(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 30 日 (30.12.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/259294 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 38/25 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/095495

(22) 国际申请日: 2020 年 6 月 11 日 (11.06.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910572005.4 2019年6月24日 (24.06.2019) CN

(71) 申请人: 浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(72) 发明人: 余红 (YU, Hong); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。
项平平 (XIANG, Pingping); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。 沙利·安德鲁·V (SCHALLY, Andrew V); 中国浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号, Zhejiang 310058 (CN)。

(74) 代理人: 杭州杭诚专利事务所有限公司 (HANGZHOU HANGCHENG PATENT ATTORNEY OFFICE CO., LTD.); 中国浙江省杭州市上城区西湖大道35号万新大厦1号楼505, Zhejiang 310009 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) **Title:** USE OF GROWTH-PROMOTING HORMONE RELEASING HORMONE AGONIST GHRH-A IN PREPARING ANTI-AGING MEDICAMENT

(54) **发明名称**: 促生长激素释放激素激动剂GHRH-A在制备抗衰老药物中的用途

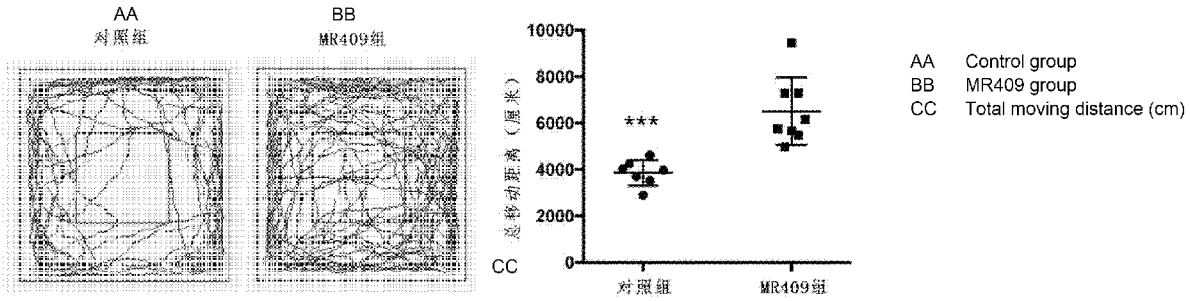


图1

(57) **Abstract:** Disclosed by the present invention is the use of a growth-promoting hormone releasing hormone agonist GHRH-A in preparing an anti-aging medicament. GHRH-A is capable of resisting aging, comprising reducing the positive rate of senescence marker β-gal staining, reducing the expression of a related protein p21 in the cell cycle of senescent cells, and reducing ROS production; in addition, GHRH-A is capable of improving the mitochondrial morphology and function of senescent cells, increasing the expression of mitochondrial protein OPA1 and the ratio of long form to short form L/S-OPA1 thereof, and improving cardiac functions, that is, improving systolic and diastolic functions of the heart; at the same time, GHRH-A is capable of improving the body's immune cell ratio and immunity, increasing the number of stem cells, increasing the motor abilities of the body, promoting hair growth, and increasing the survival rate.

(57) **摘要**: 本发明公开了一种促生长激素释放激素激动剂GHRH-A在制备抗衰老药物中的用途。其中，GHRH-A能够抗衰老，包括降低衰老标记β-gal染色阳性率，减少衰老细胞的细胞周期中相关蛋白p21的表达，减少ROS产生；而且，GHRH-A能改善衰老细胞线粒体形态和功能，提高线粒体蛋白OPA1表达及其长型对短型的比例L/S-OPA1；提高心脏功能，即改善心脏收缩和舒张功能；同时GHRH-A能够改善机体免疫细胞比例及免疫能力；增加干细胞数量；提高机体运动能力，促进毛发生长，提高生存率。

WO 2020/259294 A1

[见续页]

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国**(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 在制备抗衰老药物中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域，尤其涉及促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 在制备抗衰老药物中的用途。

背景技术

[0002] 衰老又称为老化，是一种自然而复杂的生物学过程，是所有动物的共同特征。随着年龄的增长，衰老的机体出现生理结构的退行性改变以及机能衰退，动物体从器官、组织、细胞、分子水平上均发生相应变化。心脏是一个重要的器官，受年龄影响很大。近年来人口老龄化成为重要趋势，随之而来的老年心脏变为随年龄增长的左室肥厚，舒张功能不全，房颤，以及血管内膜增厚，硬度增加。此外，研究表明，病理性肥厚，凋亡，纤维化，进展性心衰也与机体的衰老有关。

[0003] 心衰是心功能不全的一种障碍性疾病，一般表现为心肌收缩功能降低或障碍，导致心输出量降低和机体组织供氧和代谢的血液供应减少而引起心脏功能的衰竭。目前，抗心衰药物一般可分为强心苷(正性肌力药)、非强心苷如：ACE 抑制剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂 ARB、β 受体阻断剂、利尿药和钙通道阻滞剂。现有的大部分抗心衰药物对于改善病症，提高生活质量有明显的好处，但是对延长寿命和减缓衰老的影响不大。

[0004] 生长激素释放激素（GHRH）是 44 个氨基酸组成的多肽类物质。它能特异性的与垂体前叶的生长激素释放激素受体结合，从而调节生长激素的释放。生长激素释放激素激动剂（GHRH-A）是 29 个氨基酸组成的 GHRH 类似物。本发明人的合作者、美国迈阿密大学的教授 Schally 发明了 29 氨基酸的 GHRH-类似物，为激动剂 GHRH-A，和拮抗剂 GHRH-Ant。其中，激动剂 GHRH-A，在 1990 年的产品是 JI 系列， 在 2012 年后的是新的 MR 系列。在 Schally 的激动剂专利 201280070383.9 上有提及抗心力衰竭的作用。但是其只是在专利中只是简单地提及了这一作用，而并未公开具体的机理、通路以及实验数据。因此，本领域技术人员仍无法知晓其具体的机理、通路等。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题，本发明提供了一种促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 在制备抗衰老药物中的用途。

[0006] 本发明的具体技术方案为：将促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 应用于制备抗衰老

药物。具体地：

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高心脏收缩和舒张功能来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高免疫力功能、改善机体免疫反应效果来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高运动能力来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过降低细胞的衰老特性来实现抗衰老作用；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高骨髓中干细胞活性、增加干细胞数量来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过促进毛发生长来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过降低死亡率、提高生存率，延长寿命预期值，来实现抗衰老作用。

[0007] 本发明团队经过研究发现：

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过与细胞表面 GHRH 受体结合，激活 cAMP/PKA 通路，减少 OPA1 长亚基的剪切，促进线粒体融合，提高线粒体活性，增强线粒体氧化磷酸化能力，从而增加线粒体 ATP 产量和产能效率， 最终达到改善衰老小鼠心脏的收缩和舒张功能；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过增加衰老个体中总 CD3 阳性 T 细胞、CD4 阳性 T 辅助细胞和 CD20 阳性 B 细胞的数量，降低 CD8 阳性 T 抑制细胞的数量，从而提高免疫力功能、改善机体免疫反应能力；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过减少衰老细胞中细胞周期抑制蛋白 P21 的表达，减少 ROS 产生，减少衰老相关的β-Gel 染色阳性率，进而降低衰老细胞特征。

[0008] 所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高线粒体活性和能量供给，增强老年小鼠心功能，改善免疫功能，进而提高运动能力；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高干细胞活性，增强其生长繁殖能力，增加骨髓细胞集落形成数（CFU），从而增加干细胞数量。

[0009] 所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高干细胞活性、增加干细胞数量，改善毛发生长。

[0010] 所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高干细胞活性、增加干细胞数量，改善心脏功能和机体免疫反应能力，从而降低死亡率，增加小鼠生存率，提高寿命预期值。

[0011] 作为优选，所述抗衰老药物的应用对象为人或动物。

[0012] 进一步的，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 的人体使用量为每次 0.01μg/kg-1mg/k。进一步的，使用频率可以是每天 1 次或多次。

[0013] 作为优选，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 选自 JI-22，JI-25，JI27，JI-29，JI-34，JI-36，JI-38，JI-40，JI-42，MR-351，MR-356，MR-361，MR-367，MR-401，MR-403，MR-404，MR-405，MR-406，MR-407，MR-408，MR-409，MR-410，MR-420，MR-421，MR-326，MR-327，MR-502，MR-504，MR-702，CJC-1288，CJC-1293 和 CJC-1295 中的一种或多种。

