



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111658643 B

(45) 授权公告日 2021.12.07

(21) 申请号 202010761090.1

US 2003022911 A1,2003.01.30

(22) 申请日 2020.07.31

EP 1469879 A1,2004.10.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111658643 A

洪强 等.CD4+CD25+Foxp3+调节性T淋巴细胞与Graves病复发的关系.《中华检验医学杂志》.2008,第33卷(第4期),

(43) 申请公布日 2020.09.15

Jae Mi Suh 等.Regulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt/Protein Kinase B, FRAP/Mammalian Target of Rapamycin, and Ribosomal S6 Kinase 1 Signaling Pathways by Thyroid-stimulating Hormone (TSH) and Stimulating type TSH Receptor Antibodies in the Thyroid Gland.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2003,第278卷(第24期),

(73) 专利权人 西安交通大学医学院第一附属医院

地址 710061 陕西省西安市雁塔区雁塔西路277号

孟萍 等.雷公藤多甙治疗难治性Graves病的临床研究.《5TH全国中西医结合内分泌代谢病学术大会暨糖尿病论坛论文集》.2012,

(72) 发明人 施秉银 王悦 陈子怡 胡诗倩

(74) 专利代理机构 西安通大专利代理有限责任公司 61200

代理人 范巍

Johnthomas Kang 等.De novo induction of antigen-specific CD4 CD25 Foxp3.《Journal of Leukocyte Biology》.2008,第83卷

(51) Int. Cl.

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 31/4164 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 5/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102065854 A,2011.05.18

CN 102458387 A,2012.05.16

审查员 张冲

权利要求书1页 说明书6页 附图5页

(54) 发明名称

雷帕霉素在难治性Graves病中的制药应用

(57) 摘要

本发明首次公开了雷帕霉素治疗难治性GD的制药应用,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗可以改善难治性GD患者的TSH、TRAb水平;并且,患者体内的Treg/CD4+T比例升高,Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值均降低;同时,Th17与Treg细胞相关细胞因子,包括IL-17A、IL-6以及TGF-β1的血浆水平均被明显改善。雷帕霉素的难治性GD给药量为0.5mg/天,药物谷浓度为2~4ng/mL。雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组无明显不良反应。因此,本发明的实验结果充分支持雷帕霉素在治疗难治性GD的新应用,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗是值得探索的难治性GD治疗新方向。

CN 111658643 B

1. 雷帕霉素联合甲巯咪唑在制备治疗难治性Graves病的药物中的应用,其特征在于,所述的药物中雷帕霉素的给药量为0.5mg/天,药物谷浓度为2~4ng/mL,且所述的药物为改善难治性Graves病的抗促甲状腺激素受体抗体水平的药物;

其中,接受抗甲状腺药物治疗5年以上的Graves病患者,甲状腺功能正常或轻度亢进者的Graves病症被定义为难治性Graves病。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的药物为改善难治性Graves病的Treg/CD4+T比例、Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值的药物。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述的药物为改善难治性Graves病的血浆IL-17A、IL-6以及TGF- β 1细胞因子水平的药物。

4. 一种用于治疗难治性Graves病的药物,其特征在于,该药物由雷帕霉素和甲巯咪唑添加药用辅料制成制剂,制成的制剂中含有0.5mg的雷帕霉素。

雷帕霉素在难治性Graves病中的制药应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,涉及雷帕霉素在难治性Graves病中的制药应用。

背景技术

[0002] Graves病(GD)是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,是甲状腺功能亢进最常见的病因。GD年发病率为(20~50)/10万,大约3%的女性和0.5%的男性终身患有GD。其中,接受抗甲状腺药物治疗5年以上的GD患者,甲状腺功能正常或轻度亢进者,被定义为难治性GD。基于我们以前的研究,与缓解期GD组和健康对照组相比,GD的难治性与调节性T细胞(Treg)/CD4+T的降低、Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值显著增高有关;并且,难治性GD患者血浆中Th17和Treg细胞相关细胞因子IL-17A、IL-6、TGF- β 1、IL-1 β 以及IL-10的表达水平显著高于健康对照。目前,临床上针对难治性Graves病的治疗方案相对局限,而长期的药物治疗给这些患者的生活和经济带来了巨大的负担。因此,针对难治性Graves病的新的治疗方法的探索十分重要。

[0003] 雷帕霉素靶向受体(mammalian target of rapamycin,mTOR)是一种在进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,可在糖皮质激素、营养物质(葡萄糖、脂肪酸等)和各种应激原作用下被激活并参与调控T细胞生长、增殖和分化。在哺乳动物体内,mTOR存在两种蛋白复合体即mTORC1和mTORC2;其中,mTORC1主要参与Th1和Th17细胞分化,而mTORC1和mTORC2均抑制了CD4+CD25+Foxp3+Treg细胞的分化。因而,针对mTOR的作用机制,可利用其抑制剂,阻断mTOR。而雷帕霉素可竞争性抑制mTOR,是mTORC1/mTORC2双重抑制剂,可以改善体内Th17/Treg比例;其对T细胞的激活效应的抑制作用被应用于治疗自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮、幼年特发性关节炎。

