

УДК 615.371:616.89-008.441.33

ТЕХНОЛОГИЯ СИНТЕЗА СУБСТАНЦИИ ИММУНОГЕНА ДЛЯ ПРОТИВОПИАТНОЙ ВАКЦИНЫ

Мягкова М.А., Петроченко С.Н., Орлова Е.А.

*ФГБУН «Институт физиологически активных веществ» Российской академии наук,
Черноголовка, e-mail: dianark@mail.ru*

Разработан синтетический иммуноген, представляющий комплекс, состоящий из конъюгата макромолекулярного носителя в виде природного белка и гаптена – наркотического соединения группы опия (морфина), ковалентно связанного с поли(4-нитрофенил)акрилатом. Макромолекулярным носителем в конъюгате является белок сыворотки крови человека (гамма-глобулин человека ГГЧ, человеческий сывороточный альбумин ЧСА). Установлена оптимальная конструкция синтетического иммуногена. При исследовании структуры синтетического иммуногена изучено связывание различных комбинаций перечисленных выше компонентов комплекса. Выбраны соотношения конъюгатов белкового носителя с гаптенем и полимерной матрицей. В полученном конъюгате количественное соотношение морфина и белка составляло от 9 до 17 молей для гамма-глобулина человека и от 5 до 15 молей гаптена на моль носителя для сывороточного альбумина человека. Присоединение конъюгата к основе полимера соответствовало 4 или 10 молей конъюгата на моль полинитрофенилакрилата. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проведено исследование эпитопной доступности и специфичности синтезированных комплексов иммуногена. По результатам ИФА установлено, что антигенные детерминанты не экранируются при связывании с антителами для комплексов с оптимальным соотношением конъюгата и синтетического полимера 1:10. Дана оценка острой токсичности поли-4(нитрофенил)акрилата. Показано, что полимер относится к группе практически нетоксичных веществ. Изучена иммуногенность синтетических комплексов в моделях иммунизации крыс. Установлено влияние структуры иммуногена дозы вакцинации на способность продуцировать специфические антитела к морфину. Оптимизированные структуры синтетических комплексов планируется использовать на дальнейших этапах создания препарата для противорецидивного лечения опиатной зависимости.

Ключевые слова: субстанция вакцины, иммуноген, опиаты, противорецидивное лечение, наркозависимость

THE TECHNOLOGY OF SYNTHESIS OF THE SUBSTANCE OF THE IMMUNOGEN FOR VACCINE

Myagkova M.A., Petrochenko S.N., Orlova E.A.

*Institute of Physiologically Active Substances of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka,
e-mail: dianark@mail.ru*

Developed synthetic immunogen representing the complex consisting of conjugate of a natural protein and hapten – drug compounds of the group of opium (morphine), covalently linked to poly(4-nitrophenyl)acrylate. Macromolecular carrier in conjugate is human serum protein (human gamma globulin, HUMAN serum albumin HSA). The optimal design of synthetic immunogen is established. In the study of the structure of synthetic immunogen studied binding of various combinations of the above components of the complex. The ratios of protein carrier conjugates with hapten and polymer matrix were selected. In the resulting conjugate ratio of morphine and haptens in the range from 9 to 17 for GGCH and from 5 to 15 for HSA moles of hapten per mole of the carrier. Substitution of the polymer matrix conjugate ranged from 4 to 10 moles of conjugate per mole of polynitroalkanes. By the method of enzyme immunoassay (ELISA) the study of epitope availability and specificity of synthesized complexes of immunogen was carried out. The results of the ELISA established that antigenic determinants are not screened by the binding of the complexes with optimal ratio and synthetic polymer of 1:10. The evaluation of acute toxicity of poly-4(nitrophenyl)acrylate is given. It is shown that the polymer belongs to the group of almost non-toxic substances. The immunogenicity of synthetic complexes in rat immunization models was studied. The influence of the structure of immunogen dose vaccination on the ability to produce specific antibodies to morphine. Optimized structure of the synthetic complexes will be used on both the further stages of development for relapse prevention of opiate dependence.