[0014] 作为优选，所述抗衰老药物为注射制剂、口服制剂、贴剂或喷剂。所述抗衰老药物的剂型包括但不限于冻干粉针、注射液、片剂、丸剂、颗粒剂、硬胶囊、糖浆、软胶囊、药膏、面霜、贴剂或微针等。所述抗衰老药物的给药方式可以是皮下注射，肌肉注射，静脉注射，口服，外用、涂抹、皮肤贴剂、鼻内或肺吸入。注射、渗透、吸收、物理或化学介导的方法导入机体如肌肉、皮内、皮下、粘膜组织；或是被其他物质混合或包裹后导入机体。

[0015] 作为优选，所述抗衰老药物包括：

1）促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 和/或其在药学上可接受的盐、酯；

2）药学上可接受的载体、赋形剂、溶剂和缓冲液中的一种多种。

[0016] 与现有技术对比，本发明的有益效果是：本发明发现 GHRH-A 能够降低细胞的衰老特性，包括降低衰老标记β-gal 染色阳性率，减少衰老细胞的细胞周期中相关蛋白 p21 的表达，减少 ROS 产生。且 GHRH-A 改善衰老细胞线粒体形态和功能，提高线粒体蛋白 OPA1 表达及其长型对短型的比例 L/S-OPA1；同时 GHRH-A 能够提高运动能力，促进毛发生长，延长寿命，提高心脏功能即对心脏收缩和舒张功能均有改善。该 GHRH-A 在抗衰老药物中具有稳定性好，药物活性高的特点，适用于防治心衰，减轻衰老的全身表型。该药物具有制作简单，效果显著，副作用小的效果。

附图说明

[0017] 图 1 为小鼠的运动能力图；矿场实验图显示小鼠运动轨迹。

[0018] 图 2 为毛发生长图。

[0019] 图 3 为生存曲线图；MR409 处理的 8 只小鼠，在 22 个月时死了一只，生存率为 87.5%。对照小鼠 7 只，在 22-23 月期间死了 4 只，生存率为 42.9%。

[0020] 图 4 为小鼠体重图。

[0021] 图 5 为骨髓细胞集落生成试验结果图；MR409 处理过的小鼠骨髓来源的细胞可以形成

更多的细胞集落。

[0022] 图 6 为 GHRH-A 对老龄老年小鼠心脏结构和功能的影响图：其中，（A）小鼠左室收缩功能 M-超声示意图；（B）左室射血分数；（C）左室短轴缩短率；（D）心脏收缩末期左室后壁厚度；（E）心脏舒张末期左室后壁厚度；（F）小鼠舒张功能 PW 多普勒和组织多普勒示意图；（G）E/A（舒张早期二尖瓣口血流速度比舒张晚期二尖瓣口血流速度）；（H）E/E’(舒张早期二尖瓣口血流速度比舒张早期二尖瓣环运动幅度)；（I）Tei 指数（左室松弛常数）。

[0023] 图 7 为 GHRH-A 增强心脏中的线粒体功能图：其中，（A）小鼠心肌组织线粒体电镜示意图；（B）小鼠心肌组织线粒体动态相关蛋白表达水平；（C）小鼠心肌组织线粒体氧化磷酸化耗氧量及能量产生图。

[0024] 图 8 为 GHRH-A 使 H9C2 细胞活力免受 Dox 诱导的细胞损伤图：其中（A）经不同方式处理后的 H9C2 细胞形态图；（B）死亡细胞定量分析；（C）存活细胞定量分析。

[0025] 图 9 为 GHRH-A 保护 H9C2 免受 Dox 诱导的线粒体功能障碍图：其中，（A）Dox 诱导的 H9C2 及 GHRH-A 处理后的线粒体形态电镜图；（B）Dox 诱导的 H9C2 经 GHRH-A 处理后的线粒体氧耗水平；（C）Dox 诱导的 H9C2 经 GHRH-A 处理后的 ATP 产生；（D）Dox 诱导的 H9C2 的线粒体长亚基 L-OPA1 表达水平。

[0026] 图 10 为 GHRH-A 对细胞衰老的影响图：其中，（A）经 GHRH-A 处理后 Dox-H9C2 p21 的表达量；（B）经 GHRH-A 处理后原代乳鼠心肌细胞（NRCM）p1 代 p21 表达量；（C）经 GHRH-A 处理后脐静脉内皮细胞（HUVEC）传了 10 代后 p21 表达量；（D）HUVEC 传了 10 代后β-gal 染色。

[0027] 图 11 为 GHRH-A 对 Dox 诱导的 H9C2 细胞 ROS 产生的影响图：（A）Dox 诱导的 H9C2 及 GHRH-A 处理后 ROS 表达量；（B）Dox 诱导的 H9C2 及 GHRH-A 处理后线粒体 mitoROS 表达量；

具体实施方式

[0028] 总实施例

GHRH-A 以人 GHRH 的 1-29 位氨基酸（人 GHRH 1-44 位氨基酸）为骨架，进行特定位点氨基酸的替换或者修饰，GHRH-A 的序列如表 1 所示。其中，MR-326/327/502/502 包含 30 个氨基酸，而 MR-702 则含有 31 个氨基酸。首行中的数字代表对应的氨基酸位点，“—”表示该氨基酸位点与 hGHRH 中的相同。

[0029] 表 1：GHRH-A 的氨基酸序列

Peptide	1	2	6	8	12	15	21	27	28	29		30
hGHRH(1-29)-NH_2	Tyr	Ala	Phe	Asn	Lys	Gly	Lys	Met	Ser	Arg	—NH2	
JI-22	Dat	—	—	—	Orn	Abu	Orn	Nle	—	Agm		
JI-25	Dat	—	—	—	—	Abu	Orn	Nle	—	Agm		
JI-27	Dat	—	—	—	Orn	Abu	—	Nle	—	Agm		
JI-29	Dat	—	—	—	—	Abu	—	Nle	—	Agm		
JI-34	Dat	—	—	—	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
JI-36	Dat	—	—	Thr	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
JI-38	Dat	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
JI-40	Dat	—	—	Ser	Orn	Abu	Orn	Nle	—	Agm		
JI-42	Dat	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	—	Agm		
MR-351	Ac-Me-Tyr	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
MR-356	N-Me-Tyr	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
MR-361	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
MR-367	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Asn	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Agm		
MR-401	Dat	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	D-Arg	—NH—CH_3	
MR-403	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-404	N-Me-Tyr	D-Ala	Fpa5	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-405	N-Me-Tyr	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Ser	Arg	—NH—CH_3	
MR-406	N-Me-Tyr	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-407	Dat	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-408	Dat	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-409	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Asn	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-410	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Thr	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_3	
MR-420	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_2CH_3	
MR-421	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Asn	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg	—NH—CH_2CH_3	
MR-326	N-Me-Tyr	D-Ala	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg		Apa-NH_2
MR-327	Dat	—	—	Gln	Orn	Abu	Orn	Nle	Asp	Arg		Apa-NH_2
MR-502	Dat	D-Ala	Fpa5	Asn	Orn	Abu	Orn	Nle	Ser	Arg		Gab-NH_2
MR-504	Dat	A-Abu	—	Asn	Orn	Abu	Orn	Nle	Ser	Arg		Gab-NH_2
MR-702	Dat	D-Ala	—	Asn	Orn	Abu	Orn	Nle	Ser	Arg		Gln

其中，N-Me-Tyr 指酪氨酸 N 端存在甲基化。

[0030] 将促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 应用于制备抗衰老药物。

[0031] 作为优选，所述抗衰老药物的应用对象为人或动物。

[0032] 进一步的，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 的人体使用量为每次 0.01μg/kg-1mg/kg。使用频率可以是每天 1 次至多次。

[0033] 作为优选，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 选自 JI-22，JI-25，JI27，JI-29，JI-34，JI-36，JI-38，JI-40，JI-42，MR-351，MR-356，MR-361，MR-367，MR-401，MR-403，MR-404，MR-405，MR-406，MR-407，MR-408，MR-409，MR-410，MR-420，MR-421，MR-326，MR-327，MR-502，MR-504，MR-702，CJC-1288，CJC-1293 和 CJC-1295 中的一种或多种。