[0004] 然而,雷帕霉素在难治性Graves病的治疗应用并未见报道。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供雷帕霉素在难治性Graves病中的制药应用。

[0006] 为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案予以实现:

[0007] 本发明公开了雷帕霉素在制备治疗难治性Graves病的药物中的应用。

[0008] 本发明公开了雷帕霉素联合甲巯咪唑在制备治疗难治性Graves病的药物中的应用。

[0009] 优选地,所述的药物为改善难治性Graves病的抗促甲状腺激素受体抗体水平的药物。

[0010] 优选地,所述的药物为改善难治性Graves病的Treg/CD4+T比例、Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值的药物。

[0011] 优选地,所述的药物为改善难治性Graves病的血浆IL-17A、IL-6以及TGF- β 1细胞因子水平的药物。

[0012] 优选地,雷帕霉素的给药量为0.5mg/天;谷浓度为为2~4ng/mL。

[0013] 本发明还公开了一种用于治疗难治性Graves病的药物,该药物由雷帕霉素添加药用辅料制成制剂,制成的制剂中含有0.5mg的雷帕霉素。

[0014] 本发明还公开了一种用于治疗难治性Graves病的药物,该药物由雷帕霉素和甲巯咪唑添加药用辅料制成制剂,制成的制剂中含有0.5mg的雷帕霉素。

[0015] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0016] 本发明提出了雷帕霉素在治疗难治性GD的制药新用途,难治性甲亢的发病与Treg/CD4+T的降低、Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值显著增高有关;mTOR参与了Th17与Treg细胞的分化过程。而其抑制剂雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗可以改善难治性GD患者的TSH、TRAb水平;并且,患者体内的Treg/CD4+T比例升高,Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值均降低;同时,Th17与Treg细胞相关细胞因子,包括IL-17A、IL-6以及TGF- β 1的血浆水平均被明显改善。雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组无明显不良反应。本发明的实验结果充分支持雷帕霉素在治疗难治性GD的新应用。所述雷帕霉素的难治性GD给药量为5mg/天,药物谷浓度为2~4ng/mL。

附图说明

[0017] 图1为难治性GD、缓解期GD、健康对照组受试者年龄、性别组成柱状图;

[0018] 图2a为难治性GD、缓解期GD、健康对照组受试者外周血Th17/CD4+T比例流式结果图;

[0019] 图2b为难治性GD、缓解期GD、健康对照组受试者外周血Treg/CD4+T比例流式结果图;

[0020] 图2c为难治性GD、缓解期GD、健康对照组受试者外周血Th17/CD4+T、Treg/CD4+T、Th17/Treg比例柱状图;

[0021] 图3为难治性GD、健康对照组受试者血浆细胞因子水平结果图;其中,(a)~(g)分别为IL-17A、IL-6、TGF- β 1、IL-1 β 、IL-10、IL-23、TNF- α 水平结果比较图;

[0022] 图4单纯甲巯咪唑治疗组和雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组基线资料分析结果图;其中,(a)~(h)分别为单纯甲巯咪唑治疗组和雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组的年龄、性别、甲巯咪唑用量、疾病持续时间、抗甲状腺激素受体抗体(TRAb)滴度、Th17/CD4+T比例、Treg/CD4+T比例、Th17/Treg比例柱状图;

[0023] 图5两组干预前后TSH指标的变化结果;其中,(a)为TSH升高的患者比例;(b)为TSH恢复正常范围的患者比例;

[0024] 图6两组干预前后血浆TRAb滴度的变化结果;其中,(a)为RAPA+MMI联合治疗组;(b)为单纯MMI治疗组;

[0025] 图7两组干预前后外周血中Th17、Treg细胞比例的变化结果;其中,(a)为CD3+CD8-IL-17A+Th17细胞;(b)为CD4+CD25+Foxp3+Treg细胞;

[0026] 图8两组干预前后血浆相关细胞因子水平的变化结果图;其中,(a)~(f)分别为Th17/CD4+T比例、Treg/CD4+T比例、Th17/Treg比例在单纯甲巯咪唑治疗组和雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组治疗前后比较图;

[0027] 图9为两组干预前后血浆相关细胞因子水平的变化结果图;其中,(a)~(f)分别为IL-17A、IL-6、TGF- β 1水平在单纯甲巯咪唑治疗组和雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组治疗前

后比较图。

具体实施方式

[0028] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明方案,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分的实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

