7 und 14 nach der Präparation des Hirnschädigungs-Modells, wurden 5 μ m dicke Schnitte von zwei Ratten in ähnlicher Weise wie in Beispiel 2 hergestellt. Ihre Paraffinschnitte wurden angefertigt und mit H-E und Anti-Maus-MK-Antikörper gefärbt. Die an Tag 1 nach der Hirnpräparation erhaltenen Ergebnisse, werden in [Fig. 3](#) gezeigt; die Felder A, C und E zeigen H-E-Färbung und die Felder B, D und F stellen Anti-MK-Antikörper-Färbung dar. Die Felder bekräftigen, dass MK sehr schnell auf mechanische Schäden reagiert. Die Bilder A, C und E der H-E-gefärbten Gewebe deuten darauf hin, dass Hirnzellen großen Schaden durch mechanische Schädigungen erlitten. Die Bilder B, D und F der mit dem Anti-MK-Antikörper gefärbten Geweben, zeigt viele auf die Antikörperfärbung positive Zellen, hauptsächlich neben der hämorrhoidalen Region und in dem Bereich, wo die Hirnzellen stark geschädigt waren, was mit dem, in A, C und E gefärbten Bereich korrespondiert. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass sogar im Falle des Schaden erleidenden Neurocyten, infolge von sowohl ischämischem, als auch mechanischem Stress, MK in einem frühen Stadium antwortet und nahe des geschädigten Bereichs exprimiert wird.

Beispiel 4 Expression von MK im Myokard-Infarkt-Modell

4.1 Herstellung eines Myokard-Infarkt-Modells

[0064] Es wurde ein myokardialer Infarkt an der linken ventrikulären Wand von Wistar-Ratten (7 Wochen alt, männlich) nach der Methode von Fine, G. et al. (Fine, G., Morales, A. und Scerpella, J. R.: Arch. Path. 82: 4–8, 1966) durch Abbinden der linken vorderen, absteigenden Coronararterie (LAD), hergestellt. Sechs Stunden nach dem Abbinden, wurden die Ratten eingeschläfert und das Herz sofort für die Analyse ausgeschnitten. Um die Lebensfähigkeit der myokardialen Zellen zu bekräftigen (Fishbein, M. C. et al.: Am. Heart J. 101: 593–600, 1981), maßen die Erfinder den Bereich und die Größe des myokardialen Infarkts durch Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).

4.2 MK, Anti-MK-Antikörper und Anti-bFGF-Antikörper

[0065] MK und ein Affinitäts-gereinigter Kaninchen-Anti-Maus-MK-Antikörper wurden nach der Methode von Take, M. et al. (Take, M. et al.: J. Biochem. 116: 1063-1068, 1994) hergestellt. Die Spezifität des Affinitäts-gereinigten Anti-MK-Antikörper war fast die gleiche, wie die des in Muramatsu et al. (Muramatsu, H. et al.: Dev. Biol. 159: 392–402, 1993) beschriebenen Antikörpers. Dieser Antikörper reagierte mit MK, aber nicht mit PTN in der Western-Blot-Analyse. Mab52 (Wako Pure Chemikalien) wurde als Maus-Anti-Mensch bFGF monoclonaler Antikörper verwendet. Dieser Antikörper erkennt den Ratten bFGF (Takami, K. et al.: Exp. Brain Res. 90: 1–10, 1992).

4.3 Immunhistochemische Analyse

[0066] Es wurde ein horizontaler Ausschnitt der ventrikulären Region des Rattenherzens herausgenommen, in einer neutralen Puffer-Formalin-Fixierlösung bei Raumtemperatur fixiert, in Paraffin eingebettet und in 5 μ m dicke Schnitte geschnitten. Nachdem die Schnitte entparaffinisiert waren, wurden sie in einer, 0,3 Wasserstoffperoxid enthaltenden 100 % Methanol-Lösung für 30 Min. inkubiert, um endogene Peroxidase zu blockieren.

Bovines Serumalbumin (1 %) wurde zu den Schnitten gegeben und man ließ die Reaktion für 30 Min. ablaufen. Um MK nachzuweisen, wurden diese Schnitte mit dem Affinitäts-gereinigten Kaninchen-Anti-MK polyclonalen Antikörper (8 µg/ml) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Diese Schnitte wurden mit einem biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Vector Laboratorien Korp., Kalifornien) für 30 Min. und dann mit einem biotinylierten alkalische Phosphatase-Streptavidin-Komplex (Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 Min. inkubiert. Um bFGF nachzuweisen, wurden die Schnitte mit dem monoclonalen Maus-Anti-bFGF Antikörper (5 µg/ml) bei 4 °C über Nacht inkubiert, dann mit einem biotinylierten Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratorien, Korp., Kalifornien) für 30 Min. und weiter mit einem biotinylierten alkalische Phosphatase-Streptavidin-Komplex (Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 Min. Die Immunreaktion wurde mit einem Fast Red TR/Naphthol (Sigma, St. Louis, MO) sichtbar gemacht. Eine Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin durchgeführt. Die Spezifität der MK-Immunofärbung wurde bestimmt, indem rekombinatem MK ermöglicht wurde, den Anti-MK-Antikörper zu absorbieren und der resultierende Komplex einer Heparin-Sepharose-Affinitäts-Chromatographie (Yasuhara, O et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 192: 246–251, 1993) unterworfen wurde.