[0034] 作为优选，所述抗衰老药物为注射制剂、口服制剂、贴剂或喷剂。所述抗衰老药物的剂型包括但不限于冻干粉针、注射液、片剂、丸剂、颗粒剂、硬胶囊、糖浆、软胶囊、药膏、面霜、贴剂或微针等。所述抗衰老药物的给药方式可以是皮下注射，肌肉注射，静脉注射，口服，外用、涂抹、皮肤贴剂、鼻内或肺吸入。注射、渗透、吸收、物理或化学介导的方法导入机体如肌肉、皮内、皮下、粘膜组织；或是被其他物质混合或包裹后导入机体。

[0035] 作为优选，所述抗衰老药物包括：

1）促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 和/或其在药学上可接受的盐、酯；

2）药学上可接受的载体、赋形剂、溶剂和缓冲液中的一种多种。所述载体包括药学领域常规的稀释剂、赋形剂、填充剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸收促进剂、表面活性剂、吸附载体、润滑剂等。

[0036] 所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 从以下几大途径来实现抗衰老：

（1）提高心脏收缩和舒张功能来实现抗衰老作用；（2）提高免疫力功能、改善机体免疫反应效果；（3）提高机体运动能力；（4）降低细胞的衰老特性；（5）提高骨髓中干细胞活性、增加干细胞数量；（6）促进毛发生长；（7）降低死亡率、提高生存率，延长寿命。

[0037] 具体地：体外实验表明，GHRH-A 能降低细胞的衰老特性，衰老特性表现为随年龄增加出现的退行性变化。将本发明的 GHRH-A 应用于制备抗衰老药物，能够降低细胞的衰老相关的β-gal 染色阳性率，减少衰老细胞（如心肌细胞和内皮细胞）的细胞周期相关蛋白 p21 的表达，减少 ROS 产生。GHRH-A 可以改善衰老导致的细胞线粒体形态和功能，提高线粒体蛋白 OPA1 表达及其长型对短型的比例（L/S-OPA1）。动物实验研究表明：GHRH-A 可以增加机体干细胞活性和数量，提高老年小鼠的心血管功能，增加基础活动能力，改善毛发生长，增强免疫功能，使免疫功能年轻化，最终延长老年小鼠的寿命。总之，GHRH-A 对老年小鼠的具有很好的抗衰老作用。

[0038] 实施例

下面通过具体实施例对本发明进行说明，本实施例采用的 GHRH-A 为 MR409，但本发明的保护范围并不局限于此。下述实施例中所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所述试剂和材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。其中 MR409 由迈阿密大学的教授 Andrew V. Schally 提供。

[0039] MR409 氨基酸序列为：N-Me-Tyr—D-Ala—Asp—Ala—Ile—Phe—Thr—Asn—Ser—Tyr—Arg—Orn—Val—Leu—Abu—Gln—Leu—Ser—Ala—Arg—Orn—Leu—Leu—Gln—Asp—Ile—Nle—Asp—Arg-$NHCH_3$。（即 N-甲基酪氨酸—D-丙氨酸—天冬氨酸—丙氨酸—异亮氨酸—苯丙氨酸—苏氨酸—天冬酰胺—丝氨酸—酪氨酸—精氨酸—鸟氨酸—缬氨酸 －亮氨酸—2-氨基丁酸—谷氨酰胺—亮氨酸—丝氨酸—丙氨酸—精氨酸—鸟氨酸—亮氨酸—亮氨酸—谷氨酰胺—天冬氨酸—异亮氨酸—正亮氨酸—天冬氨酸—精氨酸-$NHCH_3$）。

[0040] 本发明利用体外建立的细胞衰老模型以及体内 C57 背景的 15 月龄老年小鼠模型检测 MR409 在抗衰老方面的作用。

[0041] 为了研究 GHRH-A 对衰老的影响，将 GHRH-A 的人体使用量 0.01μg/kg-1mg/kg，给予适用于小鼠使用的 GHRH-A 使用剂量。给 15 个月龄的小鼠皮下注射 MR409（10μg/小鼠/天）或空白溶剂(对照小鼠)6 个月。

[0042] 如图 1 所示，用 MR409 处理 3 个月后，观察得到：经 MR409 处理的小鼠精力旺盛，活动能力强。与对照小鼠相比，它们的总移动距离增加了 55%；如图 2 所示，毛发生长状况得到改善，毛发的平均灰度值显著增加；如图 3 所示，经 MR409 处理小鼠在 23 个月的存活率为 87.5%，显着高于对照小鼠的 42.9%，且如图 4 所示，经 MR409 处理后未观察到体重变化。 如图 5 所示，经 MR409 处理过的小鼠，其骨髓来源的细胞经培养后，可以形成更多的细胞集落（colony forming unit, CFU），表明经 MR409 处理过的小鼠骨髓中有更多的干细胞。

[0043] 如图 6 所示，GHRH-A 可以改善老年小鼠的心功能。注射空白溶剂 4 个月后，对照小鼠的心脏收缩功能降低，但经 MR409 处理的小鼠能够维持在原来的水平，且收缩期和舒张末期的左心室后壁厚度（LVPW）没有变化。通过心超脉冲波多普勒（PWD）和组织多普勒成像（TDI），测量小鼠心脏的舒张功能，反映舒张功能的 E/E'和 Tei 指数在经 MR409 治疗小鼠的舒张功能上均优于对照小鼠。该研究结果表明 MR409 能够治疗和改善心脏收缩和舒张功能。

[0044] 如图 7 所示，GHRH-A 可以改善老年小鼠心肌组织线粒体形态和功能。通过透射电子显微镜检查小鼠心脏中线粒体的形态，发现：经 MR409 处理的小鼠的 CM 中的线粒体更大，具有比对照小鼠更大的表面积和更长的周长，这表明经 MR409 处理的小鼠的 CM 有更多的线粒体融合，导致经 MR409 处理的小鼠的线粒体数量少于对照小鼠。与对照小鼠相比，经 MR409 处理的小鼠心脏线粒体蛋白 OPA1 长型与短形的比值增加，表明 MR409 通过阻止其碎裂来保护线粒体完整性。经 MR409 处理的小鼠的 CM 的新鲜分离的线粒体的耗氧率高于对照小鼠的线粒体，通过分析线粒体氧化磷酸化水平，得出经 MR409 处理的小鼠的线粒体氧化磷酸化水平高于对照小鼠。

[0045] 为了模拟体内 CM 的衰老过程，用 Dox 处理 H9C2 心肌细胞，在有或没有 MR409 的情况下诱导应激和凋亡。如图 8 所示，经 Dox 处理导致 H9C2 细胞死亡，而向培养物中添加 MR409 显著降低了细胞的死亡。如图 9 所示，通过电子显微镜观察线粒体的形态，Dox 中加入 MR409 的细胞中的线粒体变得更长，且比没有添加 MR409 的细胞碎片更少，这表明经 MR409 处理后线粒体融合增强。虽然通过 Dox 处理降低了线粒体蛋白 OPA1，但是通过 MR409 处理增加了 L-OPA1 与 S-OPA1 的比值。

[0046] 为了进一步研究 MR409 对细胞衰老的影响，分别将 Dox 处理的 H9C2 细胞和新生大

鼠 CM（NRCM）以及内皮细胞（EC）与或不与 MR409 一起培养 48 小时，检查衰老标记蛋白 p21 和 β-gal 染色以确定衰老水平。如图 10 所示，在所有 MR409 处理的细胞（H9C2，NRCM 和 HUVEC）中 p21 减少。与未添加 MR409 培养的细胞相比，用 MR409 培养细胞 10 次后，在 HUVEC 中观察到更少的 β-gal 阳性细胞。如图 11 所示，GHRH-A 可以减少衰老心肌细胞 ROS 产生和线粒体 ROS 产生。如下表所示，GHRH-A 可以促进全身免疫稳态年轻。

[0047] 下表为不同年龄小鼠免疫细胞分析结果。与年轻小鼠(7-8 周大)相比，老年对照小鼠的总 CD3+T 淋巴细胞、CD4+T 助细胞、CD161+ NK 细胞和 CD4/CD8 比值都降低了，CD8+T 抑制细胞增多了。使用 MR409 处理老年小鼠 6 个月后，衰老个体中总 CD3 阳性 T 细胞、CD4 阳性 T 辅助细胞和 CD20 阳性 B 细胞的数量都增加了，CD8 阳性 T 抑制细胞的数量降低了。这些数据表明，老年小鼠免疫细胞在使用 MR409 治疗后，其免疫细胞数量比例变得与年轻小鼠的接近，表明 MR409 能通过改变免疫细胞数量及比例，改善老小鼠的免疫系统，提高免疫力功能、改善机体免疫反应能力。