[0029] 需要说明的是,本发明的说明书和权利要求书及上述附图中的术语“第一”、“第二”等是用于区别类似的对象,而不必用于描述特定的顺序或先后次序。应该理解这样使用的数据在适当情况下可以互换,以便这里描述的本发明的实施例能够以除了在这里图示或描述的那些以外的顺序实施。此外,术语“包括”和“具有”以及他们的任何变形,意图在于覆盖不排他的包含,例如,包含了一系列步骤或单元的过程、方法、系统、产品或设备不必限于清楚地列出的那些步骤或单元,而是可包括没有清楚地列出的或对于这些过程、方法、产品或设备固有的其它步骤或单元。

[0030] 下面结合附图对本发明做进一步详细描述:

[0031] 1、难治性GD发病机制探索

[0032] 1.1难治性GD、缓解期GD、健康对照组患者招募

[0033] 共招募难治性GD患者27例,缓解期GD患者25例,健康对照27例,三组在年龄和性别构成方面均无统计学差异,结果如图1所示,图1中(a)为年龄;(b)为性别。

[0034] 难治性GD、缓解期GD的纳入标准:(1)诊断为GD;(2)服用抗甲状腺药物5年以上或停止服用抗甲状腺药物两年以上且甲功正常(3)年龄在18~60岁之间(4)本人签署知情同意书。排除标准:(1)合并其他自身免疫性疾病;(2)合并严重心、肝、肾功能不全;(3)妊娠或者哺乳期女性;(4)入组前6个月内糖皮质激素治疗史;(5)认知功能异常、无法配合相关检查。健康对照组为甲功正常且满足上述排除标准且年龄 ≥ 18 周岁。

[0035] 1.2难治性GD、缓解期GD、健康对照组外周血Th17与Treg细胞比例检测

[0036] 外周血CD4+CD25^{Foxp3}+Treg细胞占CD4+T细胞比例以及CD3+CD8-IL17A+Th17细胞占CD4+T细胞比例采用BD FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司)检测。

[0037] 结果参见图2a、图2b和图2c所示,发现难治性GD组外周血中Treg/CD4+T比例显著低于缓解期GD组和健康对照组,Th17/CD4+T比例和Th17/Treg的比值显著高于缓解期GD组和健康对照组。

[0038] 1.3难治性GD、缓解期GD、健康对照组血浆细胞因子检测

[0039] 血浆细胞因子水平通过使用应用Luminex(奥斯汀,得克萨斯州,美国)的人类高灵敏度T细胞磁珠面板和人预混多分析试剂盒(上海华恩生物科技有限公司)。血浆的TGF- β 水平使用的酶联免疫试剂盒测定(Raybiotech)。

[0040] 结果参见图3,结果发现,难治性GD患者血浆中IL-17A、IL-6、TGF- β 1、IL-1 β 以及IL-10的表达水平显著高于健康对照;但IL-23和TNF- α 在两组的表达没有统计学差异。

[0041] 2、雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗在难治性GD患者的作用

[0042] 2.1难治性GD患者分组

[0043] 在征询难治性GD患者本人同意后,将病人分为两组,分别为雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗和单纯甲巯咪唑治疗组。每组各有12名患者。只有1例雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗的患者为临床甲亢,其余患者均为亚临床甲亢,并且连续两次以上复查TSH $<0.07\mu\text{IU/mL}$ 。其余参数,包括年龄、性别、服用甲巯咪唑剂量、服用甲巯咪唑时间、TRAb值、外周血中Th17/CD4+T比例显著、Treg/CD4+T比例显著、Th17/Treg比值均未明显差异(结果参见图4)。雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组在患者原甲巯咪唑服用剂量的基础上给予雷帕霉素0.5mg/天,维持患者体内雷帕霉素药物谷浓度在2~4ng/mL(谷浓度即指给药期间的最低浓度);单纯甲巯咪唑治疗组继续维持原甲巯咪唑服用剂量。

[0044] 2.2两组干预前后TSH指标的变化检测

[0045] 干预结束时、干预结束后3月及6月时,对两组患者的TSH水平分别进行检测。血清TSH值用放免法检测,TSH,参考范围0.25-5 $\mu\text{IU/mL}$ 。

[0046] 参见图5,结果发现,干预结束时、干预结束后3月及6月随访时,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组中TSH升高的患者比例和TSH恢复正常范围的患者比例均高于单纯甲巯咪唑治疗组。2.3两组干预前后TRAb指标的变化检测

[0047] 干预结束时、干预结束后3月及6月时,对两组患者的TRAb水平分别进行检测。TRAb水平的测量使用ElisaRSRTM TRAB第二代试剂盒(RSR Limited,United),阳性值设定为9.31U/L。

