



(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 I798552 B

(45) 公告日：中華民國 112 (2023) 年 04 月 11 日

(21) 申請案號：109116220

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 05 月 15 日

(51) Int. Cl. :

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P25/00 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

A61P9/10 (2006.01)

(30) 優先權：2019/05/16 美國

62/848,863

(71) 申請人：中央研究院(中華民國) ACADEMIA SINICA (TW)

臺北市南港區研究院路 2 段 128 號

(72) 發明人：徐松錕 SHYUE, SONG KUN (TW)；陳思甫 CHEN, SZU FU (TW)；吳軍滄 WU, CHUN HU (TW)；張哲逢 CHANG, CHE FENG (TW)

(74) 代理人：張家彬

(56) 參考文獻：

US 2016/0176961A1

US US2001/0012890A1

網路文獻 Chang, Che-Feng, et al. "Caveolin-1 deletion reduces early brain injury after experimental intracerebral hemorrhage." The American journal of pathology 178.4 (2011), p 1749-1761.

網路文獻 Li, Hui-Qin, et al. "Electroacupuncture exerts neuroprotection through caveolin-1 mediated molecular pathway in intracerebral hemorrhage of rats." Neural plasticity 2016, p 1-8.

審查人員：余家嫻

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：11 共 39 頁

(54) 名稱

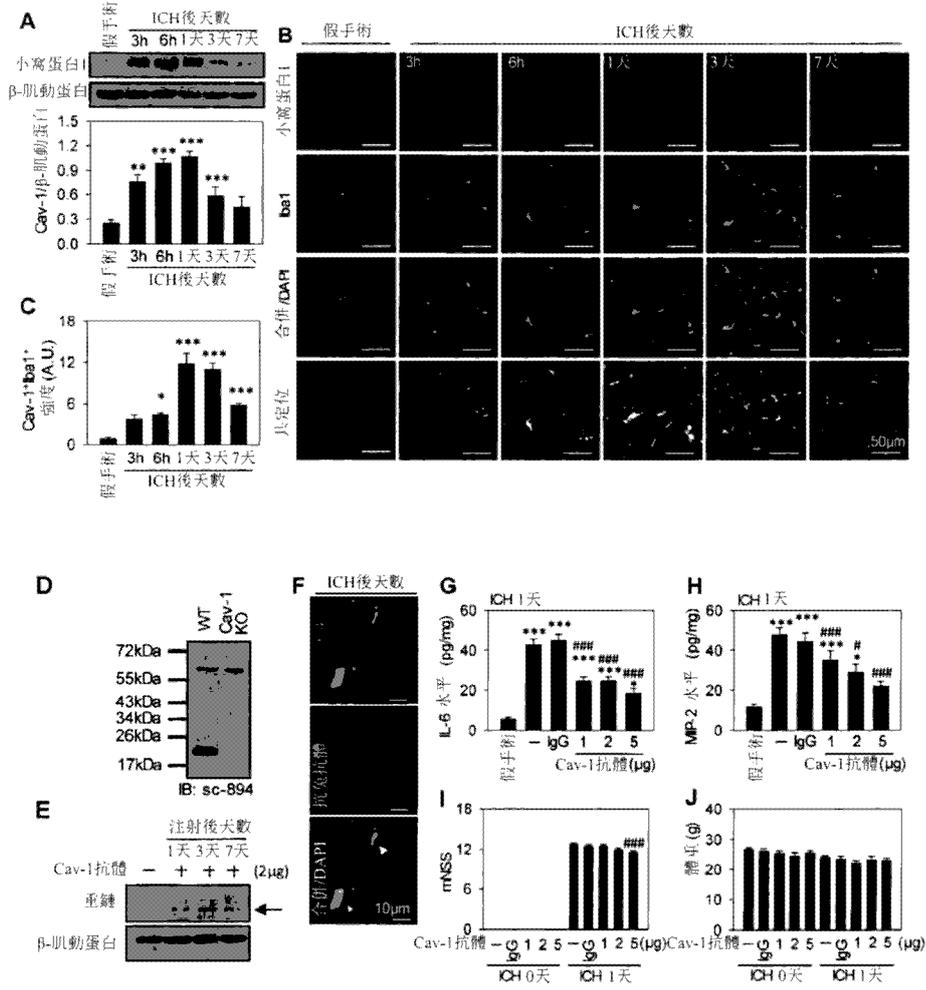
用於治療腦發炎和損傷並改善功能恢復的小窩蛋白 1 抗體

(57) 摘要

本揭露係有關用於治療腦發炎和損傷並改善功能恢復的小窩蛋白 1 抗體。具體地，公開了針對小窩蛋白 1 的特異性抗體或其抗原結合片段在製備用於在有需要的受試者中治療與小窩蛋白 1 的腦水準升高有關的神經障礙、症狀或疾病的藥物的用途。還公開了針對小窩蛋白 1 的特異性抗體或其抗原結合片段在製備用於在有需要的受試者中減少腦發炎、腦組織損傷、腦神經元死亡，以及改善與出血性中風有關的行為預後或功能恢復的藥物的用途。

The present application relates to caveolin-1 antibody for use in treating brain inflammation and injury and improving functional recovery. Specifically, use of an antibody specific against caveolin-1 (Cav-1) or an antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for treating a neurological disorder, symptom or disease that is associated with an increase in the brain levels of Cav-1 in a subject in need thereof is provided. Use of the antibody specific against Cav-1 or the antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for reducing cerebral inflammation, brain tissue damage, brain neuronal death, and improving behavioral outcomes or functional recovery related to a hemorrhagic stroke in a subject in need thereof is also provided.

指定代表圖：



【圖 1】

I798552

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於治療腦發炎和損傷並改善功能恢復的小窩蛋白1抗體

【英文發明名稱】 CAVEOLIN-1 ANTIBODY FOR USE IN TREATING
BRAIN INFLAMMATION AND INJURY AND
IMPROVING FUNCTIONAL RECOVERY

【中文】

本揭露係有關用於治療腦發炎和損傷並改善功能恢復的小窩蛋白1抗體。具體地，公開了針對小窩蛋白1的特異性抗體或其抗原結合片段在製備用於在有需要的受試者中治療與小窩蛋白1的腦水準升高有關的神經障礙、症狀或疾病的藥物的用途。還公開了針對小窩蛋白1的特異性抗體或其抗原結合片段在製備用於在有需要的受試者中減少腦發炎、腦組織損傷、腦神經元死亡，以及改善與出血性中風有關的行為預後或功能恢復的藥物的用途。

【英文】

The present application relates to caveolin-1 antibody for use in treating brain inflammation and injury and improving functional recovery. Specifically, use of an antibody specific against caveolin-1 (Cav-1) or an antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for treating a neurological disorder, symptom or disease that is associated with an increase in the brain levels of Cav-1 in a subject in need thereof is provided. Use of the antibody specific against Cav-1 or the antigen-binding fragment thereof in the manufacture of a medicament for reducing cerebral inflammation, brain tissue damage, brain neuronal death, and improving behavioral

- ✓ outcomes or functional recovery related to a hemorrhagic stroke in a subject in need
- ✓ thereof is also provided.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 用於治療腦發炎和損傷並改善功能恢復的小窩蛋白1抗體

【英文發明名稱】 CAVEOLIN-1 ANTIBODY FOR USE IN TREATING
BRAIN INFLAMMATION AND INJURY AND
IMPROVING FUNCTIONAL RECOVERY

【技術領域】

【0001】 本揭露主要關於小窩蛋白 1 (caveolin-1, Cav-1) 抗體和治療小窩蛋白 1 相關疾病的方法。

【先前技術】

【0002】 腦內出血 (intracerebral hemorrhage, ICH) 是一類由腦組織內或心室內出血所引起的中風。ICH 占有中風的 10% 至 15%，但卻導致較高的死亡率和發病率。在 ICH 中，從血清和血細胞釋放的成分引起神經元細胞損傷並引發強烈的發炎反應，從而導致循環免疫細胞的浸潤和發炎介質的釋放，導致血腦屏障的破壞、繼發性神經元損傷和腦水腫形成。臨床上已經測試了許多治療方法，但是有效的治療仍然不能令人滿意。

【0003】 因此，在本領域中需要提供一種減少由 ICH 所引起的腦損傷的有效方法。

【發明內容】

【0004】 本揭露係關於針對小窩蛋白 1 (caveolin-1, Cav-1) 的特異性抗體或其抗原結合片段在製備用於以下目的之藥物的用途：(1) 在有此需要的

受試者中治療與小窩蛋白 1 (Cav-1) 的腦水準升高有關的神經障礙、症狀或疾病；(2) 在有此需要的受試者中減少腦發炎、腦組織損傷、腦神經元死亡，以及改善與出血性中風有關的行為預後或功能恢復；或(3) 在有此需要的受試者中治療出血性中風。

【0005】 治療藥物可以在神經障礙、症狀或疾病發生之前的 30 分鐘內、1 小時內或 2 小時內施用於有此需要的受試者。治療藥物可以在所述神經障礙、症狀或疾病發生之後不遲於 3 小時或不遲於 6 小時施用於有此需要的受試者。

【0006】 在另一個具體實施例中，有此需要的受試者處於在 30 分鐘內，或在 1 小時內，或在 2 小時內發生神經障礙、症狀或疾病的風險。

【0007】 在另一個具體實施例中，有此需要的受試者是在神經障礙、症狀或疾病發生的 6 小時內，亦即，有此需要的受試者是在神經障礙、症狀或疾病發生之前或之後的 6 小時內，例如在 0.5、1、2、3、4、5 或 6 小時內。

【0008】 有此需要的受試者可以是在出血性中風發生的 1 至 24 小時內或 3 至 24 小時內。亦即，有此需要的受試者是在出血性中風發生之後或之前的 1 至 24 小時內或 3 至 24 小時內。

【0009】 在一個方面，本揭露係關於一種在有此需要的受試者中治療與小窩蛋白 1 的腦水準升高有關的神經障礙、症狀或疾病的方法。該方法包括向有此需要的受試者施用包含以下的組合物：

【0010】 (a) 治療有效量的針對 Cav-1 的特異性抗體或其抗原結合片段；和

【0011】 (b) 藥學上可接受的載體，

【0012】 以在有此需要的受試者中治療與 Cav-1 的腦水準增加有關的神經障礙、症狀或疾病。

【0013】 在一個具體實施例中，神經障礙、症狀或疾病是由腦內出血或出血性中風所引起的。

【0014】 在另一個具體實施例中，施用步驟在神經障礙、症狀或疾病發生之前的 1 小時內或 2 小時內進行。

【0015】 在另一個具體實施例中，施用步驟在神經障礙、症狀或疾病發生之後不超過或不遲於 5 小時，或不超過或不遲於 6 小時進行。

【0016】 在另一個具體實施例中，施用步驟在神經障礙、症狀或疾病發生之後的 3 小時內進行。

【0017】 針對 Cav-1 的特異性抗體可以是針對小窩蛋白 1 產生的多株抗體。小窩蛋白 1 可以是人源的。

【0018】 在另一個具體實施例中，針對 Cav-1 的特異性抗體是針對定位在人源的小窩蛋白 1 的 N-末端的肽而產生的多株抗體。

【0019】 針對 Cav-1 的特異性抗體可以是單株抗體。它可以是針對人源的 Cav-1 而特異性產生的單株抗體。

【0020】 施用步驟可以藉由腦室內 (intracerebroventricular, i.c.v.) 或靜脈內注射。

【0021】 在一個具體實施例中，神經障礙、症狀或疾病是選自腦出血、腦損傷、腦發炎、腦水腫、凋亡神經元、半球萎縮和運動缺陷中的至少一種。

【0022】 在另一方面，本揭露係關於一種用於在有此需要的受試者中減少腦出血、腦組織損傷、腦神經元死亡，以及改善與出血性中風有關的行為預後或功能恢復的方法。該方法包括向有此需要的受試者施用包含以下的組合物：

【0023】 (a) 治療有效量的針對小窩蛋白 1 的特異性抗體或其抗原結合片段；和

【0024】 (b) 藥學上可接受的載體，

【0025】 以在有此需要的受試者中減少腦發炎、腦組織損傷、腦神經元死亡，以及改善與出血性中風有關的行為預後或功能恢復。

【0026】 行為預後可以選自神經病學行為預後和不對稱運動行為預後中的至少一項。

【0027】 在另一個具體實施例中，行為預後或功能恢復係選自改良神經功能損傷嚴重程度評分 (modified neurological severity score, mNSS) 和提升軀體搖擺試驗 (elevated body swing test, EBST) 比中的至少一項。

