

**ИСКУССТВЕННЫЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ
С ГАПТЕНАМИ-АНАЛОГАМИ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
И ТОКСИКАНТОВ: ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ
И УВЕЛИЧЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ**

Козлов В.К.^{1,2*}, Беспалов А.Я.¹, Кашуро В.А.^{2,3,4}, Батоцыренова Е.Г.^{2,3},

¹ *ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова
ФМБА России», 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева д.1;*

² *ФГБОУВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 190000, Санкт-
Петербург, Менделеевская линия д. 2;*

³ *ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский
университет» Минздрава России, 194100, Российская Федерация, Санкт-Петербург, ул.
Литовская, д.2.;*

⁴ *ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена»,
191186, Российская Федерация, Санкт-Петербург, наб. реки Мойки, д.48.*

*e-mail: kvk52@mail.ru

Резюме. Сформулированы основные представления об антигенах, описаны их типы, качества и свойства, молекулярные представления об иммунохимической специфичности и иммуногенности. Проанализированы условия, при которых низкомолекулярные ксенобиотики в составе конъюгированных антигенов приобретают свойства инициировать иммунный ответ с образованием специфических иммуноглобулинов и иммуноцитов. Детально рассмотрены принципы конструирования конъюгированных антигенов с гаптенами лекарственных и токсичных ксенобиотиков, обеспечивающие их высокую иммуногенность. Приведены варианты оптимальных макромолекулярных носителей гаптенных эпитопов, рассмотрены методы химического конъюгирования применительно к наличию в целевых лигандах реакционно-способных (функциональных) химических групп.

Ключевые слова: конъюгированные антигены, антигенность (иммуногенность), гаптенные детерминанты, иммунохимическая специфичность, психоактивные вещества и токсиканты в качестве гаптенов, макромолекулярные носители, методы конструирования молекулярных вакцин, методы химического конъюгирования.

**HAPTEN-CARRIER CONJUGATES WITH HAPTENS-ANALOGUES
OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES AND TOXICANTS:
PRINCIPLES FOR DESIGNING AND INCREASING IMMUNOGENICITY**

Kozlov V.K.^{1,2*}, Bespalov A.Ya.¹, Kashuro V.A.^{2,3,4}, Batotsyrenova E.G.^{2,3}

¹ Scientific and clinical center of toxicology named after academician S.N. Golikov FMBA of Russia 192019, St. Petersburg, st. Bekhtereva 1.;

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, Mendeleevskaya line 2;

³ St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of Russia, 194100, Russian Federation, St. Petersburg, st. Lithuanian 2;

⁴ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Russian State Pedagogical University. A.I. Herzen 191186, Russian Federation, St. Petersburg, emb. Moika River, 48.

**e-mail: kvk52@mail.ru*

Summary. The basic ideas about antigens are formulated, their types, qualities and properties, molecular ideas about immunochemical specificity and immunogenicity are described. The conditions under which low molecular weight xenobiotics in the composition of conjugated antigens acquire the properties to initiate an immune response with the formation of specific immunoglobulins and immunocytes are analyzed. The principles of construction of conjugated antigens with haptens of medicinal and toxic xenobiotics, which ensure their high immunogenicity, are considered in detail. Variants of optimal macromolecular carriers of hapten epitopes are presented, methods of chemical conjugation are considered in relation to the presence of reactive (functional) chemical groups in the target ligands.

Key words: conjugated antigens, antigenicity (immunogenicity), hapten determinants, immunochemical specificity, psychoactive substances and toxicants as haptens, macromolecular carriers, methods for constructing molecular vaccines, methods of chemical conjugation.

Введение

Одна из основных функций иммунной системы заключается в обеспечении постоянства антигенного состава организма, что подразумевает идентификацию как «своего», так и «чужого», распознавание «чужого» в качестве объекта для ответа, а также специфическую инактивацию «чужого» и его удаление из организма. В общей иммунологии исчерпывающая характеристика «чужого» дается в представлении об антигенах или

иммуногенах. Как правило, антигены – это генетически чужеродные вещества с характерными для макромолекул определенного типа (белок, полисахарид, липополисахарид, гликопротеин, липопротеин, нуклеопротеин) и их комплексов химическими группировками – антигенными эпитопами, вызывающими в организме антителообразование и другие формы иммунного ответа, а также специфически взаимодействующими с активными центрами антител и антигенраспознающими рецепторами Т- или В-лимфоцитов.

Иммунная система контролирует как собственные или *эндогенные антигены*, отслеживая их измененные варианты, так и попадающие в организм извне антигены – *экзоантигены*. Как измененные собственные антигены, так и экзоантигены подвергаются иммунной элиминации с задействованием в осуществлении этого процесса различных факторов и механизмов. Иммунная система участвует также в обеспечении химического гомеостаза организма, включаясь в элиминацию молекул, в частности низкомолекулярных токсичных и фармакологически активных соединений, которые из-за малого размера не могут быть полноценными антигенами, но проявляют некоторые из антигенных свойств (например, специфичность) тогда, когда ковалентно соединяются (конъюгируются) с антигенами как гаптены. В этом случае антиген приобретает дополнительную специфичность за счет присоединения гаптенного эпитопа. Следует заметить, что прочное связывание гаптенных с эндогенными макромолекулами, в частности с белками с изменением их антигенной специфичности за счет гаптенного эпитопа может происходить в условиях *in vivo* (например, при биоконъюгации). Аналогичный результат может быть достигнут и в условиях *in vitro* с помощью методов химического ковалентного связывания – химического конъюгирования.

Представление о гаптенах и гаптенных эпитопах особого типа антигенов – конъюгированных антигенов имеет особое значение в иммунотоксикологии и иммунофармакологии как в контексте понимания принципов функционирования системы обеспечения химического гомеостаза организма и механизмов нарушений работы этой системы [1, 2, 3], так и в контексте возможностей практического использования подобных антигенов, которые фактически являются особым типом молекулярных вакцин [4, 5].

Основное предназначение конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами биологически активных веществ в медицинской практике – это их применение с целями либо создания искусственного иммунитета со специфичностью к целевому низкомолекулярному соединению путем активной иммунизации (фактически вакцинации, например при разработке иммунологического способа вторичной профилактики наркотической зависимости), либо применение этих антигенов для индукции образования специфических

антител *in vivo* у животных-доноров (сывороточных иммуноглобулинов) или же для активации продукции иммуноглобулинов *in vitro* клеточными культурами-продуцентами антител – гибридомами. Полученные таким образом специфичные антитела к гаптенам-аналогам биологически активных веществ затем используются как иммунохимические реагенты в различных методах индикации и количественного определения этих веществ.

Во всех вышеназванных случаях важно добиться интенсивного образования антител соответствующей специфичности, что достигается оптимизацией строения конъюгированных антигенов, в частности путем выбора адекватных макромолекулярных носителей и моделированием в их составе структуры гаптен-аналогов целевых соединений.

Детальное освещение перечисленных выше вопросов являлось целью предлагаемого вниманию заинтересованных специалистов исследования.

Антигены и иммуногены: свойства и качества, молекулярные характеристики специфичности

Антиген (англ. antigen от antibody-generator – «производитель антител») – *любая молекула, которая специфично связывается с антителом и при попадании в организм вызывает иммунный ответ.* Антигены, как правило, имеют естественное происхождение, чаще являются белками или полисахаридами и представляют собой структурные компоненты клеток или же продуцируемые ими продукты.

Типы антигенов. *Аутоантигены или аутологичные антигены* – это структурные компоненты клеток, тканей и органов собственного организма. Этот тип антигенов имеет эндогенное происхождение и уникально организованную специфичность (например, специфичность иммуноглобулинов сыворотки крови или же специфичность продуктов главного комплекса гистосовместимости). Все прочие антигены для организма являются *чужеродными антигенами*. Степень чужеродности антигенов определяется удаленностью друг от друга на общей эволюционной лестнице тех биологических видов, сравниваемые представители которых явились источником антигенов. Структурные компоненты клеток, тканей и органов других особей того же биологического вида будут являться по отношению друг к другу *гетерологичными антигенами*. Некоторые группы антигенов разных особей одного биологического вида (например, антигены человеческих эритроцитов лиц с идентичной группой крови, иммуноглобулины сыворотки крови людей) не являются чужеродными для всей человеческой популяции, а лишь для отдельных популяционных групп. В пределах определенных популяционных групп эти антигены выявляют групповую специфичность, выступая как *аллоантигены*.

Чужеродными антигенами для человека, безусловно, являются структурные компоненты микроорганизмов: вирусов, бактерий, низших грибов или же их продукты (например, бактериальные экзотоксины). Качества антигенов проявляют компоненты организмов особей, паразитирующих на представителях других биологических видов (например, простейших, гельминтов, членистоногих), или же их экскреты, а также компоненты растений (например, пыльца цветов и многих злаков позиционируется как аллергены из-за способности этих антигенов вызывать атопический /аллергический/ вариант иммунореактивности). Сильными антигенами являются токсины ядовитых змей, земноводных, рыб, моллюсков, насекомых. При определенных условиях в роли антигенов могут выступать отравляющие вещества, экотоксиканты и лекарственные препараты, проявляя *in vivo* свойства неполных (неполноценных) антигенов – гаптенов.

Полноценные антигены: молекулы представители. Считается, что качества и свойства полноценных антигенов (иммуногенов) проявляют молекулы, способные при попадании в организм вызывать комплекс ответных реакций иммунной системы – иммунный ответ или же иммунологическую толерантность [6, 7, 8, 9]. Эти молекулы распознаются элементами иммунной системы индивидуально (т.е. за их распознавание отвечают специфические антиген-распознающие рецепторы соответствующего клона лимфоцитов) [6, 7, 8, 10, 11, 12]. Способность специфически инициировать иммунореактивность организма – основная характеристика любого антигена (иммуногена).