[0048] 结果参见图6,(a)为RAPA+MMI联合治疗组;(b)为单纯MMI治疗组;结果发现,干预结束时,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组血浆中TRAb滴度较干预前显著降低,而单纯甲巯咪唑治疗组TRAb滴度的变化没有统计学意义。2.4两组干预前后外周血Th17与Treg细胞比例检测

[0049] 干预结束时、干预结束后3月及6月时,对两组患者的外周血Th17与Treg细胞比例检测。外周血CD4+CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞占CD4+T细胞比例以及CD3⁺CD8⁻IL17A⁺Th17细胞占CD4+T细胞比例采用BD FACSCanto II流式细胞仪(美国BD公司)检测。

[0050] 参见图7,其中,(a)为CD3⁺CD8⁻IL-17A⁺Th17细胞;(b)为CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞,结果发现,干预结束时,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组外周血中Th17/CD4+T比例显著降低、Treg/CD4+T比例显著增高,Th17/Treg比值显著降低,而单纯甲巯咪唑治疗组以上指标的变化均无统计学意义。

[0051] 2.5两组干预前后血浆细胞因子检测

[0052] 干预结束时、干预结束后3月及6月时,对两组患者的血浆Th17和Treg相关细胞因子记性检测。血浆细胞因子水平通过使用应用Luminex(奥斯汀,得克萨斯州,美国)的人类高灵敏度T细胞磁珠面板和干预混多分析试剂盒(上海华恩生物科技有限公司)。血浆的TGF- β 水平使用的酶联免疫试剂盒测定(Raybiotech)。

[0053] 参见图8和图9,结果发现,干预结束时,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组血浆中IL-17A、IL-6以及TGF- β 1表达水平显著降低,IL-1 β 、IL-10、IL-23和TNF- α 等细胞因子水平的变化没有统计学意义,单纯甲巯咪唑治疗组血浆中以上细胞因子表达水平的变化均无统计学意义。

[0054] 2.6雷帕霉素血药浓度及安全性分析

[0055] 干预一周后,对雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组患者进行全血雷帕霉素谷浓度进

行测定。干预结束时、干预结束后3月及6月时,对雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组进行随访,了解是否有不良反应。随访内容包括血脂水平、血常规检测等。结果如下表1所示:

[0056] 表1

编号	年龄	性别	病程 (y)	入组时 MMI 剂量 (mg/d)	RAPA 剂量 (mg/d)	全血 RAPA 谷浓度 (ng/mL)	不良反应
1	26	女	9	5	0.5	2.95	无
2	30	女	7	10	0.5	2.23	WBC 降低至 2.51×10 ⁹ /L, 口腔溃疡
3	44	女	5.5	10	0.5	3.22	LDL-C 轻度升高至 3.14mmol/L
4	33	女	10	15	0.5	3.11	无
5	26	女	8	15	0.5	2.52	无
6	50	女	6	10	0.5	2.85	无
7	39	男	9	10	0.5	2.17	TG 轻微升高至 1.66mmol/L
8	36	女	8	2.5	0.5	3.02	无
9	52	女	14	10	0.5	2.56	无
10	44	女	12	5	0.5	2.80	无
11	42	女	5	12.5	0.5	3.77	无
12	47	男	12	10	0.5	2.91	无

[0058] 综上所述,本发明首次公开了雷帕霉素治疗难治性GD的制药应用,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗可以改善难治性GD患者的TSH、TRAb水平;并且,患者体内的Treg/CD4+T比例升高,Th17/CD4+T比例以及Th17/Treg的比值均降低;同时,Th17与Treg细胞相关细胞因子,包括IL-17A、IL-6以及TGF-β1的血浆水平均被明显改善。雷帕霉素的难治性GD给药量为5mg/天,药物谷浓度为2~4ng/mL。雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗组无明显不良反应。因此,本发明的实验结果充分支持雷帕霉素在治疗难治性GD的新应用,雷帕霉素+甲巯咪唑联合治疗是值得探索的难治性GD治疗新方向。

[0059] 以上内容仅为说明本发明的技术思想,不能以此限定本发明的保护范围,凡是按照本发明提出的技术思想,在技术方案基础上所做的任何改动,均落入本发明权利要求书