Keywords: vaccine substance, immunogen, opiates, anti-relapse treatment, drug dependence

На сегодняшний день остается актуальной проблема разработки эффективных методов лечения больных наркоманией. Это связано в первую очередь с большой распространенностью заболевания и трудностью его излечения [1, 2]. Проблема эффективного лечения наркомании не решена ни в нашей стране, ни за рубежом. Задача усложняется высокой частотой возникновения рецидивов болезни [3]. Из 7-миллиардного населения планеты, по данным ВОЗ, злоу-

потребляют наркотиками 3% людей, что составляет 210 миллионов человек [4]. Поэтому столь актуально создание эффективных и безопасных лекарственных препаратов для лечения наркозависимости. Существует два подхода в противорецидивном лечении наркомании. Первый – это традиционный с использованием препаратов блокаторов опиатных рецепторов (при опиоидной зависимости). Второй подход включает заместительную терапию (бупренорфин, ме-

тадон) [5]. Лечение блокаторами опиатных рецепторов является недостаточно эффективным в долгосрочной перспективе и имеет много побочных эффектов на ЦНС. Заместительная терапия требует длительного, порой пожизненного лечения. Она сопровождается побочными эффектами, связанными с высокой аддиктивностью препаратов. Разработка вакцин, снижающих патологию зависимости к наркотическим веществам – это принципиально новый подход в лечении наркомании [6, 7]. Принцип действия вакцин против наркомании основан на образовании антител, связывающих психоактивные вещества, попадающие в кровоток человека. Такие молекулы способны действовать в организме на периферическом уровне. Они препятствуют проникновению наркотиков сквозь ГЭМ барьер в мозг, снижая при этом их токсическое действие. Новая терапия безопаснее, чем существующие способы противорецидивного лечения наркомании. К настоящему моменту учеными ряда мировых научных школ активно проводятся исследования в этой области. Так, известны разработки по созданию вакцин против различных групп наркотиков, главным образом опиатов [8] и кокаина [9]. Отличительная особенность разработанных препаратов заключается в использовании различного вида инновационных адъювантов для усиления иммунного ответа и повышения эффективности препарата [10].

Целью данного исследования являлась разработка технологии получения и оценка активности субстанции иммуногена терапевтической вакцины для противорецидивного лечения зависимости от наркотических веществ группы опия.

Материалы и методы исследования

Для проведения биохимических и иммунохимических исследований применяли следующие материалы и методы. Кроличья сыворотка против морфина, конъюгаты антител овцы против Ig кролика, меченых ферментом, ТМБ, пироксид водорода 10%, детергент TV-20, водорастворимый карбодимид (1-циклогексил-3-(2-морфолинодиэтил)-карбодимид-мета-N-толуолсульфокислоты) «Sigma» (США). Гамма-глобулин, альбумин сыворотки крови человека ФГУП НПО Микроген (Россия). Иммуноферментный анализ проводили на высокосорбционных планшетах «Nunc» (Дания). Результаты иммуноферментного анализа измеряли спектрофотометрически при 450 нм. Выделение синтетического иммуногена проводили хроматографией на колонке (2x50 см) с Sephadex G-25 в хроматографической системе Pharmacia (Швеция). Элюирование выполняли двукратно фосфатным буфером pH 7,2 со скоростью 50 мл/ч. Контроль хроматографического процесса осуществляли путем измерения концентрации белка при длине волны 280 нм в спектрофотометре Genesys 10UV

(ThermoFisherScientific, США). Количество молекул гаптена, присоединенных к белку, определяли по методу разработанному ранее [4]. Белок в растворах определяли методом Бредфорда с использованием реагента фирмы «Sigma» (США).

Получение конъюгата морфина с гамма-глобулином человека (М-ГГЧ). К раствору 15 мг ($1,3 \times 10^{-3}$ ммоль) гамма-глобулина в 3 мл дист. воды прибавили в жидком виде 3,9 мг (0,01 ммоль) 6-о-гемисукцинат морфина, полученного по методу [8], в 1 мл ДМФА, охладили реакционную смесь до 0 °С и при перемешивании прибавили 5 мг водорастворимого карбодимид. Реакционную смесь выдерживали в течение 12 час в холодильнике, фильтровали выпавший осадок и хроматографировали на Сефадексе G-25 полученный конъюгат. Количество связанного морфина определяли сравнением УФ-спектров белка и полученного конъюгата при 280 нм. По данным УФ-спектров в полученном конъюгате было 9 молей морфина на моль белка.

