

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98808934.3

[51] Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/715 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 12 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1287852C

[22] 申请日 1998.7.14 [21] 申请号 98808934.3

[30] 优先权

[32] 1997. 7. 14 [33] JP [31] 205320/97

[32] 1997. 7. 14 [33] JP [31] 205332/97

[86] 国际申请 PCT/JP1998/003161 1998. 7. 14

[87] 国际公布 WO1999/003493 日 1999. 1. 28

[85] 进入国家阶段日期 2000. 3. 6

[73] 专利权人 村松乔

地址 日本东京都

[72] 发明人 高田彻 鸟山和宏 村松寿子

村松乔

审查员 姜 涛

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 6 页

[54] 发明名称

含有 midkine 或其抑制剂作为活性成分的药剂

[57] 摘要

治疗嗜中性白细胞功能障碍或炎症疾病的药物，含有发现可增强嗜中性白细胞的迁移并且炎症状态下有高浓度存在的作为视黄酸可诱导的肝素 - 结合生长因子的 midkine (MK) 或其抑制剂作为活性成分。

1. 一种药剂在制备刺激或抑制嗜中性白细胞功能的药物中的用途，其中所述药剂含有 midkine 作为活性成分，并刺激嗜中性白细胞的功能，或所述药剂含有 midkine 抗体作为活性成分，并抑制嗜中性白细胞的功能。

2. 权利要求 1 的用途，其中所述的 midkine 是哺乳动物的 midkine。

3. 权利要求 1 或 2 的用途，其中所述嗜中性白细胞的功能是迁移。

4. 权利要求 3 的用途，其中所述迁移是基于趋化性机理。

5. 权利要求 1 中所述的刺激嗜中性白细胞功能的药剂在制备治疗或缓解嗜中性白细胞功能障碍的药物中的用途。

6. 权利要求 5 中所述的用途，其中所述嗜中性白细胞功能障碍是懒-白细胞综合症。

7. 权利要求 5 的用途，其中所述药剂含有 midkine 作为活性成分。

8. 权利要求 7 的用途，其中 midkine 是哺乳动物 midkine。

9. 权利要求 5-8 中任一项的用途，其中所述药物还包括刺激嗜中性白细胞功能的生长因子或细胞因子，其选自 G-CSF, GM-CSF, IL-8 或 M-CSF。

10. 权利要求 9 的用途，其中嗜中性白细胞的功能是嗜中性白细胞的迁移，吞噬或杀微生物的功能。

11. 权利要求 10 的用途，其中所述迁移是基于趋化性机理。

12. 权利要求 1 中所述的抑制嗜中性白细胞功能的药剂在制备治疗或缓解炎症疾病的药物中的用途，其中所述药剂含有 midkine 抗体作为活性成分，并抑制嗜中性白细胞的功能。

13. 权利要求 12 的用途，其中所述 midkine 是哺乳动物的 midkine。

14. 权利要求 12 或 13 的用途，其中炎症疾病是风湿性关节炎或骨关节炎。

15. 一种联用的药物，所述药物包括用于刺激嗜中性白细胞功能的有效量的 midkine 和有效量生长因子或细胞因子，其中生长因子或细胞因子选自 G-CSF, GM-CSF, IL-8 或 M-CSF。

16. 权利要求 15 的联用药物，其中所述 midkine 是哺乳动物的 midkine。

17. 权利要求 15 的联用药物，其中所述嗜中性白细胞的功能是嗜中性

白细胞的迁移，吞噬或杀微生物的功能。

18. 权利要求 17 中的联用药物，其中所述迁移是基于趋化性机理。

19. 权利要求 15 - 18 中任一项的联用药物在制备治疗或缓解嗜中性白细胞功能障碍的药物中的用途。

20. 使用 midkine 或包括 midkine 作为活性成分的药剂体外刺激嗜中性白细胞趋化性的方法。

21. 权利要求 20 的方法，还包括使用选自 G-CSF, GM-CSF, IL-8 或 M-CSF 的生长因子或细胞因子。

含有 midkine 或其抑制剂作为活性成分的药剂

技术领域

本发明涉及控制嗜中性白细胞功能的药剂，该药剂含有 midkine 或其抑制剂作为活性成分。可使用该药剂治疗与嗜中性白细胞相关的疾病，如嗜中性白细胞功能性障碍或炎症疾病。

背景技术

嗜中性白细胞是一种粒细胞，它具有迁移，吞噬细胞和杀微生物的活性，在抗传染性因子，如细菌或真菌的生物保护中起着重要的作用。有一些疾病与嗜中性白细胞相关。

嗜中性白细胞功能性障碍(其中嗜中性白细胞的一个或多个上述生物活性受损)包括例如：懒-白细胞(趋化性-缺损的白细胞)综合征(一种趋神经性-缺陷疾病)。在患有此综合征的患者中，外周血中嗜中性白细胞的数目显著降低，其迁移活性受损，但骨髓中存在的嗜中性白细胞的量为正常水平。患有嗜中性白细胞功能性障碍的患者非常少，迄今为止，市场上还买不到适用于此障碍的药物。

