

肺动脉高压治疗新方法——内皮素受体 A 治疗性疫苗

周子华

基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号:81770366,81470494)

作者单位：430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科

作者简介：周子华(1974-),男,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:治疗性疫苗。E-mail: zzhua2001@163.com



周子华,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师,华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科副主任。担任国际心脏研究会和中国病理生理学会中国转化医学工作委员会委员,中国医师协会高血压专业委员会高血压相关代谢工作委员会委员,中华医学会心血管分会肿瘤心脏病学学组委员,武汉市医学会心血管专业委员会高血压学组委员,武汉中西医结合学会心血管专业委员会常务委员,《临床心血管病杂志》常务编委。长期从事心血管方向治疗性疫苗研究。主持国家自然科学基金项目4项,参与国家重大新药创制、973项目、国家自然科学基金重大研究计划等项目;入选武汉市中青年医学骨干人才培养工程;研究成果获中华医学科技奖二

等奖、湖北省科技进步奖一等奖各1项;并以通讯作者在 *JACC*、*Circulation*、*Hypertension*、*Journal of Hypertension*、*Cardiovascular Research* 等杂志发表了一系列原创性成果。

【摘要】 肺动脉高压(PAH)是一种慢性致死性疾病,现有针对PAH的药物虽有一定的治疗效果,但其预后仍不尽人意,需要探索新的治疗方法。治疗性疫苗是治疗PAH的新方法。内皮素(ET)系统,尤其是ET-1和内皮素受体A(ETAR)的异常激活与PAH的发病机制密切相关,ETAR是PAH治疗性疫苗的理想靶点。我们最近成功研发出一种以ETAR为靶点的PAH治疗性疫苗ETRQ β -002。该疫苗能显著降低两种PAH动物模型的肺动脉压,改善甚至逆转肺小动脉重构和右心室肥厚,且没有发现明显的靶器官免疫损害和肝肾功能异常,说明ETRQ β -002是一种能有效并且安全地治疗PAH的治疗性疫苗。

【关键词】 肺动脉高压; 内皮素; 内皮素受体A; 治疗性疫苗

【中图分类号】 R 544.1⁺6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1674-3806(2020)09-0859-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2020.09.03

A new method for treatment of pulmonary arterial hypertension—a therapeutic vaccine targeting endothelin A receptor ZHOU Zi-hua. Department of Cardiology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Pulmonary arterial hypertension(PAH) is a chronic and fatal disease. Although the existing agents for PAH have certain therapeutic effects, their prognoses are still unsatisfactory, and new treatment methods need to be explored. Therapeutic vaccines offer a novel approach to treating PAH. The abnormal activation of endothelin(ET) system, especially ET-1 and endothelin A receptor(ETAR) is closely related to the pathogenesis of PAH, and ETAR is an ideal target of PAH therapeutic vaccine. Recently, we have successfully developed ETRQ β -002, a PAH therapeutic vaccine targeting ETAR, which can significantly reduce pulmonary artery pressure in two types of PAH-model animals, and improve or even reverse the remodeling of pulmonary arterioles and right ventricular hypertrophy, and no obvious target organ immune damage and abnormal liver and kidney function are found, indicating that ETRQ β -002 is an effective and safe therapeutic vaccine for PAH.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension(PAH); Endothelin(ET); Endothelin A receptor(ETAR); Therapeutic vaccine

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是严重危害人类健康的世界性问题。PAH是一种以肺动脉平滑肌增殖和肺血管阻力进行性升高为主要特征,进而导致肺动脉压力升高及右心衰竭的进展性、致死性疾病^[1]。PAH患病率为15~60/10⁶,虽罕见但预后极差,在缺乏靶向药物的时代,我国特发性和家族性PAH的3年生存率、5年生存率分别为38.9%、20.8%;2007年以后我国逐步进入靶向药物时代,PAH患者生存率有所提高,但2011年我国特发性PAH的3年生存率仍仅为75.1%^[2],预后甚至不如某些恶性肿瘤。并且,因靶向药物价格昂贵,对于家庭经济困难的患者来说,是一种巨大的经济负担,使患者无法坚持长期治疗而获益。因此,积极寻找治疗PAH的新型药物及治疗方法具有重大社会及经济意义。

