

**ИСКУССТВЕННЫЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ
С ГАПТЕНАМИ-АНАЛОГАМИ ПСИХОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
И ТОКСИКАНТОВ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ
СПЕЦИФИЧНОСТИ ГАПТЕННЫХ ЭПИТОПОВ**

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

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. На основании анализа имеющихся литературных данных и собственного опыта авторов в области конструирования конъюгированных антигенов с гаптенами психоактивных и токсичных соединений обобщены принципы придания гаптенным эпитопам свойства иммунодоминантности в составе антигенов (иммуногенов). Описаны основные алгоритмы обеспечения иммунодоминантности и целевой специфичности гаптен-аналогов, а, соответственно, и специфичности антител, получаемых при гуморальном иммунном ответе на подобные конъюгированные антигены. Утверждается, что конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами психоактивных веществ и токсикантов, являясь молекулярными вакцинами особого типа, экспонируют в своем составе различную биологическую информацию, а именно:

- 1) антигенные детерминанты иммунохимической специфичности, включая гаптенные эпитопы и эпитопы макромолекулярного носителя;
- 2) антигенные участки (сайты), активирующие кооперативные взаимодействия иммунокомпетентных клеток в процессе узнавания антигена и инициации адаптивного иммунного ответа;
- 3) антигенные участки (сайты), способные запускать процесс поликлональной активации лимфоцитов (вероятно, это утверждение справедливо далеко не для всех конъюгированных антигенов);

4) антигенные участки (сайты), идентифицируемые как РАМР, которые отвечают за проявление антигеном свойства «внутренней адъювантности» и активируют конституционную иммунореактивность (представлены далеко не на всех конъюгированных антигенах);

5) фармакофорные (токсофорные) группы гаптена-аналога, сохранившие активность при химической конъюгации с носителем.

Экспонирующий перечисленную биологическую информацию конъюгированный антиген (иммуноген) при активной иммунизации – вакцинации запускает процессы иммунореактивности организма. Активация системы конституционного иммунитета является подготовительной фазой адаптивного иммунного ответа, включая его гуморальную составляющую. По ходу иммунного ответа нарабатываются специфичные к антигену (иммуногену) антитела и пролиферируют иммунокомпетентные клетки – многочисленные клоны лимфоцитов со специфичностью к каждому конкретному эпитопу антигена. Распознав антиген, иммунная система воплощает стратегию ответа на антиген и организует совокупность проявлений и механизмов иммунореактивности – иммунный ответ, который в своей адаптационной составляющей всегда конкретен, так как реализуется с привлечением иммунных факторов индивидуального и строго специфичного распознавания иммунохимических детерминант антигенной специфичности – эпитопов антигена, включая гаптенные эпитопы конъюгированных антигенов. По сути, структура конъюгированного антигена (иммуногена) программирует ответную реакцию организма. При этом, биологическая активность иммуногена, экспонированная в его структуре, предопределяет стратегию и выбор алгоритмов иммунореактивности, специфичность и интенсивность иммунного ответа, включая антителообразование. Названными характеристиками иммунореактивности организма можно управлять, оптимизируя качества антигена и моделируя его структуру.

Излагается методология оптимизации характеристик конъюгированных антигенов, используемых с целью получения реагентов для иммунохимического анализа, в частности поликлональных и моноклональных антител. Эти антитела предназначены для применения в чувствительных и специфичных методах количественного определения множества биологически активных низкомолекулярных соединений – лекарственных препаратов различных фармакологических групп, экотоксикантов и высокотоксичных ядов.

Конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами психоактивных веществ, в частности с гаптенами-аналогами наркотиков, пытаются использовать, в качестве вакцин, применяемых для вакцинации наркозависимых лиц с целями вторичной профилактики наркотической зависимости. Проводятся также исследования по эффективности применения Fab-фрагментов моноклональных антител в качестве лечебных биотехнологических препаратов при летальных интоксикациях некоторыми лекарствами и наркотиками.

Ключевые слова: психоактивные вещества; наркотические вещества; фосфорорганические вещества; конъюгированные антигены (конъюгаты гаптен-носитель); принципы конструирования; иммунохимическая специфичность; гаптенные детерминанты (эпитопы); эпитопная плотность на носителе; гаптены-аналоги психоактивных веществ и токсикантов; моделирование специфичности; методы анализа молекулярных характеристик; иммунохимический анализ и другие направления использования в медицине.

HAPTEN-CARRIER CONJUGATES WITH HAPTENS-ANALOGUES OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES AND TOXICANTS: GENERAL PRINCIPLES OF MODELING THE SPECIFICITY OF HAPTENE EPITOPES

Kozlov V.K.^{1,2*}, Beshpalov A.Ya.¹, Kashuro V.A.^{2,3,4}

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. Based on the analysis of the available literature data and the author's own experience in the field of constructing conjugated antigens with haptens of psychoactive and toxic compounds, the principles of giving hapten epitopes the property of being immunodominant in the composition of antigens (immunogens) are summarized. The main algorithms for ensuring the immunodominance and target specificity of hapten analogs, and, accordingly, the specificity of

antibodies obtained in the humoral immune response to such conjugated antigens, are described. It is argued that conjugated antigens with hapten analogues of psychoactive substances and toxicants, being molecular vaccines of a special type, exhibit various biological information in their composition, namely:

- 1) antigenic determinants of immunochemical specificity, including hapten epitopes and epitopes of a macromolecular carrier;
- 2) antigenic sites that activate cooperative interactions of immunocompetent cells in the process of antigen recognition and initiation of an adaptive immune response;
- 3) antigenic sites capable of triggering the process of polyclonal activation of lymphocytes (probably, this statement is not true for all conjugated antigens);
- 4) antigenic sites identified as PAMP, which are responsible for the manifestation of the property of "internal adjuvant" by the antigen and activate constitutional immunoreactivity (not present on all conjugated antigens);
- 5) pharmacophore (toxophoric) groups of the hapten-analogue that retained their activity upon chemical conjugation with a carrier.

The conjugated antigen (immunogen) exhibiting the listed biological information during active immunization-vaccination triggers the processes of organism's immunoreactivity. Activation of constitutional immunity system is a preparatory phase of the adaptive immune response, including its humoral component. In the course of the immune response, antibodies specific to the antigen (immunogen) are produced and immunocompetent cells proliferate – numerous clones of lymphocytes with specificity for each specific epitope of the antigen. Having recognized an antigen, the immune system embodies the strategy of response to an antigen and organizes a set of manifestations and mechanisms of immunoreactivity – an immune response that is always specific in its adaptive component, since it is implemented with the involvement of immune factors of individual and strictly specific recognition of immunochemical determinants of antigenic specificity – antigen epitopes, including hapten epitopes of conjugated antigens. In fact, the structure of conjugated antigen (immunogen) programs the organism's response. At the same time, the biological activity of the immunogen, exposed in its structure, predetermines the strategy and choice of immunoreactivity algorithms, the specificity and intensity of the immune response, including antibody production. These characteristics of the organism's immunoreactivity can be controlled by optimizing the quality of the antigen and modeling its structure.

A methodology for optimizing the characteristics of conjugated antigens used to obtain reagents for immunochemical analysis, in particular, polyclonal and monoclonal antibodies, is outlined. These antibodies are intended for use in sensitive and specific methods for the quantitative

determination of many biologically active low molecular weight compounds – drugs of various pharmacological groups, ecotoxigants and highly toxic poisons.

Conjugated antigens with haptens-analogs of psychoactive substances, in particular with haptens-analogs of drugs, are trying to be used as vaccines used to vaccinate drug addicts with the aim of secondary prevention of drug addiction. Studies are also being conducted on the effectiveness of the use of Fab fragments of monoclonal antibodies as therapeutic biotechnological preparations for lethal intoxications with certain drugs and narcotic substances.

Keywords: psychoactive substances; narcotic substances; organophosphates; conjugated antigens (hapten-carrier conjugates); design principles; immunochemical specificity; hapten determinants (epitopes); epitope density on the carrier; haptens-analogues of psychoactive substances and toxicants; specificity modeling; methods of analysis of molecular characteristics; immunochemical analysis and other practical directions in medicine.

Введение

К веществам, вызывающим полноценный ответ иммунной системы, – антигенам (иммуногенам) обычно относят: белки растительного и животного происхождения, нуклеиновые кислоты, белки и липополисахариды различных микроорганизмов, а также их комплексы; полипептиды, некоторые полимеры углеводов, искусственные полимеры типа поликатионов и полианионов, более сложные искусственные макромолекулы. Антигены (иммуногены) характеризуются рядом качеств, включая достаточную высокую (несколько тысяч дальтон) молекулярную массу, повторяемость структурных компонентов в макромолекуле в сочетании с разнообразием её общей структуры, обладание структурными компонентами, идентифицируемыми как Pathogen-associated molecular patterns – PAMP [1-5]. В иммунохимическом контексте с этими общими характеристиками организации молекулярной структуры антигенов ассоциировано представление о детерминантах иммунохимической специфичности – антигенных эпитопах, на которые и развивается адресный иммунный ответ, включая образование специфичных к антигену иммуноглобулинов и появление клонов лимфоцитов. В качестве детерминант иммунохимической специфичности в конъюгированных антигенах выступают как участки макромолекулярного носителя:

- 1) пространственные (конформационные) детерминанты, формируемые складчатостью цепей аминокислот белков и пептидов;
- 2) конформационные детерминанты третичной и четвертичной структуры крупных белков и нуклеопротеинов;

- 3) линейные детерминанты, формируемые отрезками аминокислотной последовательности белков или олигосахаридами корда полисахаридов;
- 4) детерминанты концевых аминокислотных остатков белков или детерминанты последовательности 2-3 моносахаридных остатков на концах боковых цепей разветвленных полисахаридных носителей; так и конъюгированные с макромолекулярными носителями гаптенные эпитопы. Следовательно, по набору антигенных эпитопов конъюгированные антигены обычно полиспецифичны.

