



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117209587 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 12

(21) 申请号 202311305815.6

(22) 申请日 2023.10.09

(71) 申请人 复旦大学附属中山医院

地址 200032 上海市徐汇区医学院路136号

(72) 发明人 程蕾蕾 汪雪君 沈毅辉 张卉

陈怡帆 许宇辰 张健

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司

31001

专利代理师 翁若莹

(51) Int. Cl.

C07K 14/60 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

A61K 38/25 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

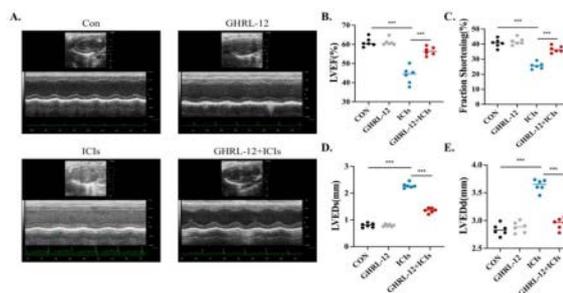
权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

生长激素释放相关多肽在防治免疫检查点抑制剂相关性心肌炎中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种生长激素释放相关多肽在防治免疫检查点抑制剂相关性心肌炎中的应用。本发明的生长激素释放相关肽来源于人的生长激素分泌受体的内源性配体,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。所述生长激素释放相关肽能够减少免疫检查点抑制剂相关性心肌炎小鼠血清中心肌损伤标志物,如CK,CKMB,LDH-1,cTnI和cTnT释放,减少心肌组织炎性细胞浸润和纤维化程度,改善心肌炎小鼠心功能,抑制心肌细胞发生凋亡和自噬。本发明的生长激素释放相关肽作为药物成分时,具有分子量小,免疫原性低,特异性高,作用模式安全,成药性高等优势。本发明为ICIs相关性心肌炎治疗提供给新的药物选择,具有良好的应用前景。



1. 一种生长激素释放相关多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列为:X-P-Y,其中,P为如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,X为: NH_2 或任意一种氨基酸或任意两种氨基酸的组合,Y为: OH 或任意一种氨基酸或任意两种氨基酸的组合。

2. 如权利要求1的生长激素释放相关多肽,其特征在于,所述多肽为GHRL-12,具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列,其氨基酸序列来源于ghrelin蛋白。

3. 一种用于编码权利要求2所述的生长激素释放相关多肽的基因,其特征在于,所述基因具有如SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列。

4. 权利要求1或2所述的生长激素释放相关多肽或其药学上可接受的盐形式在制备预防和/或治疗免疫检查点抑制剂相关性心肌炎药物中的应用。

生长激素释放相关多肽在防治免疫检查点抑制剂相关性心肌炎中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生长激素释放相关多肽在防治免疫检查点抑制剂相关性心肌炎中的应用,属于生物医药技术领域。

背景技术

[0002] 自2011年以来,免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitors,ICIs)的应用为晚期恶性肿瘤治疗带来了新的选择。临床数据表明,有1.14%的患者罹患ICIs相关性心肌炎,死亡率将近50%。ICIs相关性心肌炎临床表现为胸痛、呼吸急促、肺水肿甚至心源性休克,还可能出现心律失常,导致晕厥和猝死。与传统心肌疾病不同的是,免疫检查点抑制剂相关性心肌炎的主要发病机制学说认为是常驻在心肌周围的免疫细胞被激活攻击正常心肌细胞发生损伤,病理学主要表现为炎症细胞浸润。而传统缺血性心肌病是冠心病的晚期表现,是由于冠状动脉粥样硬化使心肌细胞丢失,纤维化或瘢痕增生。两者发病机制不同,治疗手段也不相同。缺血性心肌病仍以传统的心血管治疗药物,如洋地黄,氨茶碱,扩血管药物为主。而ICIs相关性心肌炎主要以大剂量激素冲击治疗为主,传统心血管药物对ICIs相关性心肌炎治疗几乎无效。但在临床诊疗中发现,一部分患者因出现激素抵抗使临床获益率降低,这部分患者最终可能进展为MACE(Major Adverse Cardiovascular Events,主要心血管不良事件)。为此,为ICIs相关心肌炎寻找高敏感性和特异性的治疗手段迫在眉睫。