Получено 13 мг (90%) конъюгата морфина с гамма-глобулином (М-ГГЧ), содержащего 9 молей морфина на моль белка.

Для получения М-ГГЧ, содержащего 17 молей морфина на моль белка, синтез проводили аналогично описанному выше, однако, к раствору 30 мг ($2,5 \times 10^{-3}$ ммоль) гамма-глобулина в 10 мл дист. воды прибавили в жидком виде 15,1 мг (0,04 ммоль) вещества производного 6-О-гемисукцинат морфина в 1,5 мл ДМФА, далее аналогично. Получено 27 мг (91%) конъюгата морфина с гамма-глобулином (М-ГГЧ), содержащего 17 молей морфина на моль белка.

Получение конъюгата морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА). Синтез конъюгата морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА) проводят аналогично описанному выше. При этом используют раствор 50 мг (0,08 ммоль) сывороточного альбумина человека (ЧСА) в 15,0 мл дист. воды приливали 3,1 мл ДМФА, содержащего 25 мг (0,063 ммоль) 6-о-сукцинилморфина. Далее по каплям в охлажденном состоянии добавляли раствор 18,9 мг (0,054 ммоль) карбодимид растворенного в 3 мл дист. воды. Смесь продуктов реакции выдерживали 5 час при 4 °С. Образовавшийся конъюгат хроматографировали на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали. Получено 42 мг (85%) конъюгата (М-ЧСА), содержащего 15 молей морфина на моль белка.

Получение комплекса синтетического иммуногена М-ГГЧ с полимерным носителем-(4-нитрофенил) акрилатом (ПНФА). К раствору 6 мг ПНФА (м.в. 40 000) в 1,5 мл диметилформамида (ДМФ) добавляют по каплям при перемешивании раствор 3,8 мг конъюгата М-ГГЧ (соотношение белок : гаптен 1:9) в 500 мкл фосфатно-солевого буфера, pH 7,2. Реакционную смесь выдерживают в течении суток при 20 °С, добавляют 20 мкл 25% NH₃. Проводят выпаривание в вакууме растворителя и промывку эфиром остатка. В результате проведенного синтеза получают комплекс, имеющий замещение 10:1 полимерной матрицы конъюгатом морфина гамма-глобулин человека. Контроль за степенью замещения полимерной матрицы осуществляют спектрофотометрически по количеству образовавшегося в процессе реакции п-нитрофенола.

Получено 5,5 мг (90%) комплекса с конъюгатом морфин гамма-глобулин человека (М-ГГЧ) соотношение белок: гаптен 1:9) с замещением полимер (М-ГГЧ) 1:10.

Аналогично описанному выше проводят синтез, используя в качестве исходного соединения 5 мг поли-(4-нитрофенил)акрилата в 1 мл ДМФ и 4 мг конъюгата М-ГГЧ (соотношение белок: гаптен 1:17) в 800 мкл фосфатно-солевого буфера, рН 7,2. Получено 4,2 мг (94%) комплекса с конъюгатом морфин гамма-глобулин человека (М-ГГЧ соотношение белок: гаптен 1:17) с замещением полимер-(М-ГГЧ) 1:10.

Получение комплекса синтетического иммуногена М-ЧСА с полимерным носителем ПНФА. Аналогично описанному выше проводят синтез, используя в качестве исходного соединения 10 мг ПНФА в 4 мл ДМФ и 4 мг конъюгата М-ЧСА (соотношение белок: гаптен 1:15) в 1 мл фосфатно-солевого буфера, рН 7,2. Получено 8,7 мг (89%) комплекса с конъюгатом морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА соотношение белок: гаптен 1:15) с замещением полимер – (М-ЧСА) 1:4.

Аналогично описанному выше проводят синтез, используя в качестве исходного соединения 12 мг поли-(4-нитрофенил)акрилата (м.в. 40 000) в 4 мл ДМФ и 8 мг конъюгата М-ЧСА (соотношение белок: гаптен 1:15) в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера, рН 7,2. Получено 10,7 мг (90%) комплекса с конъюгатом морфина с сывороточным альбумином человека (М-ЧСА соотношение белок: гаптен 1:15) с замещением полимер- (М-ЧСА) 1:10.