К молекулам способным вызывать ответные реакции организма иммунного типа относятся белки растительного и животного происхождения, компоненты микроорганизмов – белки и липополисахариды, нуклеиновые кислоты; разнообразные искусственные макромолекулярные соединения – полипептиды, полимеры углеводов, полиэлектролиты. Иммунная система реагирует на названные молекулы по-разному, но все перечисленные выше вещества способны индуцировать специфическую иммунореактивность организма.

Качества и свойства полноценных антигенов. Для всех соединений, способных индуцировать иммунный ответ адаптивного типа с активным продуцированием специфических антител, характерен ряд общих качеств, в частности обладание достаточно высокой молекулярной массой (≥ 10000 дальтон /D/) и наличие полимерности – повторяемости структурных компонентов в строении молекулы в сочетании с разнообразием молекулярных участков, формирующих структуру антигена [7, 8, 10, 13, 14, 15, 16]. Для белковых и полипептидных антигенов существенным моментом в определении антигенных свойств их молекул является разнообразие аминокислотных остатков и присутствие ароматических аминокислот в полипептидной цепи [16, 17, 18].

Как антиген каждое вещество характеризуется несколькими свойствами:

чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью [7, 14]. *Чужеродность антигена* – это отличие конкретного антигена от другого конкретного антигена (например, альбумин сыворотки крови быка чужероден для человека, но не для других представителей этого вида жвачных животных). *Антигенность* – способность антигена вызывать тот или иной вариант иммунореактивности организма (например, бактериальные липополисахариды как антигены существенно превосходят гетерологичные альбумины сыворотки крови по способности индуцировать при первичном иммунном ответе на эти антигены образование антител IgM-класса). *Иммуногенность антигена* – способность антигена при иммунизации организма индуцировать всю совокупность реакций иммунного типа (т.е. создавать состояние иммунитета). Ранее этот термин использовался преимущественно для характеристики способности вакцин как биологических препаратов при активной иммунизации (вакцинации) искусственно формировать состояние невосприимчивости иммунизированной особи к инфекционному заболеванию.

В настоящее время термин иммуногенность чаще используется как синоним термина антигенность, что не совсем справедливо. Сегодня общепризнано, что иммуногенность антигенов ассоциирована с их чужеродностью. В свою очередь чужеродность детерминирована не только принадлежностью молекулы к определенному типу антигенов. Более значимыми носителями признаков чужеродности антигенов считается наличие в их молекулярной структуре патоген-ассоциированных молекулярных блоков (паттернов) (*Pathogen-associated molecular patterns* – PAMP) [7]. Эти части (сайты) антигена отвечают за инициацию процессов, составляющих конституционную основу иммунной защиты. Именно обладание PAMP-сайтами обеспечивает молекулам антигенов иммуногенность. Сильными иммуногенами являются те антигены, в структуре которых сочетаются участки антигена, ответственные за запуск механизмов приобретенного (адаптивного) иммунитета, с участками, которые ответственны за активацию врожденного (конституционного) иммунитета. Один и тот же участок определенных антигенов может выступать и как антигенный эпитоп, и как PAMP. У других же антигенов функции антигенных эпитопов и PAMP могут выполнять разные участки их молекул.

Специфичность антигена – это особенности организации молекулярной структуры конкретного антигена, которые позволяют иммунной системе определять его отличие от других антигенов. Специфичность антигена обуславливает специфичность индуцированного антигеном антителообразования и специфичность клонов эффекторных Т-лимфоцитов, которые пролиферируют и дифференцируются при реализации иммунного ответа на этот антиген.

Детерминанты (эпитопы) антигенной специфичности. Носителем свойства

специфичности является характерный участок молекулы антигена – *антигенный эпитоп* или *детерминанта антигенной (иммунохимической) специфичности* [7, 14]. Один конкретный антиген может обладать многими антигенными эпитопами, между которыми существует определенная иерархия (т.е. антиген имеет один иммунологически доминирующий эпитоп и другие, иммунологически менее значимые, эпитопы). Антигенный эпитоп комплементарен активному центру специфичных антител, а также антигенным рецепторам В- и Т-лимфоцитов. Антигенные рецепторы В- и Т-лимфоцитов взаимодействуют с разными антигенными эпитопами (т.е. их антигенная специфичность различна), но взаимодействие реализуются по единому принципу молекулярной комплементарности.

Антигенные эпитопы белков могут быть линейными и конформационными. В-лимфоциты и антитела распознают конформационные эпитопы антигена. Антигенные рецепторы Т-лимфоцитов в основном специфичны в отношении линейных и относительно коротких пептидных эпитопов белков. У полисахаридов роль антигенных эпитопов выполняют концевые моносахара полисахаридного остова и дисахара боковых цепей их молекул. Липиды и нуклеиновые кислоты как антигены эффективны лишь в составе комплексов с белками [19]. Роль антигенных эпитопов могут играть также различные молекулярные включения в структуру антигенов (например, низкомолекулярные соединения могут выступать как эпитопы со специфичностью гаптенов (гаптенные эпитопы), которые при определенных условиях могут быть иммунологически доминантными иммунохимическими детерминантами антигена).

Долгое время считалось, что иммунный ответ в форме образования специфических антител возможен исключительно в ответ на чужеродные макромолекулы и надмолекулярные структуры. В первую очередь это касается структурных компонентов вирусов, бактерий, низших грибов, простейших, паразитов, токсинов микроорганизмов и природных токсинов (например, токсинов рыб, моллюсков, змей и насекомых) в качестве классических (или полных /полноценных) антигенов [11, 14]. Оказалось, однако, что при определённых условиях в роли полноценных антигенов могут выступать и низкомолекулярные соединения, впоследствии названные неполными антигенами или гаптенами [11, 20].

Гаптены и конъюгированные антигены: общий принцип и методология получения конъюгированных антигенов, условия обеспечения иммуногенности подобных антигенов, значение этих знаний для прогресса иммунологии

Еще в первой трети XX века было выяснено, что простые по строению химические вещества с небольшой молекулярной массой, не обладающие перечисленными выше

качествами антигенов, при их введении экспериментальным животным не индуцируют иммунный ответ, включая антителообразование, т.е. не выступают как иммуногены. Было установлено, что иммунная система конституционно не генерирует ответ на вещества с молекулярной массой ≤ 1000 D, а именно такой размер молекул имеет большинство простых химических веществ, включая множество токсичных ксенобиотиков и лекарственных соединений. Однако многие низкомолекулярные вещества (например, алкилирующие цитостатики, азотистый иприт, ряд экотоксикантов) небезразличны для иммунной системы и способны инициировать состояния и заболевания, в патогенезе которых присутствуют звенья, трактуемые сегодня как иммунотоксикологические и иммунофармакологические феномены (т.е. феномены, обусловленные воздействием на организм подобных ксенобиотиков) [21, 22, 23]. Примером этих состояний являются аллергические реакции на лекарственные соединения.

Общий принцип получения. Молекулы упомянутых выше веществ могут также выполнять функцию детерминант иммунохимической специфичности, если они прочно (преимущественно ковалентно) связаны с высокомолекулярными носителями, которые в свою очередь являются полноценными антигенами. Как правило, подобные вещества в условиях *in vivo* химически активны (например, они алкилируются с белками, т.е. присоединяются с изменением конформации или же к ним непосредственно присоединяются (т.е. конъюгируются) и выступают в качестве гаптенных).

Гаптены (от греч. ἄπλω – прикреплять) – низкомолекулярные вещества, не обладающие иммуногенностью и другими качествами и свойствами полноценных антигенов, но приобретающие их при увеличении молекулярного веса (например, за счет прикрепления к белку-носителю). Сами по себе гаптены не могут вызывать антителообразования, но могут связываться со специфичными к ним антителами. Обычно *гаптенный эпитоп конъюгированного антигена* – это сравнительно небольшой его структурный компонент, представляющий собой одну детерминанту иммунохимической специфичности антигена.

В функциональном контексте, как узнавание антигена, так и связывание с антигеном специфичных рецепторов лимфоцитов и активных центров иммуноглобулинов происходит именно по детерминантам иммунохимической специфичности, включая и гаптенные эпитопы. Гаптенами (или гаптенными эпитопами антигенов) могут становиться многие низкомолекулярные органические соединения (в том числе – экотоксиканты и лекарственные препараты), моно- и олигосахариды, а также олигопептиды малой молекулярной массы.

Методология получения искусственных конъюгированных антигенов, обладающих иммуногенностью и специфичностью. Присоединять гаптены к белку или другому иммунологически активному макромолекулярному носителю можно и

искусственным путем (т.е. *in vitro*), используя различные химические реакции, что позволяет получать *искусственные конъюгированные антигены* – конъюгаты гаптен-носителя [20, 24, 25, 26, 27]. В конъюгированных антигенах гаптены связаны с макромолекулярными носителями ковалентной химической связью. Если конъюгированными антигенами иммунизируются экспериментальные животные, то последние отвечают выработкой антител со специфичностью как к детерминантам белка-носителя, так и к гаптенным детерминантам [20, 24, 28]. При этом иммуногенность конъюгированных антигенов преимущественно обеспечивает макромолекулярный носитель.