的保护范围之内。

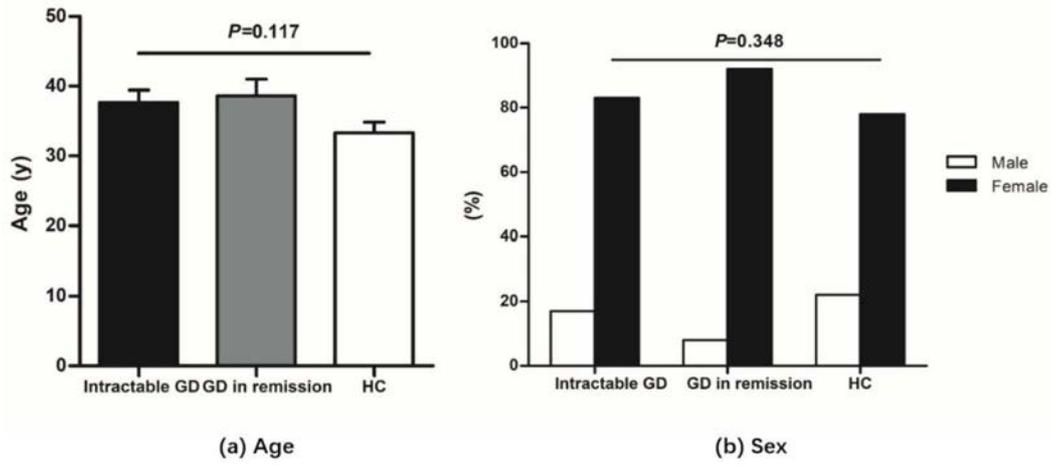


图1

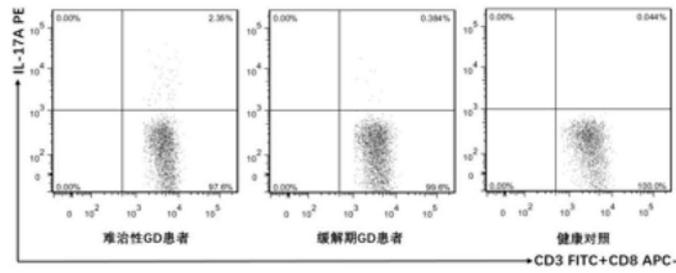


图2a

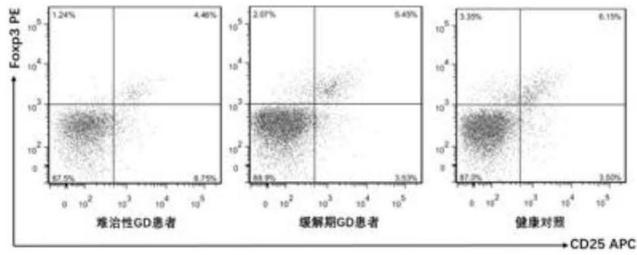