[0003] 多肽是由蛋白酶体降解产生,可作为内源性配体或受体介导多种信号通路发挥重要作用。有研究表明,除BNP和ANP以外,循环抗微生物肽LL-37已成为心血管疾病中的新型生物标志物。多肽在药物研发领域也占据独特地位,从早期由针对胰岛素的多肽药物研发至今,全球已有上百种多肽药物被批准上市。其中依替巴肽已临床用于治疗急性冠脉综合征。为多肽药物在心血管疾病领域的研发提供全新选择。

[0004] 生长激素释放肽(ghrelin)是生长激素促分泌素受体(Growth hormone secretagogue receptor,GHSR)的内源性配体。ghrelin是Kojima等在小鼠和人胃内分泌细胞及下丘脑弓状核中发现的,是目前为止发现的唯一的GHSR天然配体,它含有28个氨基酸残基,分子量为33kDa。人和大鼠的ghrelin前体蛋白由117个氨基酸组成,N端前23肽呈现分泌信号肽的特征;ghrelin的N端前4个氨基酸片段为其最小的活性中心,C末端的P-R结构(脯氨酸-精氨酸)为其识别部位。人和大鼠的ghrelin只有2个氨基酸残基不同,编码基因序列有82.9%的同源性。ghrelin在体内有两种分泌形式:一种是ghrelin的N端第3位丝氨酸发生了辛酰基化,另一种是该部位没有发生辛酰基化。ghrelin的N端第3位丝氨酸是其发挥生物学功能的实质部位。最初的研究认为去辛酰基化ghrelin(des-acyl ghrelin)不具备生物学活性,而最新研究发现,去辛酰基化和辛酰基化的ghrelin均能够促进脊索神经上皮的增殖;去辛酰基化ghrelin具有内分泌功能,能促进细胞增殖,具有抗凋亡作用。

[0005] 生长激素(growth hormone,GH)在垂体的脉冲式释放主要受下丘脑的生长激素释

放激素 (growth hormone releasing hormone, GHRH)、生长抑素 (Somatostatin, SS) 和 ghrelin 三个因子调节。对 GH 的分泌, GHRH 起促进作用, SS 起抑制作用, ghrelin 可与 GHRH 协同起到促进作用, 三者在下丘脑形成局部神经内分泌调节反馈环。在调节 GH 分泌的系统中, GHRH 与其受体结合, 增加细胞内环磷酸腺苷的水平; ghrelin 与其受体结合, K^+ 通道的去极化和抑制, 引起细胞内 IP3 浓度升高, 细胞内的 Ca^{2+} 浓度升高, 最终刺激 GH 的分泌。GH 从垂体促生长激素细胞的释放也可受到生长激素释放多肽 (GHRP) 的控制。已经发现有一种六肽, H-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-CONH₂ (GHRP-6) 在包括人的几种物种中以剂量依赖性方式调节促生长激素细胞中释放生长激素 (Bowerset.al., Endocrinology 1984, 114, 1537-1545)。其后对 GHRP-6 进行化学研究从而识别了其他一些有效的生长激素促释放素, 例如 GHRP-1、GHRP-2 以及海沙瑞林 (hexarelin) 等:

[0006] GHRP-1: Ala-His-D-(2')-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂;

[0007] GHRP-2: D-Ala-D-(2')-Nal-Ala-Trp-D-Nal-Lys-NH₂;

[0008] 海沙瑞林: His-D-2-MeTrp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂。

[0009] GHRP-1、GHRP-2、GHRP-6 以及海沙瑞林为合成的生长激素促释放素 (GHS' s), GHS' s 通过与生长激素释放素不同的机制而刺激生长激素的分泌。

[0010] 目前有专利 (CN112955165A) 公开了 GHRP-6 作为迟缓型心脏保护剂和心脏恢复剂的用途, GHRP-6 有利于逆转源自心室运动障碍和舒张期功能障碍的细胞毒性事件, 以便如此地重建心肌功能并且改善冠状动脉、心肌以及动物和人的其余组织和器官的灌注。但目前未见关于来源于 ghrelin 的生长激素释放相关多肽及其在防治免疫检查点抑制剂相关性心肌炎中的应用的相关报道。

发明内容

[0011] 本发明的目的是: 针对以激素治疗 ICI 相关性心肌炎疗效不佳的技术问题, 本发明提供一种来源于 ghrelin 的生长激素释放相关多肽及其在防治免疫检查点抑制剂相关性心肌炎中的应用。

