

甲基苯丙胺疫苗的研究进展

朱 喆 廖泫栋 曾发明 李映波

摘 要 甲基苯丙胺成瘾是一个日益严重的公共卫生问题,但却没有有效的治疗措施。甲基苯丙胺相对分子质量较小,无免疫原性,将甲基苯丙胺类似半抗原与大分子载体蛋白偶联制成疫苗,能够刺激机体产生甲基苯丙胺特异性抗体,减少或减慢甲基苯丙胺通过血-脑脊液屏障,从而减弱其产生的效应。甲基苯丙胺疫苗在甲基苯丙胺治疗和防止复吸方面具有很大的潜力。本文综述了甲基苯丙胺疫苗的作用机制、研究现状及疫苗设计时应考虑的因素。

关键词 甲基苯丙胺 治疗 疫苗

中图分类号 R392

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.006

近年来,滥用合成精神药物对社会造成了巨大的健康负担。甲基苯丙胺(methamphetamine, METH)是合成苯丙胺类药物的一种,苯丙胺类兴奋剂滥用是一个全球性的现象,在过去的10年里,苯丙胺类兴奋剂的使用明显增长。METH和其他苯丙胺类兴奋剂对中枢神经系统的影响包括情绪增强、自尊改变、警觉性增加、攻击性和性欲加强等;此外,滥用METH导致心血管和脑血管病变的发生率增加^[1]。METH对多巴胺信号通路的影响主要是由于其强大的奖赏效应即成瘾性^[2]。

METH作为一种新型合成毒品,是世界上滥用十分广泛的非法药物。目前没有批准可用于治疗METH成瘾的药物,而主要采用行为疗法进行治疗,但效果欠佳。关于METH成瘾的药物研发主要靶向于受METH影响的受体或神经递质系统。潜在的药物治疗通常因严重的药物相互作用和药物不良反应谱而复杂化,以及METH成瘾者由于使用METH而导致的结果例如睡眠中断、饮食行为改变等而在临床评估时降低了其药物依从性和功效^[3]。此外,METH戒断患者的复发率高,这对METH成瘾的有效治疗是一个重大的挑战。迄今为止,针对可卡因、尼古丁及阿片类药物疫苗的研究已被证明能够有效衰减相关药物的反应,并且关于可卡因及尼古丁疫苗的临床试验也在进行^[4,5]。这些疫苗的研究成果也激励了METH疫苗的研发。

一、疫苗作为治疗 METH 成瘾的策略

能够使机体产生特异性免疫反应的抗原的最小分子质量是10000。而METH的相对分子质量小,不能被免疫系统识别,因此其本身不具免疫原性。将其进行结构修饰即通过一段连接的基团与大分子的蛋白偶联后,免疫系统能够识别并产生特异性抗体。当METH进入机体,抗体可与METH结合,在循环系统内形成抗体-METH复合物,形成的复合物相对分子质量大以至于无法穿过血-脑脊液屏障,因此,会降低METH进入大脑的速率和数量,然后抗体结合的药物再在平衡状态下从抗体结合缓慢释放作为残留的游离药物被代谢和消除。降低METH进入大脑的速率和数量应该减弱其引起的行为效应,包括奖赏效应。研究显示血液中的抗METH抗体通过减少和减慢METH进入血-脑脊液屏障,阻断由METH诱导的自发活动、体温调节和精神运动,并抑制其自我给药^[6-9]。

此外,疫苗不同于传统的治疗药物成瘾的药物,其不会阻止药物与特定的神经元受体结合以对抗药物的效应,与此药效学的方法相反,抗药物抗体是降低多器官系统特别是大脑中可用药物浓度的药代动力学拮抗剂^[10]。由于抗METH抗体本身不调节脑内或周围的药物受体,它们的不良反应是最小的^[11]。疫苗免疫可以通过免疫系统提供长期的抗体保护,其刺激免疫系统产生的IgG抗体半衰期长,它们的作用时间比小分子长得多^[12]。尽管对于微生物疫苗这种保护可以维持数年数十年,而小分子疫苗的研究目前显示每次加强免疫后仅能维持几周到几个月,但相比其他治疗方法,疫苗仅需数次接种便可以替代每日的药物剂量,更为经济有效且具有最好的患者依从

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所生物制品五室(朱喆、李映波);650228 昆明,云南省公安厅毒品分析及禁毒技术公安部重点实验室(廖泫栋、曾发明)