[0067] Die Ergebnisse werden in den [Fig. 4](#) bis [Fig. 13](#) gezeigt.

[0068] Die [Fig. 4](#) bis [Fig. 7](#) sind Mikrofotografien, die eine gesteigerte Anfärbbarkeit von MK in Rattenherzen nach dem Verschluss der linken vorderen absteigenden Koronararterie zeigen. Die [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) stellen ein normales, immunhistochemisch gefärbtes Rattenherz dar, in dem MK in einigen den Ventrikel überziehenden Myokardzellen exprimiert wird. Eine schwache Immunreaktion wird in anderen Myokardzellen des Septums nachgewiesen. Die meisten Myokardzellen exprimieren jedoch fast kein MK. [Fig. 6](#) ist eine Mikrofotografie, die ein Rattenherz sechs Stunden nach der Erzeugung eines Myokardinfarkts zeigt. Im Septum (SE), der rechten ventrikulären Wand (RV) und dem Endokard (durch einen Pfeil angezeigter Bereich) der linken ventrikulären Wand (LV) wird starke MK-Färbung nachgewiesen. Der Unterschied in der Immunfärbung zwischen der linken ventrikulären Wand und dem Septum ist sehr deutlich. Gefärbte und nicht gefärbte Bereiche werden durch eine einzelne deutliche, dem Grenzbereich jeder Koronararterie, die Nährstoffe an diese Regionen liefert, entsprechenden Grenze, geteilt. Myokardzellen in der Region des Zelltodes von LV werden nicht gefärbt. Das Muster der MK-Expression im, eine Infarktstelle aufweisenden Herzen unterschied sich vom bFGF im gleichen Herzen. [Fig. 7](#) ist eine Mikrofotografie, die eine Kontrollfärbung mit einem neutralisierenden Anti-MK-Antikörper zeigt. Da Zellen nach Behandlung mit dem neutralisierenden Anti-MK-Antikörper nicht angefärbt wurden, wurde bestätigt, dass MK spezifisch durch diese Methode gefärbt wird. Die in den Figuren gezeigten Balken stellen 1500 µm in den [Fig. 4](#), [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) und 150 µm in [Fig. 5](#) dar.

[0069] Die [Fig. 8](#) bis [Fig. 13](#) sind Mikrofotografien, die die detaillierte MK-Expression in einem Rattenherzen sechs Stunden nach der Bildung eines Myokardinfarkts zeigt. Immunhistochemische Färbung von MK wurde in der rechten ventrikulären Wand ([Fig. 8](#)), dem Septum ([Fig. 9](#) und [Fig. 11](#)), dem Grenzbereich zwischen dem Septum, der ventrikulären Wand, die Infarktbereiche besitzt und der linken ventrikulären Wand ([Fig. 10](#)), der linken ventrikulären Wand ([Fig. 12](#)) und dem Endokard im linken Ventrikel ([Fig. 13](#)) nachgewiesen. Eine Immunreaktion von MK wurde in Myokardzellen (Teile werden mit Sternchen in den [Fig. 11](#) und [Fig. 13](#) angezeigt) und der Penumbra der Myokardzellen, auskleidenden Endothelzellen oder Endothelzellen selbst (Teile angezeigt durch Pfeil und einen Pfeilkopf) beobachtet. In einer stark vergrößerten Mikrofotografie des Septums ([Fig. 11](#)), wurde MK in der Penumbra Myokardzellen, die Blutgefäße auskleiden oder vaskulären Endothelzellen intensiv angefärbt. Das Innere von Myokardzellen ([Fig. 13](#)) wird auch intensiv oder mäßig gefärbt (Anteile mit Asterisks angezeigt). Die Grenze zwischen dem Septum und LV trennt gefärbte und nicht gefärbte Bereiche deutlich ([Fig. 10](#)). Die in den Figuren gezeigten Balken stellen 200 µm in den [Fig. 8](#), [Fig. 9](#) und 10 und 50 µm in den [Fig. 11](#), [Fig. 12](#) und [Fig. 13](#) dar.