另一例与嗜中性白细胞相关的疾病是炎症疾病。炎症反应是针对由炎症刺激(例如，如细菌等的外源体和生理化学刺激等)引起的组织损伤的生物保护作用。炎症反应基本上从活体内除去了有害的刺激，并恢复了局部组织结构的功能。然而，激活的炎症系统对正常的组织和细胞具有毒性，强表达的炎症反应应被抑制。

炎症反应包括3个主要的过程：1)感染位点的血液供应增加；2)因血管内皮细胞中的反应而使血管通透性增加；和3)白细胞(具体为嗜中性白细胞和一些巨噬细胞)从毛细血管移动至组织，随后迁移至感染位点。这些过程导致嗜中性白细胞和巨噬细胞在其靶位点积累和浸润。据信如此抑制嗜中性白细胞的功能可有效控制炎症反应。

已研制出多种抗炎症药物，它们被分为两组：非-特异性的抗炎症药物(类固醇抗炎症药物和非-类固醇抗炎症药物)和特异性抗炎症药物(抗-风湿药

物，抗-足痛风药物，免疫抑制剂等)。在风湿性关节炎(RA)的化学疗法中，主要使用止痛药和抗炎症药物(非-类固醇抗炎症药物 NSAID)，其次可使用抗风湿药物(修饰-疾病的抗风湿药物 DMARD)和类固醇药物。然而，NSAID 导致急性胃粘膜损伤(AGML)，因此，经常以原药的形式被使用以避免 AGML。

最近，midkine (MK)被鉴定为分子量为 13KDa 的肝素结合多肽和视黄酸-可诱导的基因产物。已报道的 midkine 功能包括维持和分化胚胎神经细胞并增强神经突的延伸；促进特定细胞系的分裂(Muramatsu, H 等, 生物化学生物物理研究通讯, 177:652-658, 1991; Michikawa, M 等, 神经科学研究杂志, 35:530-539, 1993; Muramatsu, H 等, 发育生物学, 159:382-402, 1993); 调节胚胎发育(Kadomatsu, K 等, 细胞生物学杂志, 110:607-616, 1990; Mitsiadis, T. A 等, 发育 121:37-51, 1995); 等。另外，据报道，抗-midkine 抗体可在体外抑制出牙(Mitsiadis, T. A 等, 细胞生物学杂志, 129:267-281, 1995)。

已揭示出 midkine 在受损组织和一些疾病的恢复中起着重要的作用。在多种人癌中研究了 midkine 的表达模式。研究表明：在包括胃癌，结肠癌，胰腺癌，肺癌，胸癌和肝癌的多种癌症中，midkine 的表达增加(Tsutsui, J 等, 癌症研究, 53:1281-1285, 1993; Aridome, K 等, 日本癌症研究杂志, 86:655-661, 1995; Garver, R. I 等, 癌症, 74:1584-1590, 1994)。成神经细胞瘤患者体内 midkine 的高水平表达与不利的预测相关(Nakagawara, A 等, 癌症研究, 55:1792-1797, 1995)。大多数 Alzheimer 氏病患者的老年斑中积累了 midkine(Yasuhara, O 等, 生物化学生物物理研究通讯, 192:246-251, 1993)。大脑梗塞早期水肿区域表达了 midkine(Yoshida, Y 等, Dev. Brain Res, 85:25-30, 1995)。这些发现表明 midkine 与损伤组织和组织异常(一些疾病的征兆)的恢复相关。

发明内容

本发明的目的是提供新的药剂以控制嗜中性白细胞功能，具体地为治疗嗜中性白细胞功能障碍，增强嗜中性白细胞的趋化性和趋触性并治疗炎症疾病。

最近的报道(Kojima, S 等, 生物化学杂志, 270:9590-9596, 1995)表明 midkine 可增强血管内皮细胞中纤溶酶原激活物的活性，并可增强对细胞迁移至炎症位点和癌细胞浸润和血管生成中的细胞迁移至关重要的溶纤活性。已

证实 midkine 可引发炎症初期的白细胞迁移(Timothy, A. S. 细胞 76:301-314, 1994)。根据这些报道, 本发明人在与风湿性关节炎(RA)和骨关节炎(OA)相关的炎症模型中分析了 midkine 的表达, 结果表明: 在与嗜中性白细胞密切相关的炎症阶段, midkine 水平升高。本发明人还检查了 midkine 对嗜中性白细胞迁移的影响, 发现与基质结合的 midkine 刺激嗜中性白细胞迁移。

另外, 根据 midkine 与中性白细胞趋性以及 midkine 与炎症之间的紧密关系, 本发明人发现通过使用 midkine 或其抑制剂控制嗜中性白细胞的生物活性可治疗与嗜中性白细胞功能相关的疾病, 所述疾病包括例如嗜中性白细胞功能障碍和炎症疾病。

本发明涉及控制嗜中性白细胞功能的药剂, 所述药剂含有 midkine 或其抑制剂作为活性成分。更具体地, 本发明涉及:

- (1) 刺激嗜中性白细胞之趋化性的药剂, 其包括 midkine 作为活性成分,
- (2)(1)之药剂, 其中嗜中性白细胞之趋化性基于趋触性机理,
- (3) 治疗嗜中性白细胞功能障碍的药剂, 其包括 midkine 作为活性成分,
- (4) 治疗炎症疾病的药剂, 其含有 midkine 抑制剂作为活性成分,
- (5)(4)之药剂, 其中炎症疾病是风湿性关节炎或骨关节炎,
- (6)(4)之药剂, 其中 midkine 抑制剂是抗-midkine 抗体, 和
- (7)(4)之药剂, 其中 midkine 抑制剂是 midkine 拮抗剂。

本文所用的“治疗嗜中性白细胞功能障碍的药剂”不仅包括治疗嗜中性白细胞功能障碍的药剂, 也包括缓解嗜中性白细胞功能障碍之不适病征的药剂。类似地, 本文所用的“治疗炎症疾病的药剂”不仅包括治疗炎症疾病的药剂, 也包括缓解炎症疾病之不适病征的药剂。

本发明的含有 midkine 作为活性成分的药剂可刺激嗜中性白细胞的趋化性。趋化性指的是包括嗜中性白细胞的白细胞沿着趋化因子的浓度梯度迁移至炎症位点(感染位点)并在此积累的过程。迁移之后, 嗜中性白细胞吸附微生物(如细菌), 摄取(吞噬)之, 并通过不同的机理清除这些微生物。趋化性是嗜中性白细胞行使其自身功能的重要步骤。有两种迁移机理, 即趋化性机理和趋触性机理。在趋化性机理中, 趋化因子是可从其产生之处(即浓度最高处)往外扩散的体液因子, 细胞朝趋化因子水平高的地方迁移。与之相反, 在趋触性机理中, 趋化因子与血管内皮细胞或胞外基质结合, 细胞迁移至趋化因子密度最高的组织。本发明人阐明: midkine 不是根据趋化性机理而是根据

趋触性机理起作用。

可使用本发明含有 midkine 作为活性成分的药剂治疗嗜中性白细胞功能障碍。主要的嗜中性白细胞功能是迁移，吞噬和杀微生物活性。嗜中性白细胞功能障碍被定义为这三种活性中的一种或多种受损的状态。嗜中性白细胞功能障碍的一个例子是懒-白细胞(趋化性-缺损的白细胞)综合征(一种趋神经性-缺陷疾病)。如上文所述，本发明人揭示出 midkine 可刺激嗜中性白细胞迁移，这表明通过 midkine 的作用可恢复不能迁移的嗜中性白细胞的受损功能。

必要时，可将治疗嗜中性白细胞功能障碍的本发明药剂与可增强嗜中性白细胞功能的其它药剂一起使用，后者包括例如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)，粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)，白细胞介素-8(IL-8)，巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)等。

本发明所用的 midkine 可来自任何哺乳动物，包括人(例见未审公开日本专利申请(JP-A) Hei 9-95454)，小鼠(Kadomatsu, K 等，生物化学生物物理研究通讯, 151:1312-1318, 1988)，大鼠等。本发明所用的 midkine 包括完整的 midkine 多肽及其衍生物和具有 midkine 生物活性的同系物，该同系物中完整多肽的部分肽序列的一个或多个氨基酸残基被取代或缺失。本发明的 midkine 多肽可以是糖基化的或非糖基化的。

可使用含有本发明的 midkine 抑制剂作为活性成分的药剂治疗炎症疾病。本发明人已阐明：midkine 以高浓度存在于炎症疾病患者的炎症位点。本领域众所周知的是炎症与嗜中性白细胞迁移密切相关。因此，假定 midkine 抑制剂对嗜中性白细胞迁移的抑制作用可治疗炎症疾病。炎症疾病指的是在任何情况下的临床表现皆为炎症的疾病，其中疾病导致炎症或是由炎症引起的。高等动物炎症的特征是：由微循环系统对刺激作出应答而发生的一系列反应所引起。在普通的炎症中，微血管瞬时收缩，然后舒张，在正常的组织状态下关闭着的毛细血管层开放并增加血液供给。另外，小静脉区域中血管内皮细胞之间的细胞内空间变得较宽，血浆成分由此渗入组织(血管通透性增加)。血管通透性增加以双相模式出现：第一相中的反应是由组胺或 5-羟色胺引发的微弱反应，可称之为立即通透；第二相反应是炎症中的主要血管通透，可称之为延迟通透。多形核白细胞，单核细胞(迁移至组织后的巨噬细胞)，淋巴细胞等通过小静脉区域迁移至组织。由这些血浆成分和细胞产生的激活物增强了组织细胞的增殖并可刺激组织恢复。已知这一过程可表现为发红，

疼痛，灼热和肿瘤。炎症基本上是局部的生物保护性反应，它也可以是组织-毒性的，因此，功能受损被认为是炎症的主要症状之一。炎症反应包括局部组织和细胞的改变，循环干扰和增殖之复杂反应的动态过程。根据表现突出的症状将炎症疾病分为3类：即改变型，渗出型和增殖型炎症。根据炎症的病程也可将炎症疾病分为急性和慢性炎症。炎症疾病包括例如风湿性关节炎(RA)和骨关节炎(OA)。