【0028】 在另一方面，本揭露係關於一種在有此需要的受試者中治療出血性中風的方法。該方法包括向有此需要的受試者施用包含以下的組合物：

【0029】 (a) 治療有效量的針對小窩蛋白 1 的特異性抗體或其抗原結合片段；和

【0030】 (b) 藥學上可接受的載體，

【0031】 以在有此需要的受試者中治療出血性中風。

【0032】 在另一個具體實施例中，施用步驟在出血性中風發生的 1 至 24 小時或 3 至 24 小時期間內進行。

【0033】 進一步地，在另一個具體實施例中，針對 Cav-1 的特異性抗體是全人單株抗體。

【0034】 藉由結合以下附圖對具體實施例進行以下描述，這些和其他方面將因而變得顯而易見，但可在不脫離本揭露的新穎概念的精神和範圍下，對其進行變化和修改。

【0035】 附圖顯示本揭露的一個或多個具體實施例，並且與書面描述一起用於解釋本揭露的原理。在全部附圖中，儘可能使用相同的附圖標記指代具體實施例的相同或相似元件。

【圖式簡單說明】

【0036】 圖 1 顯示了在 ICH 後，腦組織中的 Cav-1 誘導和抗 Cav-1 抗體治療的作用。(A) 在 ICH 後 3 小時至 7 天，藉由蛋白質墨點法檢查 Cav-1 的表現 (n = 5-6)。(B、D 至 J) 在 ICH 前 1 小時，i.c.v. 注射抗 Cav-1 抗體或對照 IgG。(B) 在 ICH 後 3 小時至 7 天，藉由 Cav-1⁺/Iba-1⁺ 細胞的螢光共定位檢測並定量小膠質細胞中 Cav-1 的表現 (n = 5)。比例尺 = 50 μm。(C) 在野生型 (WT) 和 Cav-1 剔除型 (KO) 腦裂解物中 Cav-1 的西方墨點分析。(E) 用抗兔 IgG 抗體對腦裂解物中抗 Cav-1 抗體重鏈水準進行的西方墨點分析。(F) 使用抗兔 IgG 抗體和 OX-42 抗體 (抗 CD11-b/c 抗體) 藉由螢光共定位檢測小膠質細胞中的抗 Cav-1 抗體。在 ICH 後 1 天，藉由 ELISA 測量 (G) IL-6 和 (H) MIP-2 水準 (n = 6)。在 ICH 後 1 天，在注射了對照 IgG 或 1 至 5 μg 的抗 Cav-1 抗體的小鼠中測量 (I) mNSS 和 (J) 體重的行為預後。將切片用 DAPI 染色以顯示所有細胞核。A.U.：任意單位；mNSS：改良神經功能損傷嚴重程度評分。值是平均值 ± SEM。與假手術 (sham) 組相比，*p < 0.05，**p < 0.01 和 ***p < 0.001。與 ICH IgG 組相比，#p < 0.05，##p < 0.01 和 ###p < 0.001。

【0037】 圖 2 顯示了抗 Cav-1 抗體治療改善了行為預後並減少了 ICH 後的腦水腫和神經元死亡。在 ICH 前 1 小時，i.c.v. 注射抗 Cav-1 抗體或對照 IgG。在 ICH 後 1 至 28 天，測量 (A) mNSS 和 (B) EBST 和 (C) 體重的行為預後 (n = 8)。(D、E) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由甲酚紫染色檢查損傷量和半球擴大率 (n = 8)。(F) 在 ICH 後 28 天，藉由甲酚紫染色分析萎縮率 (n = 8)。比例尺 = 2 mm。(G) 在 ICH 後 1 天，藉由血紅蛋白測定評估出血量 (n = 6)。(H) 在 ICH 後 1 天和 3 天，由腦水含量定量腦水腫水準 (n = 8)。(I) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由西方墨點法檢測剪切型半胱天冬酶 3

(cleaved caspase-3) (n = 5-6)。(J) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 FJB 染色檢查變性的神經元 (n = 8)。比例尺 = 100 μ m。(K) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 TUNEL⁺/NeuN⁺細胞的螢光共定位檢測和定量凋亡神經元 (n = 6)。

(L) 在 ICH 後 3 天，藉由 MRI 檢測損傷量。將切片用 DAPI 染色以顯示所有細胞核。Contra：對側；Ipsi：同側；CX：皮質；BG：基底神經節；Cere：小腦。值是平均值 \pm SEM。與假手術或對照組相比，*p < 0.05，**p < 0.01 和***p < 0.001。與 ICH IgG 組相比，#p < 0.05，##p < 0.01 和###p < 0.001。

【0038】 圖 3 顯示了抗 Cav-1 抗體減少小膠質細胞活化並調節 ICH 後的小膠質細胞從 M1 至 M2 表型的極化。在 ICH 前 1 小時 i.c.v. 注射抗 Cav-1 抗體或對照 IgG。在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 Iba-1 表現的免疫染色 (A) 和西方墨點 (B) 定量小膠質細胞活化 (n = 8)。(C) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 CD16/32⁺/Iba-1⁺細胞的螢光共定位檢測並定量經典活化型 (classical-activated) (類 M1) 小膠質細胞 (n = 6)。(D、E) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 (D) CD206⁺/Iba-1⁺和 (E) ARG1⁺/Iba-1⁺細胞的螢光共定位檢測替代活化型 (alternative-activated) (類 M2) 小膠質細胞。比例尺 = 50 μ m。(F 至 I) 在 ICH 後 3 天，藉由 ELISA 檢查 IL-6、MIP-2、IL-4 和 IL-10 水準 (n = 7-8)。將切片用 DAPI 染色以顯示所有細胞核。ARG1：精胺酸酶 1。值是平均值 \pm SEM。與假手術組相比，**p < 0.01 和***p < 0.001。與 ICH IgG 組相比，#p < 0.05，##p < 0.01 和###p < 0.001。

【0039】 圖 4 顯示了抗 Cav-1 抗體治療抑制 Cav-1 表現並抑制 ICH 後 P38 和 ERK 信號傳導。在 ICH 前 1 小時，i.c.v. 注射抗 Cav-1 抗體或對照 IgG。在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由西方墨點法檢測和定量 (A) Cav-1、(B) P38 磷酸化、(C) ERK 磷酸化和 (D) JNK 磷酸化水準。值是平均值 \pm SEM。(n = 5-

6)。與假手術或對照組相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$ 。與 ICH IgG 組相比，# $p < 0.05$ 。

【0040】 圖 5 顯示了抗 Cav-1 抗體治療藉由 P38 信號路徑減輕了原代小膠質細胞培養物中凝血酶誘導的發炎反應。用凝血酶加 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗 Cav-1 抗體或對照 IgG 處理原代小膠質細胞 24 小時 (A、B) 或 1 至 3 小時 (C-I)。

(A、B) 藉由 ELISA 確定凝血酶誘導的 IL-6 和 MIP-2 表現。(C-I) 藉由 (C) iNOS 和 COX-2 表現、(D) c-Jun 磷酸化、(E) P65 磷酸化、(F) Cav-1 表現、(G) P38 磷酸化、(H) ERK 磷酸化和 (I) JNJ 磷酸化的西方墨點測定凝血酶誘導的小膠質細胞活化 ($n = 3-4$)。值是平均值 \pm SEM。與對照組相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$ 。與凝血酶 IgG 組相比，# $p < 0.05$ 和### $p < 0.001$ 。

【0041】 圖 6 顯示了 ICH 後，用抗 Cav-1 抗體的延遲治療減少了腦損傷和神經元死亡，並調節了小膠質細胞從 M1 至 M2 表型的極化。在 ICH 後 3 小時，藉由尾靜脈靜脈注射抗 Cav-1 抗體 (100 μl 鹽水中 20 μg)。在 ICH 後 1 天和 3 天，評估 (A) mNSS 和 (B) EBST 和 (C) 體重的行為預後 ($n = 9$)。

(D) 在 ICH 後 3 天，藉由甲酚紫染色評估損傷量和半球擴大率 ($n = 5-6$)。比例尺 = 2 mm。在 ICH 後 3 天，測定 (E) 藉由 FJB 染色評估的神經元變性，和 (F) 藉由 Iba-1 免疫染色評估的小膠質細胞活化。(G) 在 ICH 後 3 天，藉由 CD16/32⁺/Iba-1⁺細胞的螢光共定位檢測經典活化型 (類 M1) 小膠質細胞 ($n = 5-6$)。(H、I) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 (H) CD206⁺/Iba-1⁺和 (I) ARG1⁺/Iba-1⁺細胞的螢光共定位確定替代活化型 (類 M2) 小膠質細胞 ($n = 6$)。比例尺 = 50 μm 。將切片用 DAPI 染色以顯示所有細胞核。值是平均值 \pm SEM。與 ICH IgG 組相比，# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ 和### $p < 0.001$ 。

【0042】 圖 7 顯示了延遲的靜脈內抗 Cav-1 治療調節了浸潤的巨噬細胞的 M1/M2 極化。在 ICH 後 3 小時，藉由尾靜脈靜脈注射抗 Cav-1 抗體或對照 IgG (100 μ l 鹽水中 20 μ g)。(A) 在 ICH 後 3 天，在注射了 IgG 的對照小鼠中藉由 Cav-1 和 CCR2 的螢光共定位來檢測巨噬細胞中 Cav-1 的表現。(B) 在 ICH 後 3 天，藉由 CCR2 和 DAPI 染色對浸潤的巨噬細胞進行定量 (n = 6)。(C) 在 ICH 後 3 天，藉由 CCR2⁺/CD16/32⁺細胞的螢光共定位檢測經典活化型 (類 M1) 巨噬細胞 (n = 6)。(D、E) 在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 (D) CCR2⁺/CD206⁺和 (E) CCR2⁺/ARG1⁺細胞的螢光共定位來確定替代活化型 (類 M2) 巨噬細胞 (n = 6)。將切片用 DAPI 染色以顯示所有細胞核。比例尺 = 50 μ m。值是平均值 \pm SEM。與 ICH IgG 組相比，[#]p < 0.05，^{##}p < 0.01 和^{###}p < 0.001。(F) 提出抗 Cav-1 抗體治療如何調節 ICH 後的發炎反應及其在腦保護中的預後模型。

【0043】 圖 8 顯示了 ICH 後 Cav-1 的表現和抗 Cav-1 抗體治療的作用。(A、B) 在 ICH 後 3 小時至 7 天，藉由 Cav-1⁺/GFAP⁺細胞的螢光共定位來檢測和定量星形膠質細胞中 Cav-1 的表現 (n = 5)。比例尺 = 50 μ m。(C) 用不同的抗 Cav-1 抗體在野生型 (WT) 和 Cav-1 剔除型 (KO) 腦裂解物中的 Cav-1 的西方墨點分析。比例尺 = 50 μ m。(D) 藉由抗兔 IgG 抗體和 NeuN 或 GFAP 的螢光共定位檢測神經元和星形膠質細胞中的抗 Cav-1 抗體。比例尺 = 10 μ m。(E) 在 ICH 後 6 小時，藉由 ELISA 測量 IL-6 和 MIP-2 水準 (n = 6)。(F) 在 ICH 後 6 小時，藉由血紅蛋白測定評估出血量 (n = 6)。

【0044】 圖 9 顯示了抗 Cav-1 抗體治療減少了 ICH 後的中性粒細胞浸潤。在 ICH 後 1 天和 3 天，藉由 MPO 染色檢測中性粒細胞浸潤。

【0045】 圖 10 顯示了抗 Cav-1 抗體治療降低了凝血酶誘導的亞硝酸鹽、IL-6 和 MIP-2 的產生。BV2 細胞用凝血酶加 0.1 至 1 μ g/ml 的抗 Cav-1 抗體或對

照 IgG 處理 24 小時。(A) 在亞硝酸鹽產生中抗 Cav-1 抗體處理的劑量依賴性作用 (n = 6)。(B、C) 藉由 ELISA 確定凝血酶誘導的 IL-6 和 MIP-2 表現 (n = 6)。