Впервые искусственные конъюгированные антигены многих низкомолекулярных гаптен-носителей были получены К. Landsteiner – лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 1930 года за открытие антигенов групп крови человека. К. Landsteiner [20, 29], используя химическую реакцию азосочетания (позднее и другие химические реакции, обеспечивающие образование ковалентной связи между гаптенами и белками), получил конъюгированные антигены многих токсичных низкомолекулярных соединений. Он же предложил общий принцип получения конъюгированных антигенов тех низкомолекулярных гаптен-носителей, которые имеют соответствующие функциональные группы и способны ковалентно соединяться с высокомолекулярным носителем в мягких условиях проведения синтеза, существенно не нарушающих структуры носителя [20, 29]. Этому ученому следует считать пионером научных исследований по иммунохимии и основам антигенности широкого круга низкомолекулярных соединений, включая лекарства и токсичные ксенобиотики. В последующем именно эти исследования сыграли ключевую роль в инициации познания свойств антигенов и антител, образующихся при иммунизации антигенами.

Значение конъюгированных антигенов для теории и медицинской практики.

Данный методологический подход позднее обеспечил возможность получения антител специфичных ко многим низкомолекулярным биологически активным соединениям, в том числе к различным токсичным ксенобиотикам и лекарственным препаратам. Эти исследования стали отправной точкой формирования новых направлений медицинской науки – иммунотоксикологии и иммунофармакологии низкомолекулярных биологически активных соединений. Развитие данного направления прикладных научно-исследовательских работ позволило синтезировать несколько сотен искусственных конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами химических соединений различной структуры и биологической активности [24, 25, 27, 28, 30, 31, 32], включая фосфорорганические токсиканты [33, 34, 35], морфин и его аналоги, барбитураты, серотонин [36]; героин [37], кокаин [38], никотин [39], метамфетамин [40].

С использованием искусственных конъюгированных антигенов были получены

поликлональные и моноклональные антитела со специфичностью к множеству целевых низкомолекулярных соединений, которые оказались пригодными для целей количественного определения иммунохимическими методами этих биологически активных веществ [28, 30, 41, 42, 43, 44]. Эти достижения, бесспорно, стали самым крупным вкладом иммунологии в медицинскую практику. Начиная с последней трети XX века и до настоящего времени, в данной области медицины проводятся интенсивные научные исследования, а иммунохимические реагенты для целей лабораторного анализа многих сотен эндогенных физиологически активных соединений, лекарственных препаратов, экотоксикантов и других ксенобиотиков активно и с коммерческим успехом используются в различных областях человеческой деятельности, включая медицину.

Биологическая специализация различных частей молекулы конъюгированных антигенов в инициации иммунореактивности

С функциональной точки зрения молекула конъюгированного антигена может рассматриваться состоящей из нескольких частей, которые определяют особенности биологической активности. В их числе: *а) распознаваемые В-лимфоцитами участки (сайты)* (как гаптенные эпитопы, так и конформационные эпитопы носителя), называемые детерминантами иммунохимической специфичности антигена или антигенными эпитопами; *б) участки* (преимущественно пептидные эпитопы носителя), *специфически взаимодействующие с антигенспецифическими рецепторами различных субпопуляций Т-лимфоцитов*; *в) участки* (преимущественно различные эпитопы носителя) *способные активировать метаболические процессы в иммунореактивных клетках*, в частности в профессиональных антигенпрезентирующих клетках и мононуклеарных фагоцитах – макрофагах [45, 46] (по современным воззрениям эти участки представляют собой РАМР-сайты этиопатогенов).

В молекулах конъюгированных антигенов могут присутствовать также *скрытые детерминанты иммунохимической специфичности (ε)*, а также *участки, ответственные за митогенный эффект антигенов (δ)*. Наличие подобных участков характерно, например, для некоторых тимуснезависимых антигенов [18].

А.Д. Кульбергом в 1986 году [45] обобщены варианты инициации антигенами гуморального иммунного ответа и сделан вывод о том, что все механизмы и особенности иммунологической отвечаемости (т.е. сама возможность иммунного ответа) фактически детерминированы молекулярной организацией и свойствами молекулы антигена. Этого же мнения придерживался М. Sela – один из авторитетнейших иммунологов, детально описавший различные антигены в своих фундаментальных трудах [8, 15, 47].

Таким образом, варьирование структурой, количеством и взаимными связями составных частей молекул создаваемых антигенов позволяет получать антигенные препараты с заданными биологическими свойствами, т.е. в полной мере реализовывать принцип – *«от искусственного антигена к эффективной вакцине»* [4, 18, 47, 48]. Очевидно, что индуцирующие полноценный иммунный ответ антигены полифункциональны, т.е. наряду с иммунологически доминантными эпитопами соответствующей антигенной специфичности имеют и другие функциональные участки. В соответствии с современными представлениями, предполагающими необходимость кооперации В-лимфоцитов с Т-хелперами при иммунном ответе на тимусзависимые антигены, иммуногенность обусловлена преимущественно способностью антигена активировать Т-хелперы.

Важным условием развития иммунного ответа служит также предварительная активация клеток, презентующих антигены лимфоцитам, в частности дендритных клеток, которая требует распознавания ими участков сигнализирующих о патогенной опасности – РАМР-этиопатогенов [19, 49]. Совокупность подобных участков (как антигенных сайтов, так и сайтов патогенной опасности) позволяет индуцировать при организации иммунного ответа на антиген активирование и мобилизацию различных популяций иммунореактивных клеток (в том числе лимфоцитов), а также активировать факторы и запускать механизмы конституционного иммунитета, включая реакции воспаления. Молекулярная организация антигенов определяет их многие биологические характеристики, в частности, такое качество антигенов, как тимус-зависимость или тимус-независимость гуморального иммунного ответа.

Иммуногенность конъюгированных антигенов, подходы оптимизации молекулярных характеристик и свойств конъюгатов путем выбора носителя

Выше уже отмечалось, что роль гаптенных эпитопов в обеспечении общей иммуногенности конъюгированного антигена преимущественно сводится к обеспечению иммунодоминантности антителообразования со специфичностью именно к гаптenu-аналогу в общем спектре специфичностей иммуноглобулинов, образующихся при иммунизации конъюгированными антигенами. В этом контексте молекулярные характеристики конъюгированных антигенов могут оптимизироваться подбором эпитопной плотности гаптена на носителе, которая для каждого конкретного гаптена и на каждом конкретном носителе будет иметь определенное значение. При получении конъюгированного антигена важно также устранить возможную роль феномена внутримолекулярной конкуренции антигенных детерминант, что достигается путем выбора адекватной стратегии химической модификации и последовательности проводимых химических манипуляций как с молекулярными структурами гаптена-аналога, так и носителя при осуществлении процедуры

химического конъюгирования.

Определяющее значение оптимального макромолекулярного носителя гаптенных эпитопов для обеспечения иммуногенности конъюгированных антигенов. Анализ литературных данных по иммуногенности синтетических конъюгированных антигенов свидетельствует, что, если за специфичность антителообразования на гаптенные эпитопы, прежде всего, ответственна молекулярная структура гаптена-аналога – строение гаптенного эпитопа, то интенсивность гуморального иммунного ответа к гаптенной детерминанте и продолжительность образования антител зависят преимущественно от качеств молекулы носителя этих детерминант. Следовательно, возможность оптимизации биологической активности конъюгированных антигенов, прежде всего, их иммуногенности в основном достигается путем выбора носителя. Этим положением обычно руководствуются при получении конъюгированных антигенов, используя в качестве носителей различные исходно иммуногенные молекулы (например, гетерологичные белки, липосомы, структурные компоненты микроорганизмов или же их молекулярные продукты (инактивированные эндо-, экзотоксины), искусственные полимеры) [24, 28, 50]. При этом установлено, что более иммуногенный носитель (как правило обладающий высокой молекулярной массой гетерологичный белок) с большей вероятностью придает свойство иммуногенности гаптену, ковалентно связанному с этим носителем (в случае иммунизации конъюгированным антигеном экспериментальных животных определенного биологического вида).

Белки в качестве носителей гаптенных эпитопов. В течение многих десятилетий при получении конъюгированных антигенов в качестве носителей наиболее широко использовали именно высокомолекулярные белки: бычий сывороточный альбумин (BSA) (молекулярная масса /м.м./ ~ 69000 D), овальбумин (м.м. ~ 43000 D), тиреоглобулин (м.м. ~ 660000 D), гемоцианин моллюсков (KLH) (например, гемоцианин морского моллюска *Megathura crenulata* или гемоцианин виноградной улитки) (м.м. $4,5 \times 10^5$ – $1,3 \times 10^7$ D (в зависимости от количества субъединиц в выбранном образце биопрепарата); различные токсидные белки, включая столбнячный анатоксин и дифтерийный анатоксин. При получении конъюгированных антигенов в качестве носителей гаптенных эпитопов реже использовали: миоглобин, сывороточный альбумин кролика, молекулы иммуноглобулинов (в частности, IgG) из бычьей или мышинной сыворотки и синтетические полипептиды, такие как поли-L-лизин и поли-L- глутаминовая кислота.

Значительно реже в качестве носителей применяли полимеры небелковой природы – декстран, агарозу, состоящие из липидных бислоев липосомы или же синтетические направленно сконструированные органические молекулы – дендримеры [51].