本发明所用 midkine 抑制剂的优选例子是有效量的肝素(Kaneda, N 等, 生物化学杂志, 119:1150-1156, 1996)和竞争性地与 midkine 的结合位点结合并抑制 midkine 活性的人 ryudocan(Kojima, T., Katsumi, A., Yamazaki, T., Muramatsu, T., Nagasaka, T., Ohsumi, K., 和 Saito, H, 生物化学杂志, 271(10):5914-5920, 1996)。最优选的是抗-midkine 抗体, 该抗体可以是多克隆或单克隆抗体。

可按下述制备抗 midkine 的多克隆抗体：将通过适当方法制备的重组人 midkine 溶液与等体积的弗氏完全佐剂(FCA)混合以得到均质的乳剂。以每只兔(New Zealand White, 2,500-3,000g)约 10 个位点皮下注射该乳剂，用含 70% 酒精的棉花使注射位点免除感染。第一次免疫之后，在第二次和以后的免疫中，使用弗氏不完全佐剂(FIA)替代 FCA 作为佐剂，每两周进行一次免疫。第三次免疫 1 周后，采取兔的血样，4 °C，以 1,600rpm 离心以得到血清，检查血清中抗 midkine 抗体的滴度。当抗体滴度增加至令人满意的水平时，于第 4 或第 5 次免疫之后，采取兔的全血。如上所述，4 °C，以 1,600rpm 离心从全血中得到血清，使用蛋白质 A 从血清中纯化抗 midkine 抗体。然后使用人 midkine 多肽-结合柱，经亲和柱层析进一步纯化抗体。通过上述方案制备抗 midkine 的多克隆抗体。被免疫的动物并不局限于兔。通过与上述基本上相同的方法从多种经免疫的动物中得到抗 midkine 抗体。

通过 Kohler 和 Milstein(Kohler, G 和 Milstein, C, 自然 256:495-497, 1975)报道的方法制备抗 midkine 的单克隆抗体。

抗 midkine 抗体包括人源化抗体(Noguchi, H 和 Azuma, T, 通过抗体工程制备嵌合抗体及其应用, 医学免疫学, 22:628-638, 1991; Noguchi, H, 嵌合抗体和人源化抗体的基本原理和临床应用, Igakunoayumi 167:457-462, 1993; Nakatani, T 和 Noguchi, H, 抗体的人源化, Pharmacia 33:24-28, 1997), 人抗体(Chothia, C 等, 自然, 324:877, 1989; Roguska, M. L 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.

S. A., 91:969, 1994; Winter, G 等, Annu. Rev. Immunol., 12:433, 1994;和 Lonberg, N 等, 自然, 368:856, 1994), 嵌合抗体(Morrison, S. L 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81:6851, 1984;和(Noguchi, H 和 Azuma, T, 医学免疫学, 22:628-638, 1991)等。

用作抗原以制备抗体的 midkine 多肽可以是得自哺乳动物, 如人(JP-A-Hei 5-217778), 小鼠(Kadomatsu, K 等, 生物化学生物物理研究通讯, 151:1312-1318, 1988), 大鼠等的任何 midkine 多肽。衍生自完整的 midkine 并具有 midkine 生物活性的部分肽也可用作抗原以制备抗 midkine 抗体。也可使用 midkine 的衍生物或同系物或其部分肽, 其中一个或多个氨基酸被取代或缺失。用作抗原的 midkine 多肽可以是糖基化的或非糖基化的。

通过例如测定 midkine 中对激活嗜中性白细胞的功能至关重要的氨基酸序列并缺失该序列可以制备 midkine 拮抗剂。

可以给患者施用本发明的含有 midkine 或其抑制剂作为活性成分的药剂以刺激嗜中性白细胞的趋化性, 治疗嗜中性白细胞功能障碍, 或治疗炎症疾病。可根据患者的性别, 体重和病情改变活性成分的剂量, 一般给患者施用的日剂量为 0.1-1000mg, 1 次或几次给药。优选将 midkine 或其抑制剂配制成水溶液或与药物可接受的载体一起配制成适当的剂量形式, 静脉内, 皮下或肌肉内给药。

附图简述

图 1 图示了滑液中 MK 多肽的酶-免疫测定结果。此试验中的检测限为 9pg/ml。低于检测限的 MK 浓度被作图于横坐标的基线上。

图 2 显示出滑液中具有风湿性关节炎(RA)活动性炎症之患者的炎性滑膜组织切片经免疫组化染色后的显微照片。A 试验显示出滑膜细胞和新生血管之间的染色切片; B 试验显示出染色的滑膜壁细胞, C 试验显示出新生血管中染色的血管内皮细胞。A 试验的放大倍数为 104; B 和 C 试验的放大倍数为 208。

图 3 是滑膜组织提取物之 Western 印迹分析模式的照片。泳道 1 是 OA 患者的活动性滑膜炎组织; 泳道 2 是 RA 患者的活动性滑膜炎组织; 泳道 3 是非活动性滑膜炎组织; 泳道 4 是经人工关节置换之患者的无严重组织学炎症的滑膜组织。

图4图示了在MK的作用下,嗜中性白细胞迁移的水平。以预定的浓度将MK加入下部孔中。在MK的存在下保温3小时之后,计数迁移至过滤器下表面的嗜中性白细胞的数目。将每个光区迁移的嗜中性白细胞的平均数目对MK浓度作图。