【0046】圖 11 顯示了延遲的抗 Cav-1 抗體治療減少了 ICH 後的中性粒細胞浸潤。在 ICH 後 3 天，藉由 MPO 染色檢測中性粒細胞浸潤。

【實施方式】

定義

【0047】如本文所用，術語「抗體」包括與特異性抗原結合的任何單株抗體、多株抗體、多特異性抗體或雙特異性（二價）抗體。

【0048】術語「治療 (treating 或 treatment)」是指將有效量的治療劑施用於具有疾病或具有這種疾病的症狀或易患這種疾病的傾向的有需要的受試者，用以治癒、減輕、緩解、醫治或改善此疾病、其症狀或易患這種疾病的傾向。該受試者可由專業醫護人士根據任何適合的診斷方法的結果來鑑別。

【0049】「有效量」是指賦予受治療的受試者治療效果所需的活性化合物的量。如本領域技術人員所認識到的，有效劑量將視施用途徑、賦形劑使用及與其他治療性處理共同使用的可能性而不同。

【0050】術語「腦損傷」和「腦組織損傷」是可以互換的。

【0051】由美國衛生與公共服務部食品藥品監督管理局 (U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration) 發佈的「評估成人健康志願者治療的臨床試驗安全起始劑量的行業和審查人員指南 (Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers)」公開了「治療有效量」可藉由下式由計算得到：

HED = 以 mg/kg 計的動物劑量 × (以 kg 計的動物重量/以 kg 計的人類重量)^{0.33}。

【0052】 小窩蛋白 1 (N-20) 是指 sc-894 抗體 (SANTA CRUZ Biotech, Inc., CA, 美國)，是一種親和純化的兔多株抗體，其是針對定位在人源小窩蛋白 1 的 N 端的肽而產生的。

【0053】 約 1 至 24 小時意味著該範圍內的全部十分之一和整數單位量都被具體公開作為本揭露的一部分。因此，包括 1、1.1、1.2、1.3、……1.7、1.8、1.9、2、……23.8、23.9 和 24 的單位量作為本揭露的具體實施例。

【0054】 約 3 至 24 小時意味著該範圍內的全部十分之一和整數單位量都被具體公開作為本揭露的一部分。因此，包括 3、3.1、3.2、3.3、……3.7、3.8、3.9、4、……23.8、23.9 和 24 的單位量作為本揭露的具體實施例。

【0055】 「在發生 1 至 24 小時視窗內」是指發生之前或之後 1 至 24 小時內。

【0056】 「在發生 3 至 24 小時視窗內」是指發生之前或之後 3 至 24 小時內。

【0057】 本揭露關於發現藉由抗 Cav-1 抗體 (Ab) 處理來抑制 Cav-1 在小鼠 ICH 模型中具有保護作用。抗 Cav-1 抗體的預先處理或延遲處理減少了 ICH 後的發炎和腦損傷。

實施例

材料和方法

動物

【0058】 將成年雄性 C57BL/6J 小鼠 (8 至 12 周齡，體重 22 至 28 g) 飼養在無特定病原體的環境中，並進行溫度和濕度控制。所有動物程序和實驗方

案均遵循美國國立衛生研究院（US National Institutes of Health）出版的《實驗動物的護理和使用指南（Guide for the Care and Use of Laboratory Animals）》。

實驗性 ICH 模型

【0059】簡而言之，將小鼠用戊巴比妥鈉麻醉並置於立體定位框架中。使頭皮縮回後，使用牙科的鑽-環鋸（dental drill-trephine）在前囟之前 0.8 mm 且中線右側 2.5 mm 處鑽一個 1.0 mm 的鑽孔。為誘導 ICH，經由漢密爾頓注射器上的 30 號針頭，藉由微型輸液泵在 10 分鐘內以 0.05 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度注射細菌膠原酶（0.5 μL 鹽水中 0.075 U；VII-S 型，Sigma），該針頭使用立體定位座標：前囟之前+0.8 mm、側向+2.5 mm 植入右側紋狀體至深度為 2.5 mm。將針頭再留 20 分鐘以防止回流。取下針頭後，用牙骨水泥密封開顱顱骨並縫合頭皮。在整個手術過程中，使用加熱墊將小鼠維持在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ，並置於溫暖的環境中以進行恢復。假手術小鼠以相同方式接受等體積的生理鹽水。

腦室內和靜脈內注射

【0060】簡而言之，將漢密爾頓注射器的 30 號針頭使用立體定向座標：前囟之前-0.5 mm、側向+1.0 mm 插入側腦室至深度為 2.0 mm，並以 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率注入抗體。然後，藉由微型輸液泵注入兔對照 IgG（5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ ；無疊氮化鈉；I5006，Sigma-Aldrich）或抗 Cav1 抗體（5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ ；無疊氮化鈉；sc-894，Santa Cruz，SC）持續 10 分鐘。注入後 50 分鐘取下針頭以防止回流，並在抗體注射後 1 小時進行 ICH 程序。對於靜脈內注射，在 ICH 後 3 小時，藉由尾靜脈注射 100 μL 鹽水中的 20 μg 抗體。

神經功能缺陷評估試驗

【0061】如 Wu 等人 (*J. Neuroinflammation* 2016, 13:62) 所述，應用改良神經功能損傷嚴重程度評分 (mNSS)，藉由測定運動、感覺、反射和平衡試驗 (總計 18 分) 來評估功能缺陷，該文獻藉由引用併入本文。分數越高表示損傷越嚴重。

軀體擺動測量試驗

【0062】進行用於評估不對稱運動行為的提升軀體搖擺試驗 (EBST)，同時略微進行了修改。將小鼠藉由尾巴垂直懸垂，倒垂離地面約 1 英寸。記錄擺動行為的頻率和方向，持續 30 s。當動物的頭從垂直軸向任一側移動大於 10 度時，計為一次擺動。ICH 小鼠的擺動活動顯示出明顯偏向於出血側對側的方向。向左側進行的擺動總數除以擺動總數，即可獲得左偏擺動的百分比。

血紅蛋白測量

【0063】定量 ICH 腦的血紅蛋白含量。終末麻醉後，用 0.9% 的鹽水對小鼠進行心臟灌注，以清除 ICH 後的血管內血液。之後，收集小鼠腦的同側和對側半球，並向每個半球中加入 PBS 緩衝液 (300 μ L)，然後在冰上超音波處理 1 分鐘，並在 4°C 下以 13,000 rpm 離心 30 分鐘。將 Drabkin 試劑 (80 μ L) 添加到 20 μ L 等分的上清液中，並在室溫下靜置 15 min (避光)。然後在 540 nm 的波長下測量光密度，以測定氰化正鐵血紅蛋白的濃度。對於標準曲線，在麻醉的對照小鼠中藉由心臟穿刺收集血液。然後將這種血液的增量體積 (0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 μ L) 添加到 300 μ L 來自正常半球樣本的組織裂解物中。

腦水含量測量

【0064】 測定腦水含量以代表腦水腫。終末麻醉後，在 ICH 後將小鼠斷頭。立即取出腦，將其分為五個部分，由同側和對側皮質、同側和對側基底神經節以及小腦（用作內部對照）組成。立即稱量腦樣本以獲得濕重，然後在 100°C 下乾燥 24 小時以獲得乾重。使用以下公式計算每個樣本的水含量： $[(\text{濕重}-\text{幹重})/\text{濕重}] \times 100\%$ 。

磁共振成像

【0065】 如前所述，使用 3 TMRI 系統（TRIO 3T MRI, Siemens MAGNETOM, 德國）進行磁共振成像（MRI）。藉由在受傷後第 1 天和第 4 天獲得的 T2 加權圖像測定腦水腫。T2 加權成像的參數如下：重複時間/回波時間 = 3500/75 ms，矩陣 = 125 × 256，視場 = 25 × 43 mm，截面厚度 = 1.0 mm。成像平面位於穿過病變部位的中心。在將 TBI 前後的圖像強度標準化後，高強度區域代表水腫區域。由不知情的操作員使用 MRI 系統軟體（NUMARIS/4, 版本 syngo MR B17, Siemens MAGNETOM）的 ROI 工具手動繪製感興趣的區域（ROI）。藉由累加四個切片測得的水腫面積並乘以切片厚度（1.0 mm），由 T2 加權圖像測定水腫體積。

用於組織學的組織處理

【0066】 終末麻醉後，對小鼠先後用 PBS 和 4% 多聚甲醛進行心臟灌注。取出腦，在 4% 多聚甲醛中固定過夜，然後轉移到含有 30% 蔗糖的 PBS 中進行冷凍保護。此後，在低溫恆溫器中，在整個損傷區域上將腦切成 10 μm 的冠狀切片。

出血性損傷和半球擴大率分析

【0067】 使用在 20 吻-尾 (rostral-caudal) 水準上用甲酚紫染色的間隔為 200 μm 的冠狀切片定量損傷量、半球萎縮、紋狀體萎縮和半球擴大率。使用 Image J 軟體 1.48 版 (Image J, 美國國立衛生研究院, 貝塞斯達 (Bethesda), 馬裡蘭州 (MD), USA) 對切片進行分析。體積測量是藉由將面積乘以層間距離 (200 μm) 的總和來計算的。藉由以下公式計算半球或紋狀體萎縮: $[(\text{對側半球或紋狀體體積}-\text{同側半球或紋狀體體積})/\text{對側半球或紋狀體體積}] \times 100\%$ 。藉由以下公式計算半球擴大率: $[(\text{同側半球體積}-\text{對側半球體積})/\text{對側半球體積}] \times 100\%$ 。由對所有動物組不知情的兩名實驗者進行了分析。評價者間的可靠性在 10% 以內。

免疫組織化學

【0068】 進行了免疫組織化學分析。在淬滅內源性過氧化物酶活性並阻斷非特異性結合後, 使切片與一級抗體 [兔抗髓過氧化物酶 (MPO, 中性粒細胞標誌物; Dako)] , 兔抗離子鈣結合接頭分子 (ionized calcium-binding adaptor molecule) 1 (Iba-1, 小膠質細胞/巨噬細胞標誌物; Wako) 在 4°C 下反應過夜。然後將切片與二級抗兔抗體 (Santa Cruz) 一起反應 2 小時, 使用二胺基聯苯胺作為過氧化物酶基質, 根據 Vectastain Elite ABC 試劑盒 (Vector Laboratories) 的說明書進行比色檢測。在幾種對照程序中測定染色反應的特異性, 包括省略了一級抗體和用非免疫兔血清替代一級抗體。

雙重免疫螢光

【0069】 為了測定 Cav-1 的細胞定位, 藉由將小鼠抗 Cav-1 或兔抗 Cav-1 (Santa Cruz) 與小鼠單株 CD11b/c 抗體 (OX42, 小膠質細胞/巨噬細胞標誌物, GeneTex)、小鼠抗神經元核抗原 (NeuN, 神經元標誌物; Millipore)、

兔抗 Iba-1 (Wako)、大鼠抗神經膠質原纖維酸性蛋白 (GFAP; 星形膠質細胞標誌物; Invitrogen) 或 CD31 (內皮細胞標誌物, BD Biosciences Pharmigen) 在 4°C 下同時反應過夜來進行雙重免疫螢光標記。為了測定不同類型的小膠質細胞活化, 藉由將兔抗 Iba-1 與大鼠抗 CD16/32 (BD Biosciences)、小鼠抗 CD206 (Bio Rad)、小鼠抗精胺酸酶 1 (ARG1, BD Sciences) 或 CCR2 (巨噬細胞標誌物, Novus) 在 4°C 反應過夜來進行免疫染色。然後洗滌切片, 用 Alexa Fluor 488 或 Alexa Fluor 594 偶聯的二級抗體 (Molecular Probes) 反應 2 小時, 並在螢光顯微鏡下觀察。

Fluoro-Jade B 染色

【0070】 Fluoro-Jade B (FJB) 是一種以高靈敏度和特異性結合變性神經元的多陰離子螢光素衍生物, 進行 Fluoro-Jade B (FJB) 染色。簡而言之, 將切片分別在梯度乙醇溶液 (100% 和 70%) 和蒸餾水中再水化 5 分鐘, 在 0.006 %KMnO₄ 中反應 30 分鐘, 在蒸餾水中沖洗 2 分鐘, 在 0.001%FJB (Chemicon) 溶液中反應 30 分鐘, 並在螢光顯微鏡下於 450 至 490 nm 下觀察。