Beispiel 5 Messung von MK im Serum von Infarktpatienten

[0070] Unter Verwendung eines, in JP-A Hei 10-160735 beschriebenen EIA-Systems, bestimmten die Erfinder die MK-Konzentration in Seren von Patienten mit Myokardinfarkten und Hirninfarkten. Jede von Patienten gesammelte Serumprobe wurde bei 3000 UpM für 15 Min. (bei Raumtemperatur) zentrifugiert. Diese Seren wurden bei -80 °C gelagert. [Fig. 14](#) zeigt ein Beispiel einer regelmäßig bestimmten MK-Konzentration im Serum eines Patienten mit Myokardinfarkt. MK wurde in dem relativ späten Stadium nach der Entstehung des Myokardinfarkts exprimiert. Seine Konzentration in Blut stieg an und erreichte einen Höchstwert 12 Stunden nach der Entstehung. Er fiel nach 24 Stunden auf den gleichen Spiegel wie sechs Stunden nach der Entstehung ab und, nach 31 Stunden auf etwa 0,16 ng/ml, was der Durchschnittsspiegel normaler Personen ist. Dieser Wechsel in der MK-Konzentration im Blut nach der Entstehung eines Myokardinfarkts ist vielleicht einmalig für MK. So ein Zusammenhang von Myokardinfarkt mit MK, einschließlich der MK-Expression in der Infarkt-Penumbra im frühen Stadium, zeigt die Beteiligung von MK im Reparaturmechanismus des Herzmuskels. [Fig. 15](#)

zeigt die MK-Konzentration in Seren von Hirninfarkt-Patienten. In Fällen von Hirninfarkt wurde MK ebenso in einer sehr hohen Konzentration im Blut von Patienten, deren Blut vermutlich in einem frühen Stadium der Entstehung eines Hirninfarkts gesammelt wurden, gefunden, wie in den **Fig. 15A, D, E und F**. Diese Daten werden für die Studie der Tatsache, dass eine große Menge an MK nahe des Bereichs mit Hirninfarkt in einem frühen Stadium nach der Entstehung nachgewiesen wird, auf der Ebene der Einzelperson, als interessant erachtet.

Industrielle Anwendbarkeit

[0071] Die Proteine der Midkine-Familie oder Teilpeptide davon, sind nach dieser Erfindung sehr wirksam in der Behandlung oder Prävention von Cytopathie, die durch Ischämie oder ischämische Erkrankungen, die auf diese Cytopathie zurückzuführen sind, verursacht wird. Diese Proteine sind zum Beispiel als Medikamente sowohl zur Behandlung oder Prävention von cerebrovaskulären Erkrankungen, wie cerebrovaskulärem Krampf nach subarachoidaler Hämorrhagie, Alzheimerscher Krankheit, seniler Demenz von Alzheimer-Typ, cerebrovaskulärer seniler Demenz etc., als auch von Hirninfarkt, vorübergehenden ischämischen Erkrankungen und Kopftrauma und anderen cerebrovaskulären Krankheiten, wie Parkinsonsche Krankheit, Chorea Huntington, amyotrophe Regressionserkrankungen etc., wirksam. Außerdem wird von diesen Proteinen erwartet, dass sie als Medikamente zur Behandlung und Prävention ischämischer Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, Anstrengungs-Angina; ischämischer Colitis; Obstruktion der oberen Mesenterialarterie etc. verwendet werden.

[0072] Zusätzlich kann von diesen Proteinen erwartet werden, dass sie in der Gentherapie durch die Aktivierung von Promotoren für die Gene von MK und PTN verwendet werden können, um die Proteine MK und PTN an ischämischen Stellen zu exprimieren.

Patentansprüche

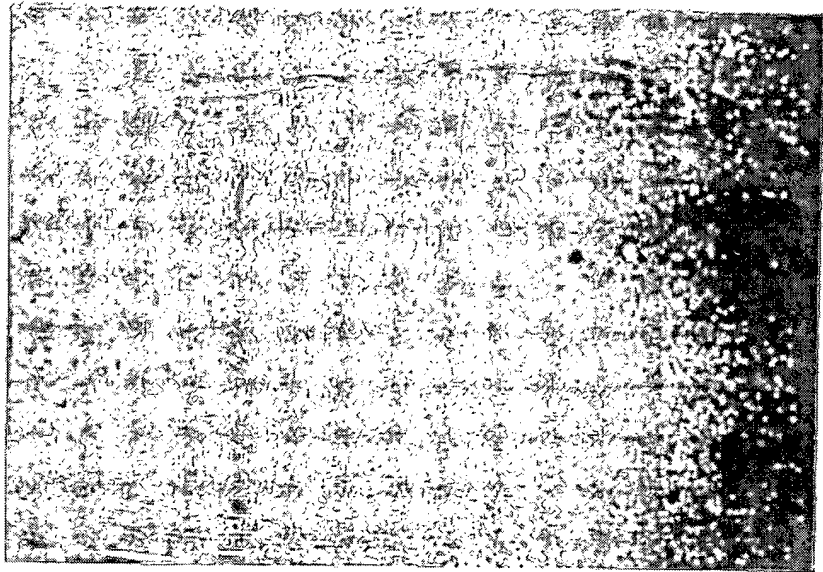
1. Verwendung eines Proteins der Midkine (MK)-Familie für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Prävention von durch Ischämie hervorgerufener Cytopathie.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die durch Ischämie hervorgerufene Cytopathie im Gehirnparenchym auftritt.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Gehirnparenchym Pyramidalzellen in der hippocampalen CA1-Region ist.
4. Verwendung eines Proteins der Midkine (MK)-Familie für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Prävention von Hirninfarkt, der durch Cytopathie aufgrund von Ischämie verursacht wird.

