



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I566780 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：104134410

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)
A61P9/14 (2006.01)

C07K16/24 (2006.01)

(30)優先權：2014/10/24 美國 62/068,475

(71)申請人：國立陽明大學(中華民國) NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY (TW)

臺北市北投區立農街 2 段 155 號

臺北榮民總醫院(中華民國) TAIPEI VETERANS GENERAL HOSPITAL (TW)

臺北市北投區石牌路 2 段 201 號

(72)發明人：陳肇文 CHEN, JAW WEN (TW)；張婷婷 CHANG, TING TING (TW)

(74)代理人：蔡坤旺

(56)參考文獻：

US 2011/0280871A1

Wetzler C et al., "Large and Sustained Induction of Chemokines during Impaired Wound Healing in the Genetically Diabetic Mouse: Prolonged Persistence of Neutrophils and Macrophages during the Late Phase of Repair", Journal of Investigative Dermatology, Vol. 115, No.2, , Pages 245-253, 2000/08

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：6 共 31 頁

(54)名稱

巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑用於促進血管新生以改善組織缺血及糖尿病血管病變的用途USE OF MIP-1 β INHIBITORS FOR IMPROVING ANGIOGENESIS TO REDUCE TISSUE ISCHEMIA AND RESCUE DIABETIC VASCULAR DISEASE IN DIABETES MELLITUS

(57)摘要

本發明係關於巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑用於促進糖尿病患者血管新生，以改善受損部位組織缺血，及防止併發糖尿病血管病變的用途。

The present invention relates to a use of MIP-1 β inhibitor in improving angiogenesis to reduce tissue ischemia and rescue diabetic vascular diseases in diabetes mellitus patients.