1 治疗性疫苗是治疗PAH的新方法

治疗性疫苗是近来出现的治疗慢性病的一种新的治疗策略^[3],为PAH的治疗提供了新思路。与预防性疫苗不同,治疗性疫苗主要针对自身抗原或免疫耐受外来抗原,带有耦联自身抗原的载体进入体内后,通过一系列免疫应答,突破自身免疫耐受,诱导机体产生针对与之结合抗原的抗体,从而发挥治疗效应^[4]。与传统的化学药物相比,治疗性疫苗具有生物靶向目标精确(靶点特异性高),作用持久(1~3个月免疫一次可维持数月效果,不需要天天给药),依从性高及费用更低的优点。国际上已有前列腺癌治疗性疫苗普列威(provenge)成功上市,其他系列慢性疾病治疗性疫苗包括高血压^[5,6]、糖尿病^[7]、高血脂^[8]、血栓^[9]、阿尔茨海默病^[10]、肿瘤疫苗^[11]等也在如火如荼研究中,但未见PAH疫苗的相关研究报道。基于病毒样颗粒(virus-like particles, VLP)载体和短肽表位筛选平台,本团队先前已经研发出针对血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensin Ⅱ type 1 receptor, AT1R)的降压疫苗(ATRQβ-001)及针对前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)的降脂疫苗(PCSK9Qβ-003),实验证实ATRQβ-001疫苗可显著降低高血压模型动物血压及保护靶器官,而PCSK9Qβ-003疫苗显著降低高脂血症模型小鼠的血脂,颇具临床应用前景,目前正在进行积极转化^[12,13]。这些工作为我们PAH疫苗的研发提供了坚实的基础。

2 PAH治疗性疫苗的研发

2.1 内皮素系统与PAH 内皮素系统异常激活是PAH发生发展的重要机制之一^[14]。内皮素1(endothelin 1, ET-1)是目前作用最强的缩血管因子,主要在血管内皮细

胞产生,也可由其他类型的细胞分泌,如血管平滑肌细胞、肾小球上皮细胞、系膜细胞、肾小管和肾髓质集合管细胞等^[15]。ET-1主要与内皮素受体A(endothelin A receptor, ETAR)、内皮素受体B(endothelin B receptor, ETBR)结合发挥效应。ETAR主要分布于肺血管平滑肌细胞,ETBR主要存在于肺内皮细胞和平滑肌细胞,ET-1与平滑肌细胞的ETAR、ETBR结合后产生血管收缩、细胞增殖等效应,而与内皮细胞ETBR结合后可促进ET-1的清除,刺激一氧化氮(nitric oxide, NO)和前列腺素等舒张血管因子的释放,减少细胞凋亡,抑制内皮依赖的血管收缩反应^[16]。ETAR拮抗剂是PAH目前最有效的治疗药物之一,ETAR是PAH治疗性疫苗的理想靶点。指南所推荐的内皮素受体拮抗剂包括选择性ETAR拮抗剂(安立生坦)和非选择性ETAR、ETBR拮抗剂(波生坦、马昔腾坦),多个临床试验已证实内皮素受体拮抗剂可改善患者的临床症状、功能状态和整体生活质量^[17~19]。然而,现有内皮素受体拮抗剂在改善PAH的同时也存在诸多问题,包括:(1)价格昂贵;(2)半衰期短,需每日给药或一日数次给药;(3)肝功能损害;(4)降低循环血压,恶化循环血流动力学状态。这些副作用可能限制了内皮素受体拮抗剂在部分PAH患者中的使用。鉴于此,近年来我们一直致力于PAH疫苗方面的研究,希望能研发出一种以ETAR为靶点的治疗性PAH疫苗,能方便、经济、长效且安全地降低肺动脉压,以改善PAH患者的生活质量和提高生存率。