TUNEL 測定

【0071】 使用末端去氧核苷酸轉移酶 dUTP 缺口末端標記 (TUNEL) 染色來用異硫氰酸螢光素標記凋亡細胞 (原位細胞死亡檢測試劑盒 (*In situ* Cell Death Detection Kit); Roche Molecular Biochemicals)。將切片用含有末端去氧核苷酸轉移酶的 TUNEL 反應混合物在 37°C 下染色 60 分鐘, 然後與小鼠抗 NeuN 一起在 4°C 反應過夜, 並與 Alexa Fluor 594 偶聯的二級抗體 (Molecular Probes) 一起反應 2 小時。於螢光顯微鏡下在激發光下檢測圖像。

FJB、NeuN、Iba-1 和 MPO 染色的定量

【0072】在距前窗 0.24 mm 的水準處從出血核心連續三個切片上定量 FJB、NeuN、Iba-1 和 MPO 染色。用×200 的放大倍數在緊鄰血腫的 10 至 12 個非重疊區域中的 $920 \times 860 \mu\text{m}^2$ 區域中計數陽性細胞的數量。如果 Iba-1 陽性的靜息小膠質細胞/巨噬細胞包含具有長的細長突起的相對較小的細胞體（直徑小於 $7.5 \mu\text{m}$ ），則其被定義為靜息。當與靜息的小膠質細胞相比，細胞體大小增加且具有短而厚的突起和強烈的免疫強度時，小膠質細胞/巨噬細胞被定義為活化的。活化的小膠質細胞/巨噬細胞是根據形態學標準和 $7.5 \mu\text{m}$ 的細胞體直徑截斷值的組合定義的。NeuN 陽性細胞、FJB 陽性細胞、Iba-1 陽性細胞和 MPO 陽性細胞的總數表示為每個視野的平均數。由對所有動物組不知情的兩名實驗者進行了分析。評價者間的可靠性在 10% 以內。

定量免疫共定位分析

【0073】分析了 Cav-1 與 Iba-1 的共定位或者 Iba-1 與 CD16/32、CD206 或 ARG1 的共定位。簡而言之，將合併圖像中的共定位信號轉換為灰階圖，並藉由 Image J 軟體進行計算。共定位的程度以任意單位表示。

西方墨點分析

【0074】在 ICH 或假手術後，收集來自同側半球的 2 mm 厚的冠狀切片。用十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠分離等量的蛋白質（對組織樣本，20 μL 中的 35 至 50 μg 蛋白，以及對於細胞裂解物，20 μL 中的 20 μg 蛋白），轉移至 Immobilon-P 膜，用在含 0.1% Tween-20 的 PBS 中的 5% 奶封閉，並在 4°C 下用一級抗體探測過夜。兔抗 iNOS 和兔抗 COX-2 來自開曼化學（Cayman

Chemical)。兔抗剪切型半胱天冬酶 3、兔抗磷酸 p38、兔抗總 p38、兔抗磷酸胞外信號調節激酶 p44/42、兔抗全 Erk、兔抗磷酸 Jun 胺基末端激酶 (JNK, Thr183/Tyr185)、兔抗總 JNK、兔抗磷酸 P65、兔抗磷酸 c-Jun 和兔抗 c-Jun 來自細胞信號傳導公司 (Cell Signaling)。小鼠抗 β -肌動蛋白來自 Sigma-Aldrich。然後將膜與辣根過氧化物酶連接的抗兔或抗小鼠二級抗體一起在 4°C 反應 1 小時。使用 Image J 軟體定量蛋白質條帶強度，並將蛋白質信號的相對強度標準化為相應的 β -肌動蛋白強度。

酶聯免疫吸附測定和亞硝酸鹽測定 (ELISA)

【0075】 手術後，如西方墨點分析一樣收集腦樣本。使用商購的 ELISA 試劑盒 (R&D Systems) 在腦勻漿或細胞裂解物中測量巨噬細胞炎性蛋白 2 (MIP-2)、白介素 (IL) -6、IL-1 β 、IL-4 和 IL-10。所有樣本和標準品均按照製造商的說明書一式兩份進行測定。藉由使用 Griess 試劑測量培養上清液的亞硝酸鹽水準來評估一氧化氮 (NO) 的產生。

小膠質細胞系培養

【0076】 在 37°C，5%CO₂ 濕潤環境下，將 BV2 小鼠小膠質細胞在補充有 10% 熱滅活胎牛血清 (FBS; Gibco/BRL)、100 U/mL 青黴素和 100 μ g/mL 鏈黴素的 Dulbecco 改良 Eagle 培養基 (DMEM; Gibco/BRL) 中培養。在不存在或存在不同濃度的抗 Cav-1 抗體 (sc-594, Santa Cruz) 的情況下，用 0.1 μ g/mL LPS 或 10 U/mL 凝血酶刺激 BV2 小膠質細胞 24 小時。用不同批次的培養物重複實驗四次。

小鼠原代小膠質細胞培養

【0077】小鼠原代小膠質細胞獲自 P7 產後小鼠腦紋狀體，並在 37°C，5 %CO₂ 濕潤環境下，在補充有 10% 熱滅活胎牛血清 (FBS; Gibco)、100 U/mL 青黴素和 100 µg/mL 鏈黴素的羅斯維·派克紀念研究所培養基 (Roswell Park Memorial Institute's media, RPMI; Gibco/BRL, 貝塞斯達, 馬裡蘭州, 美國) 中培養。培養 14 天後即可使用小膠質細胞，並在不存在或存在抗 Cav-1 抗體的情況下，用 10 U/mL 凝血酶 + 100 ng/mL IFN- γ 刺激 24 小時。用獨立的培養物重複實驗四到五次。

統計分析

【0078】所有資料均以平均值 \pm 平均值的標準誤差 (SEM) 表示。對於多組，使用單因素或雙因素方差分析 (ANOVA)，然後進行事後 Bonferroni 檢驗評估，來確定顯著性差異。Student t 檢驗用於檢驗兩組之間的差異。統計學顯著性設定為 $P < 0.05$ 。

結果

在 ICH 後，小膠質細胞/巨噬細胞中 Cav-1 蛋白表現增加

【0079】藉由西方墨點分析檢查了在 ICH 後 3 小時至 7 天的 Cav-1 的誘導。ICH 在 3 小時、6 小時、1 天和 3 天在出血半球中誘導 Cav-1 蛋白水準的增加 (分別為假手術水準的 303%、392%、423% 和 231%；圖 1 的 A)。該水準在 1 天達到峰值，然後在 3 天下降。在 ICH 後 7 天，Cav-1 蛋白水準略有增加，但與假手術對照水準無明顯差異 (假手術水準為 178%； $P = 0.079$)。使用雙重免疫螢光染色檢查在 ICH 後，腦中小膠質細胞/巨噬細胞中的 Cav-1 表現。在 ICH 後 6 小時、1 天、3 天和 7 天，小膠質細胞/巨噬細胞中 Cav-1 被顯著誘導 (假手術水準的 526%、1425%、1327% 和 699%)，在 1 天和 3 天達到

峰值（圖 1 的 B、C）。進一步檢查了 Cav-1 與 GFAP⁺細胞的共定位水準，結果顯示，在假手術對照腦中或在 ICH 後，在星形膠質細胞中很少表現 Cav-1 蛋白（圖 8 的 A、B）。該資料顯示，Cav-1 可能參與了 ICH 誘導的小膠質細胞/巨噬細胞的活化，並且這種作用可能早在 ICH 後 6 小時。

抗 Cav-1 抗體治療減少腦發炎和腦組織損傷並改善 ICH 後的長期行為預後

【0080】 藉由對來自 Cav-1 基因剔除小鼠的腦樣本進行免疫墨點，驗證了三種商業抗 Cav-1 抗體的特異性。在這三種測試抗體中，只有 sc-894 抗體未在 Cav-1 基因剔除的腦裂解物中檢測到 Cav-1 蛋白（圖 1 的 D），另外兩種候選抗體仍在 Cav-1 基因剔除的腦裂解物中檢測到在約 22 kDa 處的 Cav-1 免疫反應帶（圖 8 的 C）。因此，選擇 sc-894 抗體（抗 Cav-1 抗體）用於以下實驗。在 ICH 前 1 小時藉由腦室內（i.c.v.）注射遞送抗 Cav-1 抗體。i.c.v.注射後長達 7 天用抗兔 IgG 抗體進行的抗 Cav-1 抗體的西方墨點分析顯示在約 55 kDa 處有一個免疫反應帶，對應於腦裂解物中的重鏈（圖 1 的 E），這表明抗 Cav-1 抗體可以在大腦中維持 7 天以上。在 i.c.v.注射後 1 天，在小膠質細胞/巨噬細胞（圖 1 的 F）和神經元中觀察到兔 IgG 染色，但在星形膠質細胞（圖 8 的 D）中未觀察到。然後，進一步研究了抗 Cav-1 抗體的抗炎作用。用 1、2 和 5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ Cav-1-抗體處理均能夠降低 ICH 後 1 天時 IL-6（圖 1 的 G）和 MIP-2（圖 1 的 H）的細胞激素表現，並且 5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ 的劑量效果最好。僅 5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ 的劑量降低了在 ICH 後 1 天時的 mNSS 評分（圖 1 的 I），並且在不同劑量的抗 Cav-1 抗體注射後，體重沒有變化（圖 1 的 J）。因此，在後續實驗中使用的劑量為 5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ 。在 ICH 後 6 小時，用 5 $\mu\text{g}/2.5 \mu\text{L}$ 抗 Cav-1 抗體處理也降低了 IL-6（圖 8 的 E）和 MIP-2（圖 8 的 F）的表現。

【0081】 由於大多數 ICH 患者均遺留有運動缺陷，因此進一步評估了長期功能預後。從 ICH 後 1 天到 28 天，用抗 Cav-1 抗體治療的小鼠顯示出比對照組更好的 mNSS 和 EBST 比率（圖 2 的 A、B），而兩組小鼠的體重變化相似（圖 2 的 C）。為了確定觀察到的功能恢復變化是否反映在腦組織損傷和神經元死亡的減少中，對組織學預後進行了評估。甲酚紫染色顯示，與安慰劑組相比，在第 1 天和第 3 天，抗 Cav-1 抗體治療分別將出血損傷量顯著降低了 22% 和 34%（圖 2 的 D、E）。半球擴大率（腦水腫的指標）在第 1 天（ $9.21 \pm 0.99\%$ 對 $12.22 \pm 0.93\%$ ；圖 2 的 D）和第 3 天（ $2.53 \pm 0.57\%$ 對 $6.12 \pm 1.12\%$ ；圖 2 的 E）在抗 Cav-1 抗體治療的小鼠中也顯著小於在安慰劑治療的小鼠中。進一步評估了抗 Cav-1 抗體治療是否減輕 ICH 慢性期的腦組織損傷。與急性期的保護作用一致，抗 Cav-1 抗體治療顯著降低了 28 天時的半球萎縮率（ $7.34 \pm 0.71\%$ 對 $10.71 \pm 0.70\%$ ；圖 2 的 F）。然而，抗 Cav-1 抗體在 6 小時（圖 8 的 G）或 1 天（圖 2 的 G）均不影響血腫大小（臨床 ICH 的主要預後指標），顯示 Cav-1 抑制的保護作用與血塊形成無關。

抗 Cav-1 抗體治療減少 ICH 後的腦水腫和神經元死亡

【0082】 與 IgG 組相比，在 ICH 後第 1 天（ $79.47 \pm 0.52\%$ 對 $83.43 \pm 1.05\%$ ）和第 3 天（ $80.56 \pm 1.17\%$ 對 $84.84 \pm 1.32\%$ ），在抗 Cav-1 抗體組的同側基底神經節中的腦水含量顯著降低（圖 2 的 H）。在施用抗 Cav-1 抗體後，與施用 IgG 相比，中性粒細胞浸潤（血腦屏障破壞和腦水腫的主要結果）在第 1 天（ 53.80 ± 2.57 對 69.76 ± 5.50 個細胞/視野）和第 3 天（ 62.27 ± 3.57 對 86.21 ± 3.18 個細胞/視野）也都減少（圖 9）。

【0083】 在抗 Cav-1 抗體治療後，在第 1 天（IgG 水準的 46%）和第 3 天（IgG 水準的 51%），剪切型半胱天冬酶 3（細胞凋亡的最終效應物）的水準