Значение молекулярной массы носителя. Достаточно высокая молекулярная масса

использованного для получения конъюгатов белкового или другого макромолекулярного носителя (обычно несколько десятков тысяч дальтон и выше: у молекулы BSA ~ 69000 D, у молекулы тиреоглобулина ~ 660000 D) – важнейшее условие, обеспечивающее высокую иммуногенность получаемых конъюгированных антигенов [24, 28]. В последнее время именно поэтому в качестве носителя при получении конъюгированных антигенов очень широко используется KLH (средняя по размеру мультисубъединица данного белка имеет м.м. ~ 5000000 D). Биоматериал, содержащий субъединицы KLH, выпускается как коммерческий продукт (в частности, производится компанией *Thermo Fisher*). В этом виде данный белок достаточно хорошо растворим в водных солевых растворах, что облегчает процедуру синтеза конъюгированных антигенов на основе средней по размеру мультисубъединицы KLH и позволяет получать растворимые в обычных буферах конъюгаты, у которых возможно определить их характеристики, в частности оценить количество гаптенных эпитопов, располагающихся на молекуле носителя.

Значение однородности используемого носителя по молекулярной массе.

Существенное влияние на интенсивность специфичного к гаптену антителообразования оказывает степень гетерогенности использованного носителя по молекулярной массе, так как наличие в используемых в качестве носителя белках низкомолекулярных фракций значительно уменьшает интенсивность гуморального иммунного ответа на гаптен [12, 52].

Как уже отмечалось с характеристикой достаточной молекулярной массы носителя должно быть сопряжено такое качество синтезируемого конъюгированного антигена как чужеродность молекулы носителя гаптенных детерминант, ибо известно, что конъюгаты, полученные на основе гомологичных белков или эритроцитов, не обладают иммуногенностью [53].

Гетерологичные белки сочетают свойство чужеродности с их достаточно высокой иммуногенностью для особей другого биологического вида, поэтому эти молекулы способны придать иммуногенность гаптенам-аналогам целевых соединений, ковалентно связанным с ними как с носителями.

Как правило, эффективным макромолекулярным носителем гаптенных детерминант может выступать та молекула, которая сама способна индуцировать гуморальный иммунный ответ высокой интенсивности. Этим объясняется факт частого использования в качестве носителей гаптенных эпитопов крупных молекул или же надмолекулярных структур (например, белков с достаточно большой молекулярной массой, липосом, состоящих из повторяющихся липидных бислоев; фрагментов микроорганизмов).

Оптимальный молекулярный вес носителя может быть обеспечен путём подбора искусственных полимеров с соответствующими молекулярными характеристиками или же

выбором природных белков (например, белков сыворотки крови животных разных биологических видов с предварительным фракционированием этих белков на фракции (альбумины, глобулины, другие белки сыворотки)). Оба указанных подхода оправданы и используются при подборе носителя оптимального типа.

Выбор носителя влияет не только на интенсивность ответа на гаптен, но и на класс образующихся при гуморальном иммунном ответе иммуноглобулинов со специфичностью к гаптену [54].

Значение сложности строения молекулы носителя, разнообразия детерминант его иммунохимической специфичности и необходимость наличия функционально активных химических группировок. Для придания высокой иммуногенности получаемым конъюгатам используемый высокомолекулярный носитель должен быть мультиспецифичным по антигенным эпитопам [8, 16]. У естественных макромолекул (например, у белков) набор отличных друг от друга детерминант иммунохимической специфичности обычно велик. Напротив, у гомополимеров аминокислот практически нет различающихся по специфичности эпитопов, что препятствует высокой иммуногенности конъюгатов, полученных на основе подобных носителей, даже при условии обеспечения их достаточно большой молекулярной массы.

Другой важный момент, который имеет отношение к возможности получения на основе соответствующих носителей конъюгированных антигенов – это наличие в составе используемых макромолекулярных соединений подходящих функциональных групп, через которые осуществляют конъюгирование с гаптенами. В этом качестве обычно рассматривают: амино-, карбокси-, сульфгидрильные и алифатические окси-группы входящих в состав различных белков аминокислот – лизина, аспарагиновой и глутаминовой кислоты, цистеина, серина и треонина; имидазольный фрагмент гистидина, п-гидроксифенильный фрагмент тирозина, индольный фрагмент триптофана, бензольный фрагмент фенилаланина.

Белки, используемые как носители гаптенов, обладают значительным числом указанных функциональных групп. Так, молекула BSA (м.м. ~ 69000 D) имеет в общей сложности: 59 ϵ -аминогрупп боковой цепи остатков лизина (из них только 30-35 обычно доступны для дериватизации), 1 свободную сульфгидрильную группу остатка цистеина (еще 17 дисульфидных групп, стабилизируют трехмерную структуру белка, поэтому скрыты в его конформации, но освобождаются в большинстве методов синтеза конъюгатов), 19 гидроксильных групп п-гидроксифенильных фрагментов тирозина, 17 имидазольных групп остатков гистидина. В молекуле BSA свободны также многочисленные карбоксильные функциональные группы, чем объясняется его суммарный отрицательный заряд. Этими же

качествами при значительно большей молекулярной массе (~ 660000 D) обладает молекула тиреоглобулина. В пересчете на одну среднюю мультисубъединицу (м.м. ~ 5000000 D) молекула KLN содержит более 2000 ε-аминогрупп боковой цепи остатков лизина, более 700 сульфгидрильных групп остатков цистеина и более 1900 гидроксильных групп на п-гидроксифенильных фрагментах тирозиновых остатков [50].

Токсоидные белки патогенных микроорганизмов в качестве носителей гаптенных эпитопов. Ещё более важным моментом в обеспечении более высокой иммуногенности конъюгированных антигенов является наличие у используемых для их получения макромолекулярных носителей участков молекулярной структуры, идентифицируемых как РАМР. Именно поэтому в настоящее время в качестве носителей гаптенных эпитопов биологически активных низкомолекулярных соединений все чаще используют инаktivированные токсидные белки патогенных микроорганизмов.

Используемые в качестве носителей токсидные белки являются биологически инаktivированными формами нативных токсинов – анатоксинами. Известные анатоксины имеют в структуре своих молекул детерминанты антигенной специфичности и сайты, идентифицируемые как РАМР. Анатоксины фактически представляют собой молекулярные вакцины естественного происхождения, которые лишены токсичности путем инаktivации токсифорных участков с сохранением участков, идентифицируемых как РАМР. Подобные вакцины способны активировать как адаптивный, так и конституционный иммунитет. Как биологические продукты анатоксины высоко иммуногены, и их использование путем активной иммунизации создает у вакцинированных лиц специфичный протективный иммунитет от инфекций с ярко выраженной интоксикацией (столбняк, дифтерия, кишечные инфекции, вызываемые экзотоксин-продуцирующими штаммами патогенных микроорганизмов).

Анатоксином, наиболее часто используемым в качестве макромолекулярного носителя при получении конъюгированных антигенов, является анатоксин столбняка. В этом качестве используются также токсиды дифтерии и некоторые другие инаktivированные белки патогенных микроорганизмов [55].

В молекуле столбнячного анатоксина (м.м. ~ 150000 D) имеется: 106 аминокислотных групп, 10 сульфгидрильных групп, 81 гидроксильная группа на п-гидроксифенильных фрагментах тирозиновых остатков и 14 имидазольных групп остатков гистидина, которые могут участвовать в реакциях конъюгации с молекулами гаптена [56]. Дифтерийный анатоксин (м.м. ~ 63000 D) является производным от белка, секретируемого некоторыми штаммами *Corynebacterium diphtheriae* [57]. В его молекуле также имеется достаточное число реакционно-способных химических группировок. Оба названных анатоксина ковалентно

связывали с гаптенами с помощью известных химических методов конъюгации и получали высоко иммуногенные конъюгированные антигены.

Липосомы в качестве макромолекулярных носителей гаптенных эпитопов.

Липосомы представляют собой искусственные структуры, состоящие из фосфолипидных бислоев. Липосомы имеют сложное строение, однако прослеживается одна общая закономерность. Как правило, концентрические сферы или листы липидных бислоев отделены друг от друга гидрофильными пространствами. Фосфолипидные составляющие липосом состоят из гидрофобных липидных хвостов, соединенных с головкой, которая построена из производных глицерофосфата. Гидрофобные взаимодействия между хвостами жирных кислот является основной причиной формирования в водных растворах липосомальных бислоев.

Морфологию липосомы можно классифицировать в соответствии с разделением водных областей между двухслойными листами фосфолипидов. Если каждая гидрофильная область липосомы отделена друг от друга только одним бислоем фосфолипидов, то такие липосомы называют однослойными везикулами (ULV). Если существует более одного бислоя, окружающего каждый водный отсек, липосомы называют многослойными везикулами (MLV). ULV-формы липосом далее довольно грубо классифицируют по их относительному размеру: могут быть небольшие однослойные везикулы (SUV), имеющие диаметр ≤ 100 нм, и большие однослойные везикулы (LUV), обычно имеющие диаметр ≥ 100 нм. Что касается MLV-форм липосом, то их трудно классифицировать из-за почти бесконечного числа способов, которыми каждый двухслойный лист фосфолипидов может быть связан со следующим листом. MLV-формы липосом обычно образуют большие сложные сотовые структуры, строение которых при получении липосом трудно воспроизводить.

Общие характеристики липосомы — ее морфология, состав (включая ряд потенциальных фосфолипидов и степень содержания в нем холестерина), заряд и наличие любых присоединенных к липосоме функциональных групп влияют на антигенность везикулы в условиях *in vivo* [58, 59, 60].

Синтетические молекулы могут быть использованы в качестве носителей иммуногена, если они созданы с соответствующими функциональными группами, пригодными для связывания молекул гаптена. Подобные носители могут быть простыми полимерами, такими как поли-L-лизин, поли-L-глутаминовая кислота, фиколл, декстран, полиэтиленгликоль или же являться сложными полимерами типа дендримеров [15, 24, 61, 62, 63]. Связывание молекул гаптена с основными функциональными группами этих полимеров позволяет получать иммуногенные конъюгаты, которые при иммунизации

экспериментальных животных инициируют образование антител со специфичностью к гаптену.