Оценку активности и специфичности полученных синтетических иммуногенов проводили методом ИФА. По результатам ИФА проводили индивидуальную оценку взаимодействия каждого из указанных выше иммуногенов с антиморфиновыми антителами. Далее строили кривые зависимости значения оптической плотности (OD_{450}) в ИФА от концентрации для каждого варианта конструкции полученного иммуногена. Полученные данные обработали статистически с оценкой достоверности результатов, применяя t-критерий Стьюдента. Диапазон выбранных концентраций, в котором наблюдается прямо пропорциональная зависимость оптической плотности в ИФА от концентрации иммуногена, представлен в табл. 1.

Иммуногенная активность и способность продуцировать специфические антитела была изучена в опытах на крысах породы Wistar, самцы, в возрасте 6–7 недель. Иммуноген и конъюгат М-ГГЧ, используемый в качестве контроля сравнения, вводили по 4 раза, на 0, 7, 14 и 21 день, внутримышечно, в объеме 0,2 мл на крысу. Забор крови проводили непосредственно перед вакцинацией на 0, 7, 14, 21 и 35 дни путем иссечения подъязычной вены в объеме 1–1,5 мл. Титр анти-морфиновых антител и их специфичность определяли методом ИФА. Строили кривые титрования для каждой порции сыворотки – зависимость оптической плотности от разведения сыворотки. Рассчитывали при этом титр сыворотки, принимая разведение, при котором достигается 50% сигнала ($(OP_{max} - OP_{min})/2$). Для каждой группы были рассчитаны средние геометрические обратных титров антител (1/титр) и доверительные интервалы их значений при 95% вероятности.

Результаты исследования и их обсуждение

Принципиальная новизна конструирования вакцин состоит не только в создании искусственных макромолекул, обладающих необходимыми антигенными

детерминантами, но и в возможности регулировать активность этих молекул. Иммуногенность вакцинного препарата зависит от ряда параметров, в первую очередь от антигенной структуры субстанции, а для низкомолекулярных антигенов (гаптен) – от их эпитопной плотности. Конструкция разработанного синтетического иммуногена представляет комплекс, состоящий из конъюгата низкомолекулярного наркотического соединения группы опия (гаптена морфина) присоединенного к природному белку, который в свою очередь связан с матрицей полимера (4-нитрофенил) акрилатом (ПНФА). Макромолекулярный носитель конъюгата – это сывороточный белок крови человека. А именно, гамма-глобулин человека ГГЧ и человеческий сывороточный альбумин ЧСА. Их использование минимизирует побочные реакции при вакцинации. При выборе конструкции синтетического иммуногена изучено связывание различных комбинаций перечисленных выше конъюгатов и полимерной матрицы. Первоначально осуществлено получение карбоксилсодержащего производного морфина путем взаимодействия с янтарным ангидридом в абсолютном растворителе [4]. Далее в присутствии водорастворимого карбодиимида проведено ковалентное связывание спейсер-содержащего морфина с указанными макромолекулярными носителями. В полученных конъюгатах соотношение морфина и макромолекулярного носителя составляет 9–17 молей гаптена на 1 моль носителя. Следующей стадией синтеза иммуногена являлось присоединение полученного конъюгата к полимерной матрице – ПНФА с последующей деактивацией п-нирофенильных групп путем введения раствора аммиака. Присоединение конъюгата к полимеру соответствовало 4–10 молям макромолекулы на моль ПНФА. Схема синтеза комплекса иммуногена на примере конъюгата с ГГЧ приведена на рис. 1.

В синтезированных иммуногенах, являющихся прототипом субстанции вакцины, проводили оценку антигенных участков связывания с точки зрения их специфичности и доступности. Для этого использовали метод иммуоферментного анализа (ИФА). В качестве инструмента выбрана иммунная сыворотка, содержащая антитела к опиатам. Для каждого варианта конструкции синтетического иммуногена выбирали диапазон концентраций, при котором наблюдается прямо пропорциональная зависимость изменения OP_{450} в ИФА от разведения антигена, иммобилизованного на планшете (таблица).