2.2 PAH疫苗ETRQβ-002的诞生 ETAR属于G蛋白偶联受体家族,由427个氨基酸组成,其序列在人、大鼠和小鼠中高度同源。ETAR基本结构包括细胞外N端、7个跨膜结构域(transmembrane domain, TMD)、3个胞外环、3个胞内环以及细胞内C端,研究证实其胞外第二环(the second extracellular loop, ECL2)在受体的活化中起了至关重要的作用,所以该位置成为了设计针对ETAR的治疗性PAH疫苗的理想靶点^[20,21]。根据ETAR胞外结构氨基酸的亲水性、抗原性、可塑性和可及性等特性,用生物信息技术设计出若干条氨基酸线性结构短肽,并经大量的实验验证和数据比对后,我们最终选择了ETAR胞外第二环上一段长度为10个氨基酸的短肽(ETR-002)作为PAH治疗性疫苗的靶点。短肽免疫原性较弱,不能打破免疫耐受诱导机体发生体液免疫反应产生相应抗体,因此需要选择合适的载体组成全抗原,而具有高度重复抗原表位的VLP是一

类理想的疫苗载体^[22]。我们将人工合成的 ETR-002 肽段与本团队先前自主研制成功的 Q β 噬菌体 VLP 载体用异双功能交联剂 (Sulfo-SMCC) 耦联, 制备成 PAH 治疗性疫苗 (ETRQ β -002)。除疫苗外, 我们还研发出了针对 ETAR 的特异性单克隆抗体 (A1C5)。

2.3 ETRQ β -002 疫苗治疗 PAH 的有效性 我们分别于在体和离体验证 ETRQ β -002 疫苗和单克隆抗体 (A1C5) 的有效性。细胞实验的结果表明, A1C5 能与肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs) 和稳定表达 ETAR 的 CHO 细胞 (CHO-ETAR) 上的 ETAR 特异性结合; 且与 ETBR 不存在交叉反应性, 说明 A1C5 的特异性较好。此外, A1C5 不仅能阻断 ET-1 诱导的细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 磷酸化, 还能减少转化生长因子 β 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1)、I 型胶原 (collagen type I, Col I)、腱糖蛋白 C (tenascin-C, TN-C)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 等纤维化因子表达, 减少细胞增殖因子 S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase-associated protein 2, Skp2) 并增加细胞周期的负性调控因子 P27 蛋白的表达。动物实验中, 我们在野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的 PAH 大鼠和血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 抑制剂 SU5416 联合低氧诱导的 PAH 小鼠两种动物模型上验证疫苗和单抗的治疗效果。将 ETRQ β -002 和 A1C5 分别以皮下多点免疫和尾静脉注射的方式应用于 PAH 动物模型。结果显示, ETRQ β -002 有很好的免疫原性, 能强烈刺激两种 PAH 动物模型发生体液免疫反应并产生相应特异性抗体。血流动力学和病理结果证实, ETRQ β -002 可显著降低 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠肺动脉压 20 mmHg, 降低 SU5416 及低氧诱导的 PAH 模型小鼠肺动脉压 10 mmHg, 且显著抑制肺小动脉重构和右心室肥厚。与疫苗结果类似, A1C5 也具有明显的改善 PAH 及抑制肺动脉和右心室病理性重构的作用。

2.4 ETRQ β -002 疫苗治疗 PAH 的安全性 在开发任何疫苗时, 安全性都至关重要, 对于 ETRQ β -002 同样如此。ETRQ β -002 疫苗是一种抗肽疫苗, 其安全性包括 ETR-002 肽的安全性和 Q β VLP 载体的安全性。决定疫苗安全性的三个关键因素主要在于: (1) 是否会引发针对自身抗原的细胞毒性 T 细胞 (Tc) 活化; (2) 抗体反应的可逆性; (3) 抗体依赖细胞介导的细胞毒性 (antibody-dependent cell mediated cytotoxicity, ADCC) 和补体介导的细胞毒性。首先, ETRQ β -002