顯著降低了（圖 2 的 I）。抗 Cav-1 抗體治療與施用 IgG 相比，在第 1 天和第 3 天都顯著減弱了血腫周圍的變性神經元的數量（FJB⁺細胞；第 1 天為 38.25 ± 1.44 對 50.30 ± 2.94 個細胞/視野，第 3 天為 43.43 ± 1.24 對 60.44 ± 1.33 個細胞/視野；圖 2 的 J）以及凋亡神經元信號（TUNEL⁺/NeuN⁺細胞）（圖 2 的 K）。應用 MRI 來測定在活體動物中的腦損傷程度，顯示在 ICH 後第 3 天時，抗 Cav-1 抗體治療組與 IgG 對照相比，病變體積明顯減少（ 12.63 ± 0.96 對 $17.40 \pm 0.95 \text{ mm}^3$ ）（圖 2 的 L）。

抗 Cav-1 抗體治療減少促炎性 M1 小膠質細胞/巨噬細胞活化並增強 ICH 後的抗炎性 M2 小膠質細胞/巨噬細胞回應

【0084】 在第 1 天和第 3 天在血腫周圍觀察活化的小膠質細胞/巨噬細胞（細胞體擴大的 Iba-1⁺細胞），並且與 IgG 對照相比，在抗 Cav-1 抗體治療的小鼠中，活化的小膠質細胞/巨噬細胞的數量在第 1 天（ 29.63 ± 0.89 對 39.64 ± 0.90 個細胞/視野）和第 3 天（ 38.56 ± 1.70 對 54.16 ± 2.56 個細胞/視野）顯著減少（圖 3 的 A）。抗 Cav-1 抗體處理後，Iba-1 的蛋白質表現也降低（圖 3 的 B）。藉由免疫螢光染色，用經典活化型 M1 小膠質細胞/巨噬細胞的標誌物（CD16/32）或替代活化型 M2 小膠質細胞/巨噬細胞的標誌物（CD206，ARG1）確定小膠質細胞表型。在第 1 天和第 3 天，雖然在假手術的腦中未觀察到 CD16/32⁺/Iba-1⁺、CD206⁺/Iba-1⁺或 ARG1⁺/Iba-1⁺細胞，但 ICH 在血腫周圍區域中誘導了 CD16/32⁺/Iba-1⁺、CD206⁺/Iba-1⁺和 ARG1⁺/Iba-1⁺細胞的增加（圖 3 的 C 至 E）。在血腫周圍區域中的 CD16/32⁺/Iba-1⁺信號在第 1 天和第 3 天顯著減少，而 CD206⁺/Iba-1⁺或 ARG1⁺/Iba-1⁺信號在 ICH 後 3 天在抗 Cav-1 抗體治療的小鼠中均增加（圖 3 的 C 至 E）。根據抗 Cav-1 抗體治療後降低的 M1 極化和升高的 M2 表型，用抗 Cav-1 抗體治療在 ICH 後 3 天降低了促炎細胞激素

115426 第 21 頁，共 26 頁(發明說明書)

IL-6 和 MIP-2 的表現（圖 3 的 F 至 G），並增加了抗炎細胞激素 IL-4 和 IL-10 的表現（圖 3 的 H、I）。這些結果顯示，對 Cav-1 的抑制降低了 ICH 誘導的小膠質細胞/巨噬細胞活化，並且將小膠質細胞/巨噬細胞極化從促炎狀態轉變為抗炎狀態。

抗 Cav-1 抗體治療降低 ICH 後 Cav-1 的誘導和 MAPK 信號的活化

【0085】 ICH 在第 1 天和第 3 天都誘導 Cav-1 蛋白表現以及 P38 和 JNK 的磷酸化的增加（圖 4 的 A、B 和圖 4 的 D）。增加的 ERK 磷酸化被延遲至 ICH 後 3 天（圖 4 的 C）。抗 Cav-1 抗體治療在 ICH 後第 3 天抑制了 Cav-1 誘導，但在第 1 天沒有抑制（圖 4 的 A）。抗 Cav-1 抗體治療降低了 ICH 後第 1 天和第 3 天時 P38 的磷酸化，降低了第 3 天時 ERK 的磷酸化，但不降低 JNK 的磷酸化（圖 4 的 B 至 D）。這些資料顯示，抗 Cav-1 抗體治療針對 ICH 的保護機制可能與抑制 P38 和 ERK 活化有關。

抗 Cav-1 抗體治療藉由 P38 MAPK 信號路徑減少小膠質細胞培養物中凝血酶誘導的發炎反應

【0086】 直接使用 BV2 小膠質細胞系和原代小鼠小膠質細胞培養確定 Cav-1 抑制對小膠質細胞的作用。凝血酶是一種在 ICH 中在凝血期間以高水準釋放的絲胺酸蛋白酶，其用於活化小膠質細胞。結果顯示，用 10 U/mL 凝血酶對 BV2 小膠質細胞處理 24 小時誘導亞硝酸鹽的產生顯著增加。以 0.01、0.1 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 劑量的抗 Cav-1 抗體進行共同處理顯著減少亞硝酸鹽的產生，並且 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗 Cav-1 抗體提供最高程度的抗炎保護（圖 10 的 A）。因此，後續研究採用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的劑量。類似地，在施用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗 Cav-1 抗體後，在 BV2 細胞的條件培養基中的促炎細胞激素 IL-6 和 MIP-2 的水準降低（圖 10 的 B、

C)。與對 BV2 細胞的作用相似，抗 Cav-1 抗體處理在刺激後 24 小時降低原代小鼠小膠質細胞的培養基中的細胞激素 IL-6 和 MIP-2 的水準（圖 5 的 A、B）。在凝血酶暴露後 3 小時，在凝血酶刺激的原代小膠質細胞中抗 Cav-1 抗體處理後，iNOS 和 COX-2（兩種促炎酶）的蛋白表現顯著減弱（圖 5 的 C）。AP（啟動蛋白）-1 和 NF- κ B 是兩個轉錄因子，其誘導許多關於腦發炎基因表現，並且是 MAPK 信號傳導的下游效應物。凝血酶刺激後，總 c-Jun（AP-1 家族的關鍵成員）和 p-c-Jun 水平均增加（圖 5 的 D）。然而，在暴露後 1 小時和 3 小時，凝血酶刺激僅增加 p-P65（NF- κ B 活化的指示劑），但均不影響總 P65 水準（圖 5 的 E）。用抗 Cav-1 抗體處理顯著降低了在刺激後 1 小時和 3 小時的凝血酶誘導的 P65 和 c-Jun 的磷酸化（圖 5 的 D、E）。抗 Cav-1 抗體直接降低凝血酶刺激後 1 小時的 Cav-1 蛋白表現和 P38 磷酸化（圖 5 的 F、G）。在凝血酶刺激後 1 小時或 3 小時，在 IgG 處理組和抗 Cav-1 抗體處理組之間，ERK 和 JNK 的磷酸化沒有差異（圖 5 的 H、I）。這些結果顯示抗 Cav-1 抗體可藉由抑制 P38-MAPK 信號路徑抑制促炎性小膠質細胞的活化。

延遲靜脈內抗 Cav-1 抗體治療減少腦損傷和神經元死亡，並調節小膠質細胞/巨噬細胞的 M1/M2 極化

【0087】藉由靜脈內途徑發生 ICH 後，將抗 Cav-1 抗體治療延遲了 3 小時。在 ICH 後 3 小時開始的抗 Cav-1 抗體治療仍顯著減少了在第 3 天藉由 mNSS 評估的總體神經功能缺陷和藉由提升軀體擺動試驗評估的運動不對稱性（圖 6 的 A、B）。在 3 天的觀察期內，在 IgG 治療組和抗 Cav-1 抗體治療組之間，體重變化沒有顯著差異（圖 6 的 C）。延遲的抗 Cav-1 抗體治療在 ICH 後第 3 天時還減少了損傷量和半球擴大率（腦水腫的指標）（圖 6 的 D），並減弱了血腫周圍區域附近的 FJB 陽性神經元的數量（圖 6 的 E）和中性粒細胞

浸潤（圖 11）。抗 Cav-1 抗體的延遲治療在第 3 天時降低了在血腫周圍區域中的小膠質細胞/巨噬細胞活化和 CD16/32⁺/Iba-1⁺信號，並增加了 CD206⁺/Iba-1⁺和 ARG1⁺/Iba-1⁺信號（圖 6 的 F 至 I）。這些資料顯示對 Cav-1 的延遲抑制仍然發揮神經保護作用，並且該作用可能是藉由調節小膠質細胞/巨噬細胞的 M1/M2 極化來介導的。

延遲靜脈內抗 Cav-1 抗體治療調節浸潤巨噬細胞的 M1/M2 極化

【0088】 為了研究靜脈施用抗 Cav-1 抗體是否減少外周來源的巨噬細胞浸潤，使用 CCR2 染色來標記巨噬細胞。在 ICH 後第 3 天在 CCR2⁺細胞上表現 Cav-1 蛋白（圖 7 的 A）。經由外周施用的抗 Cav-1 抗體的延遲治療在第 3 天在血腫周圍區域中減少了 CCR2⁺細胞的數目（ 55.15 ± 2.13 對 47.84 ± 0.59 個細胞/視野）（圖 7 的 B），還減少了 CD16/32⁺/CCR2⁺信號，增加了 CD206⁺/CCR2⁺信號和 ARG1⁺/CCR2⁺信號（圖 7 的 C 至 E）。這些結果顯示，巨噬細胞的 M1/M2 極化調節可能與延遲的 Cav-1 抑制的神經保護作用有關。

【0089】 本揭露關於藉由在實驗性出血性中風中使用中和抗體來抑制 Cav-1 的作用。以下發現支持了在 ICH 中抗 Cav-1 抗體治療的保護作用：（1）抗 Cav-1 抗體治療（i.c.v.注射）減少 ICH 誘導的腦損傷；（2）在 ICH 後 3 小時的延遲抗 Cav-1 抗體治療（i.v.注射）減少 ICH 誘導的腦損傷；（3）抗 Cav-1 抗體治療同時抑制 ICH 誘導的發炎反應和凝血酶誘導的小膠質細胞發炎反應；（4）抗 Cav-1 抗體治療（i.c.v.或 i.v.注射）減少 ICH 後的小膠質細胞和浸潤的巨噬細胞活化，調節小膠質細胞和浸潤的巨噬細胞極化，以減少經典活化型類 M1（促炎性）小膠質細胞/巨噬細胞，並增加替代活化型類 M2（抗炎性）小膠質細胞/巨噬細胞。

【0090】經由 i.c.v.注射的抗 Cav-1 抗體在遭受 ICH 的小鼠中降低了小膠質細胞/巨噬細胞活化，並減弱了 p38 MAPK 活化。抑制 Cav-1 改善了長期行為預後，減輕腦水腫，減少了腦組織損傷和神經元死亡。Cav-1 抑制在小膠質細胞培養物中減弱了凝血酶刺激的 P38 MAPK-AP-1/NF- κ B 信號傳導的活化。當藉由靜脈內施用而使用更臨床相關的治療時間視窗時，抗 Cav-1 抗體治療仍具有神經保護作用。Cav-1 可能是減少由小膠質細胞/巨噬細胞介導的出血後腦發炎反應的潛在候選者。

【0091】Iba1⁺細胞中 Cav-1 蛋白的增加始於 ICH 後 6 小時，而 Cav-1 抗體 (i.c.v.注射) 最早在 6 小時 (即募集周圍巨噬細胞之前的一個時間點) 就降低了細胞激素的表現。Cav-1 抗體在原代小膠質細胞培養物中減少了凝血酶誘導的小膠質細胞活化，顯示 Cav-1 抑制表現出對小膠質細胞活化的直接作用。在 ICH 後 3 小時經由 i.v.的抗 Cav-1 抗體的延遲治療減少了 CCR2⁺巨噬細胞的浸潤，這顯示血液來源的巨噬細胞也是 Cav-1 介導發炎的靶標。除了抑制經典活化型 M1 小膠質細胞/巨噬細胞的活化外，抗 Cav-1 抗體誘導了小膠質細胞/巨噬細胞極化為替代活化型 M2 表型。該結果暗示 Cav-1 抑制在抑制小膠質細胞/巨噬細胞介導的發炎反應和調節小膠質細胞/巨噬細胞的極化中扮演重要作用。