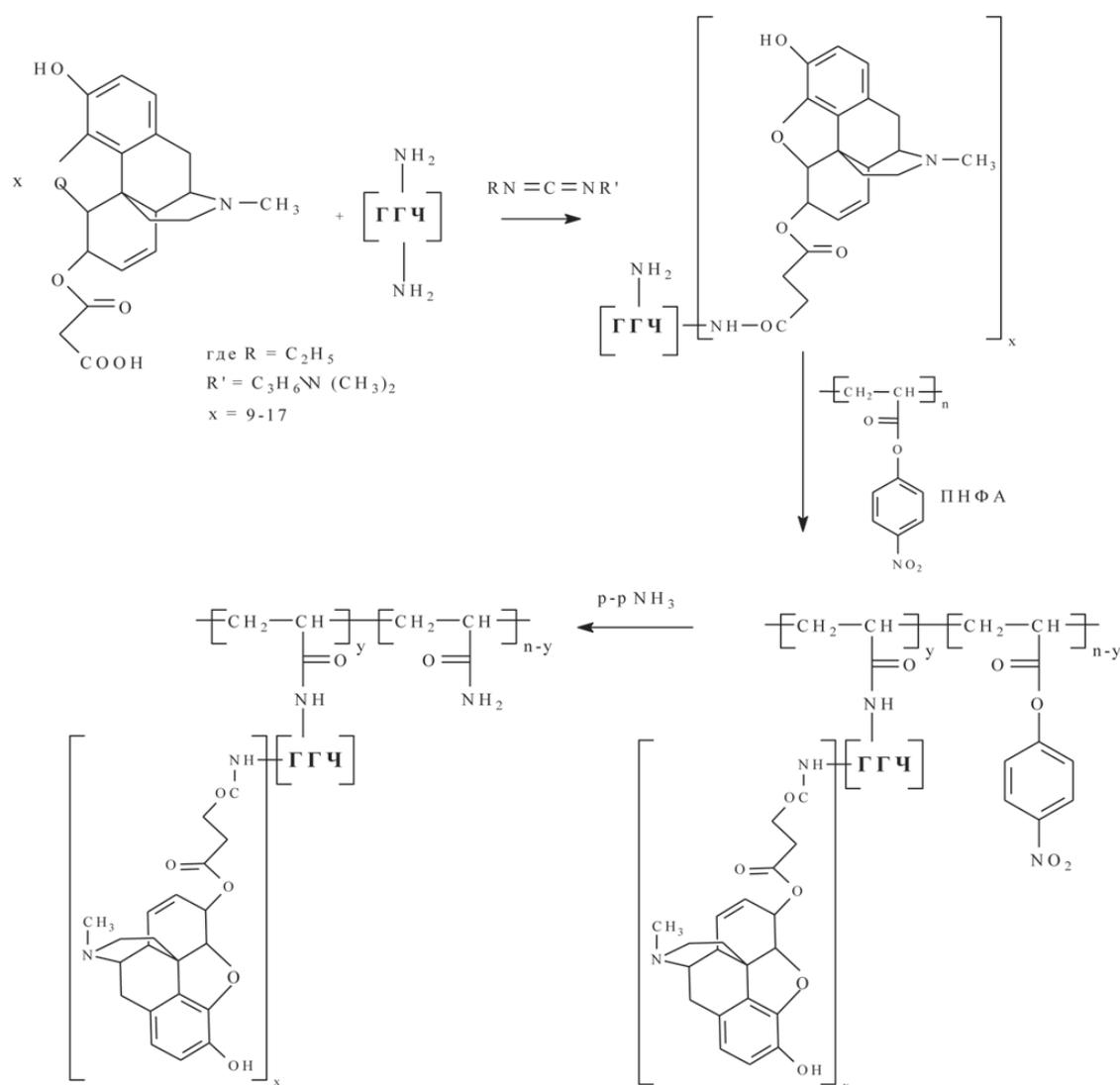


Рис. 1. Схема синтеза комплекса синтетического иммуногена М-ГГЧ с полимерным носителем ПНФА

Иммуноферментный анализ специфических антител для различных вариантов синтезированных иммуногенов

№ п/п	КМНГ – конъюгат макромолекулярного носителя с гаптеном	Соотношение гаптен: носитель	Соотношение полимер: КМНГ	Оптимальные концентрации комплекса синтетического иммуногена в ИФА, мкг/мл
1	М-ГГЧ	17:1	1:10	1–8
2	М-ГГЧ	9:1	1:10	1–5
3	М-ЧСА	5:1	1:10	1–3
4	М-ЧСА	15:1	1:10	1–4
5	М-ЧСА	15:1	1:4	1–2