图5显示出经MK刺激的嗜中性白细胞迁移的棋盘分析结果。数据被表示为每个光区迁移的嗜中性白细胞的平均数目 \pm 标准偏差($n=4$)。交叉线上的数据是缺乏MK浓度梯度时每个光区细胞数目的平均值。

图6对MK浓度作图显示出嗜中性白细胞基于趋触性或趋化性机理所作的MK-依赖型迁移的水平。空心方块表示趋触性机理的试验结果,其中MK被预先包被于过滤器的下表面;实心菱形表示趋化性机理的试验结果,其中MK被预先包被于过滤器的两个表面;空心的圆形表示阴性对照的结果,其中MK被预先包被于过滤器的上表面。保温30分钟之后,计数迁移至过滤器下表面的嗜中性白细胞数目。作图的值表示每个光区迁移的细胞数目的平均值。

实施本发明的最佳模式

下文将描述本发明的实施例,但这些实施例并不会限制本发明的范围。

实施例1

通过ELISA检测midkine(MK)

通过抽吸从OA或RA炎性滑膜炎患者(年龄为26至72;平均年龄为52岁)体内收集滑液样品。通过ELISA检测滑液样品中的MK(Muramatsu, H等,生物化学杂志,119:1171-1175,1996)。在3个健康受试者的任何滑液样品中都检测不到MK,但在6个RA患者的所有样品中都检测到MK(图1, MK浓度为62至10,000pg/ml)。在各得自不同OA患者的6个样品中,有4个可检测到大量的MK(图1, 低于检测限,至1225pg/ml)。结果表明滑液中的MK水平与滑膜炎的炎症状态显著相关。

实施例2

MK的免疫组化检测

滑膜组织得自3个RA患者和2个OA患者的整个膝盖部分。所有活检样品含有增生的炎性骨膜组织,其组织学特征在于滑膜的衬细胞增殖,淋巴

细胞和巨噬细胞广泛浸润，大量生成血管。使用 Muramatsu 等(Muramatsu, H 等, 发育生物学, 159:392-402, 1993)的方法进行免疫组化检测。用中性缓冲的福尔马林固定活检样品，用石蜡包埋，切成 5 微米厚的切片。4 °C，在含有 0.2%牛血清白蛋白和 2%正常山羊血清的 PBS 中，将切片与抗-人 MK 抗体 (15mg/ml)保温过夜。使用用购自 Peptide Institute 公司的化学合成的人 MK 免疫过的兔，通过 Muramatsu 等(Muramatsu, H 等, 生物化学杂志, 119:1171-1175, 1996)的方法制备抗-人 MK 抗体。将对照样品与含有 2%牛血清白蛋白或正常山羊血清的 PBS 保温。将样品和对照切片与生物素化的山羊抗兔抗体(稀释至抗体:PBS=1:250)保温，然后洗涤。再将切片与抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶缀合物(Vector Laboratories 公司, Burlingame, 美国)保温，接着加入含有 1%过氧化氢的 3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)并保温混合物以生色。

使用抗-MK 抗体，2 个 RA 患者样品的滑膜壁细胞和新生血管之间的区域被广泛染色(图 2A)。有趣的是，滑膜壁细胞(图 2B)和毛细血管内皮细胞(图 2C)被 MK 强染色。与其它患者的样品相比，1 个 RA 患者的样品未被强染色。这可以被解释为：此患者的疾病状态是非活动性的。用抗 MK 抗体对两例具有炎性滑膜的 OA 患者进行免疫染色的程度与 RA 患者的炎性滑膜差不多。健康受试者的滑膜样品未被采用。取而代之的是检测了经人工关节置换之患者的无炎性滑膜活检样品。这些样品未被免疫染色。

实施例 3

通过 Western 印迹分析检测 MK

对滑膜组织提取物进行 Western 印迹分析，通过 Laemmli 的方法(Laemmli, U. K., 自然 227: 680-685, 1970)在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳样品，通过 Towin 等(Towin, H 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354, 1979)的方法将凝胶中的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。4 °C，将硝酸纤维素膜与含有 5%脱脂牛奶的 Dulbecco 磷酸缓冲盐水(PBS)保温过夜。然后于室温下与经稀释的抗人 MK 抗体(用 5%脱脂牛奶溶液稀释至 20mg/ml)保温 2 小时。用含有 0.1%吐温 20 的 PBS 洗涤硝酸纤维素膜，与经亲和纯化的抗兔 IgG-辣根过氧化物酶缀合物(Jackson Immunoresearch Laboratories 公司, Baltimore, USA)保温，用 4-氯-1-萘酚染色。

在 OA 患者的活动性炎性滑膜提取物中检测到高水平的 MK(图 3，泳道

1)。而 RA 患者活动性滑膜炎的炎症位点含有中等水平的 MK(图 3, 泳道 2), 相同患者的非活动性炎症位点的 MK 水平低(图 3, 泳道 3)。在经人工关节置换的患者和未患炎性滑膜炎的患者样品中未检测到 MK(图 3, 泳道 4), 因此证实免疫反应性物质是 MK。另外, Western 印迹分析还鉴定出通过免疫组化已经发现的 MK 表达水平与炎症严重性的相关性。