通讯作者:李映波,研究员,电子邮箱:lyb@imbcams.com

性^[12]。类似 METH 的结合疫苗是通用的,理论上可以设计为靶向任何药物或药物组合。

二、METH 疫苗的研究现状

1. 以血蓝蛋白作为载体蛋白:Miller 等^[13]研究发现以钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)为载体蛋白偶联 METH 半抗原(MH6)的抗 METH 疫苗(MH6-KLH)免疫大鼠,可以阻断由 METH 诱导的体温调节和精神运动,并且减少由 METH 引起的自发活动;对疫苗组与对照组大鼠的药代动力学研究显示其血清中 METH 浓度更高,且脑内 METH 浓度更低,并且每只小鼠中 METH 的浓度与其自身抗体效价相关。之后研究人员用该候选疫苗接种大鼠模型,发现其能够抑制 METH 的自我给药,并且在维持期间产生了瞬时的和剂量依赖性的自我给药效应。与对照组比较,MH6-KLH 接种大鼠血液中 METH 浓度在急性 METH 注射后更高,且与抗体效价呈正相关^[9]。表明主动免疫能够减弱 METH 的生理和行为效应。

Hambuchen 等^[2]合成一种新的类 METH 半抗原 METH-SO09,和免疫血蓝蛋白单体(immunocyanin monomers of Keyhole limpet hemocyanin, ICKLH)偶联制成 METH 偶联疫苗 ICKLH-SO09,然后和抗 METH 单克隆抗体 mAb7F9 联合使用,在大鼠中检测其安全性和潜在的治疗效果,联合抗体治疗安全地实现早期的高抗 METH 抗体应答,并且在整个研究中一直存在,即使在 4 个月后,METH 疫苗抗体仍能显著降低由 0.56mg/kg 剂量产生的 METH 脑内浓度^[2]。抗 METH 单克隆抗体虽然昂贵但却是有效的,它在人体内的半衰期为 3~4 周,通过加量控制能够实现可预测的抗体浓度来对 METH 引发的效应产生潜在的即时保护作用^[14]。通过 2~3 个月或者更长时间的 METH 偶联疫苗的定时主动免疫可延长血液循环中抗 METH 多克隆抗体的浓度^[4]。然而,在主动免疫所需的时间段内,患者没有达到有效的抗 METH 多克隆抗体的保护水平,甚至在血液中的最大抗 METH 多克隆抗体最终浓度也远低于用单克隆抗体实现的水平^[15]。事实上,不稳定的多克隆抗体浓度被认为是尼古丁和可卡因结合疫苗 2 期临床试验失败的主要原因^[16, 17]。结合由抗 METH 单克隆抗体药物提供及时高水平的保护以及由 METH 结合疫苗提供长时间持续的多克隆抗体反应可为患者提供互补的治疗优势,在 METH 复发的关键时间由两种治疗方式共同增加免疫应答。在可卡因及尼古丁疫苗

研究中,在大鼠中联合主动免疫和单克隆抗体的治疗方式与单种治疗方式比较,其总体疗效均有所提高^[5, 18]。METH 疫苗与抗 METH 的单克隆抗体适时适当的联合使用来治疗 METH 成瘾可能比单独的疫苗使用效果好,可以成为一种较好的治疗策略。

2. 以破伤风类毒素(tetanus toxoid, TT)作为载体:研究人员通过半抗原的设计、佐剂、载体蛋白和配方的优化,得到其效果最佳的疫苗。最优的半抗原设计是通过 METH 结合 H-Gly-O^tBu 后脱保护得到的,然后与 TT 偶联,与铝佐剂或者 CpG ODN 联合免疫,在小鼠中产生强大的抗 METH 免疫反应,减少由 METH 诱导的运动活性^[8]。Haile 等^[7]合成 METH 半抗原琥珀酰 METH(succinyl-methamphetamine, SMA),与破伤风类毒素偶联为 SMA-TT,然后吸附于氢氧化铝制成 METH 疫苗,其选用破伤风类毒素作为载体蛋白,用氢氧化铝作为佐剂的目的是可用于人类。将疫苗免疫小鼠来评估其产生抗 METH 抗体、改变条件位置反射获得和恢复以及阻止 METH 脑渗透的能力。研究发现该疫苗刺激产生抗体,减弱条件位置反射的获得和恢复,并且疫苗组小鼠很大比例表现出条件位置厌恶,并且,与对照组比较降低了 METH 脑内的水平。该研究结果支持可进一步开发能够应用于人类的 METH 疫苗。