指定代表圖：

I566780

TW I566780 B

圖 1A

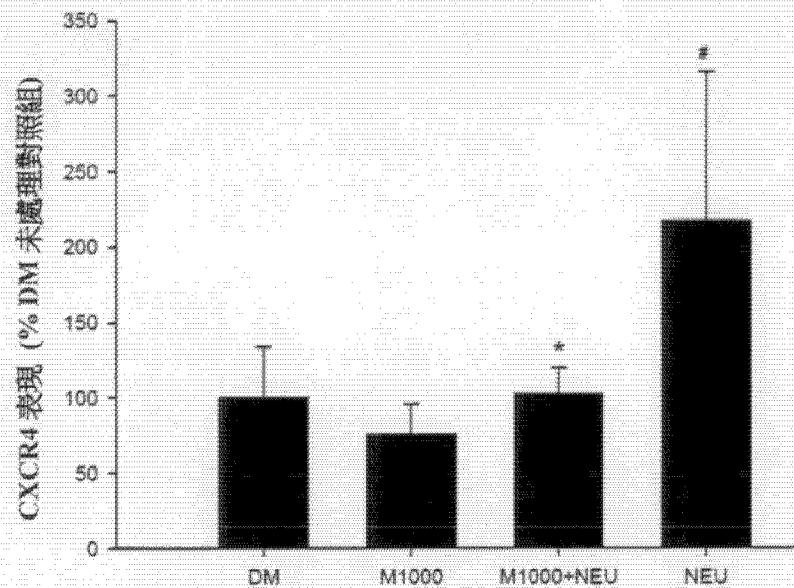


圖 1B

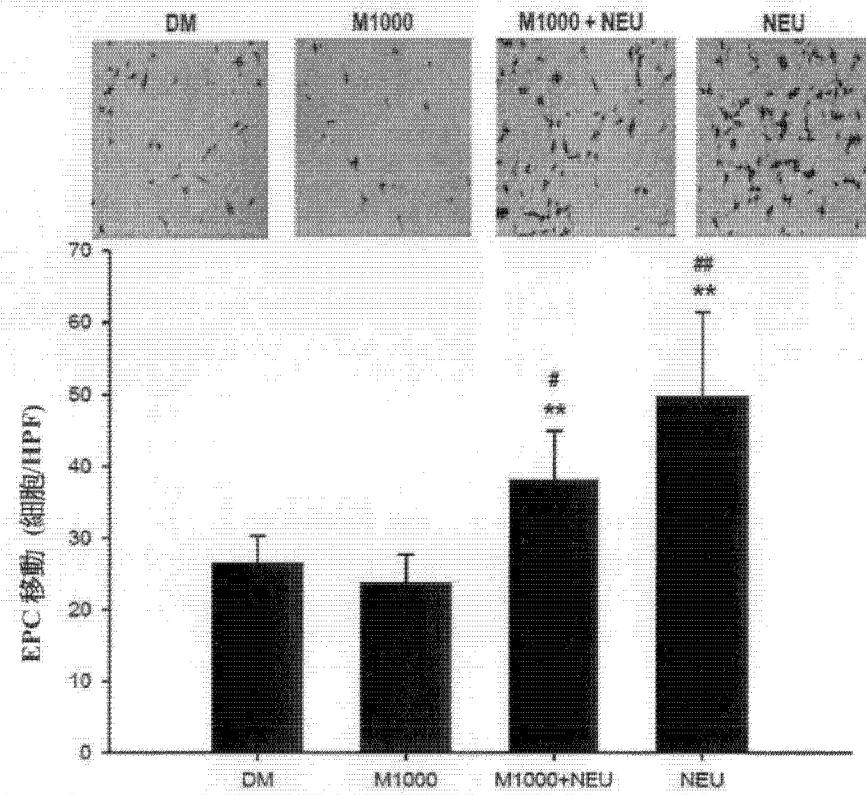


圖 1C

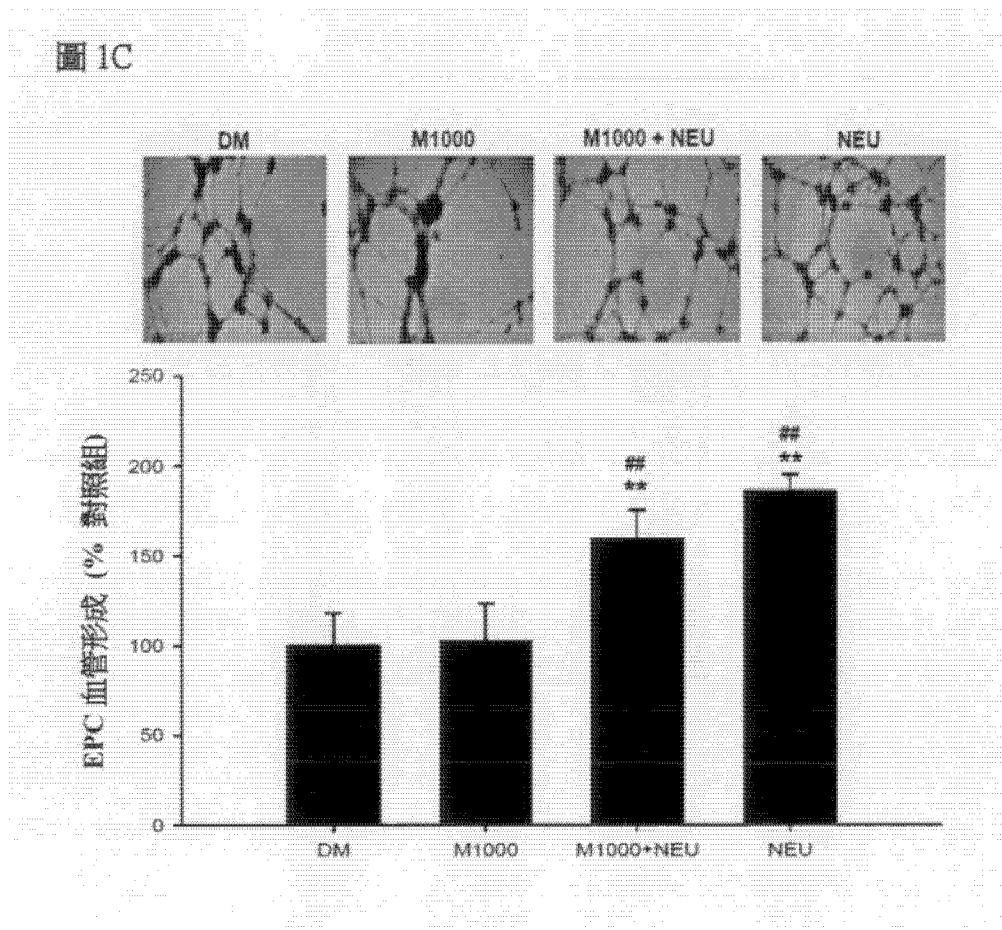


圖 1D

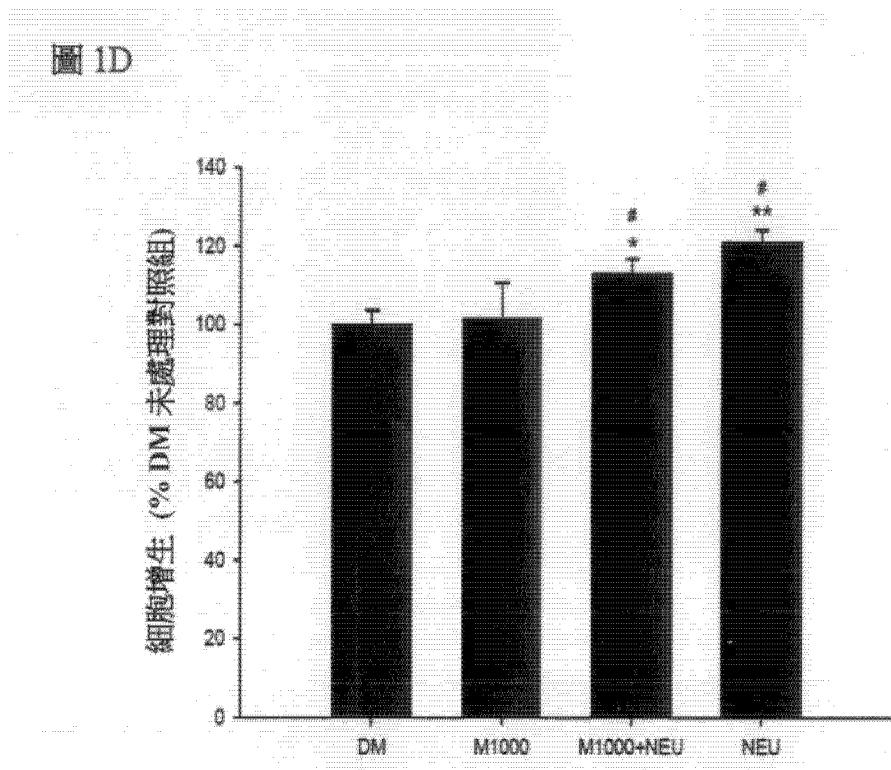


圖 1E

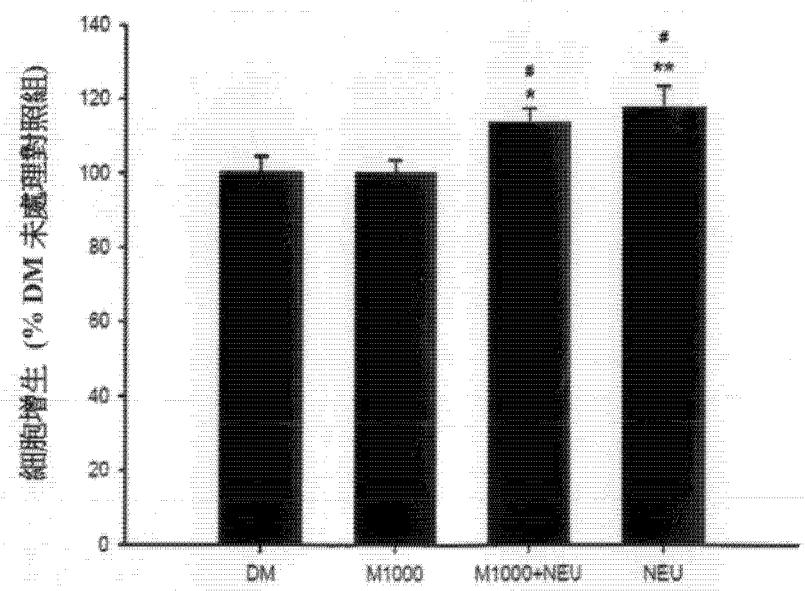
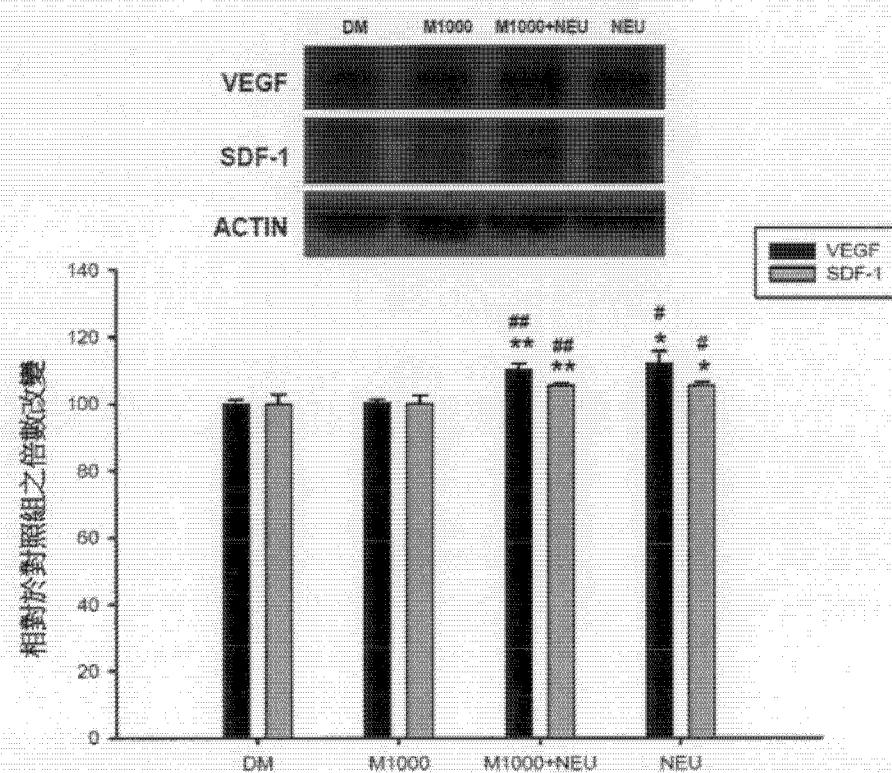


圖 1F



I566780

公告本

105年11月14日修(更)正本

(鉅)

發明摘要

※ 申請案號：104134410

A61k 39/395 (2006.01)

※ 申請日：104.10.20

※IPC 分類：C07K 16/24 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

【發明名稱】

巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑用於促進血管新生以改善組織缺血及糖尿病血管病變的用途 / Use of MIP-1 β inhibitors for improving angiogenesis to reduce tissue ischemia and rescue diabetic vascular disease in diabetes mellitus

【中文】

本發明係關於巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑用於促進糖尿病患者血管新生，以改善受損部位組織缺血，及防止併發糖尿病血管病變的用途。