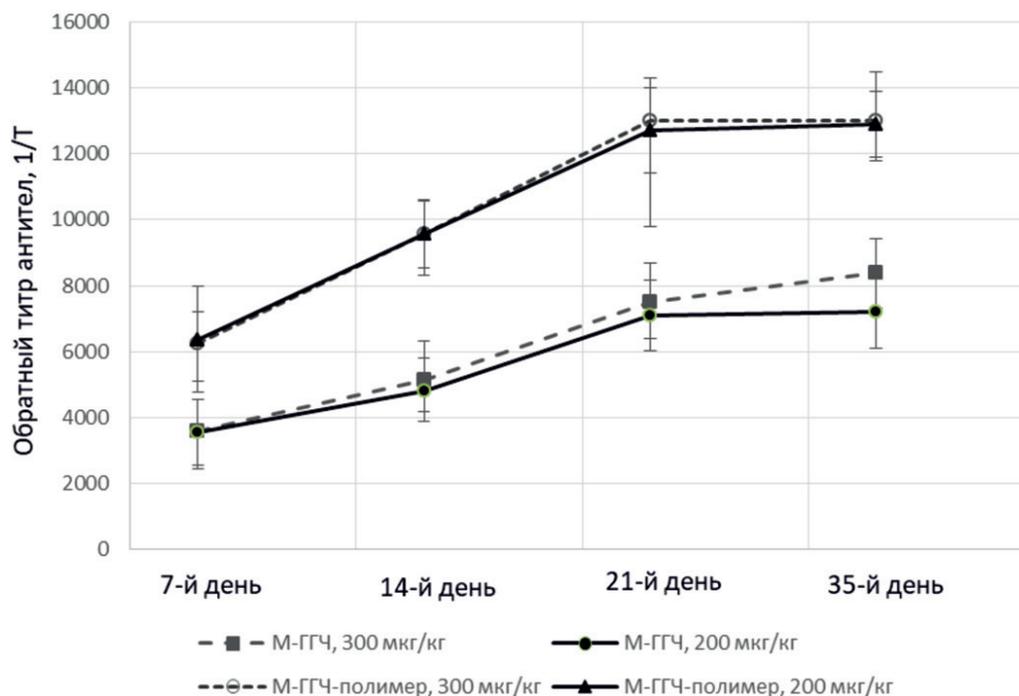


Рис. 2. Обратный титр антител при иммунизации комплексом М-ГГЧ-полимер и конъюгатом М-ГГЧ (средняя геометрическая обратного титра антител \pm 95% доверительный интервал)

Для иммуногенов, состоящих из конъюгатов ГГЧ, содержащих гаптен в соотношении 9–17 молей морфина на моль ГГЧ, установлен оптимальный диапазон концентраций 1–8 мкг/мл для комплекса № 1 и 1–5 мкг/мл для комплекса № 2. Установлено, что антигенные детерминанты доступны для взаимодействия с антителами и не экранируются при получении комплекса с синтетическим полимерным носителем при соотношении 1:10 соответственно. Наиболее важное значение в этом случае имеет исходное насыщение гаптенем ГГЧ. Так при сравнении результатов ИФА, полученных при выборе диапазона концентраций для комплексов (№ 1 и № 2), в состав которых входят конъюгаты ГГЧ с содержанием морфина в соотношении 9 и 17 молей гаптена на моль белка, наблюдается сужение диапазона концентраций (1–5 мкг/мл). Эти факты свидетельствуют о снижении доступности антигенных детерминант для связывания с антителами. Аналогичные исследования выполнены для комплексов № 3, 4 и 5, состоящих из конъюгатов ЧСА, содержащих в своем составе 5 и 15 молей гаптена на моль ЧСА. Для комплекса № 3 отмечено сужение интервала концентраций в ИФА по сравнению с иммуногеном № 4. Исследованы комплексы, различающиеся соотношением связывания с синтетическим по-

лимером (1:10 для комплекса № 4 и 1:4 для комплекса № 5). Установлен оптимальный диапазон концентраций в ИФА, составляющий 1–4 мкг/мл и 1–2 мкг/мл соответственно. Полученные результаты показывают сужение диапазона концентраций в два раза при более низком связывании с полимером, что свидетельствует об изменении доступности антигенных детерминант.