Известно, что применительно к конъюгированным антигенам на основе белков на эпитопы носителя и гаптенные эпитопы отвечают пролиферирующие разные по функциональной специализации и фенотипу лимфоидные клоны: на детерминанты белка носителя – преимущественно Т-лимфоциты, на гаптенные детерминанты – преимущественно предшественники плазматических клеток – В-лимфоциты. В клеточной кооперации при разворачивании адаптивного иммунного ответа участвуют также антигенпрезентирующие клетки разных типов.

Для белковых и полипептидных конъюгированных антигенов существенным является разнообразие аминокислот в первичной аминокислотной последовательности белка, наличие ароматических аминокислот, а также различных включений в макромолекулу, которые вместе с гаптенами могут выступать как дополнительные антигенные эпитопы [1, 3, 4]. Для конъюгированных антигенов на основе полисахаридов, а также имеющих более сложную структуру липополисахаридов, гликопротеинов, пептидогликанов существенно разнообразие их общей молекулярной и конформационной организации, а также наличие разнообразных участков, выполняющих функцию боковых цепей (пептидные или же олигосахаридные цепочки, концевые аминокислотные остатки, моно- и дисахара) [3, 4].

На молекулы с молекулярной массой менее 1000 Да (D), а именно такими молекулами является большинство простых химических веществ, включая множество ксенобиотиков с активностью токсикантов и лекарственных соединений, иммунная система конституционно не может генерировать полноценный ответ. Соответственно, низкомолекулярные химические соединения не являются иммуногенами и не способны индуцировать иммунный ответ, включая антителообразование. Некоторые низкомолекулярные вещества (например, цитостатические лекарственные препараты, азотистый иприт, ряд экотоксикантов, относящихся к галогенсодержащим и фосфорорганическим соединениям) при определенных условиях не безразличны для иммунной системы. Подобные химические вещества, имея высокую реакционную

способность, *in vivo* конъюгируются (т.е. непосредственно связываются) с эндогенными макромолекулами, в частности с нативными белками. При этом, выступая как гаптены, становятся детерминантами иммунохимической специфичности образующегося *de novo* полного (полноценного) антигена [5, 6]. В частности, установлена способность тиофосфатов и дитиофосфатов, выполняя функцию гаптенных при конъюгации с белком с участием промежуточного метаболита диоксафосфоринан-метоксиацетиловой кислоты *in vivo* образовывать конъюгированные антигены, которые вызывают интенсивное антителообразование с продукцией иммуноглобулинов преимущественно IgE-класса [7].

В первой половине XX века К. Landsteiner [8] предложил общий принцип получения в условиях *in vitro* искусственных конъюгированных антигенов (конъюгатов) с детерминантами многих ароматических низкомолекулярных соединений (гаптенных) с использованием химической реакции азосочетания. При развитии этого научного направления был разработан целый ряд других способов химического конъюгирования, пригодных для модификации структуры белков и их иммунохимической специфичности. Последующее развитие данного направления в прикладных научно-исследовательских работах оказалось крайне успешным, что позволило синтезировать несколько сотен искусственных конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами целевых химических соединений различной структуры и биологической активности, а также обосновать принципы модификации специфичности гаптенных эпитопов в составе полученных конъюгированных антигенов [9, 10, 12, 15-18, 20].

С использованием этих антигенов при активной иммунизации животных-доноров антисывороток, а позднее особых клеточных культур – гибридом, были получены специфические антитела, пригодные для количественного определения целевых биологически активных соединений иммунохимическими методами [9-24, 43, 44]. В конце XX века была обоснована возможность использования принципов активной иммунизации конъюгированными антигенами с гаптенами-аналогами наркотических веществ (фактически молекулярными вакцинами особого типа) для целей вторичной профилактики наркотической зависимости [25-29].

Наличие общих принципов и ряда технических решений по созданию иммунохимических реагентов со специфичностью к целевым низкомолекулярным соединениям – психоактивным лекарственным препаратам, интоксикантам, в частности конъюгированных антигенов оптимального строения, которые способны быть сильными иммуногенами, в принципе позволяет решать большинство задач получения иммунохимических реагентов с оптимальными характеристиками. Качества получаемых

при иммунизации подобными антигенами специфичных антител – их достаточное (поликлональные сывороточные иммуноглобулины) или же неограниченное (моноклональные антитела) количество и высокая специфичность предопределили создание методов иммунохимического анализа с выдающимися эксплуатационными характеристиками – радиоиммунологического анализа, иммунофлюоресцентного анализа, иммуноферментного анализа.

Целевые соединения в своей структуре зачастую не имеют реакционно-способных химических групп, пригодных для проведения реакций конъюгирования с макромолекулярными носителями (чаще для осуществления химического конъюгирования используют amino- или карбоксильную группы), или же имеющиеся химические группировки не обеспечивают необходимую специфичность гаптенных эпитопов синтезируемых конъюгированных антигенов. Эти ограничения могут быть преодолены введением в целевое соединение новой реакционно-способной химической группы. В этом случае синтезируется химическое соединение подходящей структуры с реакционно-способной химической группой, которое становится гаптен-аналогом исходного соединения и далее используется для химического конъюгирования с носителем.

Наличие технологий химической модификации целевых биоактивных веществ не отменяет необходимости детальной проработки применительно к каждому целевому биологически активному соединению – лекарству, наркотику, яду комплекса задач по созданию иммунохимических реагентов оптимальных характеристик и методов их практического использования. На всех этапах получения и оптимизации характеристик молекулярных вакцин с гаптенными детерминантами низкомолекулярных биоактивных веществ, включая нейротоксиканты и психотропные вещества, необходимо добиваться иммунодоминантности и целевой специфичности гаптенных эпитопов в составе конъюгированных антигенов. Это достигается химической модификацией целевых биоактивных соединений путем синтеза соответствующих гаптен-аналогов с использованием ряда известных методов и их последующим химическим конъюгированием с макромолекулярными носителями, что позволяет в результате получать конъюгированные антигены оптимальных характеристик.

Целью предлагаемого вниманию заинтересованных специалистов исследования являлась систематизация имеющейся информации по конструированию искусственных конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных веществ и токсикантов и изложением ряда общих принципов, а также описание известных технических решений достижения иммунодоминантности гаптенных эпитопов в составе конъюгированных

антигенов. Рассматриваемые технические решения имеют отношение к методам синтеза конъюгированных антигенов на основе макромолекулярных, преимущественно белковых, носителей и позволяют моделировать иммунохимическую специфичность гаптенных эпитопов в составе синтезированных конъюгатов, а, соответственно, и специфичность антителообразования к гаптенным эпитопам при иммунном ответе на подобные антигены (иммуногены).

Иммунодоминантность гаптенных эпитопов в конъюгатах биологически активных гаптенных: адекватные молекулярные характеристики гаптенных-аналогов целевых лигандов как условие обеспечения иммунодоминантности

При рассмотрении вопроса оптимизации молекулярных характеристик конъюгированных антигенов получаемых посредством конъюгирования гаптенных-аналогов целевых психоактивных веществ и токсикантов с макромолекулярными носителями принципиально важным представляется обеспечение доступности гаптенного эпитопа в составе конъюгированного антигена для его узнавания антигенраспознающими структурами В-лимфоцитов.

Доступность гаптенных эпитопов в составе конъюгированных антигенов для инициации иммунного ответа на гаптен. Доступность гаптенного эпитопа определяется: 1) локализацией гаптенного эпитопа на поверхности макромолекулярной конформации антигена, 2) достаточной удаленностью гаптенного эпитопа от линейных детерминант иммунохимической специфичности макромолекулярного носителя, 3) оптимальным числом идентичных гаптенных эпитопов, находящихся на молекуле макромолекулярного носителя, – эпитопной плотностью гаптена.

Утверждение о необходимости достижения оптимальной эпитопной плотности гаптена на носителе было сформулировано еще К. Landsteiner (1945) [8] в его классических исследованиях, посвященных принципам приобретения иммунологической активности низкомолекулярными химическими соединениями и способам придания ксенобиотикам этого типа подобной биологической активности. Применительно к активной иммунизации конъюгированными антигенами низкомолекулярных гаптенных на разных носителях установлено, что как низкая, так и высокая эпитопная плотность гаптена в используемых для иммунизации конъюгатах неблагоприятно влияют на интенсивность антителообразования к гаптенным эпитопам [30, 31]. Литературные данные по этому вопросу многочисленны, но трудно сопоставимы, так как относятся к конъюгатам различных гаптенных на разных носителях. Практически для каждого вновь получаемого

конъюгата необходимо эмпирически подбирать оптимальную эпитопную плотность гаптена.

Условия обеспечения доступности гаптенного эпитопа для инициации иммунного ответа на гаптен, зависимые от молекулярной структуры конъюгированных антигенов. Иммунодоминантность гаптенного эпитопа. Как доступность гаптенного эпитопа для узнавания антигенраспознающими структурами клеток адаптивного иммунитета, так и оптимальное число эпитопов гаптена на носителе для запуска интенсивного гуморального иммунного ответа определяются различными факторами, в частности: 1) размером молекулы гаптена-аналога; 2) выразительностью его молекулярной структуры, которая обеспечивается присутствием в составе гаптенной детерминанты иммунологически значимых участков молекулярного строения (например, ароматических и гетероциклических /т.е. условно «жестких» участков молекулярной структуры/; атомов фосфора, фтора, хлора, брома, а также длинных алифатических и разветвленных углеродных цепочек без и с включением атомов хлора и фтора на концах углеродных цепей боковых заместителей, локализованных в разных положениях циклов пятичленных и шестичленных ароматических /карбоциклических/ структур гаптена; атомов азота, кислорода, серы в составе гетероароматических /гетероциклических/ структур гаптена; полициклических /два и более сопряженных цикла/ структур гаптена); 3) удалением гаптенного эпитопа от молекулы носителя и характером расположения перечисленных выше участков гаптенного эпитопа по отношению к месту ковалентной связи гаптена-аналога с макромолекулярным носителем; 4) соотношением молекулярных масс гаптена-аналога и носителя.

В совокупности перечисленные особенности молекулярной организации конъюгированного антигена ответственны за придание гаптенному эпитопу свойства иммунодоминантности (например, посредством локализации гаптенной детерминанты на поверхности макромолекулярной конформации конъюгированного антигена) [3-5, 31-33].