Так, поли-L-лизин можно конъюгировать посредством амидных связей с гаптенами, имеющими карбоксильные группы, используя водорастворимый карбодиимид или же гомо- или гетеробифункциональные сшивающие агенты (например, сульфо-SMCC). Этот относительно простой и активный полимер можно также использовать для связывания молекул гаптена и последующего покрытия микропланшетов, предназначенных для твердофазного иммуноферментного анализа или так называемого ELISA-метода [64]. С другой стороны, поли-L-глутаминовая кислота может быть присоединена к гаптенам с аминокгруппами с помощью водорастворимого карбодиимида.

Такие синтетические носители как фиколл и декстран могут активироваться для конъюгирования с гаптенами умеренным окислением периодатом натрия с образованием реакционно-способных альдегидных групп. Последующее конъюгирование с гаптенами, имеющими аминокгруппы, может быть осуществлено путем восстановительного аминирования [50]. Химический состав полиэтиленгликоля также позволяет осуществлять его конъюгирование с гаптенами, руководствуясь известными методами активирования этого полимера [51].

Множественный антигенный пептид (МАР) в качестве носителя гаптенных эпитопов. Уникальной синтетической молекулой, которую можно использовать в качестве носителя гаптенных эпитопов, является так называемый множественный антигенный пептид (МАР) [63, 65]. Архитектура ядра МАР представлена каркасами последовательных уровней поли-L-лизина. Дендритная молекула или дендример состоит из двухвалентного соединения лизина, к которому присоединены два дополнительных уровня лизина. Конечное соединение МАР состоит из симметричной октавалентной поверхности с первичными аминокгруппами, к которой могут конъюгироваться молекулы гаптена. Например, связывание до восьми пептидных гаптенных с ядром МАР дает высокоиммуногенный антигенный комплекс, имеющий молекулярную массу ≥ 10000 D. Архитектура МАР как носителя гаптенных эпитопов и его иммуногенность свидетельствуют о перспективах подобных технических решений при разработке конъюгированных антигенов как молекулярных вакцин путем моделирования оптимальной структуры носителя, что обеспечивает возможность достижения иммунодоминантности гаптенных эпитопов.

Практическая реализация принципов увеличения биологической активности получаемых конъюгированных антигенов при создании модельных вакцин к веществам, вызывающим наркотическую зависимость. В качестве примеров научных и прикладных исследований, ориентированных на реализацию современной стратегии конструирования и

оптимизации биологической активности конъюгированных антигенов уместно привести результаты работы нескольких исследовательских центров, занимающихся проблемой получения конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами наркотических веществ – морфина и его производных, включая героин; кокаина и вызывающего болезненную зависимость никотина.

Наряду с широко используемыми белками (BSA, овальбумин, KLH) при создании конъюгированных антигенов как вакцин со специфичностью к наркотическим веществам [27, 28, 36, 37, 66, 67, 68, 69, 70], в качестве носителей гаптенных эпитопов все чаще применяют более иммуногенные естественные и искусственные биоматериалы, такие как ослабленный аденовирус [71, 72], столбнячный и дифтерийный анатоксины [73, 74], рекомбинантный экзопротеин А *Pseudomonas aeruginosa* [75], комплексы пептидов с молекулярными адъювантами [76], липосомы с включенным в их состав монофосфорил-липидом А [77].

Очевидно, что отмеченная тенденция использования при получении конъюгированных антигенов высокомолекулярных носителей, которые, помимо наличия набора детерминант антигенной специфичности, обладают участками, идентифицируемыми как РАМР-сайты, связана с необходимостью увеличения иммуногенности конъюгатов за счет более полного использования активационного потенциала конституционного иммунитета.

Методы химического конъюгирования целевых лигандов как гаптенов с носителями при получении конъюгированных антигенов

Очевидно, что наличие в молекулах белков (как и в составе других макромолекулярных носителей) значительного числа функциональных групп, пригодных для ковалентного присоединения целевого низкомолекулярного лиганда как гаптена, позволяет использовать различные технологии химического конъюгирования этих носителей с низкомолекулярными веществами разного строения. Применительно к конкретным психоактивным веществам и токсикантам это создает дополнительную возможность выбора способов их конъюгирования (в частности, с использованием для ковалентного связывания конкретных функциональных групп, имеющихся у разных низкомолекулярных соединений), что позволяет оптимизировать структуру соответствующих конъюгированных антигенов.

В настоящее время методология и конкретные способы химического связывания низкомолекулярных соединений как гаптенов с носителями достаточно хорошо отработаны. По критерию получения конъюгированных антигенов оптимальной структуры применительно к соединениям разной структуры в качестве гаптенов изучена эффективность

этих методов. Во всех известных методах конъюгирования ковалентное связывание гаптена с носителем происходит по реакционно-способным (функциональным) химическим группировкам как гаптена, так и носителя. Реализация этой возможности наиболее критична для гаптена, ибо известные носители имеют достаточное количество способных к ковалентному связыванию функциональных групп, гаптены же такие группы могут не иметь. В этом случае эти группы необходимо вводить, синтезируя гаптены-аналоги. После введения этих групп проводят реакцию ковалентного связывания модифицированных гаптенных с носителями, используя для этого введенные функциональные группы.

Таким образом, выбор метода конъюгации гаптена с функциональной группой носителя определяется фактом наличия у гаптена изначально присутствующей или же введенной функциональной группы. Руководствуясь описанными выше соображениями, наиболее часто используемые методы получения конъюгированных антигенов удобно классифицировать, исходя из факта наличия у гаптена тех или иных функциональных групп.

Гаптены с карбоксильной группой. Активация гаптенных с карбоксильной группой может быть достигнута различными путями: 1) с помощью водорастворимых карбодиимидов; 2) методом активированных эфиров; 3) с помощью карбонилдиимидазола; 4) методом смешанных ангидридов; 5) превращением карбоксилсодержащих соединений в соответствующие ацилазиды. Наиболее простым и максимально эффективным способом ковалентного связывания химических соединений, содержащих карбоксильную группу, является метод смешанных ангидридов. С использованием метода смешанных ангидридов были получены конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами морфина, фенотиазиновых и бенздиазепиновых производных, различных стероидных гормонов [78, 79, 80].

Гаптены с аминогруппой. Гаптены с аминогруппой следует подразделять на гаптены, содержащие ароматическую аминогруппу, и гаптены, содержащие алифатическую аминогруппу. «Пионерские» работы К. Landsteiner были выполнены на гаптенах, содержащих ароматическую аминогруппу [20, 29]. Эти гаптены превращали в соли диазония с помощью азотистой кислоты, затем эти соли реагировали с белками в щелочной среде при $\text{pH} \sim 9.0$. Реакция проходила преимущественно по гистидиновым, тирозиновым и триптофановым фрагментам соответствующих аминокислот. Этим же методом был синтезирован конъюгат (рисунок 1) для получения специфических антител к антибиотику хлорамфениколу [81]:

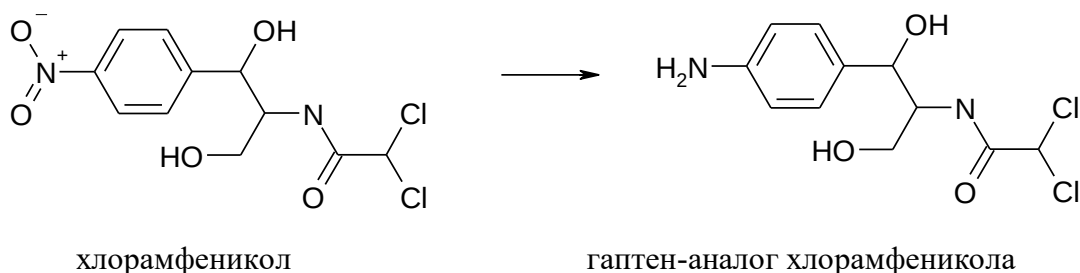


Рисунок 1. Хлорамфеникол и его конъюгат

Хлорамфеникол, содержащий в своей структуре ароматическую нитрогруппу восстанавливают водородом над окисью платины, получая его аналог, содержащий ароматическую аминогруппу, которую затем диазотируют и полученное соединение конъюгируют с кроличьим сывороточным альбумином.

Аналогичным методом в исследованиях, проведенных нами на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, гаптены-аналоги фосфорорганических нейротоксикантов 4-аминофенилдиэтил фосфат и 4-аминофенил изопропил метилфосфонат конъюгировали с бычьим сывороточным альбумином.

Алифатические первичные амины могут реагировать с белками в присутствии водорастворимых карбодиимидов. В этом случае конъюгация проходит по свободным карбоксильным группам белка. Этим способом были получены конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами антибиотиков, в частности адриамицина [82], серотонина [83], стероидных гормонов [84] и многих других биологически активных соединений.

Известны исследования, при выполнении которых химическое соединение с вторичной аминогруппой с помощью янтарного ангидрида модифицировалось по этой группе в производное моноамида янтарной кислоты со свободной карбоксильной группой [85] или же с помощью N-4-бромобутилфтальмида превращалось в фтальимидное производное, которое, после удаления фтальимидной группы, давало соединение с первичной аминогруппой [86, 87]. В обоих случаях полученные таким образом гаптены конъюгировали с белковыми носителями с помощью водорастворимого карбодиимида.

Другим распространенным вариантом конъюгирования гаптенных с алифатической аминогруппой является использование бифункциональных реагентов, в частности глутарового альдегида [88].