图2b

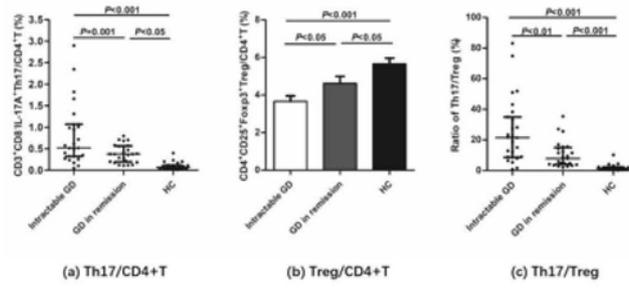


图2c

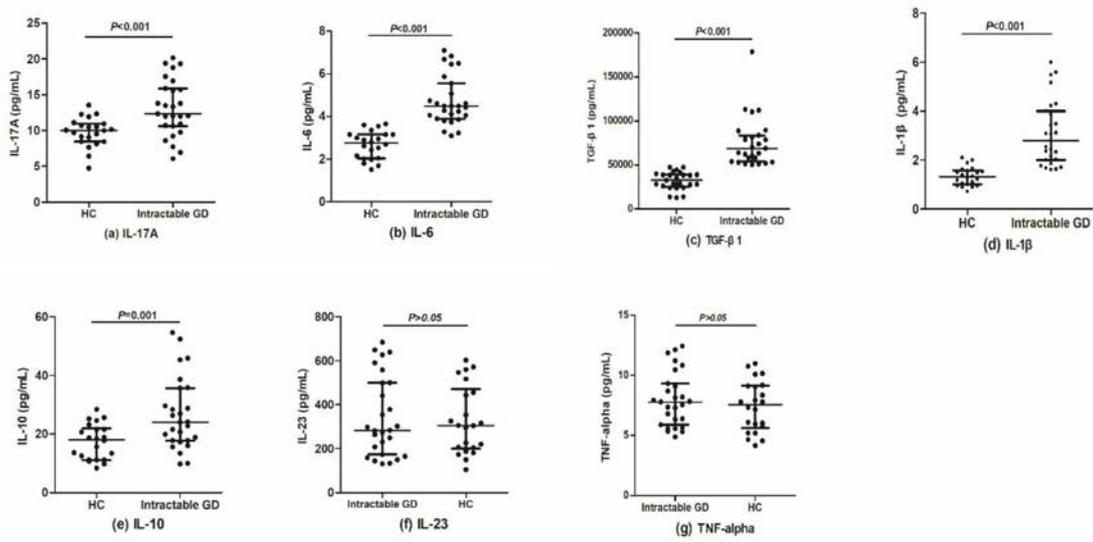


图3