疫苗的研发原理是将自身抗原表位 (ETR-002) 与外来 T 细胞表位 (VLP 载体) 结合, 在这种情况下, 抗原呈递细胞 (antigen-presenting cells, APCs) 吞噬抗原 (ETR-002)-载体 (VLP) 结合物, 并通过主要的组织相容性复合物 (major histocompatibility complex, MHC) 向 T 细胞呈递 VLP 的 T 细胞表位, T 细胞通过 T 细胞受体识别表位并被激活。特异性识别靶抗原 (ETR-002 肽段) 的 B 细胞分化为浆细胞, 并在辅助 T 细胞 (Th) 的帮助下增殖并产生结合自身抗原 (ETAR), 阻断功能抗体。另外, 单独的 ETR-002 肽长度只有 10 个氨基酸, 要短于 T 细胞可识别的最小表位, 因此 Tc 不大可能被 ETR-002 激活然后攻击表达 ETAR 的自身细胞进而造成自身免疫损伤。其次, 我们所有的肽-VLP 疫苗 (ATRQ β -001、ETRQ β -002、PCSK9Q β -003) 的抗体反应都是可逆的, 肽-VLP 疫苗的肽抗体的半衰期约为 14 d。至于 ADCC 和补体介导的细胞毒性, 其发生和调节尚存争议。在临床实践中, 许多用单克隆抗体治疗疾病的患者并未发生系统性的 ADCC, 提示 ADCC 似乎更多的是理论上的担忧而实际可能很少发生。载体的安全性也是值得关注的问题, 迄今为止, 众多以 Q β VLP 作为载体的抗肽疫苗 (CYT-006-AngQ β 高血压疫苗^[6]、IL-1 β -VLP 疫苗^[23]、Der P 1 肽-VLP 疫苗^[24]、尼古丁-VLP 疫苗^[25]) 的临床研究或临床前研究的结果均显示出良好的安全性。更重要的是, 我们的安全性实验结果也证实 ETRQ β -002 不引起重要靶器官免疫损害和肾脏基底膜免疫复合物的沉积, 不损害肝肾功能, 也不影响正常血压动物及 PAH 模型动物的循环血压, 初步验证了 ETRQ β -002 的安全性。

3 结语

总之, 经过多年的努力, 我们成功研发出国际上首个以人 ETAR 为靶点的 PAH 治疗性疫苗 (ETRQ β -002) 及相应单克隆抗体 (A1C5)^[26], 并在 PAH 动物模型上验证了其有效性和安全性, 极富临床转化价值, 未来可能会成为治疗 PAH 的一种新颖且充满希望的治疗策略。目前 ETRQ β -002 疫苗仍处于临床前研究阶段, 如想将其应用于临床, 还有很长的一段路要走。

参考文献

- 1 Galie N, Humbert M, Vachiery JL, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS); endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society

for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. Eur Respir J, 2015, 46(4):903 - 975.

2 中华医学会心血管病学分会肺血管病学组,中华心血管病杂志编辑委员会. 中国肺高血压诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志, 2018,46(12):933 - 964.

3 Bachmann MF, Dyer MR. Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight[J]. Nat Rev Drug Discov,2004, 3(1):81 - 88.

4 Zhu F, Zhou Z, Liao Y. The renin-angiotensin system and therapeutic vaccines for hypertension[J]. Curr Opin Investig Drugs,2008, 9(3):286 - 294.

5 Ambühl PM, Tissot AC, Fulurija A, et al. A vaccine for hypertension based on virus-like particles: preclinical efficacy and phase I safety and immunogenicity[J]. J Hypertens,2007,25(1):63 - 72.