[0012] 为了实现上述目的, 本发明一种生长激素释放相关多肽, 其特征在于, 所述多肽的氨基酸序列为: X-P-Y, 其中, P 为如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列, X 为: NH₂ 或任意一种氨基酸或任意两种氨基酸的组合, Y 为: OH 或任意一种氨基酸或任意两种氨基酸的组合。

[0013] 优选地, 所述多肽为 GHRL-12, 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列 (即 X 为 NH₂, Y 为 OH), 其氨基酸序列来源于 ghrelin 蛋白。

[0014] 本发明还提供了一种用于编码上述生长激素释放相关多肽 GHRL-12 的基因, 所述基因具有如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

[0015] 本发明还提供了上述的生长激素释放相关多肽或其药学上可接受的盐形式在制备预防和/或治疗免疫检查点抑制剂相关性心肌炎药物中的应用。

[0016] 本发明与现有技术相比, 具有如下有益效果:

[0017] 本发明首次提出运用来源于 ghrelin 的生长激素释放相关多肽 GHRL-12 用于制备防治 ICI 相关性心肌炎的药物, 并且在动物模型上得以验证; 特别是, 生长激素释放相关多肽能降低心肌炎组小鼠 CK, CKMB, LDH-1, cTnI 和 cTnT 含量, 提高心肌炎组小鼠心肌炎组小鼠 LVEF, FS 水平, 降低 LVEDs 和 LVEDd, 减少心肌炎组小鼠心肌组织中炎性细胞浸润和纤维化程

度,显著抑制凋亡和自噬关键蛋白的激活;并且,本发明的生长激素释放相关多肽来源于天然蛋白,作为药物成分时,具有分子量小,免疫原性小,作用模式安全,成药性高等优势。

附图说明

[0018] 图1为GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠的一般情况;A. 各组小鼠每7天体重增长情况;B. 各组小鼠心体比;C. 各组小鼠心胫比;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,单因素方差分析(one-way ANOVA),n=6。

[0019] 图2为GHRL-12改善ICIs相关心肌炎小鼠心功能;A: 各实验组小鼠M型心动超声图;B: 各组小鼠左心室射血分数(LVEF)统计结果;C: 各组小鼠左室短轴缩短率(FS)统计结果;D: 各组小鼠左心室收缩末期内径(LVEDs)统计结果;E: 各组小鼠左心室舒张末期内径(LVEDd)统计结果;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,one-way ANOVA,n=6。

[0020] 图3为GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠心肌组织炎性细胞浸润和纤维化;A: 各组小鼠HE染色结果;B: 对A中HE中炎性细胞浸润情况用ImageJ进行统计的结果;C: 各组小鼠Masson染色结果;D: 对C中染色结果进行ImageJ统计分析的结果;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,one-way ANOVA,n=6。

[0021] 图4为GHRL-12减少ICIs相关性心肌炎小鼠心肌损伤酶谱标志物释放;A: 各组小鼠肌酸激酶(Creatine kinase,CK)检测分析结果;B: 各组小鼠血清中肌酸激酶同工酶(Creatine kinase Isoenzyme,CKMB)检测分析结果;C: 各组小鼠乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)-1的检测分析结果;D: 各组小鼠肌钙蛋白(cardiac TroponinI)I的检测分析结果;E: 各组小鼠肌钙蛋白(cardiac TroponinI)T的检测分析结果;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,one-way ANOVA,n=6。

[0022] 图5为GHRL-12减少ICIs相关性心肌炎小鼠炎症因子释放;A: 通过ELISA法检测分析各组小鼠血清中白介素-1 β (IL-1 β)的结果;B: 通过ELISA法检测分析各组小鼠血清中白介素-6(IL-6)的结果;C: 通过ELISA法检测分析各组小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的结果;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,one-way ANOVA,n=6。

[0023] 图6为GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠显著抑制凋亡和自噬相关蛋白的激活;A. 各组小鼠心肌组织中HMGB1,ATG5,Beclin-1和LC3B蛋白表达图片;B. 各组小鼠心肌组织中ATG5蛋白表达统计结果;C. 各组小鼠心肌组织中Beclin-1蛋白表达统计结果;D. 各组小鼠心肌组织中HMGB1蛋白表达统计结果;E. 各组小鼠心肌组织中LC3B蛋白表达统计结果;F. 各组小鼠心肌组织TUNEL染色图片;G. 各组小鼠心肌组织TUNEL染色定量结果;H. 各组小鼠心肌组织PARP和caspase-3蛋白表达图片;I. 各组小鼠心肌组织cleaved-caspase-3与caspase-3蛋白表达统计结果;J. 各组小鼠心肌组织cleaved-PAPRP与PARP蛋白表达比值统计结果;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,one-way ANOVA,n=3。