Иммуногенная активность и способность продуцировать специфические антитела была изучена в опытах на животных (крысы) для комплекса конъюгата (М-ГГЧ в соотношении 17:1) с замещением 1:10 полимерной матрицы. Сравнивали способность конъюгатов М-ГГЧ и комплексов М-ГГЧ-полимер вызывать выработку антител у животных. Обратные титры антител, полученные при иммунизации конъюгатами и комплексами в двух дозах, представлены на рис. 2.

Установлено, что иммунизация животных комплексом полимера и конъюгата, обеспечивает более высокий титр антител при меньших дозах введения. Титр антисыворотки на 35-й день при дозе М-ГГЧ 300 мкг/кг составил в среднем 1/8280, а при введении 200 мкг/кг М-ГГЧ-полимер титр достиг большего значения (в среднем 1/12350) уже на 21-й день от начала иммунизации. Использование разработанного иммуногена

позволяет снизить вводимую дозу и достичь высокого титра антител, применяя меньшее количество иммунизаций.

Таким образом, при разработке синтетического иммуногена вакцины для лечения опиоидной наркозависимости выбраны и оптимизированы основные параметры конструкции иммуногена. Установлены соотношения гаптена, который является эпитопом выработки специфических антител, макромолекулярного носителя и полимерной матрицы. По результатам ИФА определена доступность и специфичность эпитопов синтетических иммуногенов. Оптимальный диапазон взаимодействия белка и гаптена (морфин) при получении иммуногена находятся в соотношения 9–17 (для гамма-глобулина человека) и 5–15 (для сывороточного альбумина человека) молей гаптена на моль белка. При этом связывание полимера с конъюгатом составило от 1:4 до 1:10. Комплексы данного состава будут использоваться в дальнейшей разработке лекарственного средства при проведении доклинических исследований.

Список литературы

1. Вакцины для лечения и профилактики зависимости от наркотиков / В.С. Морозова [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 4. – С. 68–75.
2. Joel E. Schlosburg, Leandro F. Vendruscolo, Dynamic vaccine blocks relapse to compulsive intake of heroin. *PNAS*, 2013, vol. 110, no. 22, pp. 8751–8752.
3. Kosten T.A., Shen X.Y., O'Malley P.W., Kinsey B.M., Lykissa E.D., Orson F.M., Kosten T.R. A conjugate-morphine vaccine attenuates the behavioral effect of in rats. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*, 2013, vol. 1, no. 45, pp. 223–229.
4. Брен Е.А. Сравнительный опыт определения наркотических веществ в России и за рубежом / Е.А. Брен, М.А. Мягкова // *Вопр. нарк.* – 2011. – № 1 – С. 7–14.
5. Зобин М.Л. Ремиссии при опиоидных наркоманиях / М.Л. Зобин, А.Ю. Егоров // *Психическое здоровье.* – 2006. – № 10. – С. 36–41.
6. Flares A., Matas M., Marin R., Hernandez J.A., Leff P. Vaccines against morphine and its use as medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. *Hum Vaccines*, 2009, vol. 5, no. 4, pp. 214–229.
7. Matyas G.R., Rice K.C., Cheng K., Li F., Antoline J.F., Jacobson A.E., Mayorov A.V., Beck Z., Torres O.B., Alving C.R. Facial recognition of heroin vaccine opiates: type 2 cross-reactivities of antibody induced by hydrolytically stable of heroin, 6-acetylmorphine, and morphine. *Vaccin*, 2014, vol. 32, no. 13, pp. 1473–1479.
8. Laurenzana E., Hendrickson D., Carpenter E. Functional determinants affecting the duration of action anti-(+)-methamphetamine monoclonal antibodies in rats. *Vaccin*, 2009, vol. 27, no. 50, pp. 7011–7020.
9. Escobir-Chavez J.J., Domanguez-Delgado C.C., Rodriguez-Cruz C.M. Targeting nicotine addiction: the possibility of a therapeutic vaccine. *Drug Des Devel Ther*, 2011, vol. 5, pp. 211–224.
10. Andrenyak D.M., Moody D.E., Koob G.F., Janda K.D., RicartArbona R.J., Lephed M.L., Crystal R.G. Fate of systemically administered coca in human primates treated with the dAd5GNE anticoca vaccine. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2014, vol. 25, no. 1, pp. 40–49.