Es folgen 15 Blatt Zeichnungen

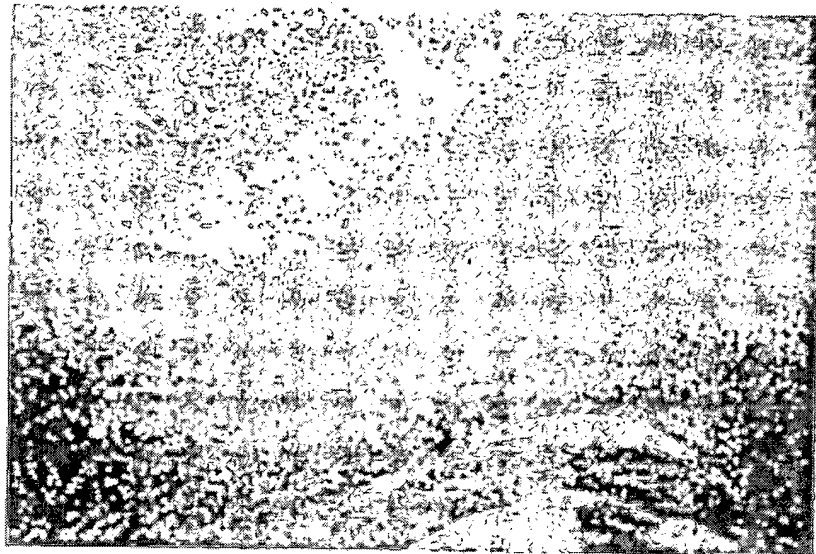
Anhängende Zeichnungen

Figur 1

A



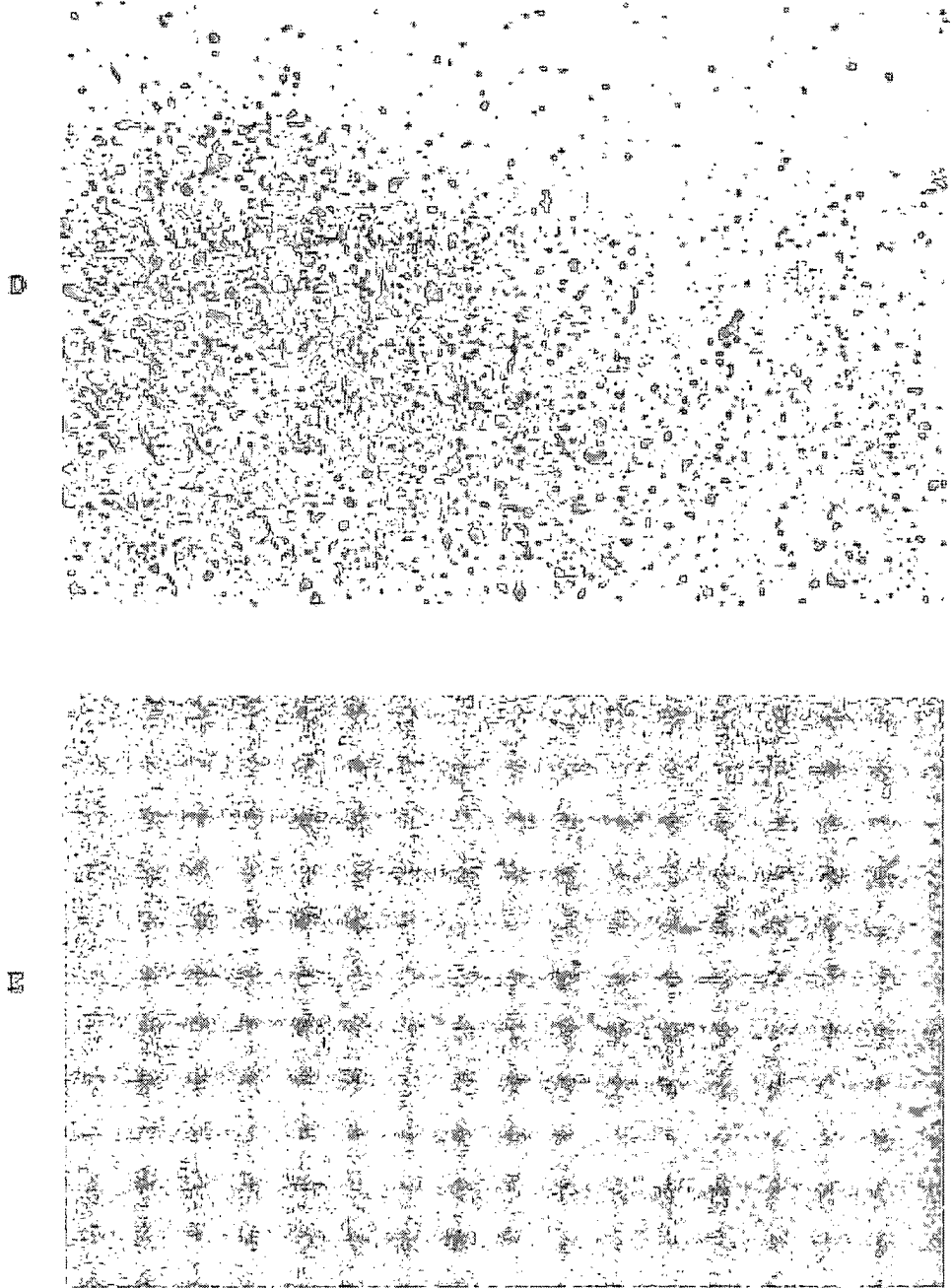