实施例 4

MK 对人嗜中性白细胞迁移的影响

检测由 MK 诱导的嗜中性白细胞趋化性以评价 MK 在炎症反应的早期阶段对白细胞迁移的作用。通过在 Ficoll-Hypaque 中进行特定的重力离心(Venaille, T, J 等, Scand. J. Clin. Lab. Invest, 54:385-391, 1994)从健康受试者的外周血中分离嗜中性白细胞。用 PRMI1640 培养基冲洗收集的细胞, 悬浮于添加有 10%AB 血型人血清的相同培养基中至细胞浓度为 2.5×10^6 个细胞/ml。使用用作上部室的 Chemotaxicell(Kurabo 有限公司, Osaka, 日本)测定由 MK 诱导的嗜中性白细胞迁移。Chemotaxicell 与装配有聚碳酸酯滤器的 Boyden 室相同。将 24 孔培养板(3047, Falcon)用作下部室。在 24 孔培养板的孔中加入用添加有 10%AB 血型人血清的 PRMI1640 培养基稀释的 MK。随后, 将用相同培养基悬浮的嗜中性白细胞(5×10^5 个细胞)置于 Chemotaxicell 中, 将室置于 37°C , 内含潮湿空气和 5% CO_2 的保温箱中保温 3 小时。用 100%乙醇固定通过具 5 微米孔的过滤器迁移的细胞, 染色, 然后用显微镜(Olympus AX80, 放大倍数为 400)计数。在每个试验中, 计数 10 个光区中的嗜中性白细胞。每个样品检测 3 份。数据被表示为平均数目 \pm 标准偏差。此实验揭示出下部室的 MK 刺激上部室中嗜中性白细胞的迁移(图 4)。诱导嗜中性白细胞迁移的 MK 最适浓度为 10ng/ml(显著水平: $p < 0.01$)(图 4)。

进行棋盘分析(Zigmond, S. H 和 Hirsch, J. G, 实验医学杂志, 137:387-410, 1973)以阐明 MK-依赖型嗜中性白细胞迁移是受识别趋化因子之浓度梯度的定向移动(趋化性)控制, 还是受随机移动(化学移动性)控制。结果示于图 5。

从图中所示的数据可明显看出: 当按下列方式安排 MK 浓度梯度时, 即下部室的 MK 浓度较高, 上部室的浓度较低时, 增加数目的嗜中性白细胞通过过滤器迁移, 这表明 MK 作为趋化因子起作用。

实施例 5

MK 依赖型趋化性的机理

细胞移动性的获得被认为是粘附-依赖型事件(Timothy, A. S., 细胞 76:301-314, 1994)。MK 与多配体聚糖紧密结合(Mitsiadis, T. A 等, 发育, 121:37-51, 1995;和 Kojima, T 等, 生物化学杂志, 271(10):5914-5920, 1996), 多配体聚糖属于细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖家族(Elenius, K 等, 细胞生物学杂志, 114:585-595, 1991)。检查了与基质结合的 MK 增强嗜中性白细胞迁移的能力。具体地说, 通过 Rot 的方法(Rot, A, 欧洲免疫学杂志, 23:303-306, 1993)进行趋触性机理试验以测定 MK 是以游离的形式起作用(趋化性机理)还是以与基质结合的形式起作用(趋触性)。

趋触性机理试验的第一步是: 通过在下部孔中加入 MK(1-100ng/ml)用 MK 预包被滤器的下表面, 用 RPMI1640 培养基填充相应的上部孔以建立 MK 的正趋触性梯度。

在另一套阴性对照试验中, 通过在上部孔中加入 MK(1-100ng/ml)用 MK 预包被滤器的上表面, 用 RPMI1640 培养基填充相应的下部孔以建立 MK 的负趋触性梯度。

在趋化性机理试验中, 上部和下部的孔都被 RPMI1640 培养基填充(趋化性梯度)。

于 37 °C 将每个孔保温 20 分钟, 用 RPMI 溶液充分洗涤由上部室和聚碳酸酯滤器组成的 Chemotaxicell 以除去未结合的(游离的)MK 分子。

第二步, 在趋触性机理和阴性对照的试验中, 用含有 10%AB 血型之血清的 RPMI 溶液填充上部和下部孔。在趋化性机理试验中, 在下部室中加入 MK(1-100ng/ml)。

在第二步制备的每套试验中, 将嗜中性白细胞(5×10^5)置于上部孔中。37 °C 将孔保温 30 分钟。通过计数穿过滤器迁移的嗜中性白细胞以测定嗜中性白细胞的移动性。在每个试验中, 计数 10 个光区中的嗜中性白细胞。每个样品检测 3 份。数据被表示为迁移的细胞数目 \pm 标准偏差。

在趋触性机理的试验中, 与滤器结合的 MK 甚至在低 MK 浓度(1ng/ml; 显著水平 $p < 0.01$)时都可在短期(30 分钟)保温阶段刺激嗜中性白细胞迁移(图 6, 空心方块)。与之相反, 在趋化性机理试验(图 6, 实心菱形)以及阴性对照试验(图 6, 空心圆形)中, 保温 30 分钟之后仍不能刺激嗜中性白细胞的迁移。