От перечисленных особенностей строения конъюгированных антигенов зависит фактическое расположение гаптенного эпитопа в локальной точке трехмерного пространства его взаимодействия как детерминанты иммунохимической специфичности с антигенраспознающими рецепторами иммунокомпетентных клеток и сайтами межклеточных взаимодействий антигенпрезентирующих клеток. Это событие, как известно, предопределяет саму возможность запуска механизмов иммунологической ответности и процесс выработки антител со специфичностью к эпитопам гаптена [32, 33], что и будет

являться проявлением иммунологической доминантности гаптенного эпитопа как детерминанты иммунохимической специфичности конъюгированного антигена.

Оптимальная эпитопная плотность гаптенного эпитопа на носителе.

Установлено, что оптимальная эпитопная плотность гаптенов в их конъюгатах с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в качестве белка-носителя (м.м. ~ 69000 D) составляет 5-15 гаптенных эпитопов [8, 12, 30]. Конкретное значение оптимальной эпитопной плотности гаптена-аналога в составе конъюгата определяется размером гаптенного эпитопа (для гаптенов большого размера это значение минимально, для гаптенов малого размера – максимально).

Применительно к гаптенам-аналогам различных токсичных и фармакологически активных соединений таких, как диоксин, афлатоксин, параоксон, ДДТ, мелатион, феноксibenзамин, мескалин, никотин, атропин, пиридоксамин, хлорфенотиазин, пирензепин, морфин и его производные, метамфетамин, кокаин, ЛСД, ГАМК и ряда других соединений оптимальная эпитопная плотность гаптена в составе конъюгированных антигенов, полученных с использованием иных, чем БСА, макромолекулярных носителей, может составлять от 2 до 850 гаптенных эпитопов на молекулу носителя [8, 12, 15, 16, 20, 25, 35-39, 41-45, 47-49, 51, 53-57, 63, 81].

Столь большой диапазон значений этой характеристики, определенной в конъюгатах разных гаптенов на различных носителях, в основном связан с различиями в молекулярной массе используемых белковых (или других) высокомолекулярных носителей. Очевидно, что с увеличением молекулярной массы носителя увеличивается количество его реакционно-способных групп, которые могут вступить в ковалентную связь с гаптенном-аналогом. Как уже отмечалось, на значение оптимальной эпитопной плотности существенное влияние оказывает также размер вводимого в состав конъюгированного антигена гаптенного эпитопа и «выразительность его молекулярной структуры». Строение гаптенного эпитопа (фактически его «иммунохимическое лицо»), определяемое наличием ароматических колец, гетероциклических и полициклических структур с включением атомов азота, серы, кислорода; наличием алифатических заместителей разветвленной структуры в различных положениях ароматических и гетероциклических колец, наличием атомов фосфора, хлора, фтора, брома в качестве боковых заместителей в различных положениях ароматических или гетероциклических колец) имеет критичное значение в контексте способности гаптенного эпитопа при активной иммунизации конъюгированным антигеном вызывать гуморальный иммунный ответ с выработкой антител именно к гаптенной детерминанте (т.е. быть иммунодоминантной антигенной детерминантой). Оптимальное соотношение

носитель/гаптен может отклоняться от наиболее часто приводимого в различных исследованиях интервала – 1/10-1/20 и по другим причинам.

Для каждого целевого биологически активного низкомолекулярного соединения оптимальная эпитопная плотность его гаптена-аналога на выбранном для получения конъюгированного антигена высокомолекулярном носителе обычно подбирается эмпирически при скрининге ряда синтезированных конъюгатов, в которых на каждую молекулу выбранного макромолекулярного носителя приходится возрастающее количество молекул гаптена. При получении конъюгированных антигенов это обычно достигается путем пошагового увеличения молярного избытка гаптена-аналога, вводимого в реакцию конъюгирования с используемым носителем (по критерию соотношения их молекулярных масс).

На величину эпитопной плотности гаптен-аналогов с карбоксильной группой на белковых носителях существенное влияние оказывает метод, который используют для того, чтобы ковалентно связать гаптен-аналог с аминок группами белка-носителя. Так, среди описанных методов конъюгирования таких гаптен-аналогов – карбодиимидного, активированных эфиров и смешанных ангидридов наибольшее значение эпитопной плотности гаптена на носителе при получении конъюгированных антигенов позволяет достичь метод смешанных ангидридов [112].

Методы определения эпитопной плотности гаптена на носителе. Значение эпитопной плотности гаптена на носителе определяют различными методами. Наиболее точным способом определения содержания гаптена в конъюгированном антигене является метод с использованием гаптена, меченного радиоактивной меткой. Содержание гаптена устанавливают по разнице в радиоактивности исходной смеси меченного гаптена с носителем и радиоактивности, которую выявляет низкомолекулярная фракция (в диализате после диализа конъюгированного антигена или в прошедшем колонку растворе, полученном после нанесения раствора конъюгированного антигена на гель-хроматографическую колонку). Так, в исследовании [51], посвященном получению специфических антител к атропину, гемисукцинат атропина как гаптен-аналог в составе конъюгированного антигена синтезировали из смеси атропина и атропина, меченного радиоактивным тритием. Наличие радиоактивной метки существенно облегчает анализ получаемых конъюгатов. Этот метод определения эпитопной плотности крайне дорог, трудоемок и требует соответствующего специального оборудования и особого режима организации работ, поэтому используется крайне редко.

Намного чаще применяют спектрофотометрические методы анализа эпитопной плотности, в особенности для тех гаптенов, которые имеют интенсивные максимумы поглощения в ультрафиолетовом спектре (УФ-спектре). Если группы гаптена-аналога имеют достаточно интенсивные максимумы поглощения в УФ-спектре, то сравнивая спектры гаптенов-аналогов, белков-носителей этих гаптенов, а также синтезированных конъюгированных антигенов и рассчитывая коэффициенты экстинкции конъюгатов при $\lambda_{\max}$ каждого гаптена из УФ-спектров конъюгатов, можно достаточно точно оценить число гаптенных групп на молекуле носителя.

В 90-е годы прошлого столетия для определения эпитопной плотности гаптенов в конъюгированных антигенах стала активно применяться технология МАЛДИ-масс-спектрометрии (МАЛДИ-МС) [36, 47, 52], которая лишена некоторых недостатков УФ-спектрометрических методов, в частности позволяет работать с конъюгатами, обладающими неполной растворимостью в водных солевых растворах.

Специфичность гаптенных эпитопов и оптимизация строения конъюгированных антигенов путем моделирования структуры гаптена-аналога

Основное предназначение конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами биологически активных веществ – это их применение с целями создания искусственного иммунитета со специфичностью к целевому низкомолекулярному соединению путем активной иммунизации (фактически вакцинации). После вакцинации в условиях *in vivo* индуцируется образование специфических антител у животных-доноров сывороточных иммуноглобулинов (источник получения поликлональных гетерологичных антисывороток). Конъюгат может использоваться для активации продукции иммуноглобулинов клеточными культурами-продуцентами антител – гибридомами в условиях *in vitro* (источник получения моноклональных гетерологичных, как правило, мышинных, или же гуманизированных моноклональных антител). Полученные тем или иным способом специфичные к гаптенам-аналогам биологически активных веществ антитела затем используются как иммунохимические реагенты в различных методах определения этих веществ (например, в иммуноферментном методе) или же для пассивной иммунизации с целью изменения у животных получивших антитела биологической активности, в частности токсичности, целевых лигандов.

Независимо от варианта планируемого использования специфичных к целевому соединению антител важно добиться интенсивного образования антител соответствующей специфичности по ходу гуморального иммунного ответа, что достигается оптимизацией строения конъюгированных антигенов, в частности путем моделирования структуры

гаптена-аналога целевых соединений в составе конъюгатов и оптимизацией методов иммунизации экспериментальных животных, служащих источником специфических антител.

Общие принципы моделирования структуры гаптена при оптимизации строения конъюгированных антигенов. Еще на заре исследований по иммунохимии низкомолекулярных соединений установили, что специфичность антител к гаптенным эпитопам конъюгированных антигенов, как правило, определяется той частью гаптенной детерминанты, которая наиболее удалена от эпитопов иммунохимической специфичности носителя и мест ковалентной связи гаптенных детерминант с носителем. Позднее эта закономерность специфичного к гаптенным эпитопам антителообразования была неоднократно подтверждена разными исследователями при получении антител к стероидам [55, 56, 60, 61], канцерогенным соединениям [57], морфину, барбитуратам и серотонину [39, 58, 63, 76], фосфорорганическим [41, 42, 53, 54] и другим биологически активным низкомолекулярным веществам [38].

Эмпирически было также выяснено, что наличие молекулярной «ножки», включающей от 7 до 10 атомов углерода в молекулярной цепи, – низкомолекулярного спейсерного участка, обеспечивает оптимальную удалённость гаптенного эпитопа от макромолекулярного остова носителя [12, 15]. Наличие низкомолекулярного спейсерного фрагмента между гаптенным эпитопом и носителем обеспечивает удаленность гаптенного эпитопа от иммунохимических детерминант носителя, что создает лучшие условия его распознавания, тем самым придавая иммунодоминантность гаптену и инициируя возможность гуморального иммунного ответа на гаптенный эпитоп. В совокупности с другими молекулярными характеристиками гаптенного эпитопа (например, его «молекулярной выразительностью»), а также молекулярными характеристиками носителя наличие низкомолекулярного спейсерного фрагмента обеспечивает локализацию гаптенной детерминанты на поверхности конформации конъюгированного антигена. Фактически это изменяет определяемую конформацией специфичность антигена (иммуногена), дополнительно придавая гаптенному эпитопу качество иммунодоминантности. В совокупности с оптимальной эпитопной плотностью гаптена-аналога на носителе перечисленные особенности молекулярной организации конъюгированного антигена являются одним из определяющих условий обеспечения иммунодоминантности гаптенной детерминанты в составе конъюгированного антигена. Целенаправленное введение спейсерного участка между гаптенным эпитопом и носителем достигается использованием при химическом конъюгировании особых бифункциональных химических реагентов [91].