Гаптены с гидроксильной группой. Что касается гаптенных с гидроксильной группой, то в большинстве случаев в химические соединения этого типа необходимо вводить функциональные группы, способные вступать в реакции с белками. Самой популярной модификацией такого рода является реакция исходного соединения с янтарным ангидридом

с получением полуэфира янтарной кислоты – гемисукцината этого соединения, выступающего в качестве гаптена-аналога. При получении конъюгированных антигенов свободная карбоксильная группа гемисукцинатов реагирует с белками [89, 90, 91].

Гаптены с карбонильной группой (кетоны и альдегиды) обычно модифицируются путем превращения их в О-карбоксиметил оксимы в реакции с О-(карбоксиметил)гидроксиламином [92, 93]. Полученные таким образом гаптены-аналоги с карбоксильной группой затем присоединяют к носителям известными методами.

Гаптены с сульфгидрильной группой. При получении конъюгированных антигенов гаптены, содержащие сульфгидрильную (тиольную) группу, могут непосредственно конъюгироваться с различными носителями. Так, при получении конъюгатов пенициллиновой кислоты белковый носитель предварительно обогащали сульфгидрильными группами путем реакции с N-ацетилгомоцистеин тиолактоном. Конъюгирование гаптена с белковым носителем проводили в присутствии перекиси водорода, при этом между гаптенем и носителем возникала дисульфидная (-S-S-) связь [94].

Наряду с описанными выше методами конъюгирования гаптенев с носителями, которые широко используются при получении конъюгированных антигенов, существуют другие методы конъюгации, которые применяют достаточно редко. Так, гаптены, содержащие карбоксильную группу, с помощью хлористого тионила легко превращаются в соединения, содержащие реакционно-способную **хлорангидридную группу**, которая способна реагировать с белками по его амино-, гидроксид- и сульфгидрильным группам [95]. В соответствии с этим способом были получены конъюгированные антигены с аспиринем в качестве гаптена. Карбоксильную группу гаптена можно также превратить в **гидразидную группу**. В соответствии с этим способом были получены конъюгированные антигены с аспиринем в качестве гаптена. При получении конъюгированных антигенов известно применение способа конъюгирования гаптенев с носителями, при осуществлении которого в структуру исходного соединения вводят **иминоэфирную группу**, и именно эта группа далее используется как реакционно-способная для ковалентного связывания гаптена-аналога с носителем. В соответствии с этим способом гаптены, имеющие нитрильные группы, последовательно обрабатывают хлористым водородом, а затем этиловым спиртом, а далее конъюгируют с белковым носителем. При этом иминоэфиры реагируют со свободными аминогруппами белков, образуя ковалентную связь. Гаптены, содержащие первичные аминогруппы под действием фосгена или тиофосгена превращаются в **изоцианатные** или **изотиоцианатные производные**. Эти соединения способны реагировать со свободными амино- или сульфгидрильными группами белков с образованием соответственно дизамещенной мочевины и карбамата.

Использование бифункциональных реагентов при оптимизации молекулярных характеристик и методов получения конъюгированных антигенов

В конце XX века возможности получения конъюгированных антигенов значительно расширились благодаря появлению на рынке бифункциональных реагентов, которые позволяют «сшивать» различные гаптены с носителями с формированием своеобразной «ножки» или «спейсера» между гаптенем и носителем [96]. Наличие спейсера дополнительно обеспечивает также более оптимальное расположение гаптенного эпитопа на носителе.

Выпускается два типа подобных реагентов – гомо- и гетеробифункциональные. *Гомобифункциональные реагенты* имеют идентичные реакционно-способные группы на концах молекулы «спейсера», а *гетеробифункциональные реагенты* обладают различными функциональными группами. Примером гомобифункционального реагента (рисунок 2) является дисукцинимидил суберат (DSS):

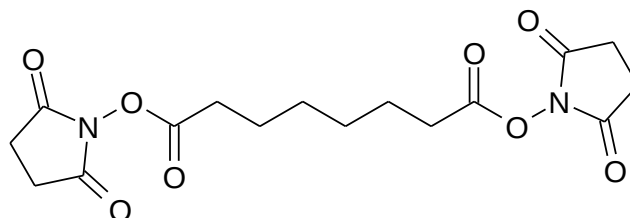


Рисунок 2. Гомобифункциональный реагент – дисукцинимидил суберат (DSS)

Гомофункциональные реагенты обычно применяют, конъюгируя гаптены с носителями в одну стадию. Гетеробифункциональные реагенты допускают последовательную (двухэтапную) конъюгацию. Наиболее широко используемые гетеробифункциональные реагенты имеют реакционно-способную по отношению к амину сукцинимидную группу сложного эфира на одном конце и реакционно-способный по отношению к сульфгидрильной группе участок (например, малеимид) на другом конце молекулы. Примером такого реагента (рисунок 3) может служить сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (sulfo/сульфо/-SMCC):

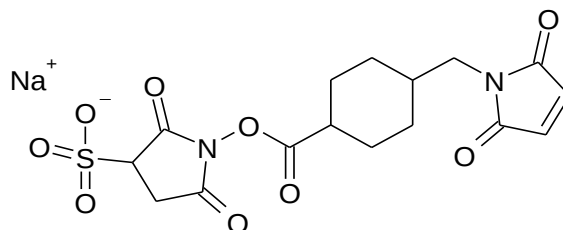


Рисунок 3. Гетеробифункциональный реагент – sulfo-SMCC

Значение феномена внутримолекулярной конкуренции гаптенных эпитопов при получении конъюгированных антигенов оптимальной структуры

При моделировании структуры конъюгированных антигенов необходимо чтобы мультивалентный макромолекулярный носитель имел определенное количество идентичных по структуре гаптенных детерминант, так как присутствие гаптена в составе конъюгата изменяет спектр иммунодоминантности антигенных детерминант носителя. Если же в составе конъюгированного антигена присутствует несколько различающихся по структуре гаптенных детерминант, то при иммунизации такими конъюгатами возможна реализация *феномена внутримолекулярной конкуренции* этих эпитопов [97].

Вероятность проявления данного феномена имеет прямое отношение к проблеме создания конъюгированных антигенов оптимального строения, так как процедура получения конъюгированных антигенов, как правило, включает несколько последовательных этапов химических реакций, необходимых для введения в определённое положение молекулы гаптена химически реакционно-способных группировок, а также наращивания протяженности участка между эпитопом гаптена и макромолекулярным носителем с целью обеспечения оптимальной ориентации вводимой гаптенной детерминанты по отношению к носителю [24, 36, 98, 99, 100].

При реализации процедуры конъюгирования последовательным химическим модификациям может подвергаться как гаптен, так и носитель. Очередность проводимых химических модификаций будет определять спектр антигенной специфичности эпитопов гаптена в составе конъюгированного антигена (например, при введении на первом этапе получения конъюгированного антигена химически реакционно-способных групп в состав носителя спектр гаптенных эпитопов конъюгата окажется более широким, так как не все введенные в состав носителя химические группы вступят во взаимодействие с вводимым гаптенном на втором этапе получения конъюгата). Эти химические группы могут сами по себе выступать в качестве гаптенных эпитопов, конкурируя с эпитопами целевого гаптена [100, 101], поэтому при оптимизации структуры конъюгированных антигенов эти эпитопы должны быть нейтрализованы.

Заключение

Обеспечение ответственных за высокую иммуногенность характеристик антигена (применительно к конъюгированным антигенам эти характеристики в основном обеспечиваются иммуногенными свойствами выбранного макромолекулярного носителя), и наличие в общем спектре антигенных эпитопов целевой иммунохимической специфичности (применительно к конъюгированным антигенам эта характеристика направлено

обеспечивается путем введения в состав соответствующего конъюгированного антигена гаптена-аналога, который в иммунохимическом контексте адекватно моделирует структуру целевого биологически активного соединения), должно иметь следствием инициацию у активно иммунизируемых особей специфичного к целевому соединению гуморального иммунного ответа с интенсивной наработкой антител необходимой специфичности. Именно таким образом достигается высокая доминантность гуморального иммунного ответа, направленного на гаптен-аналог, и именно эта задача решается при выборе путей оптимизации молекулярных характеристик и антигенных свойств получаемых конъюгированных антигенов биологически активных гаптенов.

При поиске аналогий с известными техническими решениями и формулировке общих принципов и подходов оптимизации структуры и биологических характеристик конъюгированных антигенов с низкомолекулярными гаптенами-аналогами уместно обратиться к опыту создания эффективных вакцин против инфекционных возбудителей [5, 102]. Фактически задача, решаемая при поиске подходов оптимизации характеристик конъюгированных антигенов, тождественна задаче, решаемой при разработке вакцин к бактериальным возбудителям, инфицирование которыми сопровождается выраженным токсикозом (например, вакцин против дифтерии, столбняка, ботулизма, некоторых кишечных инфекций, вызываемых токсин-продуцирующими штаммами стафилококков). Известно, что токсикоз при подобных инфекциях обусловлен преимущественно продуцируемыми их возбудителями экзотоксинами. При создании вакцин к подобным возбудителям добиваются доминантного гуморального иммунного ответа со специфичностью к экзотоксину, используя в качестве молекулярного антигена инактивированный токсин этого инфекционного возбудителя – анатоксин и дополнительно применяя стимулирующие гуморальный ответ адъюванты.

В контексте обсуждаемого направления оптимизации структуры конъюгированных антигенов реализованы также другие технические решения. В частности, высокая иммуногенность различных антигенов и их конъюгатов с гаптенами с сохранением доминантности и специфичности гуморального иммунного ответа на гаптен обычно достигается при использовании в качестве носителей высокомолекулярных белков от представителей генетически далеко отстоящих от человека и млекопитающих биологических видов (например, гемоцианин моллюсков), модифицированных бактериальных липополисахаридов и белков, липосом (как обычных, так и с включением в их состав иммуногенных компонентов бактериальных и вирусных возбудителей), искусственно модифицированных полиэлектролитами и другими макромолекулами вирусных частиц, искусственно созданных макромолекулярных комплексов особой структуры.