具体实施方式

[0024] 为使本发明更明显易懂,兹以优选实施例,并配合附图作详细说明如下。

[0025] 下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0026] 实施例1:GHRL-12多肽(即“生长激素释放相关多肽”)序列及制备

[0027] 该GHRL-12多肽由上海科肽生物技术公司通过固相化学合成,纯度在95%以上,其具有12个氨基酸,位于人Ghrelin蛋白第12-23位氨基酸,氨基酸序列为:Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala(VQQRKESKKPPA,SEQ ID NO:1),核苷酸序列(SEQ ID NO:2)为5'-gtg cag cag aga aag gag agc aag aag ccc cct gcc-3',分子质量(MW)为1395.62,等电点(PI)为10.29,在体内半衰期为大于20h,表明该多肽具有良好的成药性。

[0028] 实施例2:动物实验

[0029] 1. 动物来源:

[0030] 6-8周龄Balb/c小鼠,体重20-25g,由南京集萃药康实验动物有限责任公司提供,饲养于复旦大学附属中山医院实验动物中心。

[0031] 2. 实验分组:

[0032] 对照组(CON group),心肌炎组(ICIs group),单纯给予GHRL组(GHRL-12group)和GHRL-12+心肌炎组(GHRL-12+ICIs group)。每组随机6只,GHRL-12多肽按10mg/kg给药,以生理盐水为溶剂配成注射液,尾静脉注射方式给药。

[0033] 3. GHRL-12给药与免疫检查点抑制剂相关性心肌炎小鼠模型建立:

[0034] 对GHRL-12组和GHRL+心肌炎组小鼠连续尾静脉注射10mg/kg GHRL-12一周,同时对对照组和心肌炎组小鼠尾静脉同等体积的无功能scramble肽。在第7天和第14天分别给予心肌炎组和GHRL-12+ICIs组小鼠250 μ g cTnI,从第14天开始,每间隔一天给小鼠腹腔注射5mg/kg anti-PD-1,共5次。

[0035] 每7天称量各组小鼠体重,记录一般状态。

[0036] 模型构建完成一周后,将小鼠放置于含有2%异氟醚(河北一品药业,中国上海),的诱导室中,持续供氧2L/min。待小鼠麻醉完全后,将其平卧置于等温实验台上。使小鼠心率维持在350-550bpm,记录M模式图像。

[0037] 眼眶静脉取血1mL,常规离心取上清,测定血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CKMB),乳酸脱氢酶(LDH-1),肌钙蛋白I(cTnI)和肌钙蛋白T(cTnT)水平;酶联免疫吸附试验检测血清炎症因子TNF- α ,IL-1 β 和IL-6水平。

[0038] 取心脏组织进行切片、染色,观察心肌炎性细胞浸润水平和纤维化程度。对心肌组织进行TUNEL染色,心肌纤维用 α -actinin标记染成红色,DAPI染细胞核呈蓝色,发生凋亡的心肌细胞将被TUNEL染色呈绿色。

[0039] 将心肌组织块加入按照比例配制好的蛋白裂解液中,提取组织蛋白。鉴定凋亡关键蛋白Caspase-3和PARP以及自噬关键蛋白HMGB1,ATG5,Beclin-1和LC3B表达。

[0040] 4. 实验结果

[0041] (1) GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠一般情况

[0042] 图1是单纯GHRL-12给药组小鼠体重与灌胃生理盐水组小鼠体重无明显差异。而心肌炎小鼠体重增加不明显,从第19天开始表现出统计学差异($P=0.0248$)。在第31天,经GHRL-12干预后的心肌炎小鼠体重增加较为明显,与单纯心肌炎组小鼠存在统计学差异($P=0.0008$) (图1A)。经造模完成后,测量小鼠心体比和心径比结果发现,与对照组和GHRL-12组相比,ICIs组心体比与心径比显著增加,而GHRL-12+心肌炎组心体比与心径比显著下降(图1B和1C)。结果表明,GHRL-12改善ICIs相关心肌炎小鼠一般状况。