3. 其他载体:Carroll 等^[19]合成巯基半抗原(S)-(+) - 3-(9-羧基甲氧基)甲基苯丙胺,与马来酰亚胺激活的蛋白偶联生成 METH 疫苗,半抗原在卵清蛋白和牛血清蛋白两种载体上具有高度可控的表位密度,在小鼠中产生较好的免疫反应,并且由该疫苗在小鼠中产生的单克隆抗体显示出非常高的亲和力。该半抗原显示出的与活性载体蛋白的高效共价偶联表明,该方法对大规模生产 METH 疫苗具有成本效益。

一种 METH 疫苗是通过将 METH 半抗原通过共价连接到包含了构象位移的,选择性反应的分子佐剂 YSFKPMPLaR (EP54)的肽结构上而设计的。将包含有 EP54 佐剂的 METH 疫苗免疫大鼠后产生了 METH 特异性的血清抗体,这是改变 METH 自我给药的首要条件;免疫增加了 METH 自我给药的药代动力学拮抗作用;在 METH 自我给药期间和不久之后免疫血清结合 METH 修饰的靶蛋白的能力显著下降,说明游离的 METH 被有效结合^[20]。

三、影响 METH 疫苗效力的因素

任何小分子活性疫苗的成功是由 3 个因素密切

决定的:抗体特异性、亲和力和抗体效价^[12];而疫苗制剂的功效可通过几个参数改变,包括用于刺激免疫反应的载体蛋白、加强免疫原性的佐剂、半抗原的设计以及与载体蛋白偶联的化学结构。

METH 疫苗由一个 METH 类似半抗原与载体蛋白偶联形成。METH 类似半抗原由 METH 骨架分子结构在一个位点连接间隔基团,连接体的另一端终止于能容易形成抗原载体蛋白的共价连接的官能团。连接体还用于将半抗原与载体蛋白间隔在最佳距离,以最大限度地提高对 METH 的亲和力和特异性^[19]。连接体两端形成的化学键和该间隔臂的长度(如 9 个碳原子)对免疫应答的质量[亲和力和特异性(METH)和数量(即抗体量)]至关重要^[21],因此半抗原的设计就显得尤为关键,需要尽可能保留药物的天然化学结构以产生具有最高药物亲和力的抗体,显然,连接体的加入改变了其结构,但可以进行战略性的设计最大限度地减少关键药物功能的破坏。在 METH 中,保留仲胺是获得高亲和力抗 METH 抗体的必要条件,含有叔胺或酰胺的半抗原未能产生有效的药物结合抗体,此外,对于连接体的选择更偏向肽段而不是采用烷基连接^[8,22,23]。

研究人员合成一系列的 METH 半抗原,利用一段不同氨基酸,不同肽链长度的一段多肽与载体蛋白相连,来研究连接器的效应,发现这些参数中的每一个的独立变化都会导致疫苗接种诱导的抗体的数量和质量的改变;结果发现包含一种结构简单的氨基酸连接器的 METH 疫苗有利于限制 METH 通过血-脑脊液屏障进入脑^[24]。Moreno 等^[25]通过分子模拟系统生成一系列靶向最稳定的 METH 构象的半抗原设计,然后将合成的半抗原与 KLH 偶联,免疫小鼠后进行血清学分析,发现不同的半抗原设计所产生的抗体效价与抗体亲和力均不同。一系列的比较研究证明了半抗原设计对于药物滥用疫苗的重要性,半抗原的设计对于免疫识别至关重要,因为它影响靶抗原的递呈,进而影响免疫反应的质量;半抗原必须能够代表真正的小分子药物,其诱导的免疫反应才能够针对目标药物。

载体蛋白是偶联疫苗的重要组成部分,因为它是 T 细胞表位的来源。这些表位是通过抗原递呈细胞激活 T 细胞所必需的,而活化的 T 细胞可以刺激 B 细胞,即 T 辅助细胞。这些细胞之间的同源相互作用通过 MHC II 递呈与 T 细胞表位相关的半抗原而发生。MHC II 递呈首先是免疫交联物的摄取和胞内蛋