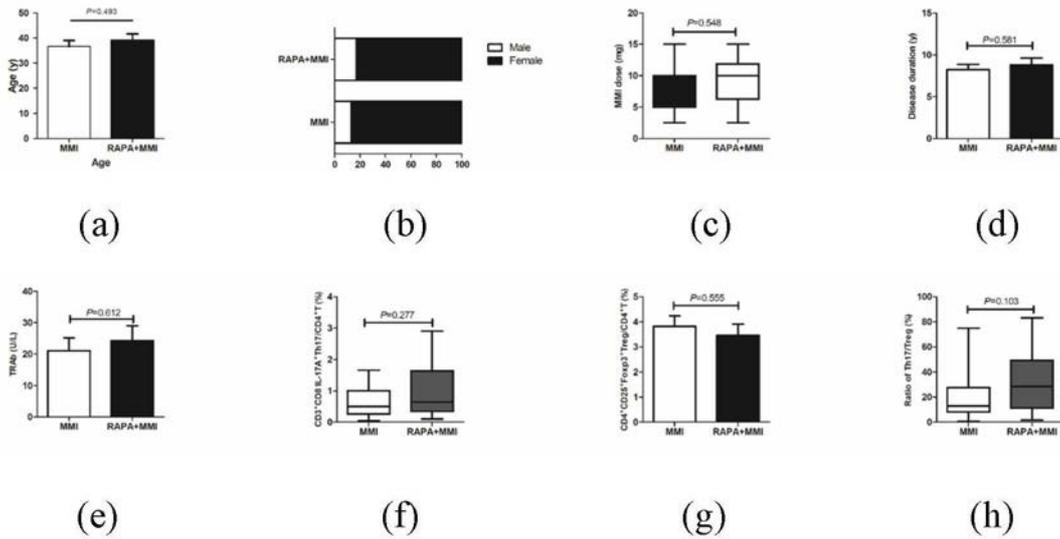


图4

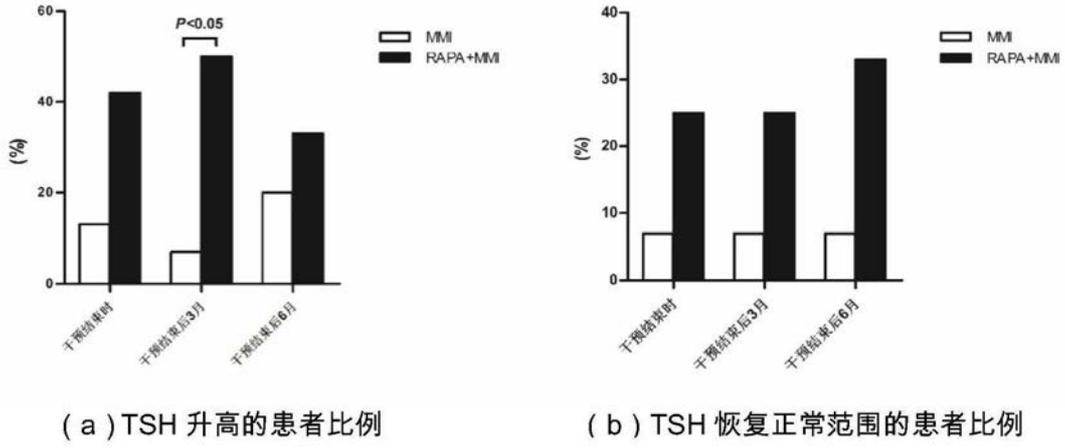


图5

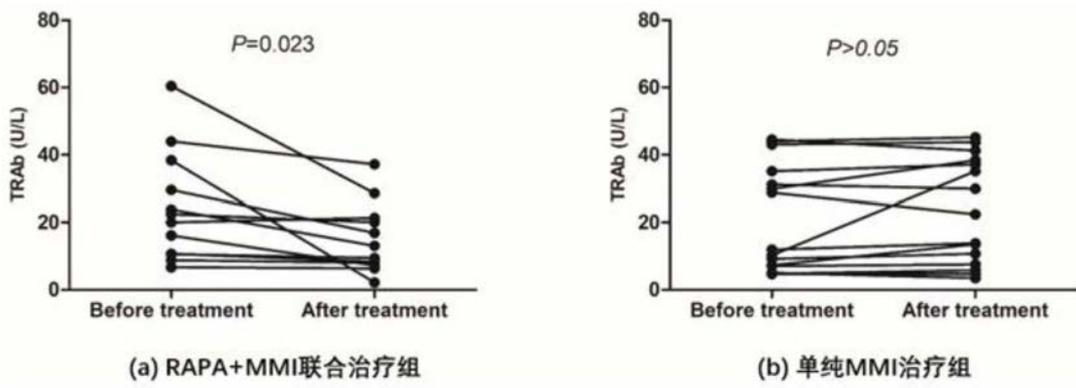


图6