[0043] (2) GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠心功能

[0044] 单纯GHRL-12给药小鼠心功能无明显变化,心肌炎小鼠左心室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(FS)均下降,而经GHRL-12干预后LVEF和FS呈一定程度上升(图2B和2C);同时,心肌炎小鼠左心室收缩末期内径(LVEDs)和左心室舒张末期内径(LVEDd)均上升($p < 0.05$),经GHRL-12干预后LVEDs和LVEDd均下降(图2D和2E)。结果表明,GHRL-12改善ICIs相关心肌炎小鼠心功能。

[0045] (3) GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠心肌组织炎性细胞浸润和纤维化

[0046] HE染色结果表明,对照组小鼠和GHRL-12组小鼠心肌细胞排列整齐,细胞形态正常,无炎性细胞浸润。而心肌炎组小鼠心肌组织部分断裂,细胞排列紊乱,有明显炎性细胞浸润,GHRL-12+心肌炎组小鼠心肌组织断裂减少,心肌细胞排列部分紊乱,且炎性细胞浸润减少(图3A)。对HE中炎性细胞浸润情况用ImageJ进行统计,发现心肌炎组小鼠炎性细胞浸润程度与对照组相比存在统计学差异($P < 0.05$),且GHRL-12+心肌炎组小鼠炎性细胞浸润程度与心肌炎组相比存在统计学差异($P < 0.05$) (图3B)。Masson染色显示心肌炎组小鼠心肌纤维排列紊乱,胶原含量较对照组和GHRL-12组明显增加,而GHRL-12+心肌炎组小鼠心肌纤维排列相对整齐,心肌胶原含量明显降低(图3C)。ImageJ分析结果显示,心肌炎组小鼠心肌纤维排列紊乱程度与胶原含量与对照组相比存在统计学差异($P < 0.05$),且GHRL-12+心肌炎组小鼠心肌纤维排列紊乱程度与胶原含量与心肌炎组相比存在统计学差异($P < 0.05$) (图3D)。结果表明,GHRL-12能显著减轻ICIs相关性心肌炎小鼠心肌组织炎性细胞浸润和纤维化程度。

[0047] (4) GHRL-12减少ICIs相关性心肌炎小鼠心肌损伤酶谱标志物释放

[0048] 肌酸激酶(Creatine kinase,CK)结果表明,与对照组相比,GHRL-12组小鼠血清CK值无显著差异,而心肌炎组小鼠血清CK值显著升高,而GHRL-12+心肌炎组小鼠血清CK下降明显(图4A)。同时,单纯GHRL-12干预后,小鼠血清中肌酸激酶同工酶(Creatine kinase Isoenzyme,CKMB)无明显变化,心肌炎组小鼠CKMB显著上升,而GHRL-12+心肌炎组小鼠血清CKMB显著下降(图4B)。同样,GHRL-12可以减少乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase,LDH)-1的释放(图4C)。心肌炎组小鼠肌钙蛋白(cardiac TroponinI)I和T均显著升高,GHRL-12减少了小鼠肌钙蛋白I和T的释放(图4D和4E)。结果表明,GHRL-12可显著减少心肌酶谱标志物的释放,减少ICI对心功能的损伤。

[0049] (5) GHRL-12减少ICIs相关性心肌炎小鼠炎症因子释放

[0050] ELISA结果表明,心肌炎小鼠血清中白介素-1 β ,白介素-6和肿瘤坏死因子- α 均显著升高,具有统计学差异($p < 0.05$);GHRL-12+心肌炎组小鼠血清IL-1 β ,IL-6和TNF- α 均显著下降,且与心肌炎组相比具有统计学意义($P < 0.05$) (图5A-C)。结果表明,GHRL-12除了可以缓解ICIs对心肌的损伤,同时可以抑制免疫细胞过度激活,抑制炎症因子释放。

[0051] (6) GHRL-12改善ICIs相关性心肌炎小鼠显著抑制凋亡相关蛋白和自噬相关基因的激活

[0052] 心肌炎组小鼠心肌组织中自噬关键蛋白Beclin-1, HMGB1, ATG5和LC3B均显著升高,但仅GHRL-12干预并不能影响自噬。GHRL-12+心肌炎组小鼠Beclin-1, HMGB1, ATG5和LC3B则显著降低,且具有统计学意义(图6A-E)。对心肌组织进行TUNEL染色,结果表明,对照组与GHRL-12组发生凋亡的心肌细胞无显著改变。ICIs组发生凋亡的心肌细胞显著增多,而GHRL-12+ICIs组凋亡心肌细胞显著减少(图6F-G)。蛋白质印迹技术进一步检测凋亡相关蛋