В конъюгированном антигене эпитоп гаптена может быть по-разному ориентирован своими функциональными химическими группами в отношении места его связи с носителем. Фактически создаются разные гаптенные модели целевого лиганда, а при иммунизации конъюгатами с рядом таких гаптен-аналогов расширяются возможности последующего использования антисывороток как реагентов для целей иммунохимического анализа [20, 25-27, 36, 45, 50, 59, 67, 68, 98, 110]. Используя гаптены-аналоги целевого соединения разного строения (т.е. химические соединения, обладающие функциональными /реакционно-способными/ группами, локализованными в разных частях молекулы гаптена-аналога), и применяя химические методы конъюгирования, позволяющие формировать ковалентную связь между разными атомами участвующих в конъюгации молекул, можно добиваться большей или меньшей специфичности к целевому лиганду продуцируемых при иммунизации подобными конъюгатами антител [59, 63, 64]. При подборе гаптен-аналогов определенной молекулярной структуры возможно также получение при иммунизации антител групповой специфичности (например, антител к целевому соединению одновременно взаимодействующих с структурными гомологами и метаболитами) [50, 91], либо антител только узкой специфичности [64, 65]. Так, продуцируемые гибридомой и выделенные из культуры гибридных клеток морфин-специфичные моноклональные антитела проявляли минимальную перекрестную реактивность с 3-метилморфином – алкалоидом опиума кодеином [65].

Обычно при создании гаптен-аналогов стремятся сохранить максимально возможное число тех частей молекулы целевого соединения, от которых зависят его биологические свойства (например, для токсичных и лекарственных соединений добиваются сохранения биологически значимых «токсофорных/фармакофорных» участков их молекул) [6, 10, 12, 37, 51, 53, 54, 56, 69-72, 112].

В ряде случаев конъюгирование гаптена и носителя с использованием имеющихся в молекуле гаптена химических группировок невозможно без изменения или полной потери специфичности к целевому соединению получаемых при иммунизации конъюгатом антител [34, 54]. В таких случаях применяют модельный подход, используя в качестве молекул, конъюгируемых с носителем, соединения, которые являются структурными аналогами целевых лигандов. Такие гаптенные эпитопы обычно обозначают как гаптены-аналоги целевых лигандов. Эти гаптены-аналоги должны иметь функциональной группы, способные к химическому соединению с носителем в мягких условиях проведения реакций конъюгирования. Подобные группы вводятся в состав гаптена-аналога путем химического синтеза.

Как уже отмечалось, гаптен-аналог низкомолекулярного лиганда, содержащий реакционно-способную группу, должен иметь строение, оптимально моделирующее строение целевого соединения. Как правило, для получения антител к целевому низкомолекулярному лиганду высокой специфичности гаптен-аналог должен быть конъюгирован с белком (или другим высокомолекулярным носителем) через ту часть молекулы, которая позволит гаптено-аналогу смоделировать иммунохимическую специфичность молекулы целевого лиганда. Желательно также, чтобы присутствовал молекулярный «мостик» – спейсер определенного строения и длины, который обеспечит доступность гаптенного эпитопа для взаимодействия со структурами распознавания антигена на лимфоцитах.

В свою очередь, этот спейсер должен иметь реакционно-способную химическую группировку на конце, предназначенном для связи с носителем. Обычно спейсер представляет собой гибкую алифатическую цепочку, соединяющую гаптен с носителем и состоящую из нескольких атомов углерода с простыми заместителями (например, аминокaproновая кислота). В настоящее время на рынке доступны как гомобифункциональные, так и гетеробифункциональные реагенты, способные при проведении реакции конъюгирования гаптена с носителем обеспечивать при ковалентном связывании формирование спейсерного фрагмента [91].

Ряд химических реагентов (глутаровый альдегид, карбодиимид), используемых для конъюгирования с носителями имеющих карбоксильную или же аминогруппу гаптен-аналогов, при проведении реакции связывания с носителем, в частности через ϵ -аминогруппы лизина белков, автоматически обеспечивают образование спейсерного фрагмента между гаптенным эпитопом и носителем.

Моделирование структуры гаптена-аналога при синтезе конъюгированного антигена имеет критичное значение для получения антител пригодных для использования в методах иммунохимического анализа (например, в радиоиммунном и иммуноферментном методах), а также при моделировании структуры создаваемых молекулярных вакцин к целевым низкомолекулярным соединениям. Поэтому эти вопросы всегда детально прорабатываются, когда речь идет о каждом новом объекте исследования – каждом новым низкомолекулярном лиганде или же группе лигандов со сходной биологической активностью.

Для полноты анализа иммунохимической специфичности получаемых впоследствии антител, как правило, синтезируют гаптены-аналоги и соответствующие конъюгаты, в которых химические функциональные группы вводятся в различные положения молекулы целевого биологически активного соединения. Это приводит к тому, что эпитопы гаптен-

аналогов по разному ориентированы в отношении макромолекулярного остова носителя. Из-за того, что молекула гаптена-аналога обладает только частичным структурным подобием в отношении целевого лиганда, подбор антител для использования в технологиях иммунохимического анализа по критерию их специфичности позволяет значительно увеличивать чувствительность метода индикации целевого соединения [14, 54, 112]. При этом появляется возможность индикации иммунохимическим методом как строго индивидуального химического соединения (например, специфичное выявление целевого соединения в составе смесей со структурно подобными соединениями, обладающими сходной биологической активностью, или же в смесях целевого лиганда и его метаболитов). Так, в поликлональных сыворотках, полученных от иммунизированных конъюгатами стероидов животных, методами иммунохимического анализа выявили выраженную перекрёстную иммунологическую специфичность антител к стероидным гормонам со структурно сходными молекулами, что потребовало для надёжного определения конкретных представителей стероидов использования в конъюгированных антигенах гаптен-аналогов стероидных гормонов различного строения [10, 55, 56, 60, 61].

Строгая зависимость иммунохимической специфичности антител от структуры присутствующего в составе конъюгата гаптенного эпитопа была установлена для конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами морфина и его производных, а также других алкалоидов опиума [9, 20, 27, 39, 50, 58, 62-68]. Поиск гаптена-аналога оптимальной структуры в составе конъюгированных антигенов с целью получения антител узкой специфичности проводился также для циклических нуклеотидов [73], простагландинов [74], катехоламинов [75], гистамина [36], серотонина [76], сердечных гликозидов [77, 117-119], барбитуратов [39], кокаина [25, 111, 113], метамфетамина [36, 107, 110,], опиатов [62-68], аминазина [78], этаперазина и других производных фенотиазина [79], ряда афлатоксинов [80, 81] и многих других биологически активных соединений [15, 16, 47, 74].

Применительно к холинергическим веществам исследования по оптимизации структуры гаптен-аналогов и конъюгированных антигенов с этими гаптенными эпитопами были выполнены для фосфорорганических ядов [35, 41-44, 53, 54, 82-85], холинолитиков, в том числе для соединений, содержащих третичную аминогруппу [51, 70-72, 79, 86-90], а также обратимых ингибиторов холинэстеразы [69].

При моделировании молекулярной структуры гаптен-аналогов различных холиноблокаторов оптимальные по структуре гаптены-аналоги получали химическими методами, подразумевающими введение в их структуру низкомолекулярного алифатического спейсерного фрагмента размером в несколько атомов углерода,

закономерно локализованного между эпитопом гаптена и высокомолекулярным носителем. В итоге, это позволило добиться высокой специфичности антител при количественном определении целевых холинэргических веществ [51, 72, 86, 87].

Ряд полученных конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами соответствующих психоактивных веществ в последующем были использованы в исследованиях по созданию молекулярных вакцин к этим психоактивным и наркотическим веществам, а также при проведении клинических испытаний экспериментальных образцов созданных вакцин с включением наркоманов-добровольцев [20, 25-27, 50, 66, 68, 101-111, 113].

Таким образом, моделирование структуры гаптена-аналога в составе конъюгированных антигенов крайне актуально при разработке и оптимизации эксплуатационных характеристик иммунохимических методов количественного определения целевых низкомолекулярных психоактивных веществ и токсикантов в биосредах организма (например, для использования в твердофазном иммуноферментном анализе необходимы как обладающие высоким сродством к целевым лигандам поликлональные или моноклональные антитела, так и антигены оптимальной структуры для твердой фазы) [10, 11, 13, 14, 40, 46, 78, 79, 86].

Биологическое обоснование известных принципов и подходов оптимизации молекулярного строения и характеристик конъюгированных антигенов

При создании конъюгированных антигенов оптимальных характеристик фактически стремятся обеспечить их высокую иммуногенность, одновременно добиваясь доминантности антителообразования к гаптенному эпитопу и высокой специфичности антител, образующихся в процессе гуморального иммунного ответа, в отношении целевого лиганда. Исключительно все антигены, включая молекулярные компоненты известных вакцин, а также конъюгаты с гаптенами-аналогами низкомолекулярных биологически активных соединений, должны обладать интегральным качеством, обычно определяемым как иммуногенность или «внутренняя адъювантность». Под адъювантностью антигена следует понимать совокупность тех качеств, которые позволяют антигену не только нести детерминанты иммунохимической специфичности – эпитопы (включая гаптенные эпитопы), индивидуально распознаваемые лимфоцитами (на которые собственно и реализуется адаптивный иммунный ответ, включая продукцию плазматическими клетками специфических антител), но и индуцировать эффективную иммунореактивность организма как совокупность реакций иммунитета.

Изучение различных антигенов, которые оказались хорошими иммуногенами, свидетельствует о том, что иммуногенность (помимо тех характеристик, которые применительно к конъюгированным антигенам перечислены выше и являются целевыми установками оптимизации их молекулярной структуры) определяется следующими качествами.

Во-первых, в составе молекулы антигена должны быть представлены различные детерминанты иммунохимической специфичности – антигенные эпитопы (желательно стабильных конформаций и равномерно распределенные по молекуле антигена). Из-за отсутствия конформационных ограничений молекулярных взаимодействий это качество обеспечит при организации иммунного ответа на антиген как саму возможность кооперации потенциально реактивных (т.е. имеющих соответствующую специфичность) Т- и В-лимфоцитов, так и многочисленность кооперативных клеточных взаимодействий, когда соответствующие антигенные эпитопы будут доступны для многоточечных контактов с антигенраспознающими и антигенпредставляющими рецепторами иммунокомпетентных и антигенпрезентирующих клеток. Немаловажное значение имеет также наличие эпитопов с перекрестной специфичностью по отношению к антигенам, которыми реципиент уже был иммунизирован до контакта с новым антигеном. Это качество создаст возможность расширения общего пула кооперирующих Т- и (или) потенциально реактивных В-лимфоцитов. Применительно к конъюгированным антигенам это положение справедливо, прежде всего, в отношении иммуногенных характеристик макромолекулярного носителя и в целом не противоречит требованию наличия в составе конъюгата гаптенных эпитопов только одной специфичности.