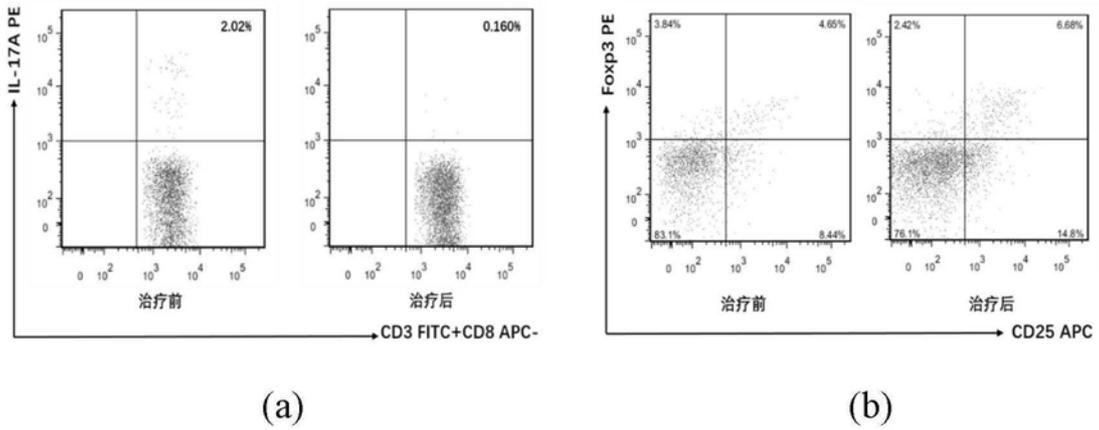


图7

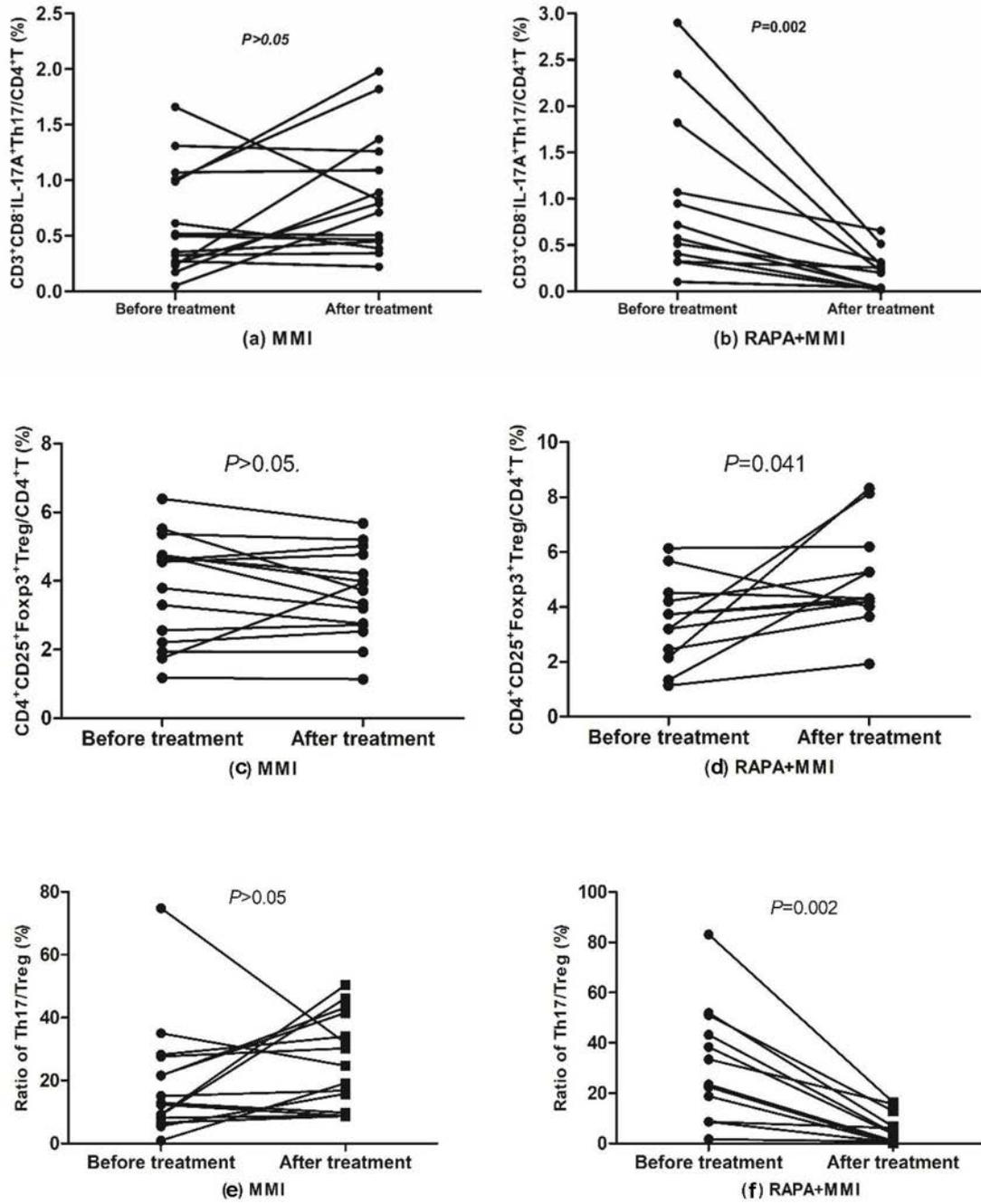


图8

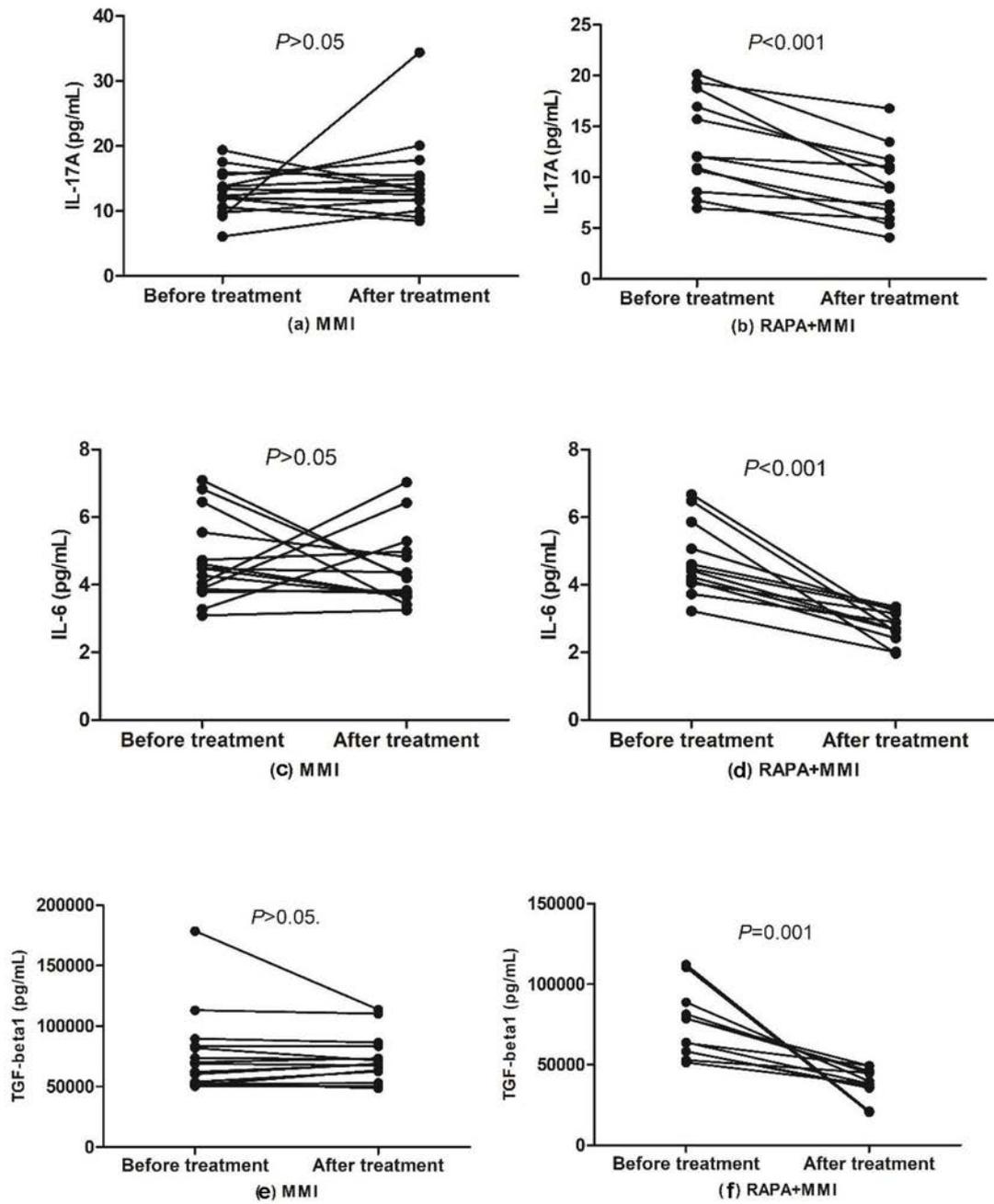


图9