这些结果表明 midkine 刺激的嗜中性白细胞迁移基于趋触性机理。

工业实用性

本发明提供了控制嗜中性白细胞功能的新药剂，其含有 midkine 或其抑制剂作为活性成分。本发明通过刺激嗜中性白细胞迁移可以治疗嗜中性白细胞功能障碍，或通过抑制嗜中性白细胞迁移可治疗炎症疾病。

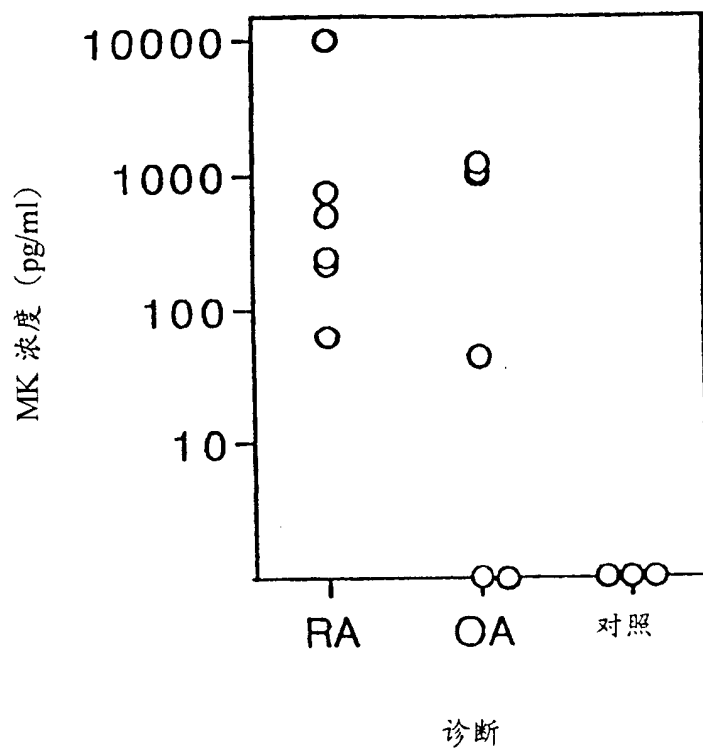


图 1

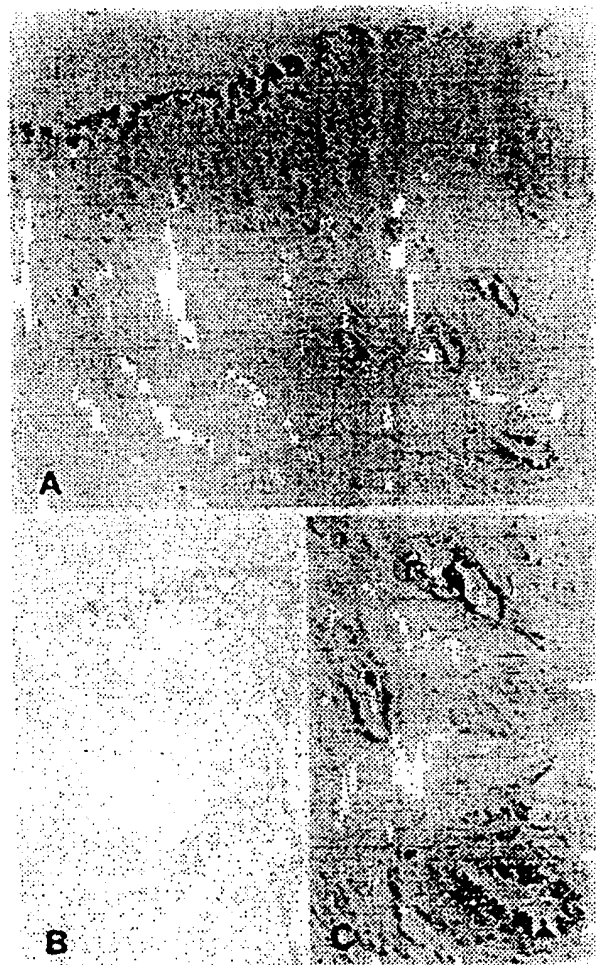


图 2

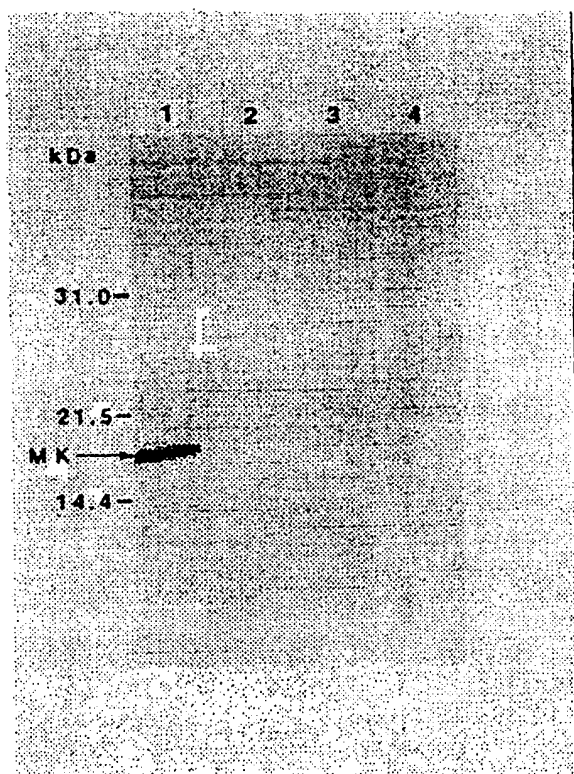


图 3