Следует подчеркнуть также то обстоятельство, что **конъюгированные антигены с гаптенными детерминантами высокоактивных биологически активных соединений** (например, с гаптенами-аналогами селективно взаимодействующих со специализированными структурами-мишенями лекарств или же с гаптенами-аналогами высокотоксичных ядов) **являются ксенобиотиками особого типа**, в молекулах которых экспонирована разнородная биологическая информация. Как уже отмечалось, конъюгированные антигены должны быть иммунологически активны и иметь индуцирующие запуск систем иммунологической реактивности организма участки (в частности, детерминанты антигенной специфичности, со специфичностью как к гаптену, так и к носителю, которые обеспечивают кооперативные взаимодействия иммунокомпетентных клеток друг с другом; детерминанты, вызывающие эффект поликлональной активации и обеспечивающие адъювантность антигенов).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ковалев И.Е. Иммунитет как функция системы организма инактивирующей чужеродные химические соединения. *Хим.-фарм. журн.* 1977; 11(12): 3-14.
2. Ковалев И.Е. Иммунохимическая функциональная система гомеостаза. В кн.: А.Б. Полетаев, С.Г. Морозов, И.Е. Ковалев. *Регуляторная метасистема (иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза)*. М.: Медицина; 2002: 103-146.
3. Козлов В.К. и др. *Основы иммунотоксикологии. Т.1. Общая иммунотоксикология. Иммунотоксичность химических соединений. Иницируемые токсикантами иммунопатологические состояния и заболевания / под ред. В.К. Козлова*. М.: Комментарий; 2019: 480 с.
4. Петров Р.В., Хайтов Р.М. *Искусственные антигены и вакцины*. М.: Медицина; 1988: 288 с.
5. Медуницын Н.В. *Вакцинология*. М.: Триада Х; 1999: 272 с.
6. Петров Р. В. *Иммунология*. М.: Медицина; 1987: 416 с.
7. Ярилин А.А. *Иммунология: учебник*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010: 752 с.
8. Sela M. Synthetic antigens and recent progress in immunology // In: *Peptides, Polypeptides and Proteins*. N.Y. – London – Sydney–Toronto: John Wiley & Sons; 1974: 495-509.
9. Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev. Immunol.* 1994; 12: 991–1045.

10. Ляшенко В.А., Воробьев А.А. *Молекулярные основы иммуногенности антигенов*. М.: Медицина; 1982: 269 с.
11. Хаитов Р.М. *Иммунология: учебник*. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016: 496 с.
12. De Weck A.L. Low molecular weight antigens. In: *The Antigens*, V.2.; M. Sela (ed.). N.Y.–San Francisco–London: Academic Press; 1974: 141-248.
13. Ляшенко В.А. Полимерность молекулы антигена как фактор определяющий характер иммунного ответа. *ЖМЭИ*. 1976; 6: 3-11
14. *Иммунология и аллергология (цветной атлас): учебное пособие для студентов медицинских ВУЗов* / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, А.В. Караулова. М.: Практическая медицина; 2006: 288 с.
15. Sela M. Antigen design as a tool for probing into the nature of immunological phenomena // In: *Immunochemistry* (ed. by W.O. Milligan). Houston: Robert A. Welch.Foundation; 1975: 201-239.
16. Gill T.J., Kunz H.W., Ruscetti S.K. Studies on the chemical and genetic bass of immunogenicity and antigenic reactivity. In: *Peptides, Polypeptides and Proteins*. N.Y. – London – Sydney–Toronto: John Wiley & Sons; 1974: 510-525.
17. Sela M. Antigenicity: some molecular aspects . *Science*, 1969; 166 (3911): 1365-1374.
18. Кашкин К.П. Принципы конструирования тимус-зависимых и тимус-независимых антигенов. В кн. *Химия и биология иммунорегуляторов*. Рига: Зинате; 1985: 21-38.
19. Карамов Э.В., Хаитов Р.М. Молекулярные механизмы врожденного иммунитета. Часть 1. Взаимодействие адаптивного и врожденного иммунитета и система распознавания антигенов. *Физиология и патология иммунной системы*. 2010; 14(11): 3-25.
20. Landsteiner K. *The Specificity of serological reactions*. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press; 1945 (republished by Dover Publication, N.Y.; 1962): 326 p.
21. Ellenhorn M.J. Иммунотоксикология (глава 44). В кн.: М.Д. Элленхорн *Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека* / пер. с англ. М.: Медицина; 2003: 818-856.
22. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. *Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография*. СВИБХБ; 2007: 420 с.
23. Pieters R., Vos J.G., Van der Laan J.W., Van Loveren H. Immunotoxicology. In: *Principles of Immunopharmacology*, 3 ed. / F.P. Nijkamp, M.J. Parnham (eds). Basel: Springer Basel AG; 2011: 623-654.

24. Erlanger B. F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: A survey. *Methods in Enzymology*. 1980; 70: 85-104.
25. Singh R.V., Kaur J., Varshney G.C. et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules. *Bioconjugate Chem.* 2004; 15(1): 168-173.
26. Lemus R., Karol M.H. Conjugation of haptens. *Methods Mol. Med.* 2008; 138: 167-182.
27. Torres O. B., Alving C. R., Matyas G. R. Synthesis of hapten-protein conjugate vaccines with reproducible hapten densities. In: *Vaccine Design. Methods and Protocols: V. 1: Vaccines for Human Diseases* / Ed. by Sunil Thomas. Methods in Molecular Biology, Vol. 1403, New York: Springer Science+Business Media; 2016: 695-712.
28. Erlanger B.F. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. *Pharmacol Rev.* 1973; 25: 271-280.
29. Landsteiner K., Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 1936; 64: 625–639.
30. Spector S. Radioimmunoassay of drugs. In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Vol. II*. International Atomic Energy Association; 1974: P. 233.
31. Spector S. Horizons in immunotoxicology: research needs and applications. *Pharmacol. Rev.* 1982; 34:150.
32. Harris P. C. et al. Bidentat conjugate and method of use thereof: Patent 5,196,351 US, Int. Pat. Cl.² G01N 33/536. /; No 612,425, fill. 09.11.1975; publ. 08.23.1977.
33. Cuculis I.I., Meyer H.G., Sim V.M. Toxic chemical vaccines: US Patent кл. 424 (88 A6 УК 27/00) № 3642981, заявл. 4.05.70, опубли. 15.02.72.
34. Sternberger L.A., Sim V.M, Kavanag W.Z. A vaccine against organophosphorus poisoning. *Proceedings of Army Science Conference*; 1972; 3: 429-441.
35. Sternberger L.A., Cuculis I.I., Meyer H.G. et al. A vaccine against organophosphorus haptens: immunity to paraoxon poisoning. *Fed. Proc.* 1974; 33: 728.
36. Spector S., Berkowitz B., Flynn E.J. et al. Antibodies to morphine, barbiturates and serotonin. *Pharmacol. Rev.* 1973; 25: 281-291.
37. Torres O.B., Jatah R., Rice K.C. et al. Caracterization and optimization of heroin hapten-BSA conjugates: method development for the synthesis of reproducible hapten-based vaccines. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406: 5927-5937.

38. Sakurai M., Wirsching P., Janda K. D. Design and synthesis of f cocaine-diamide hapten for vaccine development. *Tetrahedron Letters* 1996; 37: 5479-5482.
39. Pentel P.R., Malin D.H., Ennifar S. et al. A nicotine conjugate vaccine reduces nicotine distribution to brain and attenuates its behavioral and cardiovascular effects in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000; 65 (1):191-198.
40. Owens S.M., Carrol F. I., Abraham P. Methamphetamine-like hapten compounds, linkers, carriers and composition and uses thereof: Patent 7632929 US. Int. Pat. Cl. C07K 1/04 530/403 / No 11/733085, fill. 09.04.2007; publ. 11.10.2007.
41. Butler V.P, Jr. The immunological assay of drugs. *Pharmacol. Rev.* 1978; 29(2): 103-184.
42. Ishikawa E., Kato K. Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Scand. J. Immunol.* 1978; 8(7): 43-55.
43. Colburn W.A. Radioimmunoassay and related immunoassay techniques. In: *Pharmaceutical Analysis Modern Methods, Part A.* (J.W. Munson, ed.). New York: Marcel Dekker; 1982: 381.
44. Lee J. W., Colburn W.A. Immunoassay Techniques // In: *Handbook of Pharmaceutical Analysis* (L. Ohannesian and A.J. Streeter, eds.). New York – Basel: Marcel Dekker; 2002.
45. Кульберг А.Я. *Регуляция иммунного ответа.* М.: Медицина; 1986: 222 с.
46. Clark E.A., Ledbetter J.A. How B- and T-cells talk to each other. *Nature.* 1994; 367: 425–428.
47. Sela M. From synthetic antigens to synthetic vaccints. *Biopolimers.* 1983; 22(1): 415-424.
48. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И. *Иммуногенетика и искусственные антигены.* М.: Медицина; 1983: 256 с.
49. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Черешнев В.А. Физиология иммунной системы: клеточные и молекулярно-биологические механизмы. *Вестник Российского фонда фундаментальных исследований.* 2017; 5: 96-119.
50. Hermanson G.T. Preparation of Hapten-Carrier Immunogen Conjugates. In: Greg T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques. 2nd ed.* Amsterdam...Tokyo: Elsevier; 2008: 745-782.
51. Hermanson G.T. Modification with Synthetic Polymer // In: Greg T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques. 2nd ed.* Amsterdam...Tokyo: Elsevier; 2008: 936-960.
52. Jacob C.O., Arnon R., Sela M. Effect of carrier on immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. *Mol. Immunology.* 1985; 22(12): 1333-1339.
53. Claman H.N., Miller S.D. Requirements for induction of T cell tolerance to DNEB: efficiency of membrane associated DNFB. *J. Immunol.* 1976; 117(2):480-485.