B



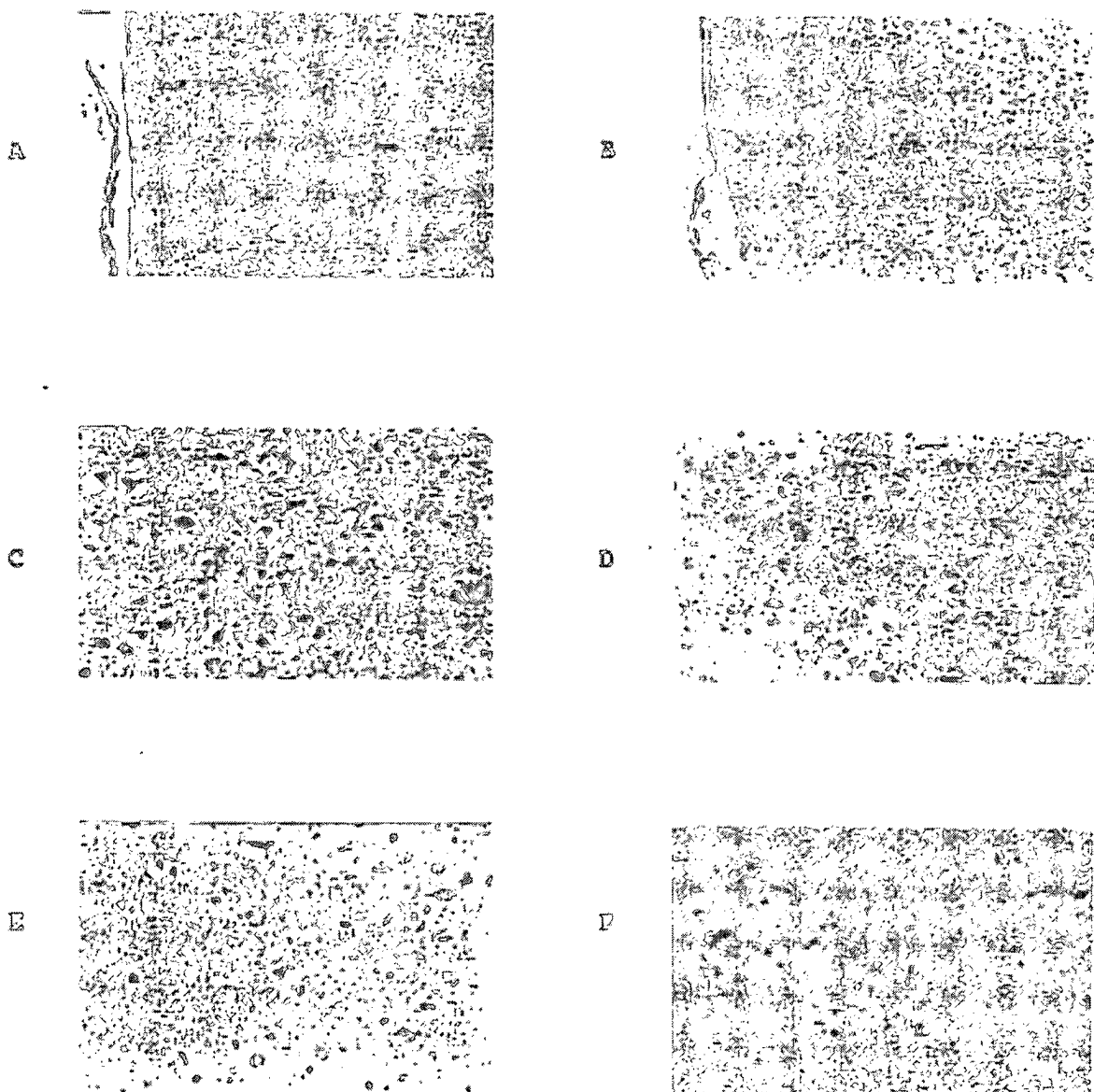
C



Figur 2



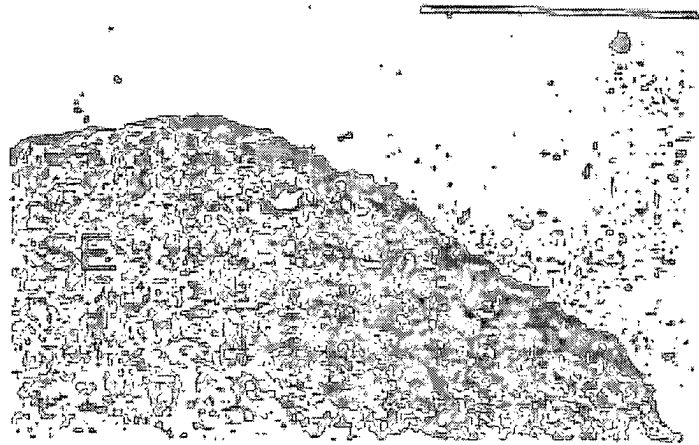
Figur 3