[0048]

Cell marker#	7-8 Week	23 Month	
	Young	Control	MR409
CD3 (T cells)	43.43±5.59	14.86±2.93$^{\$\$\$}$	19.56±4.16
CD4 (T helper)	59.36±8.33	23.82±4.48$^{\$\$\$}$	30.13±4.09*
CD8 (T suppressor)	31.57±6.03	57.92±7.43$^{\$\$}$	45.64±3.6*
CD4/CD8	1.98±0.57	0.43±0.13$^{\$\$}$	0.66±0.05**
CD14 (Monocytes)	0.79±0.18	2.36±1.01	0.56±0.17**
CD20 (B cells)	17.4±1.75	10.78±1.41	17.96±6.50
CD161 (NK cells)	11.35±3.05	5.00±2.62$^{\$}$	5.17±1.32
CD71 (Transferrin receptor)	1.43±0.3	1.36±0.72	0.78±0.41
CD54 (ICAM-1)	10.4±0.53	19.26±7.09	13.46±0.82

$^{\$}$ P<0.05 vs. Young, $^{\$\$}$ P<0.01 vs. Young, $^{\$\$\$}$ P<0.001 vs. Young, $^{\$\$\$\$}$ P<0.0001 vs. Young, * P<0.05 vs. Control, **** P<0.0001 vs. Control.

综上所述，体内实验证明，MR409 可以显著提高老年小鼠的心功能，增强老年小鼠活动能力，改善毛发生长，加强免疫力，从而延长老年小鼠寿命。同时，体外实验表明 GHRH-A 能减轻衰老细胞的氧化和衰老表形，改善线粒体功能和减少衰老导致的线粒体损伤。

[0049] 以上所述，仅是本发明的较佳实施例，并非对本发明作任何限制，凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换，均仍属于本发明技术方案的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 在制备抗衰老药物中的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高心脏收缩和舒张功能来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高免疫力功能、改善机体免疫反应效果来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高运动能力来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过降低细胞的衰老特性来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高骨髓中干细胞活性、增加干细胞数量来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过促进毛发生长来实现抗衰老作用；和/或

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过降低死亡率、提高生存率，延长寿命预期值，来实现抗衰老作用。

3. 如权利要求 2 所述的用途，其特征在于，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过与细胞表面 GHRH 受体结合，激活 cAMP/PKA 通路，减少 OPA1 长亚基的剪切，促进线粒体融合，提高线粒体活性，增强线粒体氧化磷酸化能力，从而增加线粒体 ATP 产量和产能效率，最终达到改善衰老动物心脏的收缩和舒张功能；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过增加衰老个体中总 CD3 阳性 T 细胞、CD4 阳性 T 辅助细胞和 CD20 阳性 B 细胞的数量，降低 CD8 阳性 T 抑制细胞的数量，从而提高免疫力功能、改善机体免疫反应能力；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过减少衰老细胞中细胞周期抑制蛋白 P21 的表达，减少 ROS 产生，减少衰老相关的β-Gel 染色阳性率，进而降低衰老细胞特征；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高线粒体活性和能量供给，增强老年人或动物心功能，改善免疫功能，进而提高运动能力；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高干细胞活性，增强其生长繁殖能力，增加骨髓细胞集落形成数，从而增加干细胞数量；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高干细胞活性、增加干细胞数量，提高机体免疫能力，从而促进毛发生长；

所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 通过提高干细胞活性、增加干细胞数量，改善心脏功能和机体免疫反应能力，从而降低死亡率，增加人或动物生存率，提高寿命预期值。

权 利 要 求 书

4. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述抗衰老药物的应用对象为人或动物。

5. 如权利要求 4 所述的用途，其特征在于，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 的人体使用量为每次 0.01μg/kg-1mg/kg。

6. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 选自 JI-22，JI-25，JI27，JI-29，JI-34，JI-36，JI-38，JI-40，JI-42，MR-351，MR-356，MR-361，MR-367，MR-401，MR-403，MR-404，MR-405，MR-406，MR-407，MR-408，MR-409，MR-410，MR-420，MR-421，MR-326，MR-327，MR-502，MR-504，MR-702，CJC-1288，CJC-1293 和 CJC-1295 中的一种或多种。

7. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述抗衰老药物为注射制剂、口服制剂、贴剂或喷剂。

8. 如权利要求 7 所述的用途，其特征在于，所述抗衰老药物的剂型选自冻干粉针、注射液、片剂、丸剂、颗粒剂、硬胶囊、糖浆、软胶囊、药膏、面霜、贴剂或微针。

9. 如权利要求 7 所述的用途，其特征在于，所述抗衰老药物的给药方式选自皮下注射、肌肉注射、静脉注射、口服、外用、涂抹、皮肤贴剂、鼻内或肺吸入。

10. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述抗衰老药物包括：

1）促生长激素释放激素激动剂 GHRH-A 和/或其在药学上可接受的盐、酯；

2）药学上可接受的载体、赋形剂、溶剂和缓冲液中的一种多种。

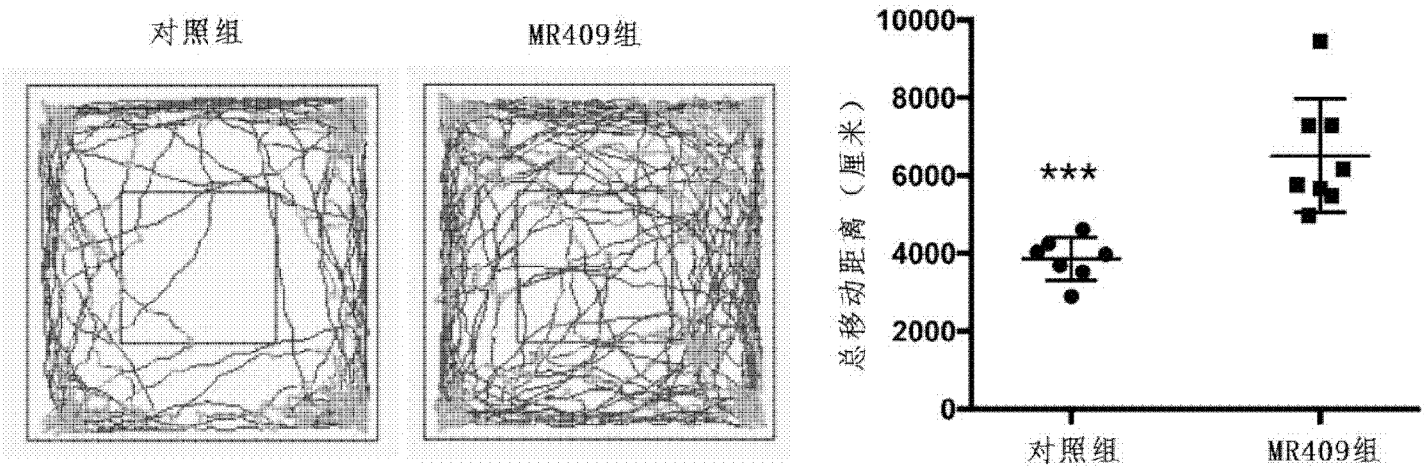


图1

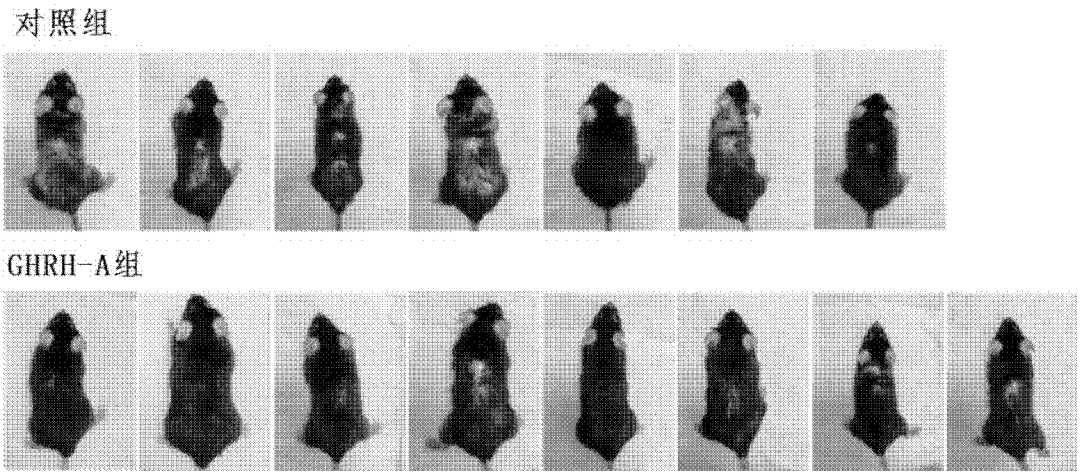

对照组
GHRH-A组

图2

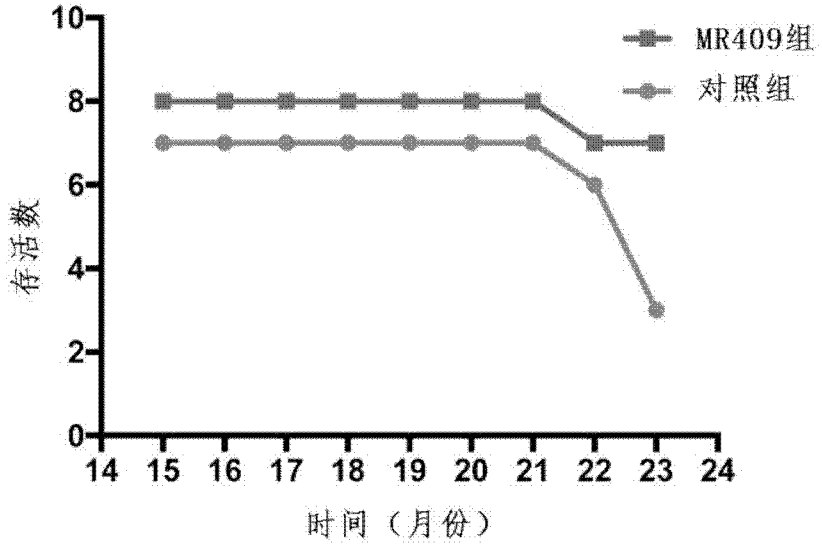

MR409组
对照组
存活数
时间（月份）
0
2
4
6
8
10
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