Во-вторых, в составе молекулы антигена желательно наличие таких участков, которые позволяют этому антигену взаимодействовать с иммунореактивными клетками через образование дополнительных точек связывания (т.е. посредством взаимодействий отличных от тех, которые реализуются между конкретным антигенным эпитопом и антигенспецифичным рецептором лимфоцита). Роль дополнительных сайтов взаимодействия с антигенами выполняют распознающие патогены рецепторы (Pathogen recognizing receptors /PRR/) фагоцитирующих и других иммунореактивных клеток (преимущественно имеющих миелоидное происхождение), которые обладают сродством к PAMP и некоторым эндогенным молекулам, сигнализирующим об опасности. К этой группе рецепторов относят мембранные и внутриклеточные Toll-like-receptors (TLR), внутриклеточные и цитозольные NOD-like-receptors (NLR), цитозольные RIG-like-receptors (RLR) и некоторые другие (например, Scavenger-рецепторы и лектиновые, в частности

маннозные, рецепторы). Реализация взаимодействий подобного типа характерна для антигенов, которые одновременно проявляют другие виды активности, в частности, токсичность, зачастую являясь экзотоксинами или факторами патогенности микроорганизмов. Примерами подобных антигенов являются: 1) экзотоксины бактерий (например, холерный и столбнячный экзотоксины), способные взаимодействовать с ганглиозидами различных клеток организма, включая лимфоциты; 2) антигены, способные фиксировать СЗв компонент комплемента или же Fc-фрагмент иммуноглобулинов; 3) антигенные комплексы, содержащие липид А, а также лектины и растительные токсины.

В-третьих, важна способность антигена запускать независимую от наличия взаимодействия антигена с антигенузнающими рецепторами лимфоцитов дифференцировку и пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. Фактически это означает, что антиген может обладать свойствами поликлонального активатора лимфоцитов (т.е. способен проявлять активность митогена). Этими свойствами, несомненно, обладает большинство известных суперантигенов.

В-четвертых, определенное значение имеет и возможность захвата антигена макрофагами, способными помимо фагоцитоза выполнять функцию процессинга и презентации антигена. При реализации гуморального иммунного ответа максимальная по длительности экспозиция фрагментов антигена на поверхности макрофагальной мембраны после его процессинга до состояния, подходящего для узнавания Т-хелперами, будет создавать условия для эффективной клеточной кооперации с В-лимфоцитами. Способностью антигена активировать макрофаги фактически будет означать активное включение в иммунореактивность возможностей цитокиновой регуляции адаптивного иммунного ответа (например, посредством выработки макрофагами факторов активации лимфоцитов с последующей продукцией последними различных лимфокинов).

Очевидно, что большой размер молекулы антигена будет способствовать оптимальному расположению эпитопов для эффективного захвата антигена макрофагами и позволит избежать быстрого удаления антигенных молекул из лимфоидной ткани (например, из лимфотических узлов, где происходит «улавливание» и селекция антигенов).

Обеспечение путем выбора носителя ответственных за высокую иммуногенность характеристик антигена 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), имеет

следствием достижение специфичного к целевому соединению и активного 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.

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 была достигнута при использовании в качестве носителей высокомолекулярных белков, полученных из тканей представителей генетически далеко отстоящих от человека и млекопитающих биологических видов (например, гемоцианина 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 ещё раз подчеркнуть то обстоятельство, что конъюгированные антигены высокоактивных биологически активных соединений являются ксенобиотиками особого типа, в молекулах которых экспонирована разнородная биологическая информация. Конъюгированные антигены должны быть иммунологически активны, то есть они должны обладать многими индуцирующими иммунореактивность участками. В частности такими сайтами являются: 1) детерминанты антигенной специфичности, представленные как детерминантами носителя, так и гаптенными эпитопами; 2) участки, обеспечивающие кооперативные взаимодействия иммунокомпетентных клеток друг с другом; 3) участки, инициирующие эффект поликлональной активации; 4) участки, обеспечивающие внутримолекулярную («внутреннюю») адьювантность антигенов.

С другой стороны, гаптены-аналоги фармакологически активных и токсичных соединений в составе конъюгированных антигенов, выполняя функцию гаптенных эпитопов антигенной специфичности, как правило, сохраняют биологическую активность (например, избирательную токсичность) соответствующих исходных лигандов [82, 114]. Своеобразный «биологический дуализм» конъюгированных антигенов с гаптенными эпитопами высокотропных к специализированным структурам-мишеням лигандов (в

частности, с гаптенными эпитопами холинэргических соединений – фосфорорганических ядов с активностью необратимых ингибиторов холинэстераз, холиноблокаторов; наркотиков и других лекарственных соединений с фармакодинамическим типом активности) влияет как на механизмы регуляции иммунологической ответственности на подобные антигены и особенности иммунного ответа на них, так и на реализуемые в условиях *in vivo* эффекторные функции специфичных к подобным ксенобиотикам антител [82, 83, 94-97, 114].

Направления практического использования конъюгированных антигенов в медицине

Наиболее значимыми представляются следующие направления использования конъюгированных антигенов в медицинской практике:

1) активная иммунизация конъюгированными антигенами животных-доноров для получения поликлональных сывороток с целью их последующего использования в качестве реагентов в различных иммунохимических методах количественного определения низкомолекулярных биологически активных лигандов или же для пассивной иммунизации с различными целями; 2) использование конъюгированных антигенов в технологиях получения моноклональных антител; 3) использование конъюгированных антигенов в качестве вакцин, включая вакцины наркотиков, и для получения антител с последующим применением этих подходов с целями антитоксической иммунотерапии.

Конкретизация прикладных задач применения конъюгированных антигенов и иммунохимических реагентов, полученных с их помощью, позволяет сформулировать следующие дополнительные задачи:

1) совершенствование технологий индикации и идентификации конкретных представителей биологически активных химических соединений в объектах внешней среды и разработка новых технологий индикации и мониторинга;

2) поиск путей совершенствования диагностики отравлений низкомолекулярными ядами и лекарствами;

3) проведение фармакокинетических исследований с использованием выдающихся эксплуатационных характеристик высокочувствительных, специфичных и производительных методов иммунохимического анализа;

4) использование специфических к гаптенам-аналогам антител для модификации биологической активности целевых соединений, в частности путем нейтрализации их активности как токсикантов.

Конкретный опыт, накопленный в области химии и иммунохимии различных органических соединений, способен обеспечить научные разработки в этом направлении стратегией и технологиями создания иммуногенных конъюгированных антигенов, которые могут быть с успехом использованы в перечисленных научных направлениях.

При создании конъюгированных антигенов оптимального строения и обладающих необходимой биологической активностью далее решается задача наработки антител, отвечающих целям иммунохимического анализа. Возможность создания лабораторных технологий иммунохимического анализа с высокими эксплуатационными характеристиками будет, прежде всего, определяться качествами полученных от животных доноров специфичных поликлональных антисывороток или же моноклональных антител, вырабатываемых культурами клеток-продуцентов – гибридами.

В поликлональных антисыворотках, полученных от экспериментальных животных, специфические антитела должны присутствовать в достаточном количестве (сыворотки должны иметь высокие титры антител к гаптенной детерминанте), и их аффинность должна характеризоваться константой связывания с гаптенным эпитопом не ниже $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$. При соблюдении этих требований чувствительность анализа целевых низкомолекулярных соединений (например, в технологии твердофазного иммуноферментного анализа – ELISA) при их количественном определении без использования дополнительных процедур амплификации может достигать $10^{-10} - 10^{-12} \text{ г/мл}$ [13, 14].

Использование конъюгированных антигенов и специфических антител в качестве реагентов в методах иммунохимического анализа. Во второй половине XX века для использования в (к тому времени предложенных) технологиях радиоиммунного анализа (RIA) [9, 10, 13, 14, 34, 46, 115, 116] и иммуноферментного анализа (ИФА) [11, 13, 14] были получены поликлональные и моноклональные антитела разнообразного спектра специфичностей, с применением которых проработали и внедрили методы количественного определения множества лекарств и токсичных соединений, а также исследовали фармако- и токсикокинетику лекарств и ядов [9, 10, 34, 38, 40]. В научных обзорах по применению в медицине методов количественного определения лекарств и токсикантов в биологических жидкостях и объектах внешней среды [5, 9, 10, 13, 14, 34, 46] приводится перечень более чем 500 лекарственных соединений и токсикантов, к которым получены специфичные антитела и разработаны методы иммунохимического анализа. В этот перечень входят: пестициды (ДДТ) и инсектициды (малатион), наркотики и психоактивные вещества различных фармакологических групп: морфин и его производные, в том числе героин и кодеин; кокаин, амфетамин и его производные; галлюциногены – канабиноиды и LSD;

никотин, атропин и другие холинолитики; барбитураты, нейролептики, малые и большие транквилизаторы, включая галоперидол, хлорпромазин, производные бензодиазепа. С использованием обладающих исключительными эксплуатационными характеристиками, высокой чувствительностью и специфичностью методов иммунохимического анализа удалось увеличить точность измерения в биологических средах организма уровней эндогенных физиологически активных веществ и лекарственных соединений. Методы иммунохимического анализа стали весомым вкладом иммунологии в практическую медицину, клиническую фармакологию, биохимию и эндокринологию.

Широкое применение иммунохимические методы нашли в области индикации канцерогенов и других экотоксикантов (например, промышленных вредных веществ и пестицидов) в объектах внешней среды, воде и пищевых продуктах. Так, с использованием этих методов определяют в пикограммовых количествах такие токсичные соединения, как ДДТ, малатион, параоксон и другие. Специфические антитела стали также незаменимым инструментом при проведении теоретических исследований (например, для выяснения особенностей фармакокинетики, механизмов избирательной токсичности, метаболизма и элиминации эко- и других токсикантов, ксенобиотиков и лекарств).