【0092】Cav-1 在腦損傷中的作用一直存在爭議。本揭露發現抑制 Cav-1 減少了 ICH 誘導的腦損傷和神經發炎，並在小膠質細胞培養物中減弱了凝血酶誘導的小膠質細胞活化。結果暗示，Cav-1 是小膠質細胞/巨噬細胞回應於 ICH 的有害作用的關鍵因素。

【0093】總之，抑制 Cav-1 改善了 ICH 後的神經功能恢復，減少了腦組織損失和腦水腫，並限制了神經變性 (圖 7)。抑制 Cav-1 還抑制了 ICH 誘導的促炎性小膠質細胞/巨噬細胞活化。在培養的小膠質細胞中，抑制 Cav-1 降低

了 P38 MAPK-AP1 和 NF- κ B 信號傳導的活化。因此，抗 Cav-1 抗體（例如人單株抗體）可具有作為治療 ICH 的新策略的潛力。

【0094】 僅出於說明和描述的目的給出了對本揭露的示例性具體實施例的前述描述，而無意於窮舉本揭露或將本揭露限制為所公開的精確形式。根據以上教導，許多修改和變化是可能的。在本說明書中引用和討論的所有參考文獻均藉由引用以其整體併入本文，其程度與每個參考文獻藉由引用單獨併入的程度相同。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種針對小窩蛋白 1 (Cav-1) 的特異性抗體或其抗原結合片段的用途，其係用於製備在有需要的受試者中治療腦內出血或出血性中風的藥物，其中，該藥物是靜脈內注射劑型，且其中，該針對 Cav-1 的特異性抗體為針對小窩蛋白 1 產生的多株抗體。

【請求項2】 如請求項 1 所述的用途，其中，該用於治療的藥物在該腦內出血或出血性中風發生之前的 2 小時內施用於有需要的受試者。

【請求項3】 如請求項 1 所述的用途，其中，該用於治療的藥物在該腦內出血或出血性中風發生之後不遲於 6 小時施用於有需要的受試者。

【請求項4】 如請求項 1 所述的用途，其中，該小窩蛋白 1 是人源者。

【請求項5】 如請求項 1 所述的用途，其中，該針對 Cav-1 的特異性抗體為針對定位在人源小窩蛋白 1 的 N-末端的肽而產生的多株抗體。

【請求項6】 如請求項 1 所述的用途，其中，該腦內出血或出血性中風係由小膠質細胞或巨噬細胞所介導。

【請求項7】 如請求項 1 所述的用途，其中，該治療包括減少選自由腦損傷、腦發炎、腦水腫、凋亡神經元、半球萎縮和運動缺陷所組成群組中的至少一種。

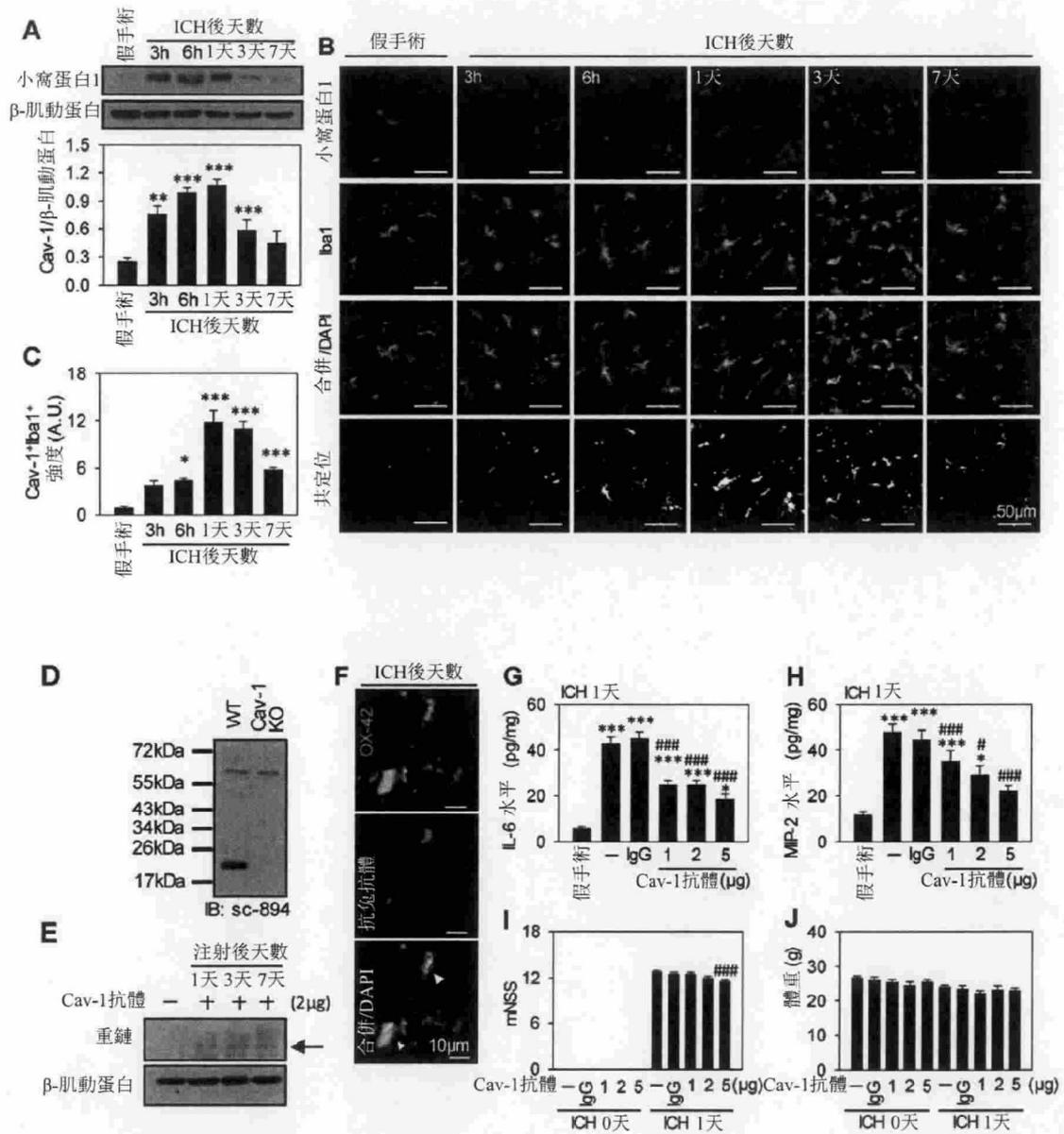
【請求項8】 如請求項 1 所述的用途，其中，該治療包括改善與出血性中風有關的行為預後或功能恢復。

【請求項9】 如請求項 8 所述的用途，其中，該行為預後係選自由神經行為預後和不對稱運動行為預後所組成群組中的至少一項。

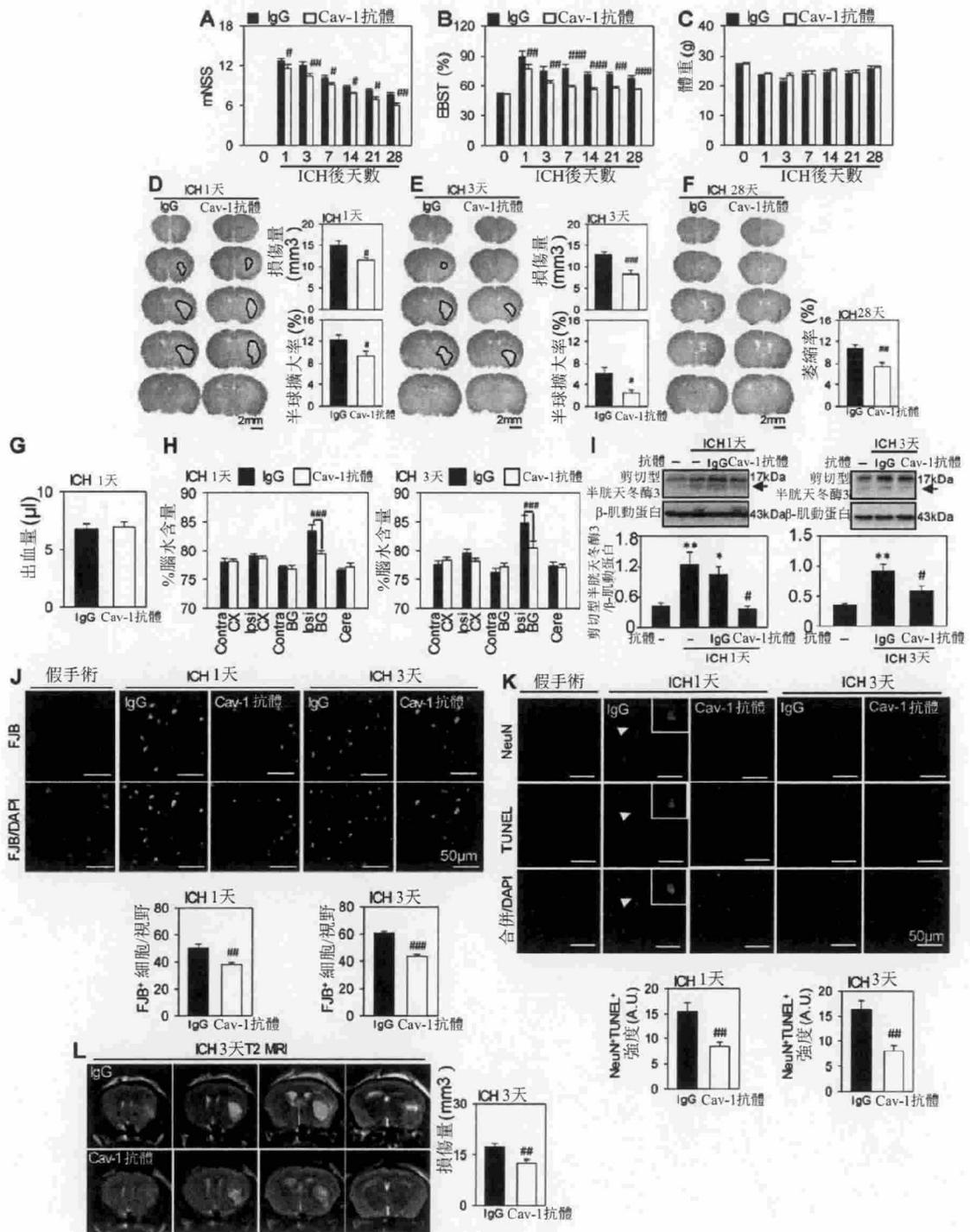
【請求項10】 如請求項 8 所述的用途，其中，該行為預後或功能恢復係選自由改良神經功能損傷嚴重程度評分 (mNSS) 和提升軀體搖擺試驗 (EBST) 比所組成群組中的至少一項。