白水解消化,B 细胞对免疫偶联物的一个重要处理过程是半抗原对多个 B 细胞受体的交联作用。所以需要足够程度的载体蛋白半抗原,即表位密度,以诱导有效的 B 细胞受体交联用于下游募集 T 辅助细胞^[11]。很少有研究比较各种蛋白质作为小分子半抗原载体的功效,在海洛因疫苗研究中发现免疫原性的趋势为 KLH < 白喉类毒素 < TT。Stevens 等^[11]通过对具有不同半抗原密度的 METH 疫苗的比较显示,每 KLH 单体在 13 和 23 个半抗原密度范围之间测试的没有显示出显著的差异,但最大平均抗体浓度是由最高半抗原密度的疫苗 ICKLH-SMO9₂₃引起的。

疫苗优化的一个领域是佐剂的选择,用于通过增加局部炎症、刺激抗原递呈细胞和充当仓库来增强局部免疫应答。Arora 等^[23]用 SMA-TT 联合氢氧化铝佐剂诱导小鼠产生抗体并能够减弱条件位置反射的获得和恢复。该研究组又用相同的 METH 疫苗 SMA-TT 配伍 E6020 佐剂(一种 Toll 样受体 4 激动剂),在最适剂量下抗体的峰值水平较铝佐剂增加了 2 倍,接种疫苗的小鼠水平活动明显减少,但对垂直活动以及条件位置偏爱无明显影响。在对 ICKLH-SMO9 疫苗佐剂的优化研究中,分别用氢氧化铝、SAS (Sigma adjuvant system, SAS)、GLA-SE (glucopyranosyl lipid A - stable emulsion, GLA-SE)作为佐剂比较有明显差异,免疫效果 GLA-SE > SAS > 氢氧化铝,但产生的抗体亲和力没有受到影响^[11]。相同的疫苗与不同佐剂配伍的免疫结局是不同的,佐剂研究在 METH 疫苗的研发中是不可缺少的一部分。

METH 疫苗需要相当高的效价水平以达到有效性,因为必须阻断大量的药物以阻止药物引起的效应。相反,针对病原体的疫苗对阻止感染的滴度要求较低。因此,不仅需要考虑半抗原的设计以及载体蛋白的选择,疫苗的免疫方式、剂量以及免疫时间表也会影响疫苗的效力。结合接种疫苗通常注射 3 次,每次注射间隔 2~4 周。效价在注射后 2~4 周达到高峰,在下次注射前的 2~3 个月衰退。

四、展 望

疫苗为治疗 METH 成瘾提供了一个新的途径,在无相关有效药物治疗的情况下,是一个很值得考虑的治疗方法。虽然这些疫苗在临床前显示出较好的效果,但这些研究成果还未能转化到临床研究,所以努力提高疫苗的效力特别是疫苗的免疫原性是势在必行的。发展新的半抗原合成策略,使用免疫原性更强并且特征良好的载体,更好的佐剂以及一些尖端的

生物材料将会生产出更为有效的下一代 METH 疫苗。除了疫苗,其他生物制品如抗药物单克隆抗体及其他药物的研究也正在进行临床前及临床研究^[10]。在研究中可以将疫苗、抗药物单克隆抗体和(或)药物作为联合疗法,以规避每个单独的治疗方法的缺点或针对特定患者群体的个体化治疗。在研究和评估潜在候选疫苗时,研究人员应该考虑性别对疫苗免疫原性的影响,这已经在可卡因疫苗的相关研究中提出。此外,药物遗传学也可能影响疫苗的效果,例如,具有多巴胺 β -羟化酶基因变体的个体(其降低胸径水平)对可卡因疫苗的治疗效果比具有正常多巴胺 β -羟化酶水平更好。应用药物遗传学原理并识别相关的遗传亚群将在未来的试验中发挥一定的作用。