白变化,发现心肌炎组小鼠心肌组织中cleaved-caspase-3和PARP均显著激活,而GHRL-12+心肌炎组则被一定程度抑制,且具有统计学差异($P<0.05$) (图6E-F)。结果表明,GHRL-12可以通过抑制凋亡和自噬关键蛋白的激活。

[0053] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

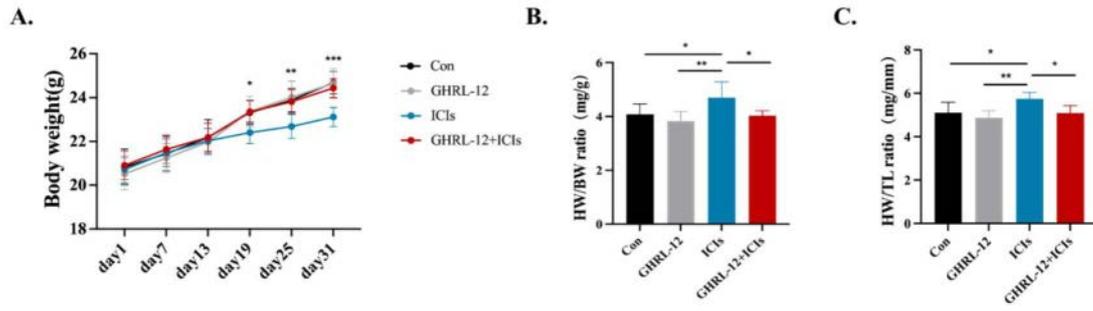


图1

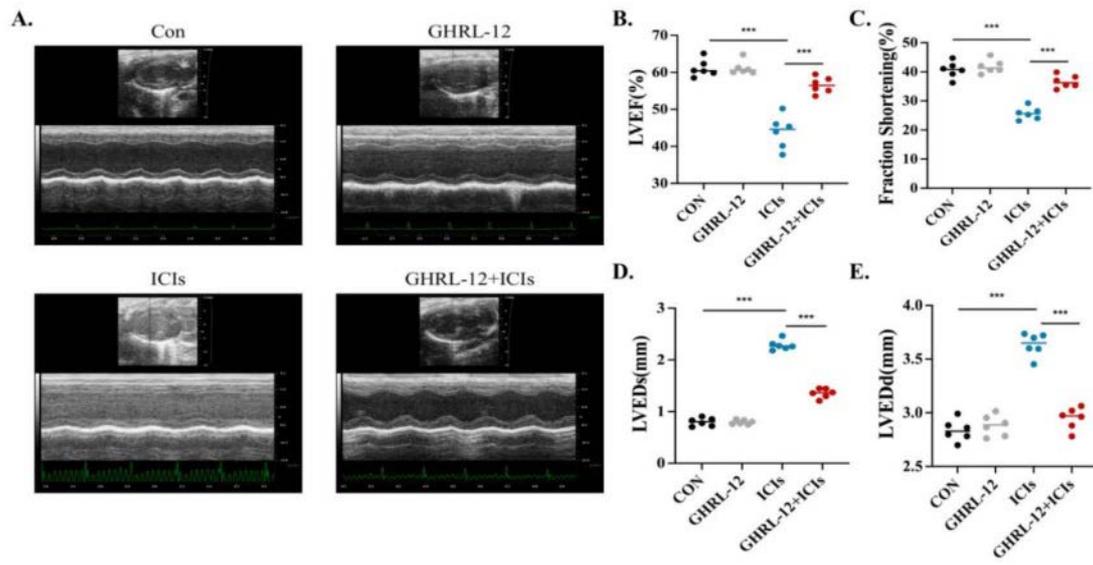


图2

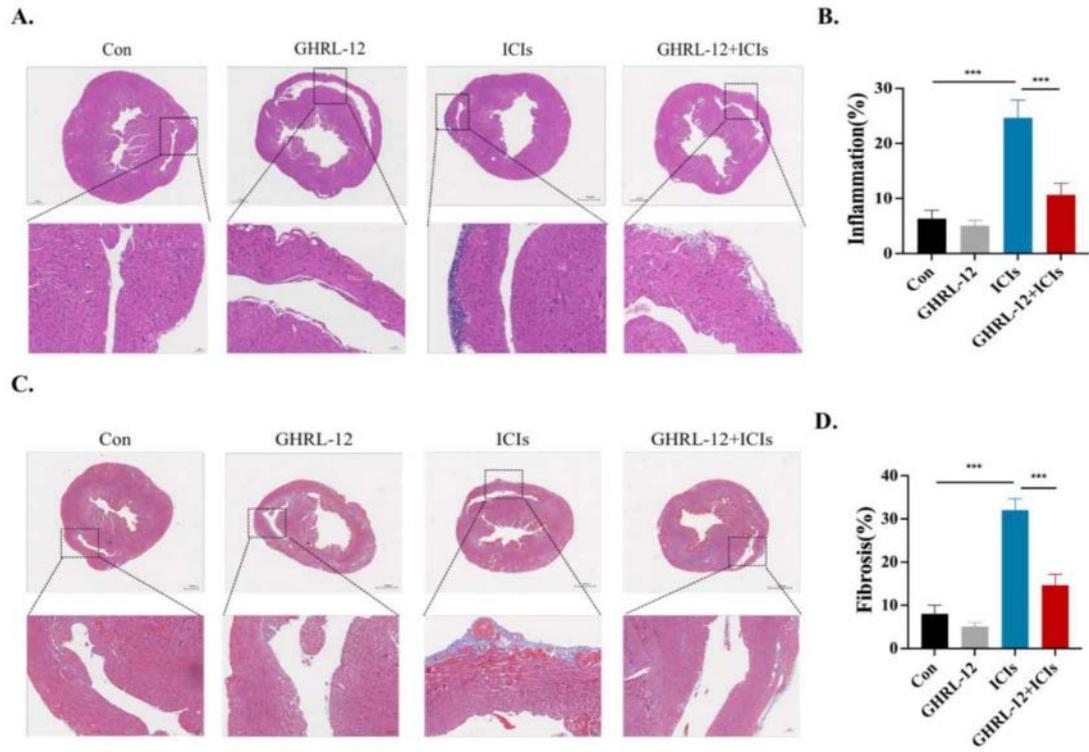