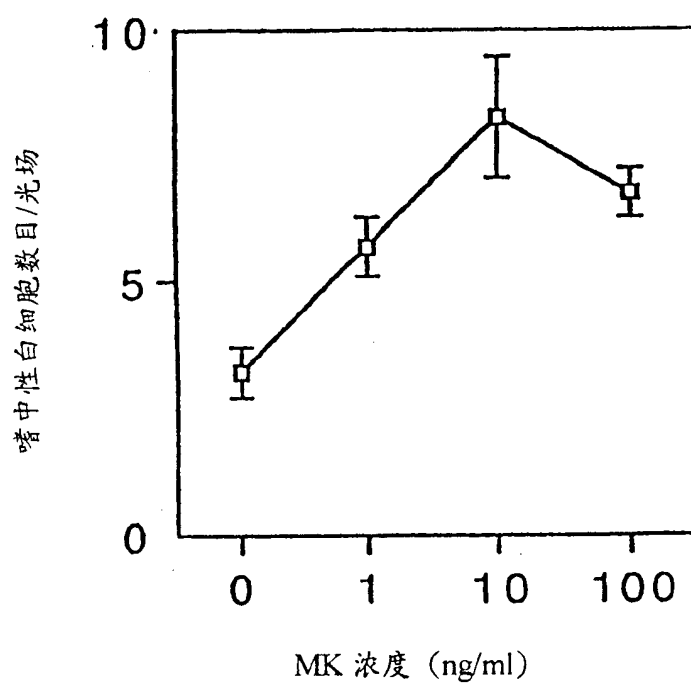


图 4

上部室中的MK浓度 (ng/ml)

	0	1	10	100
0	3.2±0.5	2.1±0.4	3.7±0.5	2.8±0.3
1	5.7±0.6	2.6±0.6	4.5±0.7	3.5±0.4
10	8.3±1.2	5.5±0.7	4.7±0.5	2.6±0.4
100	6.8±0.5	6.9±0.6	6.9±0.7	5.8±0.9

下部室中的MK
浓度 (ng/ml)

图 5

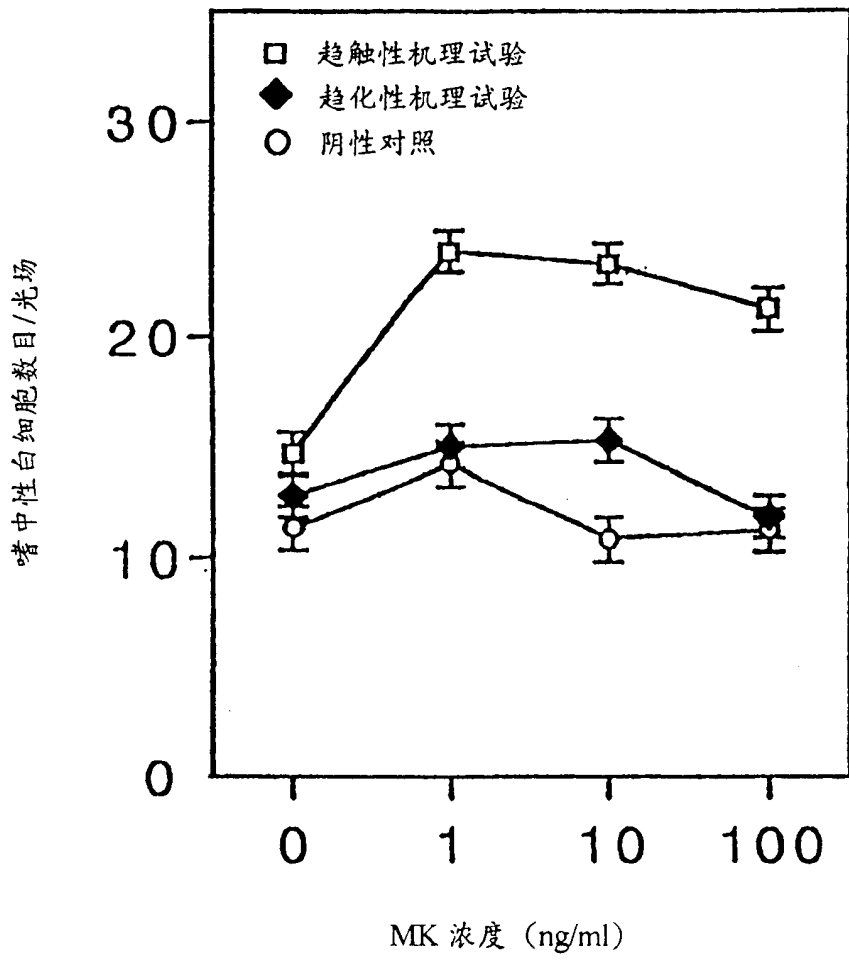


图 6