Специфическая антитоксическая иммунотерапия: принципы, использование в медицинской практике, достижения, перспективы

Хорошо известно, что при определенных условиях специфические антитела участвуют в нейтрализации высокомолекулярных биологически активных соединений, опсонизируя бактериальные экзо- и эндотоксины, фитотоксины, токсины животного происхождения, и их использование с целями детоксикации в ряде случаев эффективно. В отношении возможности нейтрализации биологической активности низкомолекулярных соединений в организме лиц с признаками уже развившейся тяжелой интоксикации низкомолекулярными лекарствами и ядами с участием иммунных факторов имеющаяся информация не столь многочисленна и противоречива.

Специфической антитоксической иммунотерапии может проводиться двумя способами: путем пассивной иммунизации и путем активной иммунизации – вакцинации. При пассивной иммунизации специфические антитела вводятся в виде гетерологичных антисывороток, полученных от иммунизированных животных-доноров; глобулиновой фракции гетерологичных гипериммунных антисывороток; очищенных поликлональных или моноклональных гетерологичных иммуноглобулинов – специфических антител; фрагментов гетерологичных поликлональных или моноклональных антител; полученных методами биотехнологии фрагментов химерных или же гуманизированных моноклональных антител. Во всех перечисленных вариантах опсонизирующая способность этих иммунных факторов определяется центром связывания антигена

иммуноглобулиновой молекулы – активным центром антитела, который комплементарен специфичному к этому центру эпитопу (детерминанте иммунохимической специфичности) антигена. При активной иммунизации антигены (ослабленные комплексные вакцины, инактивированные токсины – анатоксины), конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами целевых токсикантов) используются в качестве средств профилактики и (реже) лечения.

Пассивная иммунизация как технология специфической антитоксической иммунотерапии. Антитоксические эффекты антител впервые были установлены Е. Bering и S. Kitasato (1890) [120]. Полученные от животных-доноров антисыворотки, содержащие антитела к дифтерийному и столбнячному токсинам, были использованы для лечения тяжелых клинических случаев столбняка и дифтерии у людей. Пассивная иммунизация антисыворотками показала позитивный результат, и до сих пор очищенные различными методами специфические гетерологичные иммуноглобулины применяют при лечении инфекционных болезней, в патогенезе которых значимы токсические эффекты бактериальных экзотоксинов, продуцируемых токсогенными штаммами возбудителей (особенно у детей с кишечными инфекциями), а также для специфической иммунопрофилактики столбняка при загрязненных ранах.

Специфические антитоксические гетерологичные сыворотки также являются самым действенным средством спасения жизни пострадавших от укусов ядовитых змей и насекомых [121-124], а также в случаях бытовых смертельных отравлений некоторыми моллюсками и ядовитыми растениями.

В настоящее время известно более 100 иммунных противоядий подобного типа, и эти биопрепараты активно совершенствуются с использованием современных биотехнологий [125-128] для уменьшения опасных побочных явлений, сопутствующих их использованию. Ядовитым началом во всех перечисленных случаях являются природные токсины (часто многокомпонентные) в основном животного происхождения с достаточно высокой молекулярной массой, которые имеют белковую или пептидную природу и обладают высокой иммуногенностью, что позволяет получать от иммунизированных животных-доноров активные (гипериммунные) антисыворотки с относительно высокой связывающей способностью в отношении целевых токсинов. Как правило, противоядия (антитоксические сыворотки) поливалентны (полиспецифичны) и состоят из смеси поликлональных антител, вырабатываемых при гуморальном ответе иммунизированных животных на многократно вводимые сенсibilизирующие дозы различных ядов. Поскольку эти антитела направлены против разных мишеней и гетерогенны по специфичности, как суммарная нейтрализующая эффективность противоядия в отношении яда змей или

насекомых определенного биологического вида, так и нейтрализующая активность в отношении конкретных токсинов: нейротоксинов, цитотоксинов, гемолизина, являющихся основными компонентами этого яда, может быть недостаточной. Кроме того, производство антител ограничено размером и продолжительностью жизни иммунизированных животных, что резко увеличивает затраты на производство антисывороток [128]. Отсутствие существенного прогресса этого направления иммунотерапии связано с крайне высокой ценой современных биотехнологий и их продуктов. Именно поэтому до сих пор наиболее широко используются имеющие побочные эффекты, но более дешевые гетерологичные антисыворотки от крупных животных – доноров антител. Тем не менее, перспективы развития этого направления специфической антитоксической терапии в основном связывают именно с современными возможностями биотехнологии. Так, прогнозируется более широкое использование в качестве противоядий вместо гетерологичных антисывороток животных (эффективных, но обладающих выраженными побочными эффектами) биотехнологических продуктов – фрагментов поликлональных антител [126, 127], моноклональных антител (обычных, химерных, гуманизированных) [129], фрагментов моноклональных антител или рекомбинантных фрагментов антител (например, обсуждается перспектива более широкого использования для лечения пострадавших от укусов змей одноцепочечного гипервариабельного иммуноглобулинового рекомбинантного фрагмента scFv, сохраняющего способность к связыванию яда и обладающего минимальной реактогенностью по типу анафилаксии [128]).

В настоящее время гибридная технология [130] и технология фагового дисплея [131-133] являются теми двумя биотехнологическими подходами, эффективность которых изучается для производства в промышленных масштабах моноклональных антител к природным токсинам. Однако, подобные биотехнологические продукты в отличие от поливалентных антисывороток, сегодня получаемых от крупных животных-доноров, строго моновалентны и более того строго специфичны по их потенциальной нейтрализующей активности в отношении змеиных токсинов или токсинов насекомых, так как продуцируются последовательно селекционированными клетками, что резко ограничивает адресность их использования [128, 129]. Очевидно также, что эти биотехнологические противоядия будут иметь стоимость весьма существенно (если не запредельно) превышающую стоимость также не дешевых антитоксических сывороток.

Очевидно, что возможность использования антител со специфичностью к ядам определенного типа с задачей нейтрализации их активности при острых (в том числе летальных) отравлениях путем пассивной иммунизации пострадавших гетерологичными

антисыворотками или гамма глобулинами сыворотки – объективно установленный факт. Эти сыворотки производятся в большом количестве и активно используются в эндемичных по распространению ядовитых змей странах, спасая тысячи жизней пострадавших.

Попытки реализации аналогичного подхода (как правило, с использованием полученных методами биотехнологии фрагментов специфичных гетерологичных антител) применительно к другим биологически активным и лекарственным соединениям (в большинстве своем низкомолекулярным) для нейтрализации их токсических эффектов не оказались столь успешными. Во-первых, не было получено бесспорных позитивных результатов от проведения иммунотерапии, во-вторых, неизбежно возникала проблема высокой стоимости такого лечения.

Тем не менее, для некоторых низкомолекулярных лекарственных соединений проводимые научные разработки вышли за рамки экспериментальных исследований, и сегодня иммунные противоядия успешно применяют в клинической практике для борьбы с тяжелыми интоксикациями сердечными гликозидами: дигоксином и дигитоксином, включая лечение детей [134, 136-138]. Для этих целей используют гетерологичные Fab фрагменты специфичных к дигоксину антител [135, 137]. Стандартная доза Fab фрагментов для взрослого человека составляет 380 мг фрагментов антител вводимых в/в на протяжении 15–30 минут после разведения препарата не менее чем в 250 мл раствора белка плазмы или 0,9% (вес/объем) раствора хлорида натрия [135]. Имеются позитивные результаты использования аналогичного подхода для борьбы с тяжелыми интоксикациями рядом других структурно родственных дигоксину соединений (например, с летальными отравлениями кардиотоксинами олеандра и токсинами ядовитой жабы *Bufo spallanzani*) [135]. Эффективность технологии лечения летальных интоксикаций препаратами наперстянки подтверждена результатами многоцентровых клинических исследований [138].

В настоящее время специфическая антитоксическая иммунотерапия – это одно из перспективных направлений иммунотоксикологии, в котором применяют путем пассивной иммунизации иммунные молекулы, прежде всего, препараты специфических иммуноглобулинов и их фрагментов в качестве противоядий.

Активная иммунизация как технология специфической антитоксической иммунотерапии. Принципиальная возможность использования принципов вакцинации для борьбы с интоксикациями высоко- и низкомолекулярными ядами, лекарствами, наркотиками и с задачей модификации их биологической (фармакологической) активности установлена достаточно давно. Наиболее успешный опыт применения принципов активной иммунизации в качестве технологии специфической антитоксической терапии связан с

практикой использования различных бактериальных и предварительно инактивированных экзотоксинов – анатоксинов. Анатоксинами вакцинируют пациентов с токсинемическими инфекциями (столбняк, анаэробная газовая гангрена, ботулизм, дифтерия, холера, брюшной тиф, дизентерия, токсинемическая стафилококковая инфекция) для профилактики летального исхода и в процессе лечения. При токсинемических инфекциях с целями профилактики и в процессе лечения проводят активную иммунизацию соответствующими анатоксинами или же комплексными вакцинами, в состав которых входят анатоксины [139-142].

Для иммунизации против токсинемических инфекций обычно применяют анатоксины, адсорбированные на гидрате окиси алюминия и фосфате алюминия, используемых в качестве адъювантов, что существенно увеличивает иммуногенность анатоксинов (например, в российскую комбинированную вакцину «Пентаксим» включены адсорбированные на адъювантах дифтерийный, столбнячный и коклюшный анатоксины).

В медицинской практике нашли также применение: очищенный адсорбированный дифтерийный анатоксин, очищенный адсорбированный столбнячный анатоксин, очищенный адсорбированный стафилококковый анатоксин, адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин (АДС и АДС-М). Столбнячный и дифтерийный анатоксины входят в состав ассоциированной вакцины АКДС, холероген-анатоксин входит в состав холерной вакцины. Концентрированный адсорбированный анаэробный полианатоксин, включающий столбнячный анатоксин, несколько типов гангренозного и ботулинического анатоксинов (суммарно 7 антигенов) и обладающий хорошими иммуногенными свойствами, был создан в Советском Союзе в далеком 1959 году и внедрен в медицинскую практику.