【英文】

The present invention relates to a use of MIP-1 β inhibitor in improving angiogenesis to reduce tissue ischemia and rescue diabetic vascular diseases in diabetes mellitus patients.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

105年11月14日修(處)正本
(全文)

發明專利說明書

【發明名稱】 巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑用於促進血管新生以改善組織缺血及糖尿病血管病變的用途

【技術領域】

【0001】 本發明係關於利用抑制巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)之活性以改善組織缺血及血管病變的用途。更特別地，本發明係關於包含巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑之組合物用於促進糖尿病患者血管新生的用途。

【0002】

【先前技術】

【0003】 心血管疾病是第一型及第二型糖尿病人(尤其是第二型糖尿病病人)之主要死因。糖尿病人因周邊血管病變而截肢之情況亦時有所見。糖尿病之血管病變除與動脈硬化之一般危險因子如血壓、血脂、血糖等相關外，其特色為明顯且全身性之血管發炎反應(Vascular inflammation)。然而目前糖尿病之血管病變治療效果較一般動脈硬化心血管疾病治療效果為差。其中一個主要原因乃是：目前並無有效之治療策略針對糖尿病血管病變之發炎反應加以控制。

【0004】 現有的防治血管病變之藥物，其治療主要係針對動脈硬化之一般危險因子，如血壓、血脂、血糖等加以調控，但只能延緩糖尿病相關之血管病發病，或是在糖尿病相關之血管病變發生後再加以控制，並未能夠針對糖尿病之血管發炎反應(Vascular inflammation)加以控制。因此，有需要尋求一種可直接調控糖尿病之血管發炎反應，保護血管、加強血管新生及改善組織缺血，以防治糖尿病血管病變的新治療方式。

【0005】 許多研究發現，受損的內皮細胞層可以藉由血液中的內皮前驅幹細胞 (endothelial progenitor cell，EPC細胞) 來進行修復，藉以維持血管內皮細胞層的功能性與完整性，

而內皮前驅幹細胞在發生缺氧的組織中，亦被證實具有促進血管新生的作用，新生血管能提供缺氧組織所需要的血液循環，以減少組織因缺氧所造成的器官傷害(Asahara, T. 等人, *EMBO J* 18, 3964-3972 ,1999; Gallagher, K.A. 等人, *J Clin Invest* 117, 1249-1259 ,2007)。因此，如何藉由提升內皮前驅幹細胞來改善血管動脈硬化與增加缺氧組織之血管新生，亦是目前研究的重要課題。

【0006】 已知，SDF-1 受體 CXCR4 可介導 EPC 細胞從骨髓移出的作用，且阻斷循環性 EPC 細胞上之 CXCR4 作用，會阻止 EPC 再補充至絕血部位(Ceradini, D.J. 等人, *Nat Med* 10, 858-864 ,2004)。而在糖尿病鼠，受損組織中的 VEGF 及 SDF-1 表現、周邊血液之 EPC 細胞數量以及 EPC 細胞上之 CXCR4 表現量都有減少的現象(Ceradini, D.J. 等人, *Journal of Biological Chemistry* 283, 10930-10938 ,2008)。

【0007】 巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 最先係於由脂多醣所活化的巨噬細胞培養液中所發現，他的分子量為7.8千道爾頓，其蛋白質結構為92個胺基酸前驅物所組成。根據文獻指出，血中的巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 數值與糖尿病及心血管疾病皆有正相關性。在活體外實驗中，MIP-1 β 能夠促進THP-1細胞之活性氧產生，並誘導THP-1細胞透過經由PI3k - Rac1級聯所介導之氧化壓力，附著至人類臍靜脈內皮細胞上(Tatara Y等人, *J Mol Cell Cardiol* 47:104-111, 2009)。此外，於高濃度糖存在下，巨噬細胞分泌之MIP-1 β 蛋白能夠促使內皮細胞表現黏附分子，例如內皮細胞選擇素(E-selectin)(Chen TC等人, *J Biol Chem* 286:25564-25573, 2011)。

【0008】 在心肌梗塞動物模式中，誘導梗塞心臟產生細胞因子，會促使具有特殊性質的白血球族群再補充到缺血部位，而在梗塞小鼠之心肌中，MIP-1 β 及其受體CCR5會明顯受到誘導產生(Dobaczewski M等人, *Am J Pathol* 176:2177-2187, 2010)。但是至目前為止，MIP-1 β 是否直接與血管保護及心肌

損傷修護有關，則仍缺乏相關的活體實驗證據。

【0009】因此，吾等嘗試藉由調控巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 之作用，來增加糖尿病患者之內皮前驅幹細胞增生、促進血管修復新生、改善組織缺血，以及進一步防治糖尿病併發的血管病變及心血管疾病。

【發明內容】

【0010】本發明基於以上之目的發現，在活體內，透過直接抑制體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 之作用(例如施予抗-巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 單株抗體(mAb)或拮抗劑等方法)，可有效加強糖尿病動物之血管保護。

【0011】於是，本發明之一方面係關於，一種巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抑制劑用於製備促進糖尿病患者血管新生之醫藥組成物的用途。於本發明之某些具體實施態樣，所述之醫藥組成物係用於改善糖尿病患者組織缺血。於本發明之其他具體實施態樣，所述之醫藥組成物係用於防止糖尿病患者血管病變。