图3

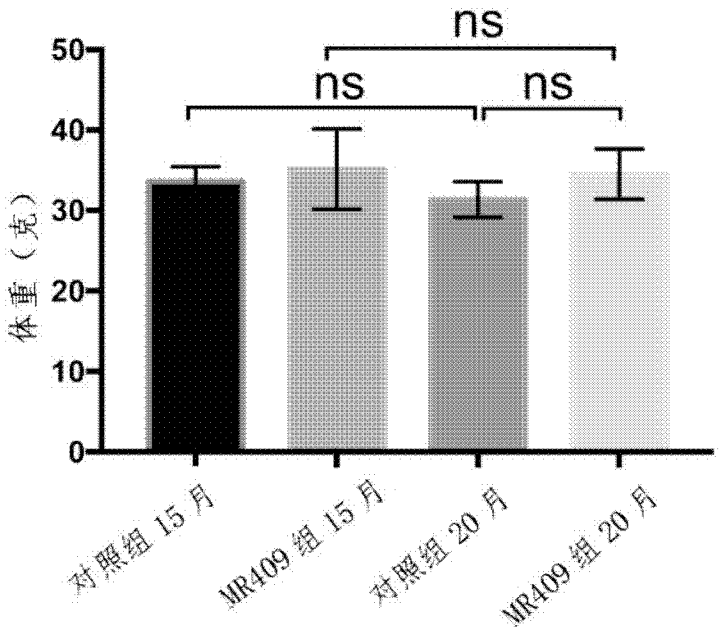

ns
ns
ns
体重（克）
0
10
20
30
40
50
对照组 15 月
MR409 组 15 月
对照组 20 月
MR409 组 20 月

图4

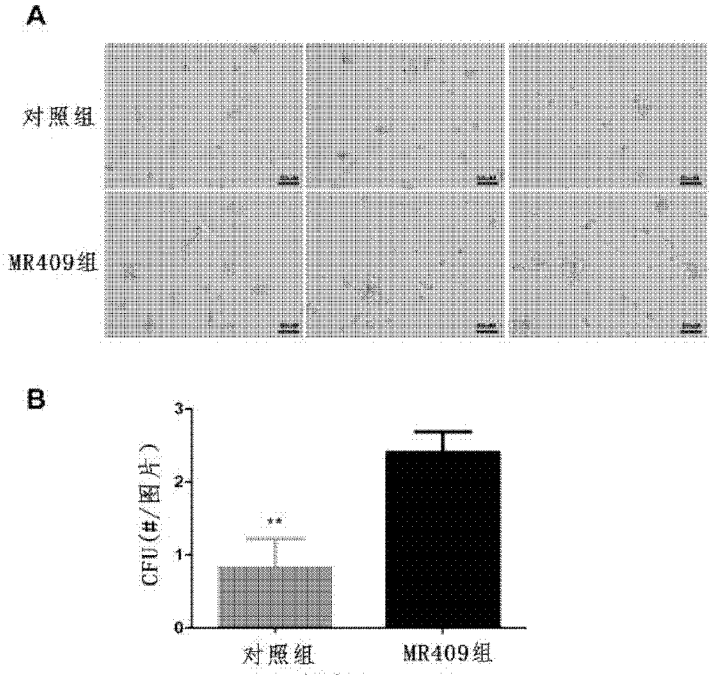

A
对照组
MR409组
B
CFU(#/图片)
对照组
MR409组

图5

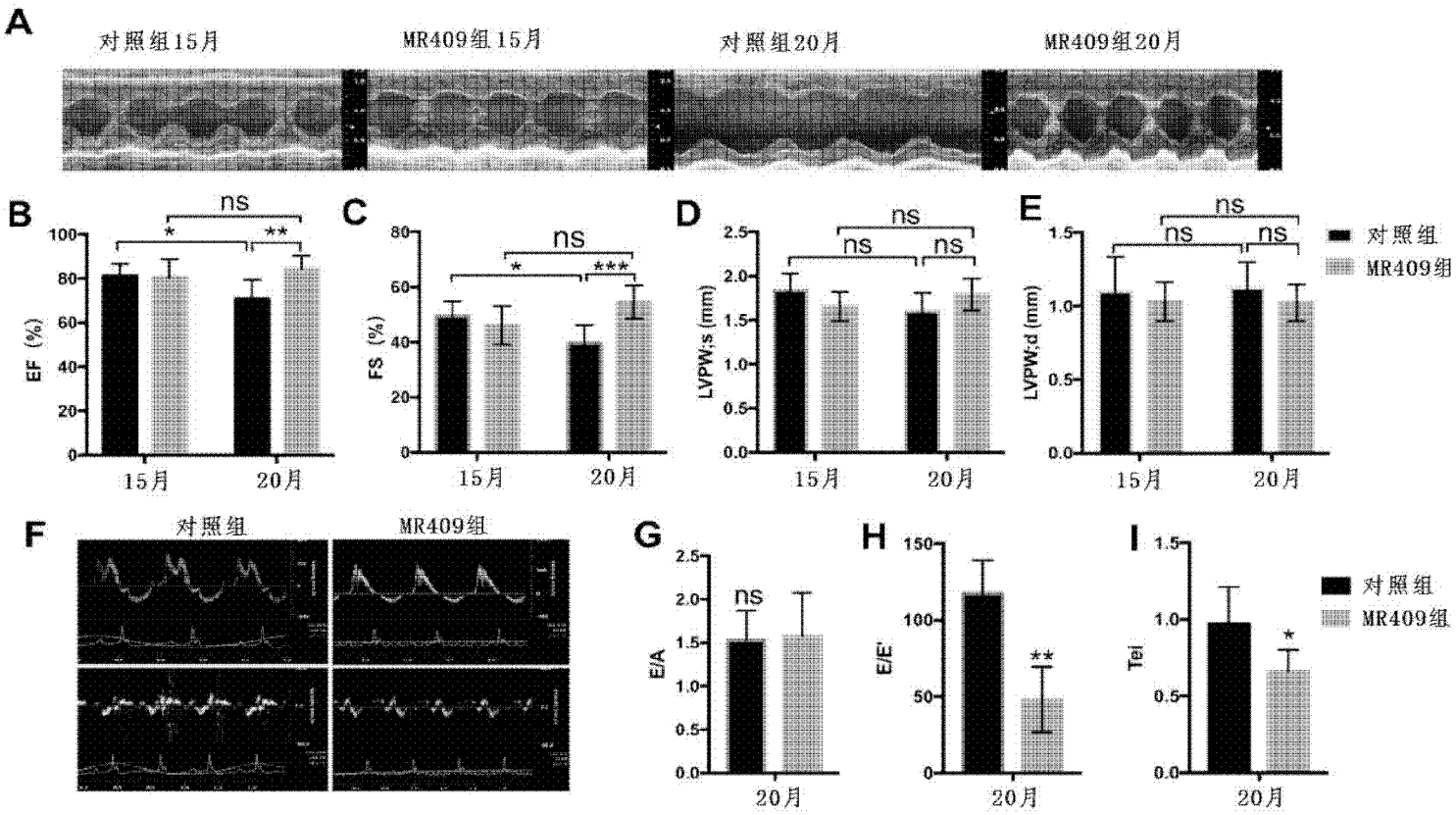

A
对照组15月
MR409组15月
对照组20月
MR409组20月
B
EF (%)
C
FS (%)
D
LVPW;s (mm)
E
LVPW;d (mm)
15月
20月
对照组
MR409组
F
对照组
MR409组
G
E/A
H
E/E'
I
Tei
20月

图6

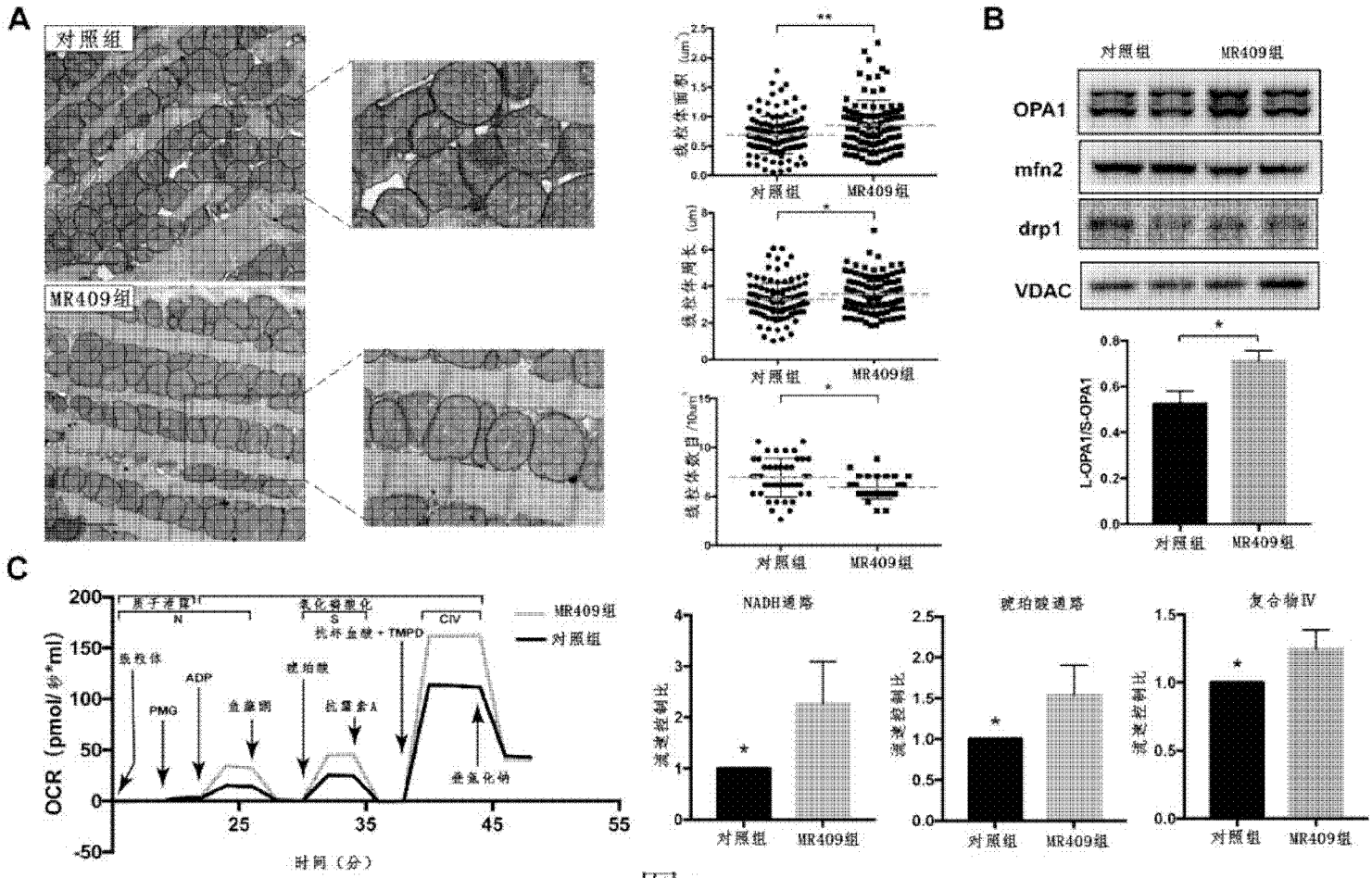

A
对照组
MR409组
线粒体面积 (um²)
线粒体周长 (um)
线粒体数目/10um²
对照组
MR409组
B
对照组
MR409组
OPA1
mfn2
drp1
VDAC
L-OPA1/S-OPA1
C
OCR (pmol/分*ml)
时间（分）
MR409组
对照组
NADH通路
琥珀酸通路
复合物IV
流速控制比

图7

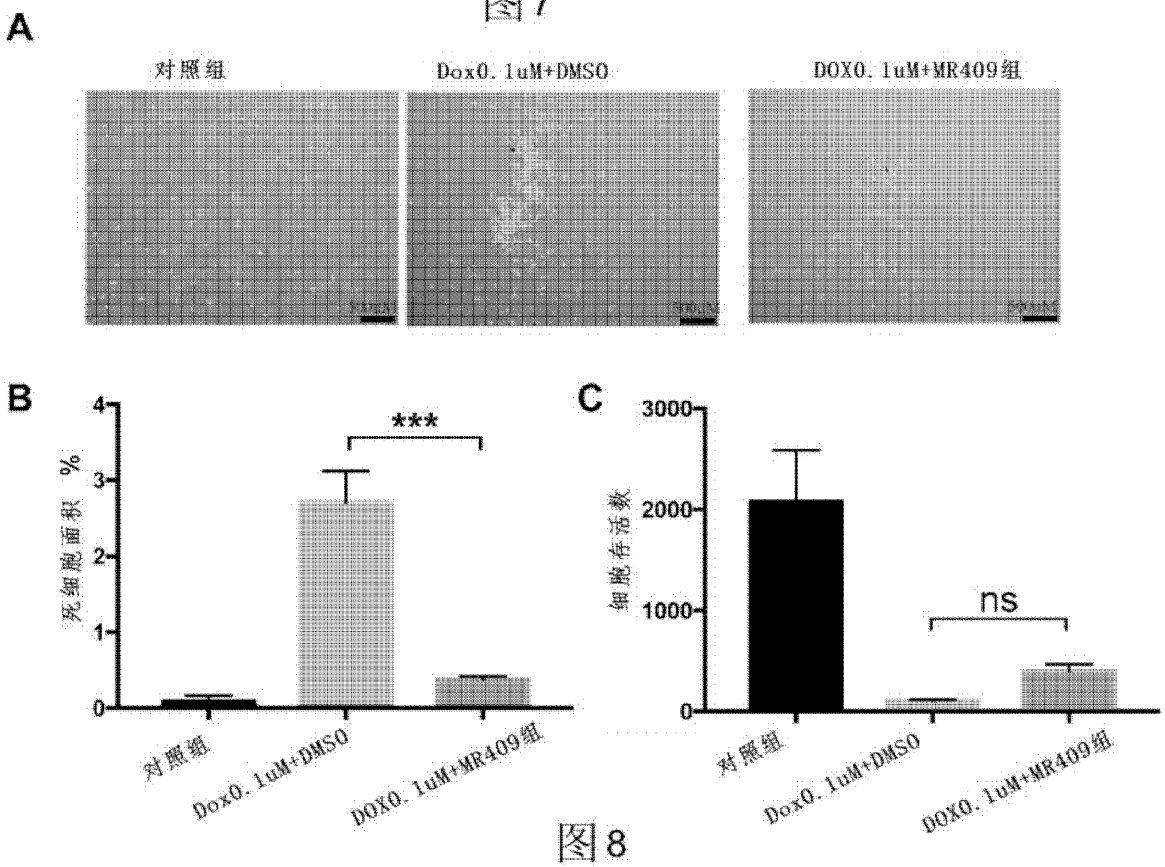

A
对照组
Dox0.1uM+DMSO
DOX0.1uM+MR409组
B
死细胞面积 %
***
C
细胞存活数
ns
对照组
Dox0.1uM+DMSO
DOX0.1uM+MR409组