Применяется также брюшнотифозная вакцина с секста(тетра)анатоксином. Эта вакцина содержит О- и Vi-антигены брюшнотифозных бактерий и очищенные анатоксины возбудителей столбняка, газовой гангрены и ботулизма.

Конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами наркотических веществ – вакцины наркотиков: использование для борьбы с наркотической зависимостью. В настоящее время распространение наркомании во всем мире несет значительную угрозу здоровью, социальному и экономическому благополучию, как отдельных индивидуумов, так и обществу в целом [92, 93]. Так как частота рецидивов наркомании достаточно высока, поиск новых подходов к лечению и профилактике страдающих болезненной зависимостью от наркотиков особенно актуален. Иммунопрофилактика наркоманий, или вакцинация от наркотической зависимости расценивается как новое направление в наркологии, имеющее важное практическое значение и до сих пор не потерявшее актуальность [49, 104-111].

Практическим смыслом этого методологического подхода является предупреждение дальнейших рецидивов зависимости (вторичная профилактика наркомании) путем вакцинации. В принципе вакцинация способна обеспечить долговременный эффект, эффективна в отсутствии мотивации пациента на лечение, не имеет тех побочных эффектов в отношении центральной нервной системы, которые характерны для общепринятых фармакотерапевтических методов лечения наркоманий [108]. Отдельные перспективы имеет введение препаратов антител – пассивная иммунизация гуманизированными моноклональными антителами наркозависимых пациентов с жизнеугрожающими передозировками наркотиков [108, 113].

Достаточно высокая иммуногенность анатоксинов и других микробиологических объектов (например, инаktivированных вирусных частиц) с возможностью активации при активной иммунизации как конституционного, так и адаптивного иммунитета стала основанием для их использования в качестве макромолекулярных носителей гаптенов-аналогов наркотических веществ [144, 145, 147] – перспективного направления конструирования молекулярных вакцин с гаптенами-аналогами психоактивных веществ. В процессе выполнения научных исследований в этом направлении был создан ряд экспериментальных мономолекулярных и комбинированных вакцин опиатов, метамфетамина, кокаина, никотина. Результаты этих исследований позднее вылились в значительные практические усилия по созданию вакцин к наркотическим веществам: опиатам, метамфетамину, кокаину, никотину [27, 101-104, 143-149], которые предполагалось использовать для иммунизации наркозависимых лиц.

После получения обнадеживающих экспериментальных данных по эффективности активной иммунизации молекулярными вакцинами с гаптенами-аналогами наркотиков [98-100, 143, 144, 146] на следующем этапе независимыми группами исследователей в клинических условиях была изучена эффективность целого ряда вакцин различных наркотиков с привлечением для проведения клинических испытаний наркоманов-добровольцев [108, 109, 150-154]. Ранние доклинические исследования на животных были достаточно успешны, и перспективы казались оптимистичными, однако большинство образцов экспериментальных вакцин не дожили до клинических испытаний с привлечением наркоманов-добровольцев. Практическая реализация этого научного направления исследований до настоящего времени впечатляющими успехами не увенчалась. Наилучшие результаты вакцинации были достигнуты при клинических испытаниях вакцин, предполагаемых к использованию в отношении никотиновой зависимости (III фаза клинических испытаний) [108, 149, 154]. Позитивный эффект иммунизации отмечен

максимум у трети испытуемых [148], и ни одна из испытанных вакцин не одобрена к использованию по назначению [104, 106, 108, 109, 151-153].

Применительно к возможности создания вакцин других наркотиков (опиаты, кокаин), которые были бы эффективны как средства борьбы с наркотической зависимостью людей, имеются экспериментальные исследования, проведенные на животных, и не слишком убедительные результаты клинических испытаний (в основном I и II фаза) с включением ограниченного числа наркоманов-добровольцев [25, 101, 103, 108, 150]. Пригодные для реального клинического использования и эффективные образцы вакцин опиатов или метамфетамина не созданы, а полученные образцы экспериментальных вакцин находятся в процессе предклинических и одиночных клинических исследований [108].

Таким образом, ни одна из созданных и испытанных с привлечением наркоманов-добровольцев вакцин наркотиков не продемонстрировала безусловной эффективности [108, 109, 150-153]. На сегодня эти вакцины к практическому применению не одобрены и в клинической практике не используются.

Заключение

Анализ данных научной литературы и наш собственный опыт исследований, выполненных в области конструирования конъюгированных антигенов и оценки их биологической активности, позволяют сформулировать следующее заключение. Стратегия синтеза гаптен-аналогов биологически активных соединений, в том числе психоактивных веществ и токсикантов, а также конъюгированных антигенов (конъюгатов) с гаптенными эпитопами этих соединений достаточно хорошо разработана. Созданы и широко используются различные химические технологии синтеза гаптен-аналогов множества физиологически активных, лекарственных и токсичных соединений, включая экотоксиканты и высокотоксичные яды. Отработаны технологии конъюгации синтезированных гаптен-аналогов с различными макромолекулярными носителями, ориентированные на определенные химические группировки гаптен-аналогов, преимущественно amino- и карбоксильные функциональные группы.

Наличие технологий синтеза гаптен-аналогов в сочетании с представлениями об основах антигенности и иммуногенности молекулярных вакцин позволяет в широких пределах моделировать структуру конъюгатов низкомолекулярных гаптен-аналогов и оптимизировать их иммунохимические и антигенные характеристики. Конечной целью моделирования структуры конъюгатов является обеспечение их иммуногенности и гаптенной специфичности, включая способность молекулярных вакцин этого типа инициировать интенсивное и специфичное антителообразование на гаптенный эпитоп в

условиях *in vivo* (при активной иммунизации [вакцинации]) и *in vitro* (в клеточных культурах гибридом).

Высокую иммуногенность конъюгированным антигенам с гаптенами-аналогами психоактивных веществ и токсикантов, включая фосфорорганические нейротоксиканты, в основном придает адекватно подобранный макромолекулярный носитель, который должен обладать большой молекулярной массой, а в случае его белковой природы, быть гетерологичным и обладать участками молекулярной структуры, идентифицируемыми как РАМР-сайты. Соблюдение этих условий позволяет при активной иммунизации (вакцинации) этими конъюгатами инициировать интенсивный гуморальный иммунный ответ на гаптенный эпитоп. Гаптенному эпитопу в составе синтезируемого конъюгата необходимо дополнительно придавать качество иммунохимической доминантности (например, за счет использования в процедуре химического конъюгирования гаптена-аналога с носителем бифункциональных реагентов, которые способны формировать молекулярную вставку – спейсер между детерминантой гаптена-аналога и конформационными детерминантами макромолекулярного носителя).

Высокая исходная иммуногенность выбранного макромолекулярного носителя, адекватно подобранная эпитопная плотность гаптена, расположенного на молекулярном спейсере; доступность для фагоцитов участков молекулярной структуры конъюгированного антигена, идентифицируемых как РАМР-сайты, являются теми основными моментами, на которые следует ориентироваться, оптимизируя структуру конъюгированных антигенов с гаптенными эпитопами психоактивных веществ и токсикантов. Синтез нескольких химических модификаций целевого лиганда с получением гаптен-аналогов, в которых функциональные группировки находятся в разных частях молекулы гаптена-аналога, обеспечивает возможность получения конъюгированных антигенов с разнообразной иммунохимической специфичностью гаптенных эпитопов, а, соответственно, и повышают вероятность получения при активной иммунизации животных-доноров поликлональных сывороток разной специфичности. Различные по гаптенной специфичности сыворотки будут содержать иммуноглобулины – антитела, имеющие разную связывающую способность в отношении целевого лиганда (в зависимости от их специфичности: от низкой связывающей способности до высокой).

Анатоксины и инактивированные токсидные белки микроорганизмов, а также гетерологичные белки большой молекулярной массы (например, гемоцианин моллюсков) являются наиболее доступными и перспективными макромолекулярными носителями гаптен-аналогов целевых низкомолекулярных соединений. Расширяющаяся практика их

использования в качестве макромолекулярных носителей при создании конъюгированных антигенов для целей иммунохимического анализа подтверждает их уникальные иммуногенные характеристики в качестве носителей, а также обосновывает перспективность их практического использования. Безусловно конъюгированные антигены на основе этих носителей перспективны и в качестве молекулярных вакцин с гаптенами-аналогами наркотиков – опиатов, метамфетамина, кокаина, никотина.

С иммунохимическими реагентами, полученными от иммунизированных конъюгированными антигенами животных доноров специфичных сывороток или в культурах гибридом, реализована методология и созданы многочисленные технологии иммунохимического анализа, позволившие количественно, с высокой чувствительностью, точностью и специфичностью определять в биосредах и тканях организма, а также в объектах внешней среды множество лекарств и токсичных соединений, исследовать их фармако- и токсикокинетику. Методы иммунохимического анализа благодаря их высокой чувствительности, специфичности, удобству и точности регистрации результатов, а также воспроизводимости стали самым значительным вкладом иммунологии в практическую медицину, клиническую фармакологию, биохимию и эндокринологию.

Принципиальная возможность использования принципов вакцинации конъюгированными антигенами для борьбы с интоксикациями низкомолекулярными ядами, наркотиками, лекарствами и модификации их биологической (фармакологической) активности продемонстрирована в экспериментах на животных и является научно подтвержденным фактом. Многочисленные образцы вакцин предназначенных для вторичной профилактики наркотической зависимости путем активной иммунизации наркозависимых лиц в экспериментах на животных продемонстрировали эффективность. В соответствующих экспериментальных моделях иммунизированные животные в сравнении с контрольными особями демонстрировали признаки отказа от приема наркотиков. В условиях активной иммунизации фармакокинетика наркотических веществ и их фармакодинамические эффекты существенно изменялись.