【0012】於本發明之某些具體實施態樣，所述之巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抑制劑為能夠減低或抑制巨噬細胞發炎蛋白-1 β 之生物活性的化合物。於本發明之一項具體實施態樣，所述之巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抑制劑為對於巨噬細胞發炎蛋白-1 β 具有結合特異性的配體化合物，例如抗-巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抗體或拮抗劑。

【0013】於本發明之某些具體實施態樣，所述之抗-巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抗體為單株抗體或多株抗體。於本發明之一項具體實施態樣，所述之抗-巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抗體為單株抗體，或其與巨噬細胞發炎蛋白-1 β 之至少肽類片段結合的抗體片段。於本發明之其他具體實施態樣，所述之巨噬細胞發炎蛋白-1 β 之肽類片段包含胺基酸序列⁴⁶SFVMDYYET⁵⁴(SEQ ID NO:1)，或⁶²AVVFLTKRGRQIC⁷⁴(SEQ

ID NO:2)。

【圖式簡單說明】

【0014】

圖 1 係顯示 MIP-1 β -抑制劑對於糖尿病患者，影響其體內 EPC 細胞之 CXCR4 表現(圖 1A; n=6)，以及回復 EPC 細胞之移動(圖 1B，1C; n=5)與增生(圖 1D，1E; n=3)，及促進血管新生能力細胞因子表現(圖 1F; n=3)的作用。圖 1D 及 1E 所表示的 EPC 細胞增生結果，係分別以 MTT (D)與 BrdU 細胞增生分析(E)測定分離自糖尿病患者之 EPC 細胞增生而得。圖 1F 所示糖尿病患者血漿中細胞因子 VEGF 及 SDF-1 α 之表現量，係以西方轉濱法進行分析，並與對照組之數值進行統計分析。 $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$ 係相較於未經抗體處理之基礎對照組。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 係相較於單獨以 MIP-1 β 1000 ng/ml 處理之對照組。

圖 2 係顯示 MIP-1 β 蛋白對於正常小鼠之血管修復新生具有抑制作用，會減低下肢血流之恢復，加重組織缺血。圖 2A 中紅色影像是指示有血液流通，圖 2B 為血流速率統計圖 (n=6~8)。

圖 3 係顯示 MIP-1 β -抑制劑對於第一型糖尿病小鼠血管的保護功效，以單株抗體(mAb)抑制體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 的活性，可於有下肢血管阻斷(OP)之糖尿病小鼠有效促進血管修復新生。圖 3A 為血流影像圖，其中紅色影像是指示有血液流通，圖 3B 為血流速率統計圖(n=6~8; 2C)。圖 3C 為注射單株抗體(mAb)2 週後，測定糖尿病小鼠體內循環性 EPC 細胞數量(n=6)。

圖 4A 為以雙重免疫組織染色分析(Immunohistochemical analysis)檢測糖尿病小鼠 eGFP(綠色螢光)-CD31(紅色螢光)陽性細胞於絕血組織肌肉中的數量及分布(n=6~8)；圖 4B

為 eGFP-CD31 陽性細胞/肌纖維螢光強度比之數值統計圖，eGFP(綠色螢光)代表 EPC 細胞(由骨髓衍生)，CD31(紅色螢光)代表微血管，綠紅螢光重疊部分表示該細胞有能力到缺血位置進行血管修復。圖 4C 及 4D 係顯示以西方轉漬法(Western blot)與統計分析，檢測糖尿病小鼠有或無注射中和抗體 2 週後，其血漿中 VEGF (C)及 SDF-1 α (D)的含量(n=3)。圖 4E 及 4F 係顯示於周邊血液單核細胞(E)及骨髓單核細胞(F)上的 CXCR4 表現量(n=6~10)。#P<0.05, ##P<0.01 係相較於未經抗體處理之 DM 小鼠。

圖 5 係顯示 MIP-1 β -抑制劑對於第二型糖尿病小鼠血管的保護功效。圖 5A, 5B 顯示，以單株抗體(mAb)抑制體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 的活性，有效促進經下肢血管阻斷(OP)之糖尿病小鼠的血管修復新生，圖 5A 中紅色影像是指示有血液流通，圖 5B 為血流速率統計圖 (n=6~8)。圖 5C, 5D 係顯示以 MIP-1 β 單株抗體抑制 MIP-1 β 活性相較於未處理組可增加缺血肌肉的微血管密度(C)，及 CD31 陽性細胞/肌纖維比(D)。圖 5E, 5F 係顯示以 MIP-1 β 單株抗體處理之糖尿病小鼠，在下肢缺血手術後的循環 EPC 細胞數(E)及骨髓單核細胞上的 CXCR4 表現量(F)相對於位處理小鼠之增加情形。#P<0.05, ##P<0.01 係相較於未經抗體處理之 DM 小鼠。