54. Snippe H., Kamp E. Cell-cooperation and hapten-carrier complex. *Immunology*. 1974; 29: 675-680.
55. Anderson P.W., Pichichero M.E., Stein E.C. et al. Effect of oligosaccharide chain length, exposed terminal group, and hapten loading on the antibody response of human adults and infants to vaccines consisting of *Haemophilus influenzae* type b capsular antigen uniterminally coupled to the diphtheria protein CRM197. *J. Immunol.* 1989; 142: 2464-2468.
56. Bizzini B., Blass J., Turpin A., Raynaud M. Chemical characterization of tetanus toxin and toxoid amino acid composition, number of SH and S-S groups and N-terminal amino acid. *Eur. J. Biochem.* 1970; 17: 100-105.
57. Collier R.J., Kandel J. Structure and activity of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 1971; 246: 1496-1503.
58. Allison A.C., Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature (London)*. 1974; 252: 252
59. Alving C.R. Liposomes as carriers for vaccines // In: *Liposomes from Biophysics to Therapeutics* (M.J. Ostro, ed.). New York: Dekker; 1987: 195-218.
60. Therien H.-M., Shahum E. Importance of physical association between antigen and liposomes in liposome adjuvant activity. *Immunol. Lett.* 1989; 22: 253-258.
61. Hopp T.P. Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: Enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Mol. Immunol.* 1984; 21: 13-16.
62. Wheat T., Shelton J.A., Conzales-Prevatt V., Goldberg E. The antigenicity of synthetic peptide 100. fragments of lactate dehydrogenase C4. *Mol. Immunol.* 1985; 22: 1195-1199.
63. Tam J.P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988; 85: 5409-5413.
64. Gegg C.V., Etzler M.E. Directional coupling of synthetic peptides to poly-L-lysine and applications to the ELISA. *Anal. Biochem.* 1993; 210: 309-313.
65. Posnett D.N., McGrath H., Tam J.P. A novel method for producing anti-peptide antibodies: Production of site-specific antibodies to the T-cell antigen receptor b-chain. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 1719-1725.
66. Koida M., Takahashi M., Muraoka S., Kaneto H. Antibodies to BSA conjugates of morphine derivatives: Strict dependency of the immunological specificity on the hapten structure. *Jpn. J. Pharmacol.* 1974; 24: 165-167.

67. Carrera M. R., Ashley J. A., Parsons I. H. Supression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature*. 1995; 378: 727-730.
68. Carrera M. R., Ashley J. A., Parsons I. H., Wirsching P., Koob G.F., Janda K. D. Supression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature*. 1995; 378:727-730.
69. Carrera M.R., Ashley J.A., Zhou B., Wirsching P., Koob G.F., Janda K.D. Cocaine vaccines: antibodies protection against relapse in a rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000; 97: 6202-6206.
70. Pichichero M.E. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2013; 9: 2505-2523.
71. Hicks M. J., De P. B., Rosenberg J. B., Davidson J. T. et al., Cocaine analog coupled to disrupted adenovirus: a vaccine strategy to evoke high-titer immunity against addictive drugs. *Mol. Ther*. 2011; 19 (3): 612-619.
72. Wee S., Hicks M. J., De P. B., Rosenberg J. B. et al. Novel cocaine vaccine linked to a disrupted adenovirus gene transfer vector blocks cocaine psychstimulant and reinforcing effects. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37: 1083-1091.
73. Basmadjian G.P., Singh S., Sastrojojo B., Smith B.T. et al. Generation of polyclonal catalytic antibodies against cocaine using transition state analogs of cocaine conjugated to diphtheria toxoid. *Chem. Pharm. Bull*. 1995; 43 (11): 1902-1911.
74. Anton B., Leff P. A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addictionj in rodents. *Vaccine*. 2006; 24: 3232-3240.
75. Ennifar S. et al. Hapten-carrier conjugates for treating and preventing nicotine addiction: Patent 7,776,620 US. Int. Cl. G01N 33/552 / No 11/780742, fill.: 20.07.2007 ; publ. 17.08.2010.
76. Duryee M. J., Bevins M. A., Reicyhel C. M. et al. Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines. *Vaccine*. 2009; 27: 2981-2988.
77. Matyas G.R., Mayorov A. V., Rice K. C. et al. Liposomes containing monophosphoryl lipid A: a potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin hapten analogs. *Vaccine*. 2013; 31: 2804-2810.
78. Козлов В.К., Дрыгина Л.Б., Беспалов А.Я. Идентификация и количественное определение в биожидкостях нейролептиков и антидепрессантов фенотиазинового ряда иммуноферментным методом // *Острые токсикозы в клинической практике: Мат. науч. конф.* Баку; 1989: 35-36.

79. Lieberman S., Erlanger B.F., Beiser S.M. Steroid-protein conjugates: their chemical, immunochemical and endocrinological properties. *Recent Progr. Hormone Res.* 1959; 15: 165-200.
80. Wainer B.H., Fitch F.W., Fried J., Rothberg R.M. A measurement of the specificities of antibodies to morphine-6-succinyl-BSA by competitive inhibition of ¹⁴ C-morphine binding. *J. Immunol.* 1973; 110: 667-673.
81. Hamburger R.N. Chloroamphenicol-specific antibody. *Science.* 1966; 152: 203-205.
82. Chien Y.-H., Levine L. Fluorescent quenching of adriamycin by specific antibodies. *Immunochemistry.* 1975; 12: 291-296.
83. Pescar B., Spector S. Serotonin: radioimmunoassay. *Immunochemistry.* 1975; 12: 1340-1342.
84. Yoshiharu K., Toshio O., Kiyoko A. et al. Enzyme immunoassay for cortisol in serum using cortisol 21-amine. *Steroids.* 1978; 32: 137-144.
85. Brunswick D.J., Needelman B., Mendel J. Radioimmunoassay of imipramine and desmethyylimipramine. *Life Sci.* 1978; 22 (2): 137-146.
86. Aherne G. W., Piall E. M., Marks V. The radioimmunoassay of tricyclic antidepressants. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1976; 3: 561-565.
87. Magulre K.P., Burrows G.D., Norman T. R., Scoggins B.A. A radioimmunoassay for nortriptyline (and other tricyclic antidepressants) in plasma. *Clin. Chem.* 1978; 24: 549-554.
88. Pescar B.F., Pescar B. M., Levine L. Specificities of antibodies to normethanephine. *Eur. J. Biochem.* 1972; 26: 101-105.
89. Tsui P.T., Kelly K.A., Ponpipon M.M. et al. Tetrahydrocannabinol-protein conjugates. *Can. J. Biochem.* 1974; 52: 252-258.
90. Kawashima K., Levy A., Spector S. Stereospecific radioimmunoassay for propranolol isomers. *J. Pharm. Exp. Ther.* 1976; 196: 517-523.
91. Dixon W. R., Young R. L., Ning R., Liebman A. Radioimmunoassay of the anti-convulsant agent clonazepam. *J. Pharm. Sci.* 1977; 66 (2): 235-237.
92. Warren R. J., Fotherby K. Radioimmunoassay of synthetic progestogens, norethisterone and norgestrel. *J. Endocrinol.* 1974; 62: 605-618.
93. Hiroi M., Stanczyk F. Z., Goebelsman U. et. al. Radioimmunoassay of serum medroxyprogesterone acetate in women following oral and intravaginal administration. *Steroids.* 1975; 26: 373-386.
94. Benesch R., Benesch R. E. In: *Sulfur in Proteins*. New York: Academic Press, 1959; 15-24.
95. Butler G.C., Harrington C.R., Yuill M.E. Observation on antisera against aspirin-protein

complexes. *Biochem. J.* 1940; 34: 838-845.

96. Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate chemistry.* 1992; 3: 3-12.

97. Пантелеев Э.И., Кашкин К.П. Т и В-клетки и проблема конкуренции антигенов. *Общие вопросы патологии.* М.: ВИНТИ; 1977: 81-100.

98. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. *Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным соединениям.* М.: Наука; 1985: 304 с.

99. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Гурьянов Г.А. Гемисукцинат бромистого 2-[N,N-диметил-N-(2-оксиэтил) аммонийметил]-3-(N,N-диметилкарбамоил) пиридина в качестве промежуточного продукта для получения синтетических конъюгированных антигенов, специфичных к аминостигмину: Авторское свидетельство СССР №1593161, приор. 13.12.1988, регистр. в Гос. реестре изобретений 15.05.1990.

100. Beiser S.M., Butler V.P., Jr., Erlanger B.F. Hapten-protein conjugates: Methodology and application. In: *Textbook of Immunopathology, 2nd ed.* P.A. Miescher, H.J. Miller-Eberhard (eds). – New York: Grune and Stratton, 1976; 15-29.

101. Chase M.W. Preparation of immunogens. In: *Methods in Immunology and Immunochemistry, V.1* (ed. by C.A. Williams and M.W. Chase). – New York: Academic Press, 1967: 197-209.

102. *Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов.* Красноярск: ООО «Издательство Поликор»; 2021: 576 с.