6 Tissot AC, Maurer P, Nussberger J, et al. Effect of immunisation against angiotensin II with CYT006-AngQb on ambulatory blood pressure: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase II a study [J]. Lancet,2008, 371(9615):821 - 827.

7 Pang Z, Higuchi M, Koriyama H, et al. Evaluating the potential of the GFAP-KLH immune-tolerizing vaccine for type 1 diabetes in mice [J]. FEBS Lett,2017,591(1):129 - 136.

8 Kawakami R, Nozato Y, Nakagami H, et al. Development of vaccine for dyslipidemia targeted to a proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) epitope in mice [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0191895.

9 Kawano T, Shimamura M, Nakagami H, et al. Therapeutic vaccine against S100A9(S100 calcium-binding protein A9) inhibits thrombosis without increasing the risk of bleeding in ischemic stroke in mice [J]. Hypertension,2018, 72(6):1355 - 1364.

10 Novak P, Schmidt R, Kontsejkova E, et al. FUNDAMANT: an interventional 72-week phase I follow-up study of AADvac1, an active immunotherapy against tau protein pathology in Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Res Ther,2018,10(1):108.

11 Hu Z, Ott PA, Wu CJ. Towards personalized, tumour-specific, therapeutic vaccines for cancer [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18(3):168 - 182.

12 Chen X, Qiu Z, Yang S, et al. Effectiveness and safety of a therapeutic vaccine against angiotensin II receptor type I in hypertensive animals [J]. Hypertension,2013,61(2):408 - 416.

13 Pan Y, Zhou Y, Wu H, et al. A therapeutic peptide vaccine against PCSK9 [J]. Sci Rep,2017, 7(1):12534.

14 Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension [J]. N Engl J Med,1993,328(24):1732 - 1739.

15 龚智峰,叶 琨. 内皮素系统及其拮抗剂与慢性肾脏病的研究进展 [J]. 中国临床新医学,2009, 2(11):1212 - 1214.

16 Galie N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(2):227 - 237.

17 Galie N, Rubin L, Hoepfer M, et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial [J]. Lancet, 2008,371(9630):2093 - 2100.

18 Pulido T, Adzerikho I, Channick RN, et al. Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension [J]. N Engl J Med, 2013,369(9):809 - 818.

19 Galie N, Olschewski H, Oudiz RJ, et al. Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2 [J]. Circulation,2008,117(23):3010 - 3019.

20 Lättig J, Oksche A, Beyersmann M, et al. Structural determinants for selective recognition of peptide ligands for endothelin receptor subtypes ETA and ETB [J]. J Pept Sci,2009,15(7):479 - 491.

21 Aubin J, Létourneau M, Francoeur E, et al. Identification of ETA and ETB binding domains using ET-derived photoprobes [J]. Biochimie, 2008, 90(6):918 - 929.

22 Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines [J]. Biol Chem,2008,389(5):521 - 536.

23 Spohn G, Schori C, Keller I, et al. Preclinical efficacy and safety of an anti-IL-1β vaccine for the treatment of type 2 diabetes [J]. Mol Ther Methods Clin Dev,2014,1:14048.

24 Kündig TM, Senti G, Schnetzler G, et al. Der p 1 peptide on virus-like particles is safe and highly immunogenic in healthy adults [J]. J Allergy Clin Immunol,2006,117(6):1470 - 1476.

25 Maurer P, Jennings GT, Willers J, et al. A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and Phase I safety and immunogenicity [J]. Eur J Immunol,2005,35(7):2031 - 2040.

26 Dai Y, Chen X, Song X, et al. Immunotherapy of endothelin-1 receptor type A for pulmonary arterial hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2019,73(20):2567 - 2580.

[收稿日期 2020 - 08 - 04] [本文编辑 吕文娟 余 军]

本文引用格式

周子华. 肺动脉高压治疗新方法——内皮素受体 A 治疗性疫苗 [J]. 中国临床新医学,2020,13(9):859 - 862.