圖 6 係顯示 MIP-1 β -抑制劑對於肥胖型糖尿病小鼠血管的保護功效，有效促進血管修復新生。圖 6A, 6B 分別為以單株抗體(mAb)處理經下肢血管阻斷(OP)之糖尿病小鼠的血流影像，及血流速率統計圖(n=6)。圖 6C, 6D 係顯示以 MIP-1 β 單株抗體處理之糖尿病小鼠，在下肢缺血手術後的循環 EPC 細胞數(C)及骨髓單核細胞上的 CXCR4 表現量(D)相對於位處理小鼠之增加情形。#P<0.05, ##P<0.01 係相較於未經抗體處理之 DM 小鼠。

【實施方式】

【0015】 於本說明書中所稱的“巨噬細胞發炎蛋白-1 β -抑制劑(MIP-1 β -抑制劑)”意指，一種可減少MIP-1 β 蛋白含量及/或降低MIP-1 β 蛋白之至少一種活性的化合物。於本發明之一項具體實施態樣，所述之MIP-1 β -抑制劑化合物可使MIP-1 β 蛋白之至少一種生物活性降低至少約10%、25%、50%、75%或以上。

【0016】 於本發明之某些具體實施態樣，所述之MIP-1 β -抑制劑化合物係藉由減低MIP-1 β 蛋白表現量，來保護胰臟及防止血糖升高。例如可使用靶定MIP-1 β 之siRNA、反義核酸或標酶，抑制細胞內MIP-1 β 基因表現。亦可藉由調節編碼MIP-1 β 蛋白之基因轉錄，或使所對應的mRNA不安定，而減少MIP-1 β 蛋白之表現量。

【0017】 於本發明之其他具體實施態樣，所述之MIP-1 β -抑制劑化合物係藉由與MIP-1 β 蛋白結合，直接或間接降低或抑制MIP-1 β 蛋白之生物活性，來保護胰臟及防止血糖升高。例如，根據本發明之某些實施例，可使用對抗MIP-1 β 之抗體與MIP-1 β 蛋白競爭結合至細胞表面上的受體，而抑制體內MIP-1 β 蛋白之生物活性。所述之抗體可包括全長單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)以及抗體片段。

【0018】 於本說明書中所稱的“抗體”意指一種與特定抗原特異結合之能力的免疫球蛋白分子或其片段。“抗體片段”包含全長抗體之一部分，較佳是抗體的抗原-結合區或可變區。抗體片段之實例包括Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、F(ab)₃、Fv(代表性地為抗體其中一單臂之VL及VH功能域)、單鏈Fv(scFv)、dsFv、Fd片段(代表性地為VH與CH1功能域)及dAb片段(代表性地為VH功能域)；VH、VL及VhH功能域；迷你抗體(minibodies)、二體(diabodies)、三體(triabodies)、四體(tetrabodies)及kappa抗體(參見，III等人，*Protein Eng* 10: 949-57,

1997)；駱駝 IgG；以及由抗體片段一或多個單離的 CDRs 或一個功能性互補位(paratope)形成之多特異性抗體片段，其中單離的或抗原結合殘基賦予相互結合或鍵聯，而形成功能性抗體片段。

【0019】 於本發明之某些具體實施態樣，所述之 MIP-1 β -抑制劑為與 MIP-1 β 蛋白特異性結合之單株抗體。於本發明之一具體實施態樣，所述之抗-MIP-1 β 單株抗體係與 MIP-1 β 蛋白結構上之主要功能作用部位結合。根據本發明之某些實施例，所述之 MIP-1 β -抑制劑(例如，抗-MIP-1 β 單株抗體)可與一包含 MIP-1 β 蛋白之胺基酸序列⁴⁶SFVMDYYET⁵⁴ (SEQ ID NO:1)，或⁶²AVVFLTKRGRQIC⁷⁴ (SEQ ID NO:2)之抗原決定基結合。

【0020】 根據本發明之某些實施例，所述之抗體可為人源化或全人源單株抗體。

【0021】 根據本發明之醫藥組成物，可包含至少一種 MIP-1 β -抑制劑及一或多種生理上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑。可依據所選擇之投藥途徑，而調配得適當的醫藥組成物形式，包括(但不限定於)口服製劑如片劑、膠囊、粉末等，非經腸道製劑如皮下、肌肉或腹膜內注射液，及於投藥前與生理緩衝溶液組合之凍乾粉末等。

【0022】 本發明之其他特色及優點將於下列實施範例中被進一步舉例與說明，而該實施範例僅作為輔助說明，並非用於限制本發明之範圍。

【0023】 本發明之其他特色及優點將於下列實施範例中被進一步舉例與說明，而該實施範例僅作為輔助說明，並非用於限制本發明之範圍。

【0024】 實施例一、MIP-1 β -抑制劑增加 CXCR4 表現及促進 EPC 細胞的增生與功能

【0025】 本實例首先評估 MIP-1 β 蛋白及 MIP-1 β -抑制劑對於 EPC 細胞的作用。將取自第二型糖尿病患者之 EPC 細胞

(5×10^4 顆細胞)以 MIP-1 β 1000 ng/ml 單獨或與抗-MIP-1 β 30 μ g/ml 中和抗體共同處理 30 分鐘。由圖 1A 之結果顯示，單獨以 MIP-1 β 蛋白處理並不會影響 CXCR4 表現，而與抗-MIP-1 β 抗體共培養，則會顯著增加 EPC 細胞上的 CXCR4 表現量。