参考文献

- Morais APD, Pita IR, Fontes-Ribeiro CA, *et al.* The neurobiological mechanisms of physical exercise in methamphetamine addiction [J]. *CNS Neurosci Therapeut*, 2018, 24(2):85-97
- Hambuchen MD, Carroll FI, Ruedi-Bettschen D, *et al.* Combining active immunization with monoclonal antibody therapy to facilitate early initiation of a long-acting anti-methamphetamine antibody response[J]. *J Med Chem*, 2015, 58(11):4665-4677
- Hermansteyne KA, Santos GM, Vittinghoff E, *et al.* Event-level relationship between methamphetamine use significantly associated with non-adherence to pharmacologic trial medications in event-level analyses[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2014, 143:277-280
- Zhao Z, Harris B, Hu Y, *et al.* Rational incorporation of molecular adjuvants into a hybrid nanoparticle-based nicotine vaccine for immunotherapy against nicotine addiction[J]. *Biomaterials*, 2018, 155:165-175
- Carrera MR, Ashley JA, Zhou B, *et al.* Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11):6202-6206
- Gentry WB, Ruedi-Bettschen D, Owens SM. Anti-(+)-methamphetamine monoclonal antibody antagonists designed to prevent the progression of human diseases of addiction[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2010, 88(3):390-393
- Haile CN, Kosten TA, Shen XY, *et al.* Altered methamphetamine place conditioning in mice vaccinated with a succinyl-methamphetamine-tetanus-toxoid vaccine[J]. *Am J Addict*, 2015, 24(8):748-755
- Collins KC, Schlosburg JE, Bremer PT, *et al.* Methamphetamine vaccines: improvement through hapten design[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(8):3878-3885
- Miller ML, Aarde SM, Moreno AY, *et al.* Effects of active anti-methamphetamine vaccination on intravenous self-administration in rats[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2015, 153:29-36
- Stevens MW, Henry RL, Owens SM, *et al.* First human study of a chimeric anti-methamphetamine monoclonal antibody in healthy volunteers[J]. *MAbs*, 2014, 6(6):1649-1656
- Stevens MW, Gunnell MG, Tawney R, *et al.* Optimization of a methamphetamine conjugate vaccine for antibody production in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 35:137-141
- Heekin RD, Shorter D, Kosten TR. Current status and future prospects for the development of substance abuse vaccines[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2017, 16(11):1067-1077
- Miller ML, Moreno AY, Aarde SM, *et al.* A methamphetamine vaccine attenuates methamphetamine-induced disruptions in thermoregulation and activity in rats[J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(8):721-728
- Hambuchen MD, Ruedi-Bettschen D, Gunnell MG, *et al.* Chronic treatment of (+)-methamphetamine-induced locomotor effects in rats using one or a combination of two high affinity anti-methamphetamine monoclonal antibodies[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(9):2240-2248
- Hambuchen MD, Ruedi-Bettschen D, Williams DK, *et al.* Treatment of rats with an anti-(+)-methamphetamine monoclonal antibody shortens the duration of action of repeated (+)-methamphetamine challenges over a one month period[J]. *Vaccine*, 2014, 32(47):6213-6219
- Tonstad S, Heggen E, Giljam H, *et al.* Nicotine(R), a nicotine vaccine, for relapse prevention: a phase II, randomized, placebo-controlled, multicenter clinical trial[J]. *Nicotine Tob Res*, 2013, 15(9):1492-1501
- Kosten TR, Domingo CB, Shorter D, *et al.* Vaccine for cocaine dependence: a randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2014, 140:42-47
- Cornish KE, Harris AC, LeSage MG, *et al.* Combined active and passive immunization against nicotine: minimizing monoclonal antibody requirements using a target antibody concentration strategy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11):1809-1815
- Carroll FI, Abraham P, Gong PK, *et al.* The synthesis of haptens and their use for the development of monoclonal antibodies for treating methamphetamine abuse[J]. *J Med Chem*, 2009, 52(22):7301-7309
- Duryee MJ, Bevins RA, Reichel CM, *et al.* Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines[J]. *Vaccine*, 2009, 27(22):2981-2988
- Ino A, Dickerson TJ, Janda KD. Positional linker effects in haptens for cocaine immunopharmacotherapy[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(15):4280-4283
- Shen XY, Kosten TA, Lopez AY, *et al.* A vaccine against methamphetamine attenuates its behavioral effects in mice[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2013, 129(1-2):41-48
- Arora R, Kosten TA, Bennett RS, *et al.* Preclinical efficacy of an anti-methamphetamine vaccine with an E6020 adjuvant[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2015, 146:e211
- Gooyit M, Miranda PO, Wenthur CJ, *et al.* Influencing antibody-mediated attenuation of methamphetamine CNS distribution through vaccine linker design[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8(3):468-472
- Moreno AY, Mayorov AV, Janda KD. Impact of distinct chemical structures for the development of a methamphetamine vaccine[J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(17):6587-6595

(收稿日期:2018-08-30)

(修回日期:2018-09-20)