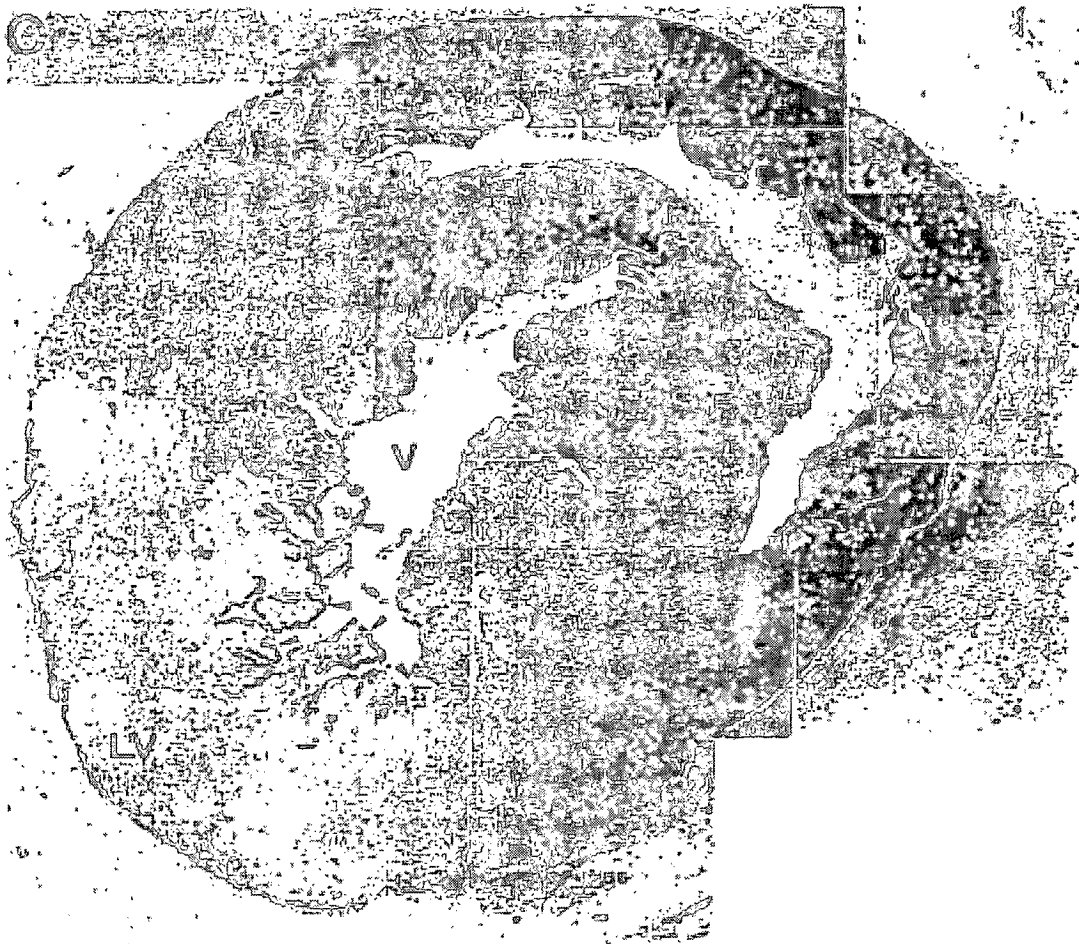
Figur 4



Figur 5



Figur 6



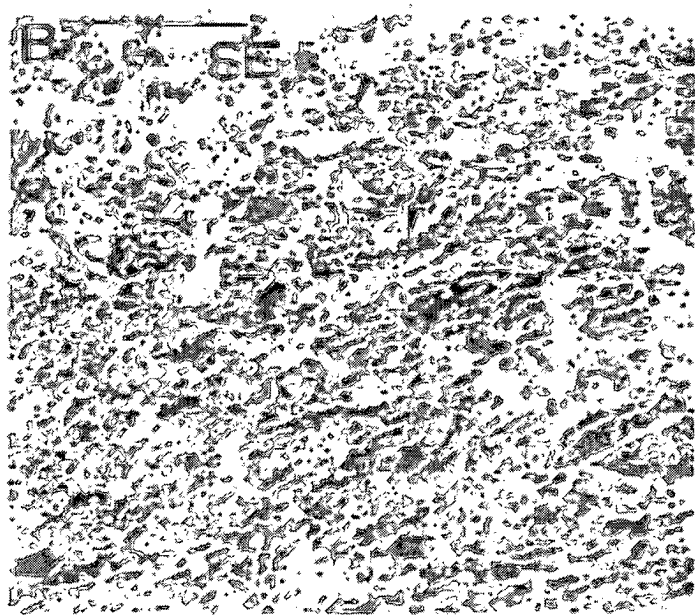
Figur 7



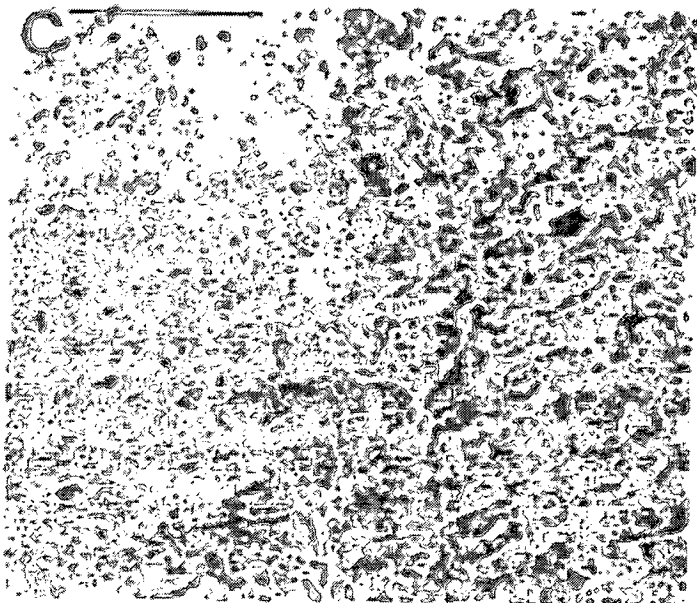