【請求項11】如請求項 1 所述的用途，其中，該治療藥物在出血性中風發生之前或之後的 1 至 24 小時視窗內施用於有需要的受試者。

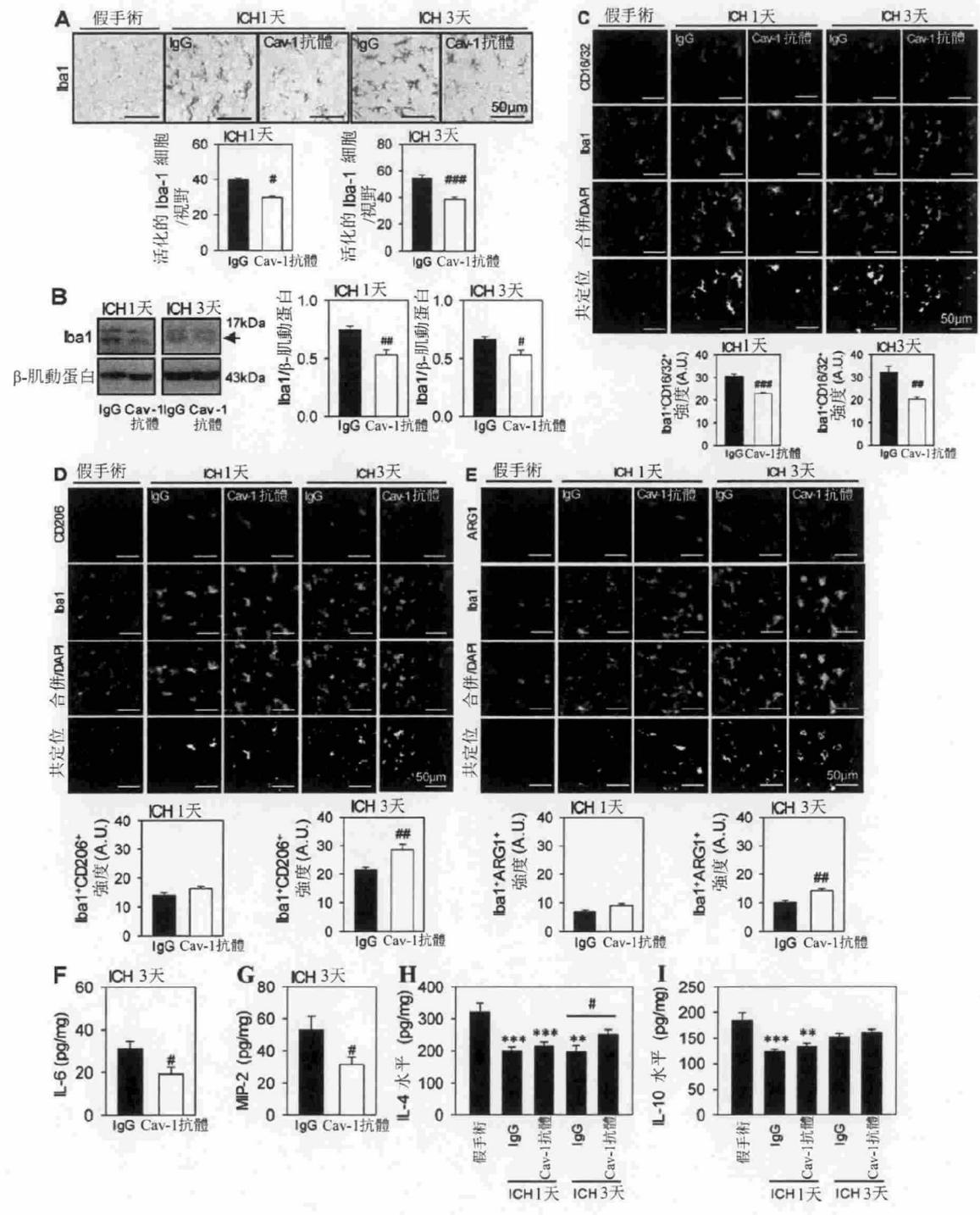
【發明圖式】



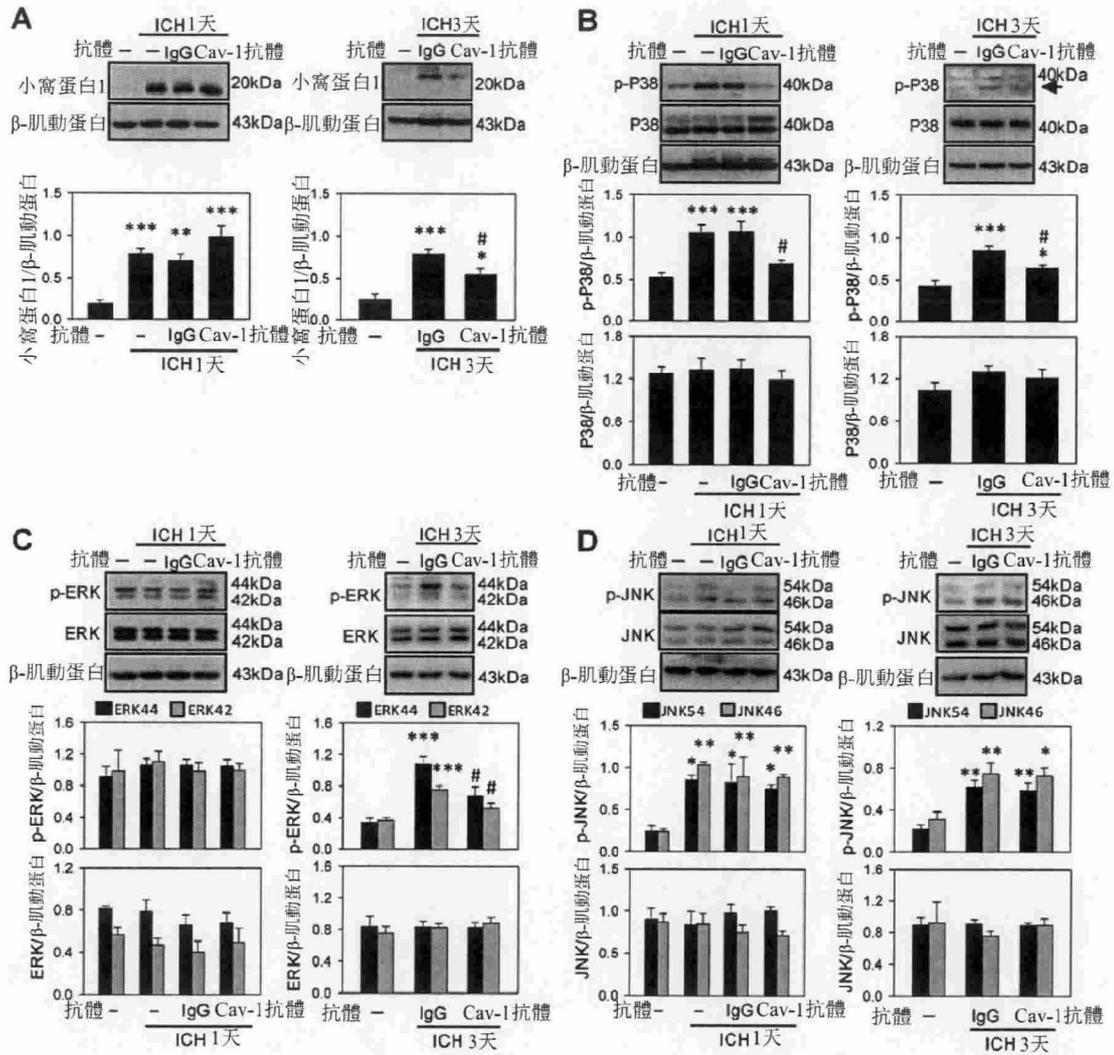
【圖 1】



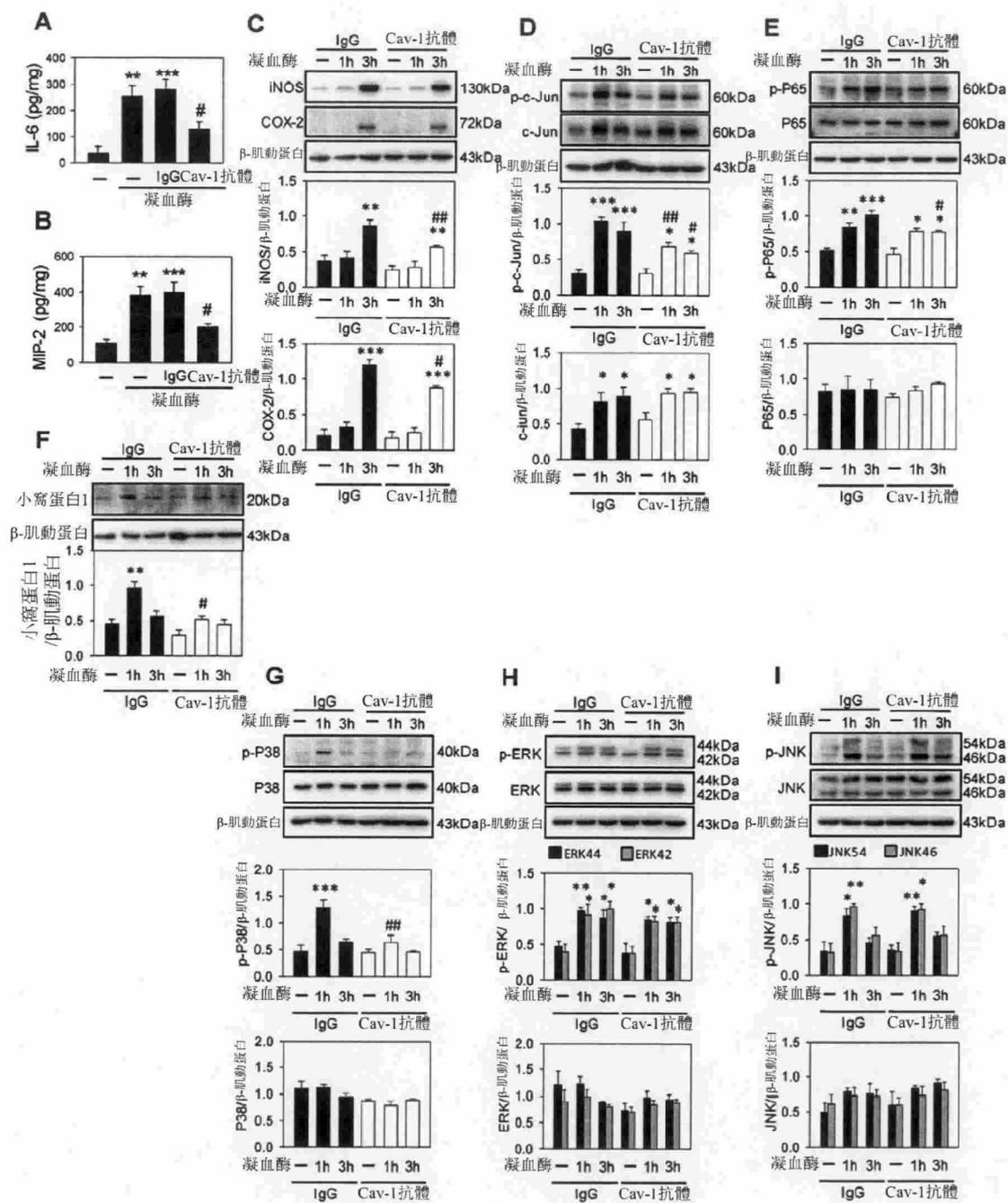
【圖 2】



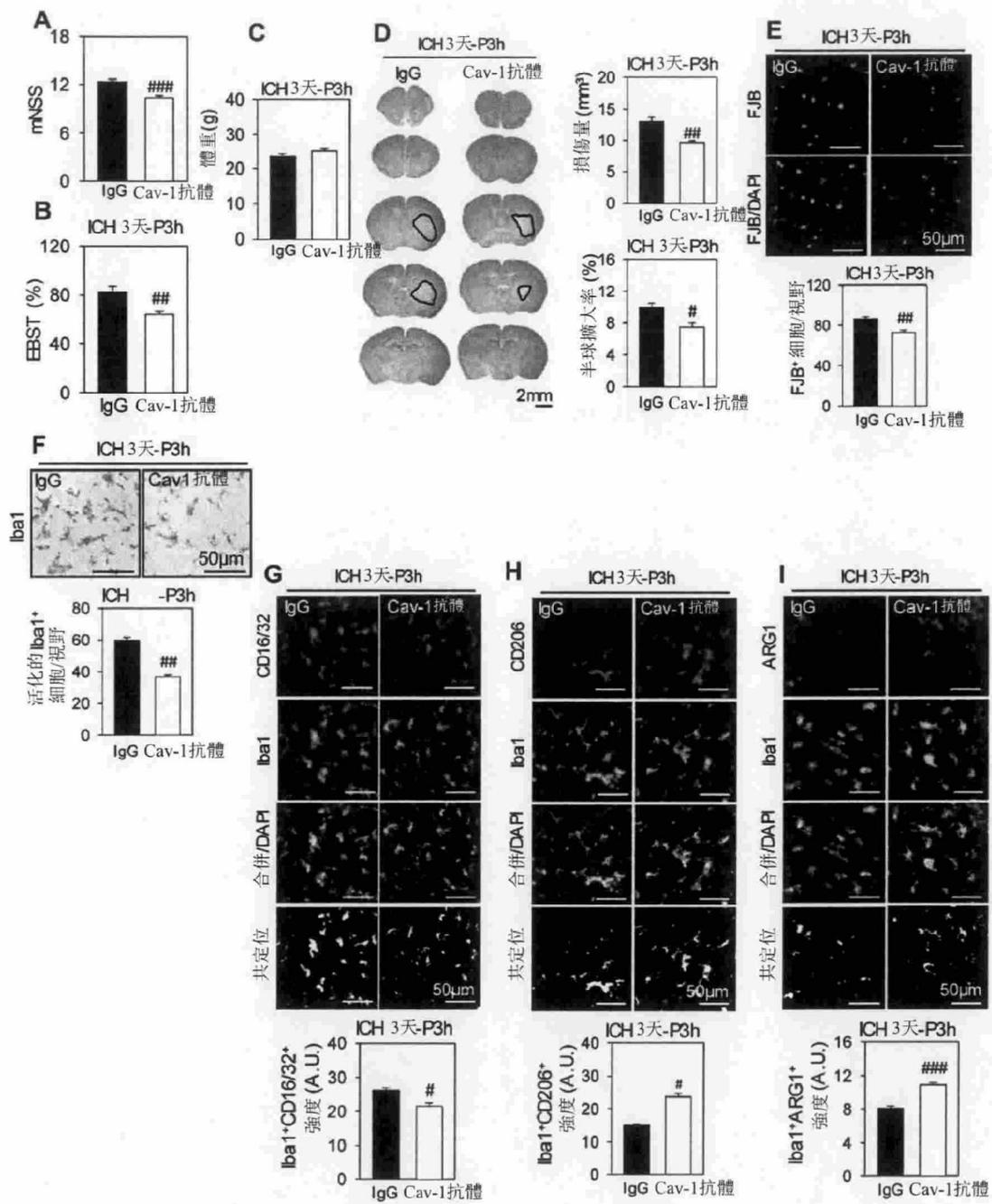
【圖 3】