【0026】 於是，進一步以艙室分析(chamber assay)測試，將 EPC 細胞暴露至 MIP-1 β 是否會抑制其朝向 SDF-1 α 的移動能力。由圖 1B 及 1C 之結果顯示，以 MIP-1 β 處理之 EPC 細胞(M1000 組)，其細胞移動及活體外血管形成能力皆受到明顯抑制；而經由 MIP-1 β -抑制劑(抗-MIP-1 β 中和抗體)處理的 EPC 細胞(M1000+NEU 及 NEU 組)，相較於 DM 組及 MIP-1 β 處理組(M1000 組)，則呈現恢復的細胞移動與活體外血管形成能力。

【0027】 而且，分別藉由 MTT 及 BrdU 細胞增生分析的測試結果顯示，在抗-MIP-1 β 中和抗體(NEU)處理的 EPC 細胞組，其細胞增生也明顯增加(圖 1D, 1E)；此外，經由 MIP-1 β -抑制劑(抗-MIP-1 β 中和抗體，NEU)處理亦可增加 VEGF 及 SDF-1 α 的產生(圖 1F)。

【0028】 實施例二、MIP-1 β -抑制劑對於第一型糖尿病動物(鏈佐黴素(STZ)-誘導之糖尿病小鼠模型)之血管保護

【0029】 在正常無糖尿病動物，注射巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β ，可抑制下肢缺血(OP)後之血管修復新生、減低下肢血流之恢復，加重組織缺血。此作用會依 MIP-1 β 劑量增加(M0.1 μ g, 1.0 μ g, 10.0 μ g)而加重(圖 2)。

【0030】 本實例以第一型糖尿病動物(鏈佐黴素(STZ)-誘導之糖尿病小鼠模型)進行活體實驗，證明 MIP-1 β -抑制劑可促進糖尿病小鼠之血管新生，改善組織缺血。將小鼠先施予骨髓細胞移植，並注射鏈佐黴素(STZ)-誘導高血糖之糖尿病發生，接著進行下肢血管結紮手術。

【0031】 由圖 3A 之結果顯示，每組小鼠經過下肢血管結

紮手術的下肢相較於另一未經血管結紮手術的下肢，血流都可以相同程度地減少。經過 2 及 4 週後，正常(非-糖尿病)小鼠的絕血情況已慢慢恢復血流，但是糖尿病小鼠則無法自行恢復。而糖尿病小鼠在經過施打 MIP-1 β -抑制劑(抗-MIP-1 β mAb)處理後，其絕血情況已明顯獲得改善，而呈現與正常小鼠相似的血流恢復(圖 3B)。

【0032】無糖尿病之正常動物於接受下肢血管結紮手術(OP)造成下肢缺血時，周邊血中血管內皮幹細胞(Sca-1 $^+$ /Flk-1 $^+$ 雙陽性細胞)會大量升高，以促進下肢血管新生。而血糖值高之第一型糖尿病動物周邊血中血管內皮幹細胞則於下肢缺血時不會升高。注射抗-MIP-1 β 單株抗體(mAb)對抗體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β ，可有效升高第一型糖尿病動物其手術(OP)後周邊血中血管內皮幹細胞數量，以幫助血管修復新生、改善組織缺血(圖 3C)。

【0033】實施例三、MIP-1 β -抑制劑藉由增加 EPC 細胞復位(homing)及增量調節 VEGF 與 SDF-1 產生而促進糖尿病動物之血管新生

【0034】由免疫組織切片染色之結果顯示(圖 4A)，在糖尿病小鼠之絕血下肢，其微血管密度及 EPC 細胞(由骨髓衍生)復位數量，相較於非糖尿病小鼠皆明顯減少；而注射對抗體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 之抗-MIP-1 β 單株抗體(mAb)的小鼠，其缺血肌肉中所含的雙陽性細胞數量明顯較未經抗體處理之糖尿病小鼠缺血肌肉多，表示抑制活體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β ，可有效增加 EPC 細胞(由骨髓衍生)復位數量，並改善糖尿病小鼠因組織缺血所產生微血管減少的情形。eGFP $^+$ (綠色螢光)代表 EPC 細胞(由骨髓衍生)，CD31 $^+$ (紅色螢光)代表微血管，DAPI 染色(藍色螢光)代表細胞核，綠、紅螢光重疊部分表示該細胞有能力到缺血位置進行血管修復。為標準化定量，將所得之綠、紅螢光重疊數量與肌纖維數量以比值呈現(圖 4B)。

【0035】以西方轉自分析測定血漿的血管生成細胞因子 VEGF 與 SDF-1 α 之含量，結果顯示以 MIP-1 β -抑制劑處理可增加糖尿病小鼠血漿中的血管生成細胞因子 VEGF 與 SDF-1 α 含量(圖 4C, 4D)，同時亦可逆轉因糖尿病所造成，在周邊血液單核細胞及骨髓單核細胞表面上 CXCR4 表現量減低的情況(圖 4E, 4F)。