图8

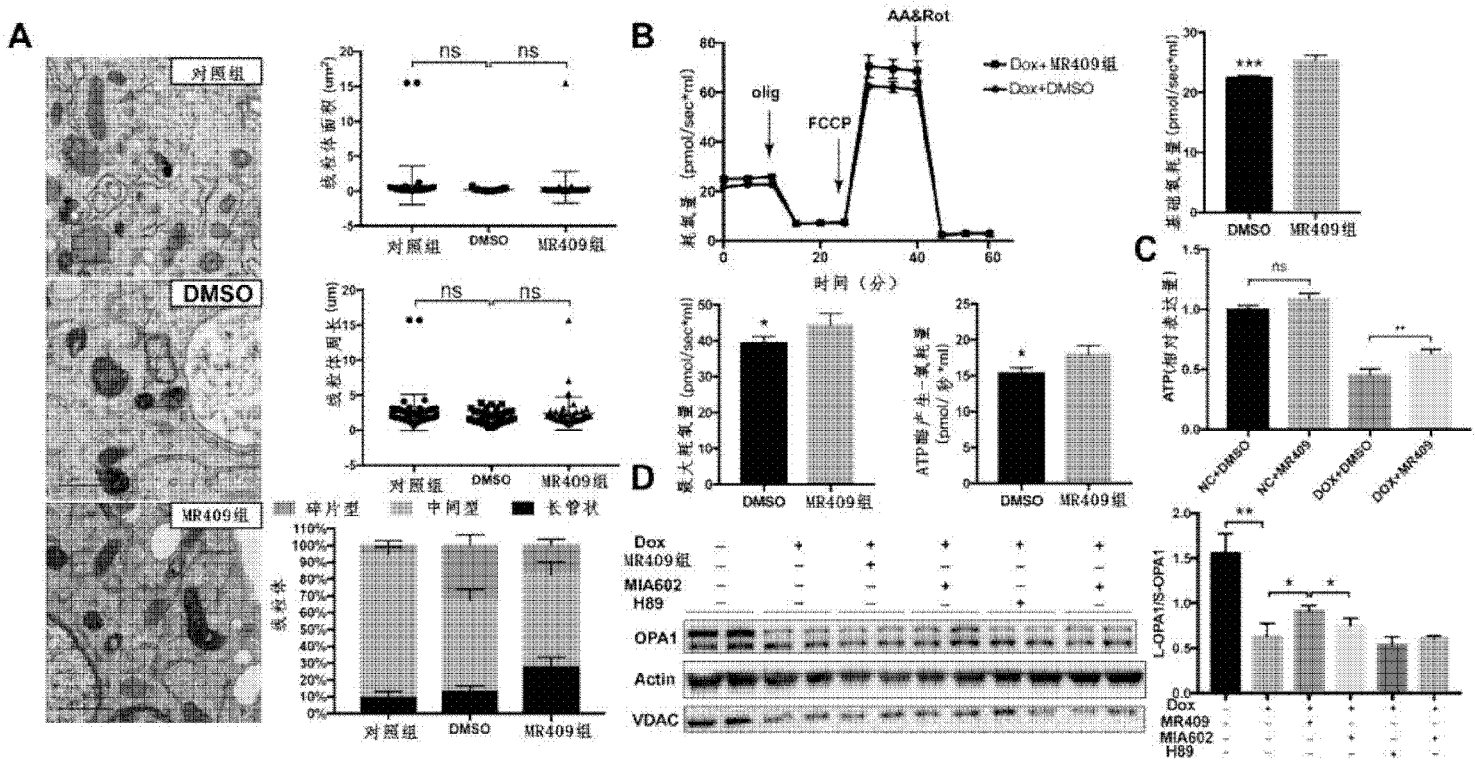

A
对照组
DMSO
MR409组
线粒体面积 (um²)
线粒体周长 (um)
ns
碎片型
中间型
长管状
线粒体
B
AA&Rot
olig
FCCP
Dox+MR409组
Dox+DMSO
耗氧量 (pmol/sec*ml)
时间（分）
基础氧耗量 (pmol/sec*ml)
最大耗氧量 (pmol/sec*ml)
ATP酶产生一氧耗量 (pmol/秒*ml)
C
ATP(相对表达量)
NC+DMSO
NC+MR409
DOX+DMSO
DOX+MR409
D
Dox
MR409组
MIA602
H89
OPA1
Actin
VDAC
L-OPA1/S-OPA1

图 9

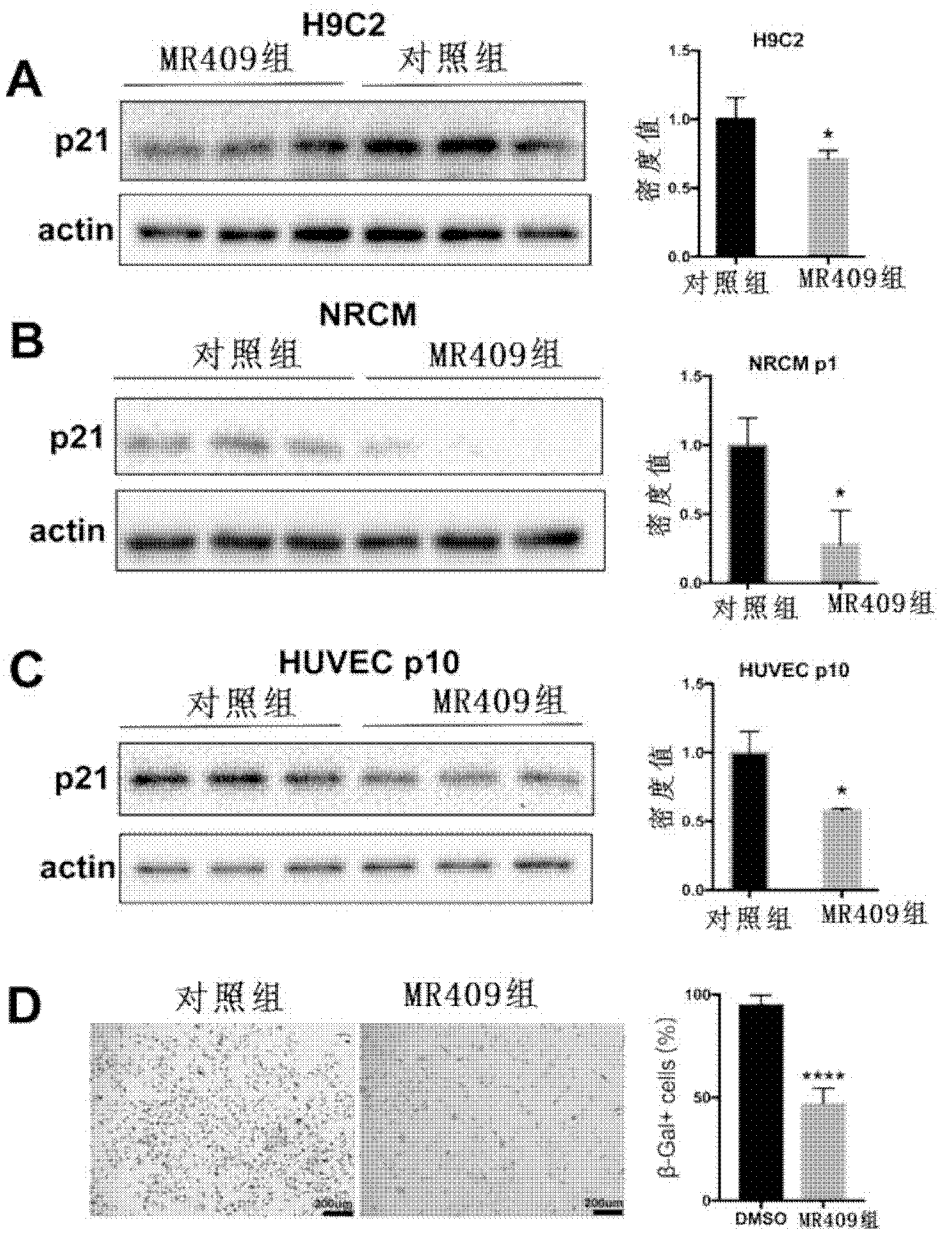

A
H9C2
MR409组
对照组
p21
actin
H9C2
密度值
对照组
MR409组
B
NRCM
对照组
MR409组
p21
actin
NRCM p1
密度值
对照组
MR409组
C
HUVEC p10
对照组
MR409组
p21
actin
HUVEC p10
密度值
对照组
MR409组
D
对照组
MR409组
β-Gal+ cells (%)
DMSO
MR409组