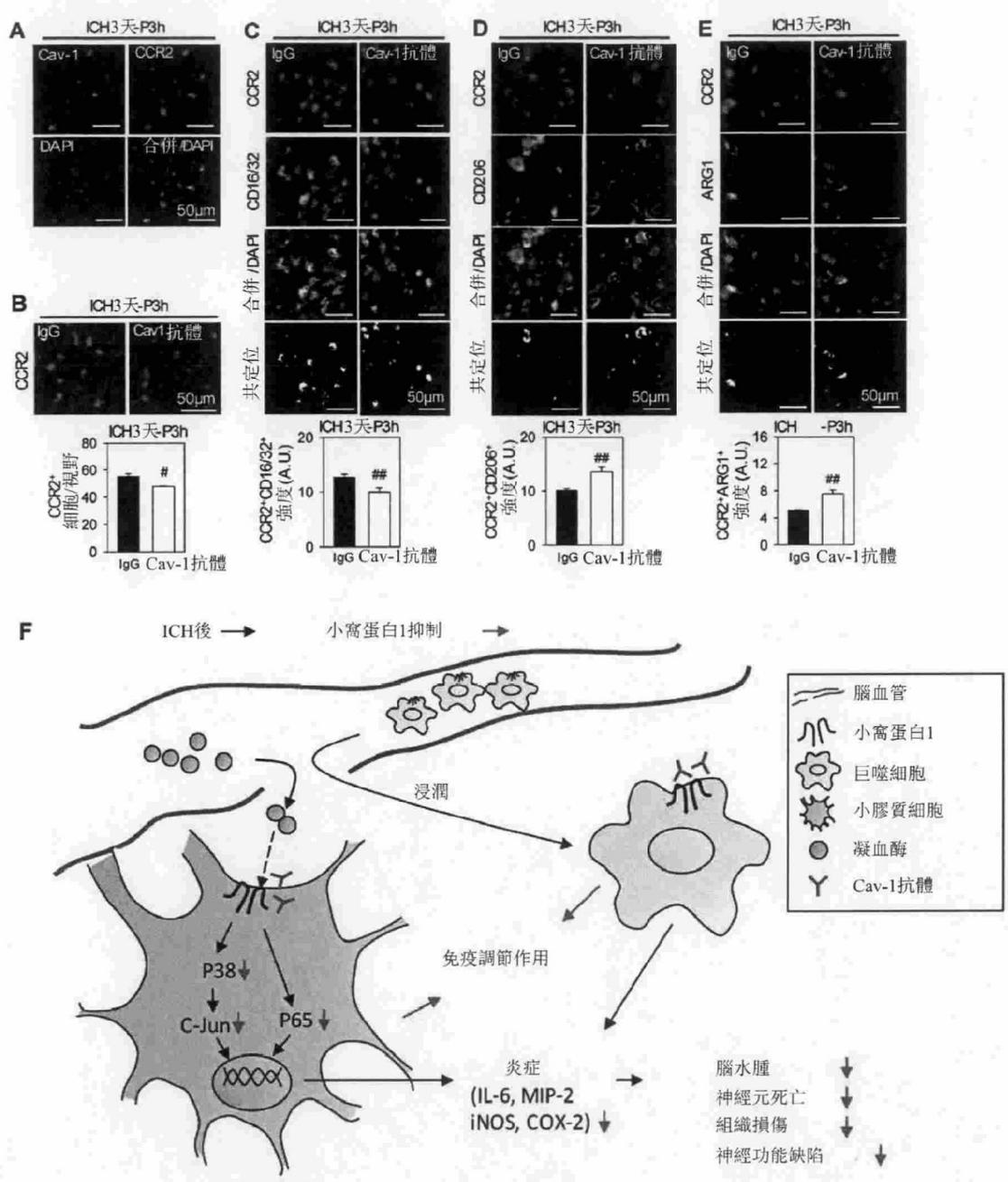
【圖 4】



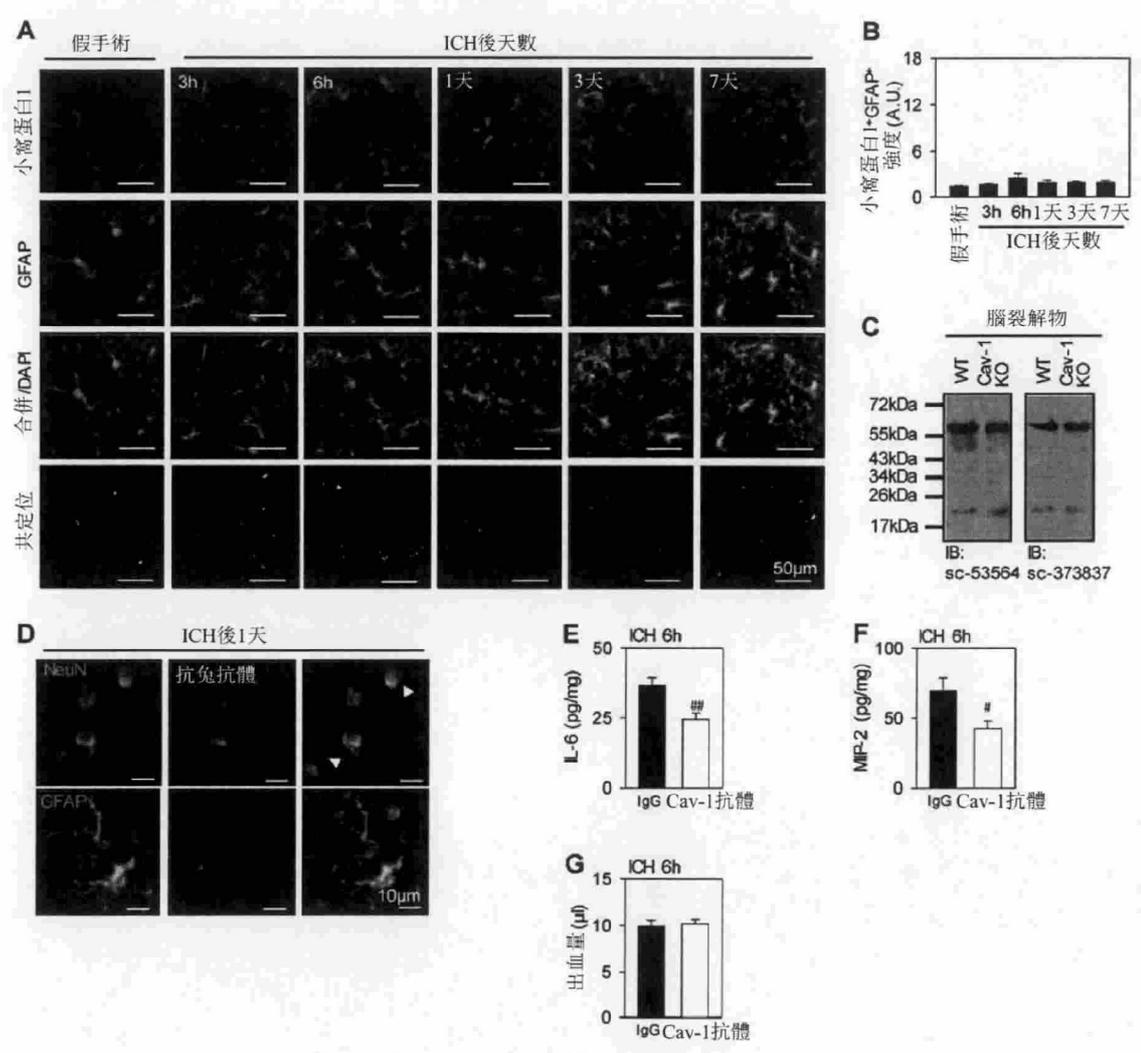
【圖 5】



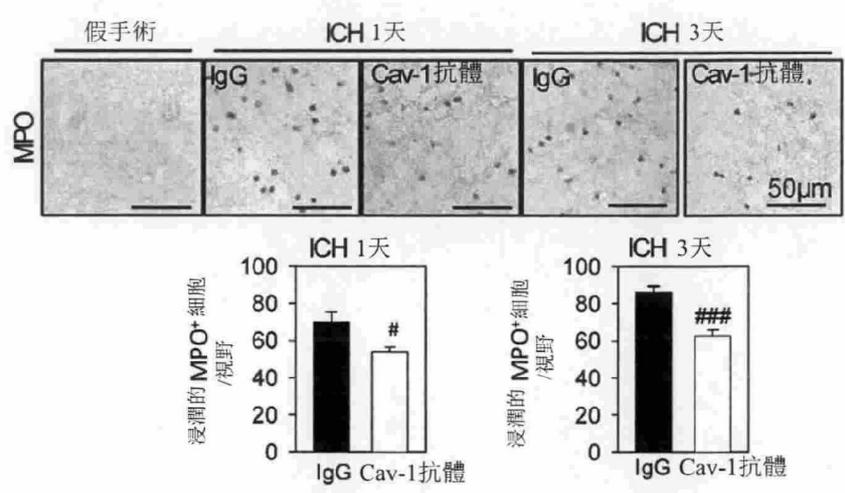
【圖 6】



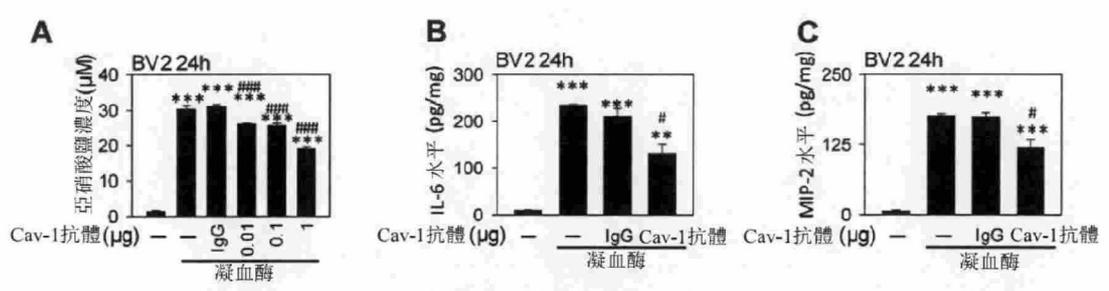
【圖 7】



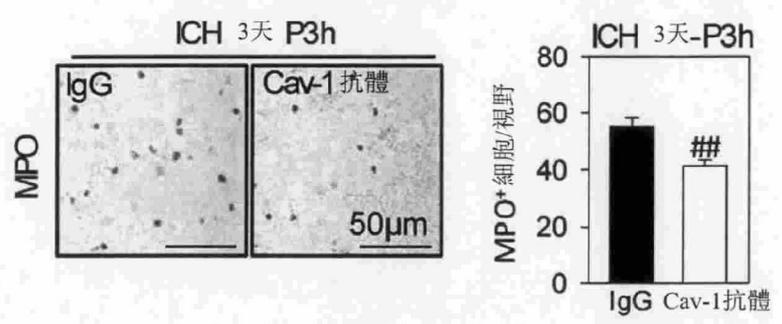
【圖 8】



【圖 9】



【圖 10】



【圖 11】