图3

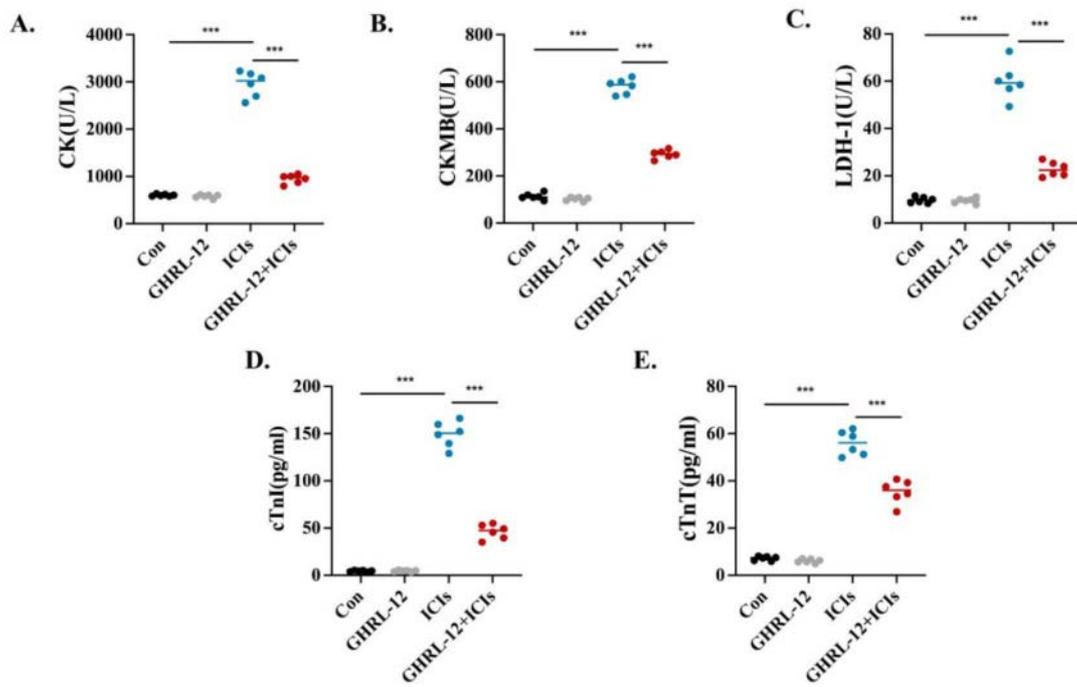


图4

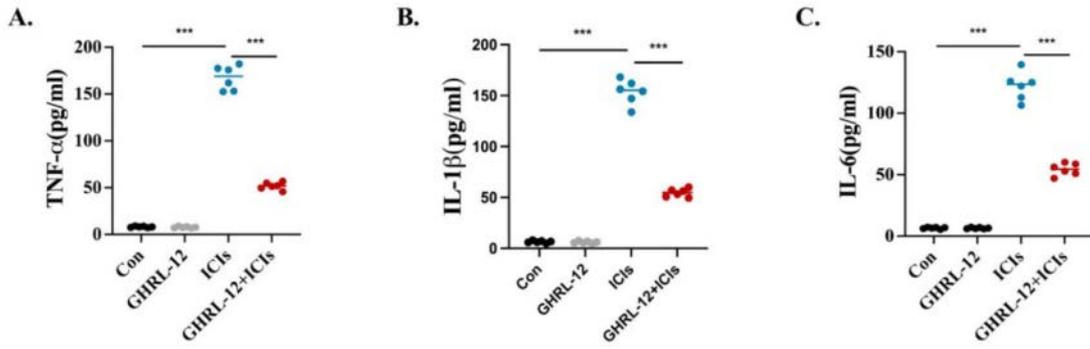


图5

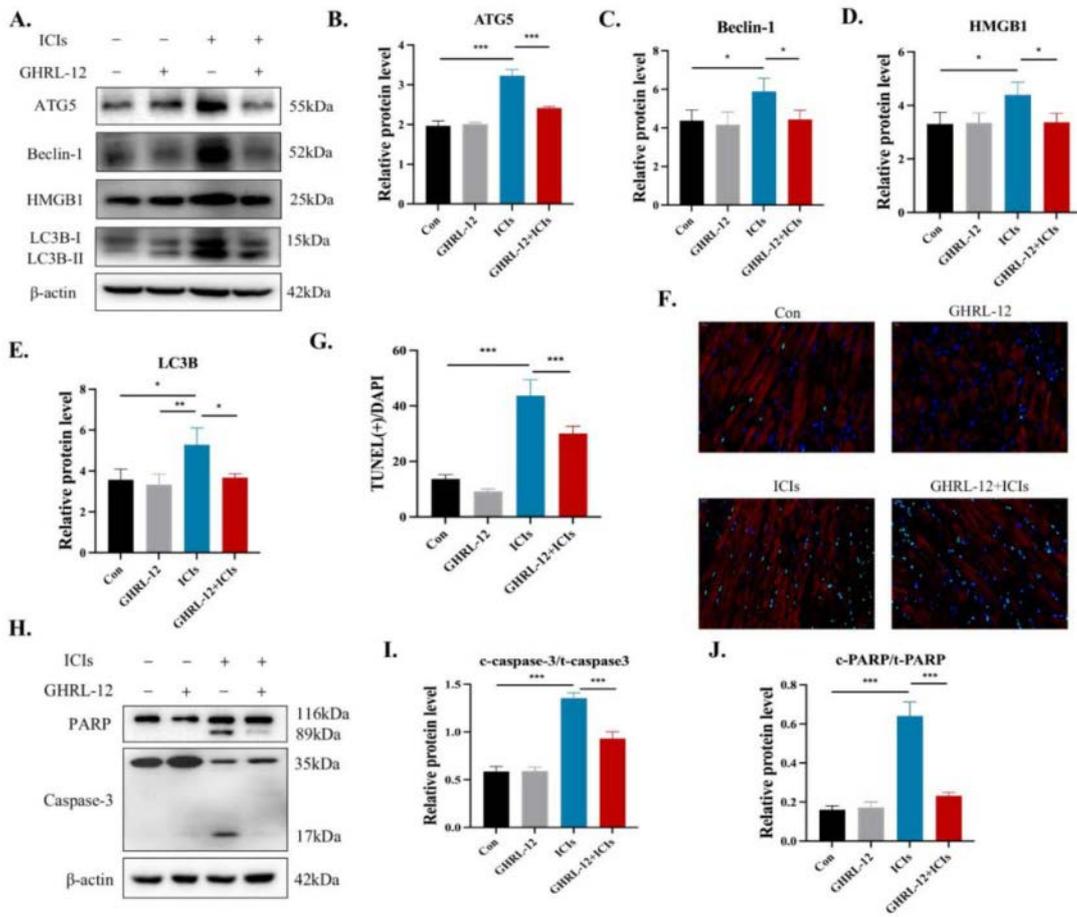


图6