Figur 8



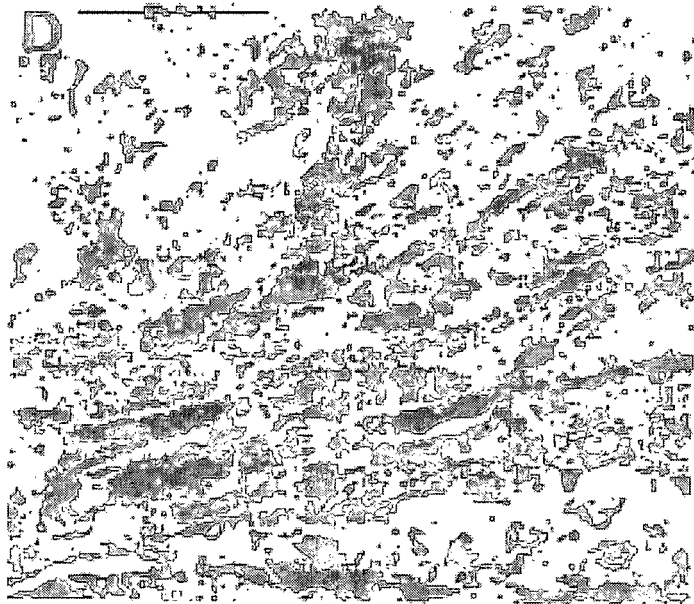
Figur 9



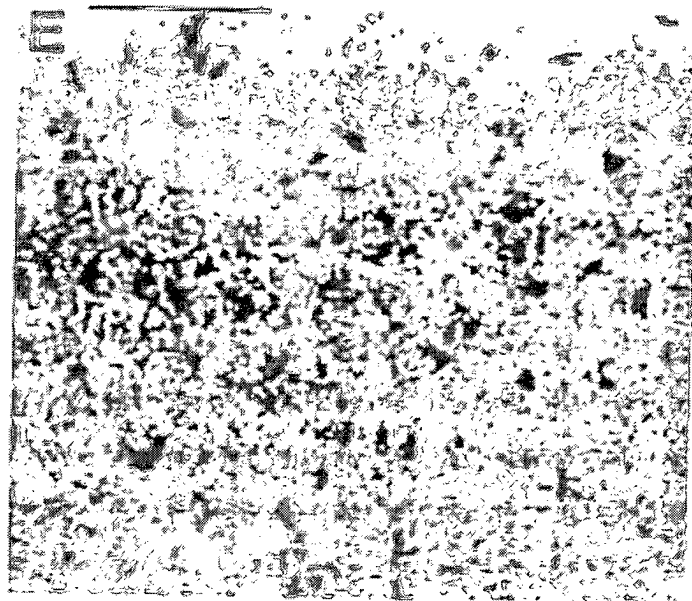
Figur 10