【0036】綜合以上的研究結果證明，於第一型糖尿病小鼠模式，MIP-1 β -抑制劑可透過增加類 EPC-細胞之復位，增加血管生成細胞因子 VEGF 及 SDF-1 α 的血漿濃度，以及回復周邊血液單核細胞及骨髓單核細胞上之 CXCR4 表現量，來促進糖尿病組織絕血部位的血管新生，協助恢復正常血流而防止受損組織壞死。

【0037】實施例四、MIP-1 β -抑制劑對於第二型糖尿病動物 (Lepr^{db/db} 小鼠模型)之血管保護及促進血管新生

【0038】本實例係以第二型糖尿病動物 (Lepr^{db/db} 小鼠模型) 進行活體實驗證明，MIP-1 β -抑制劑對於第二型糖尿病亦具有促進血管新生及恢復絕血下肢血流的功能。由圖 5 顯示，在血糖值高之第二型糖尿病動物，注射單株抗體(mAb)對抗體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β ，可有效幫助下肢缺血(OP)後之血管修復新生、增加下肢血流之恢復，改善組織缺血(圖 5A, 5B)。

【0039】同樣，於第二型糖尿病小鼠模式，MIP-1 β -抑制劑可有效升手術(op)後糖尿病動物之周邊血中血管內皮幹細胞數量(圖 5C)，增加微血管密度(圖 5D, 5E)，循環性 EPC 細胞(由骨髓衍生)復位數量(圖 5F)，及回復骨髓單核細胞上之 CXCR4 表現量(圖 5G)。

【0040】實施例五、MIP-1 β -抑制劑對於高脂肪飲食所誘發的糖尿病小鼠模型之血管保護及促進血管新生

【0041】本實例係以高脂肪飲食所誘發的糖尿病小鼠模型)進行活體實驗證明，MIP-1 β -抑制劑對於肥胖型糖尿病亦

具有促進血管新生及恢復絕血下肢血流的功能。由圖 6 顯示，在血糖值高之第二型糖尿病動物，注射單株抗體(mAb)對抗體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β ，可有效幫助下肢缺血(OP)後之血管修復新生、增加下肢血流之恢復，改善組織缺血(圖 6A, 6B)。

【0042】 於肥胖型糖尿病小鼠模式，MIP-1 β -抑制劑可有效升缺血手術(OP)後糖尿病動物之周邊血液血管內皮幹細胞(Sca-1/Flk-1 雙陽性細胞)的數量(圖 6C)，以及回復骨髓單核細胞上之 CXCR4 表現量(圖 6D)。

【0043】 根據本發明已證實，在活體內，巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β 會抑制血管修復新生，及減低下肢缺血後之血流恢復，加重組織缺血。而以單株抗體(mAb)直接對抗體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 β ，可有效加強糖尿病動物之血管保護，藉由促進血管內皮幹細胞增生及復位，幫助血管修復新生及改善組織缺血。因此，透過直接抑制體內巨噬細胞發炎蛋白(MIP)-1 之活性及作用(例如，藉由投藥單株抗體或拮抗劑等方法)，對糖尿病之血管病變防治有直接且重大的效益。

【符號說明】

【0044】 無

2016年11月14日修正

【序列表】

<110> 國立陽明大學
臺北榮民總醫院

<120> 巨噬細胞發炎蛋白-1 β (MIP-1 β)抑制劑用於促進血管新生以改善組織缺血及糖尿病血管病變的用途

<130>

<160> 2

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

Ser Phe Val Met Asp Tyr Tyr Glu Thr

1

5

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 2

Ala Val Val Phe Leu Thr Lys Arg Gly Arg Gln Ile Cys

1

5

10

公告本

2016年11月14日修正

申請專利範圍

1. 一種巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抑制劑用於製備促進糖尿病患者血管新生之醫藥組成物的用途，其中該巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抑制劑為抗-巨噬細胞發炎蛋白-1 β 抗體。
2. 如請求項 1 所述之用途，其中該醫藥組成物係用於改善糖尿病患者的組織缺血。
3. 如請求項 1 所述之用途，其中該醫藥組成物係用於防止糖尿病患者血管病變。
4. 如請求項1或2所述之用途，其中該醫藥組成物係用於增加內皮前驅幹細胞，修復糖尿病患者的血管損傷，及促進缺血後之血流恢復。
5. 如請求項 1 所述之用途，其中該 MIP-1 β -抑制劑為與 MIP-1 β 蛋白或其片段特異性結合之抗-MIP-1 β 單株抗體。
6. 如請求項 5 所述之用途，其中該抗-MIP-1 β 單株抗體係與 MIP-1 β 蛋白結構上之主要功能作用部位結合。
7. 如請求項 6 所述之用途，其中該抗-MIP-1 β 單株抗體係與一包含 MIP-1 β 蛋白之胺基酸序列位置 46~54: SFVMDYYET (SEQ ID NO:1)之肽類片段結合。
8. 如請求項 6 所述之用途，其中該抗-MIP-1 β 單株抗體係與一包含 MIP-1 β 蛋白之胺基酸序列位置 62~74: AVVFLTKRGRQIC (SEQ ID NO:2)之肽類片段結合。