图10

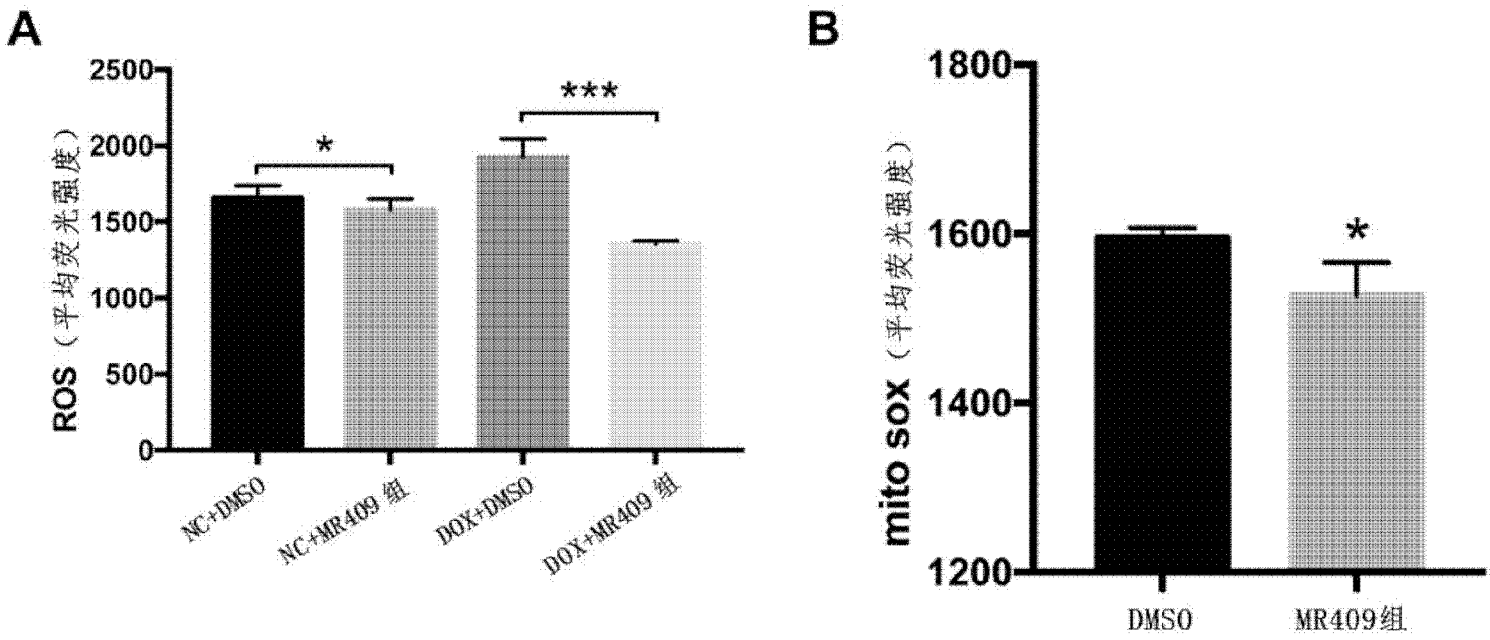

A
ROS（平均荧光强度）
2500
2000
1500
1000
500
0
*
***
NC+DMSO
NC+MR409 组
DOX+DMSO
DOX+MR409 组
B
mito sox（平均荧光强度）
1800
1600
1400
1200
*
DMSO
MR409组

图11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/095495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/25(2006.01)i; A61P 39/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed: 生长激素释放激素激动剂, GHRH, 生长激素释放激素, growth hormone releasing hormone, MR-409, 干细胞, agonist, aging

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009009727 A3 (AKELA PHARMA SRL et al.) 07 May 2009 (2009-05-07) see description page 3, lines 14-31, page 5, lines 23-29, page 11, lines 23-32, page 27, line 22- page 28, line 31	1-10
X	CN 1688696 A (UNIV MONTREAL CT HOSPITALIER CHUM [CA]) 26 October 2005 (2005-10-26) see claims 1-16, description page 4, lines 20-30, page 8, lines 2-25	1-10
A	CN 107320718 A (YU, Hong) 07 November 2017 (2017-11-07) see entire document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 September 2020	**30 September 2020**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/095495

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2009009727	A3	07 May 2009	US	2009088380	A1	02 April 2009
				WO	2009009727	A2	15 January 2009
CN	1688696	A	26 October 2005	CA	2496687	A1	01 April 2004
				ZA	200502221	A	30 August 2006
				EP	1539959	A2	15 June 2005
				JP	2006504694	A	09 February 2006
				WO	2004027064	A3	18 November 2004
				BR	0314619	A	02 August 2005
				WO	2004027064	A2	01 April 2004
				US	2009023646	A1	22 January 2009
				AU	2003269631	A1	08 April 2004
				RU	2005111253	A	20 November 2005
				NZ	539218	A	28 March 2008
				MX	PA05002991	A	05 October 2005
				US	2006128615	A1	15 June 2006
				NO	20051804	L	13 April 2005
				KR	20050071498	A	07 July 2005
				NO	20051804	A	13 April 2005
				ZA	200502221	B	30 August 2006
CN	107320718	A	07 November 2017		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/095495

A. 主题的分类

A61K 38/25(2006.01)i; A61P 39/06(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, 百度学术搜索, WEB OF SCIENCE, PubMed：生长激素释放激素激动剂，GHRH，生长激素释放激素，growth hormone releasing hormone，MR-409，干细胞，agonist，aging

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2009009727 A3 (AKELA PHARMA SRL et al.) 2009年 5月 7日 (2009-05-07) 参见说明书第3页第14-31行，第5页第23-29行，第11页第23-32行，第27页第22行-第28页31行	1-10
X	CN 1688696 A (蒙特利尔大学医疗中心) 2005年 10月 26日 (2005-10-26) 参见权利要求1-16，说明书第4页第20-30行，第8页第2-25行	1-10
A	CN 107320718 A (余红) 2017年 11月 7日 (2017-11-07) 参见全文	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 9月 10日	2020年 9月 30日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 赵彦豪 电话号码 62411043

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/095495

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2009009727	A3	2009年 5月 7日	US	2009088380	A1	2009年 4月 2日
				WO	2009009727	A2	2009年 1月 15日
CN	1688696	A	2005年 10月 26日	CA	2496687	A1	2004年 4月 1日
				ZA	200502221	A	2006年 8月 30日
				EP	1539959	A2	2005年 6月 15日
				JP	2006504694	A	2006年 2月 9日
				WO	2004027064	A3	2004年 11月 18日
				BR	0314619	A	2005年 8月 2日
				WO	2004027064	A2	2004年 4月 1日
				US	2009023646	A1	2009年 1月 22日
				AU	2003269631	A1	2004年 4月 8日
				RU	2005111253	A	2005年 11月 20日
				NZ	539218	A	2008年 3月 28日
				MX	PA05002991	A	2005年 10月 5日
				US	2006128615	A1	2006年 6月 15日
				NO	20051804	L	2005年 4月 13日
				KR	20050071498	A	2005年 7月 7日
				NO	20051804	A	2005年 4月 13日
				ZA	200502221	B	2006年 8月 30日
CN	107320718	A	2017年 11月 7日		无		