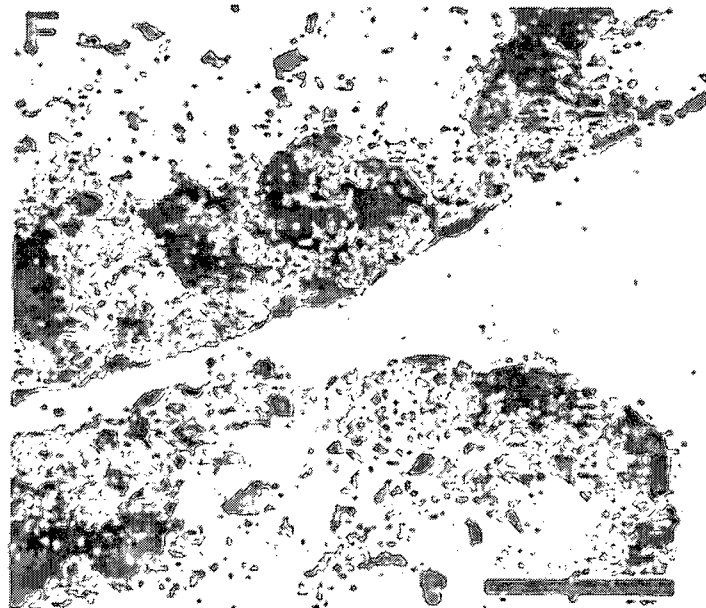
Figur 11



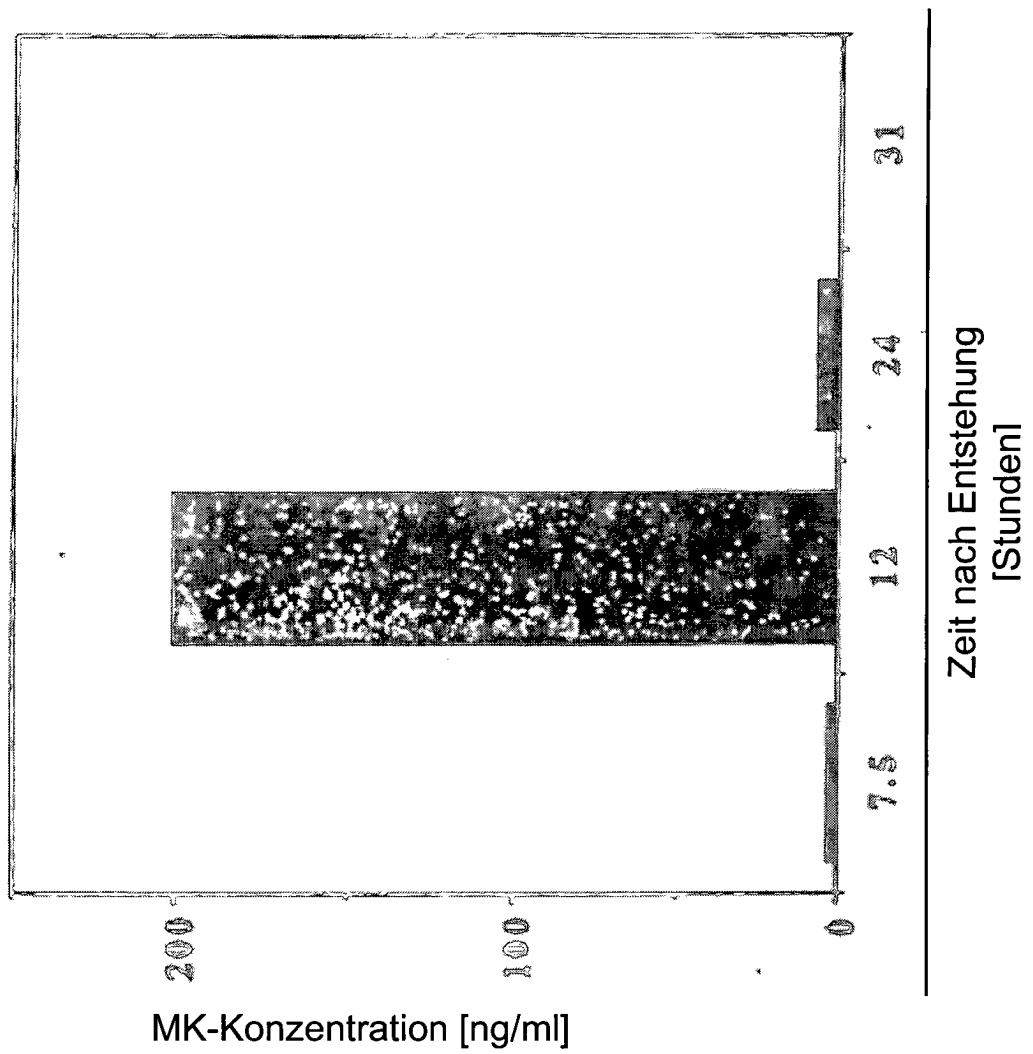
Figur 12



Figur 13



Figur 14



Figur 15