Многолетние и масштабные клинические испытания эффективности вакцинации созданными конъюгированными антигенами с гаптенами-аналогами опиатов, кокаина, метамфетамина, никотина (I, II и отчасти III фаза клинических испытаний с привлечением наркоманов-добровольцев, проведенных в нескольких клинических центрах с последующим метаанализом полученных результатов) не завершились безусловным успехом. Многочисленные научные коллективы, работающие в области изучения эффективности иммунологического подхода к проблеме вторичной профилактики

наркоманий путем вакцинации наркозависимых лиц молекулярными вакцинами с гаптенами-аналогами наркотиков, продолжают поиск эффективных вакцин и технических решений их применения в практическом здравоохранении. Это научное направление сохраняет свою актуальность.

Литература:

1. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Искусственные антигены и вакцины. М.: Медицина; 1988: 288 с.
2. 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.
3. Sela M. Antigen design as a tool for probing into the nature of immunological phenomena. In: Ed. by W.O. Milligan. Immunochemistry. Houston: Robert A. Welch. Foundation; 1975: 201-239.
4. De Weck A.L. Low molecular weight antigens. In: M. Sela, eds. The Antigens, V.2. N.Y. – San Francisco – London: Academic Press; 1974: 141-248.
5. Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. Красноярск: ООО «Издательство Поликор»; 2021: 576 с.
6. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным соединениям. М.: Наука; 1985: 304 с.
7. Yamashita N. Soluble E-selectin as a marker of disease activity in atopic dermatitis. J. Allergy Clin. Immunol. 1997; 99(3): 410-416. doi: 10.1016/s0091-6749(97)70060-5.
8. Landsteiner K. The Specificity of serological reactions. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press; 1945 (republished by Dover Publication, N.Y.; 1962): 326.
9. Spector S. Radioimmunoassay of drugs. In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Vol.II. International Atomic Energy Association; 1974: 233.
10. Butler V.P, Jr. The immunological assay of drugs. Pharmacol. Rev. 1978; 29(2): 103-184.
11. Ishikawa E., Kato K. Ultrasensitive enzyme immunoassay. Scand. J. Immunol. 1978; 8(7): 43-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1978.tb03883.x>.

12. Erlanger B.F. Principles and methods for the preparation of drug protein conjugates for immunological studies. *Pharmacol Rev.* 1973; 25: 271-280.
13. Colburn W.A. Radioimmunoassay and related immunoassay techniques. In: Munson J.W., eds. *Pharmaceutical Analysis Modern Methods, Part A.* New York: Marcel Dekker; 1982: 381.
14. Lee J. W., Colburn W.A. Immunoassay Techniques. In: Ohannesian L. and Streeter A.J., eds. *Handbook of Pharmaceutical Analysis.* New York – Basel: Marcel Dekker; 2002.
15. Erlanger B. F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: A survey. *Methods in Enzymology.* 1980; 70: 85-104. doi: 10.1016/s0076-6879(80)70043-5.
16. Lemus R., Karol M.H. Conjugation of haptens. *Methods Mol. Med.* 2008; 138: 167-182. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0_14.
17. Hermanson G.T. Preparation of Hapten-Carrier Immunogen Conjugates. In: Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques.* 2nd ed. Amsterdam...Tokyo: Elsevier; 2008: 745-782.
18. Hermanson G.T. Modification with Synthetic Polymer. In: Hermanson G.T. *Bioconjugate Techniques.* 2nd ed. Amsterdam...Tokyo: Elsevier; 2008: 936-960.
19. Caulcott C.A., Boraston R., Hill C. et al. Production and purification of monoclonal antibodies. In: Collins W.P., eds. *Complementary Immunoassays.* Chichester, UK: John Wiley and Sons; 1988: 27-42.
20. Torres O.B., Alving C.R., Matyas G.R. Synthesis of hapten-protein conjugate vaccines with reproducible hapten densities. In: Ed. by Sunil Thomas. *Methods in Molecular Biology, Vol. 1403. Vaccine Design. Methods and Protocols: Vol. 1: Vaccines for Human Diseases.* New York: Springer Science+Business Media; 2016: 695-712.
21. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting specific antibody predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517): 495-497. doi: 10.1038/256495a0.
22. Galfre G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures // In: Colowick S., Kaplan N., eds. *Methods in Enzymology, Vol. 73(Pt B).* New York: Academic Press; 1981: 3-46. doi: 10.1016/0076-6879(81)73054-4.
23. Cooper M.D., Kirkpatrick R. Production of stable heterohybridomas producing human monoclonal antibodies. *Methods Mol. Biol.* 1995; 45: 29-39. doi: 10.1385/0-89603-308-2:29.
24. Hamilton M.J., Davis W.C. Culture conditions that optimize outgrowth of hybridomas. *Methods Mol. Biol.* 1995; 45:17-28. doi: 10.1385/0-89603-308-2:17.

25. Sakurai M., Wirsching P., Janda K. D. Design and synthesis of a cocaine-diamide hapten for vaccine development. *Tetrahedron Letters*. 1996; 37: 5479-5482.
26. 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. doi: 10.1016/s0091-3057(99)00206-3.
27. Torres O.B., Jatah R., Rice K.C. et al. Characterization and optimization of heroin hapten-BSA conjugates: method development for the synthesis of reproducible hapten-based vaccines. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406: 5927-5937. doi: 10.1007/s00216-014-8035-x.
28. 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.
29. 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.
30. Klaus G.G.B., Cross A.M. The influence of epitope density on the immunological properties of hapten-protein conjugates. I. Characteristics of the immune response to hapten-coupled albumin with varying epitope density. *Cell. Immunol.* 1974; 14(2): 226-241. doi: 10.1016/0008-8749(74)90208-1.
31. Gill T.J., Kunz H.W., Ruscetti S.K. Studies on the chemical and genetic basis of immunogenicity and antigenic reactivity. In: *Peptides, Polypeptides and Proteins*. N.Y. – London – Sydney–Toronto: John Wiley & Sons; 1974: 510-525.
32. Ляшенко В.А., Воробьев А.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов. М.: Медицина; 1982: 269 с.
33. Dintzis H.M., Dintzis R.Z., Vogelstein B. Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1976; 73(10): 3671-3675. doi: 10.1073/pnas.73.10.3671.
34. Parker C.W. *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*. Prentice-Hall: Englewood Cliffs, N.J.; 1976.
35. Centeno E.R., Johnson W.J., Sehon A.H. Antibodies to two common pesticides: DDT and Melathion. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1970; 37: 1-13.

36. 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. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.105.
37. Beiser S.M., Butler V.P., Jr., Erlanger B.F. Hapten-protein conjugates: Methodology and application. In: Miescher P.A., Miller-Eberhard H.J., eds. *Textbook of Immunopathology*, 2nd ed. New York: Grune and Stratton; 1976: 15-29.
38. Butler V.P., Jr., Beiser S. M. Antibodies to small molecules: biological and clinical applications. *Adv. Immunology*. 1973; 17: 253-310. doi: 10.1016/s0065-2776(08)60734-8.
39. Spector S., Berkowitz B., Flynn E.J. et al. Antibodies to morphine, barbiturates and serotonin. *Pharmacol. Rev.* 1973; 25: 281-291.
40. Spector S. Horizons in immunotoxicology: research needs and applications. *Pharmacol. Rev.* 1982; 34: 150.
41. Sternberger L.A., Sim V.M, Kavanag W.Z. A vaccine against organophosphorus poisoning. *Proceedings of Army Science Conference*; 1972; 3: 429-441.
42. 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.
43. Hunter K.W., Lenz D.E., Briemfield A.H., Naylor S.A. Quantification of the organophosphorus nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *FEBS Letters*. 1982; 149(1): 147-151. doi: 10.1016/0014-5793(82)81091-0.
44. Erhard M.H., Kühlmann R., Szinicz L., Lösch U. Detection of the organophosphorus nerve agent soman by an ELISA using monoclonal antibodies. *Arch Toxicol.* 1990; 64(7): 580-585. doi: 10.1007/BF01971838.
45. Hieda Y., Keyler D. E., Ennifar S. et al. Vaccination against nicotine during continued nicotine administration in rats: immunogenicity of the vaccine and effects on nicotine distribution to brain. *Int. J. Immunopharmacol.* 2000; 22 (10): 809-819. doi: 10.1016/s0192-0561(00)00042-4.
46. Lee J. W., Colburn W.A. Immunoassay Techniques. In: Ohannesian L. and Streeter A.J., eds. *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. New York – Basel: Marcel Dekker; 2002.
47. 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. doi: 10.1021/bc034158v.

48. Carroll F. I., Blough B. E., Pidaparthi R. R. et al. Synthesis of mercapto-(+)-methamphethamine haptens and their use for obtaining improved epitope density on (+)-methamphethamine conjugate vaccines. *J. Med. Chem.* 2011; 54: 5221-5228. doi: 10.1021/jm2004943.
49. Stowe G.N., Vendruscolo L.F., Edwards S. et al. A vaccine strategy that induced protective immunity against heroin. *J. Med. Chem.* 2011; 54(14): 5195-5204. doi: 10.1021/jm200461m.
50. Matyas G. R., Rice K. C., Cheng K. et al. Facial recognition of heroin vaccine opiates: Type 1 crossreactivities of antibodies induced by hydrolytically stable haptenic surrogates of heroin, 6-acetylmorphine, and morphine. *Vaccine.* 2014; 32(13): 1473-1479. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.028.
51. Fasth A., Sollenberg J., Sorbo B. Production and characterization of antibodies to atropine. *Acta Pharm. Suec.* 1975; 12: 311-322.
52. Adamczyk M., Buko A., Chen Y.-Y. et al. Characterization of protein-hapten conjugates. 1. Matrix-assisted laser desorption ionization mass-spectrometry of immuno BSA-hapten conjugates and comparison with other characterization methods. *Bioconjugate Chem.* 1994; 5: 631-635. doi: 10.1021/bc00030a019.
53. Johnson J.K., Cerasoli D.M., Lenz D.E. Role of immunogen design in induction of soman-specific monoclonal antibodies. *Immunol Lett.* 2005; 96(1): 121-127. doi: 10.1016/j.imlet.2004.08.003.
54. Jia P., Wang Y., Yu M. et al. An organophosphorus hapten used in the preparation of monoclonal antibody and as an active immunization vaccine in the detoxication of soman poisoning. *Toxicol Lett.* 2009; 187(1): 45-51. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.01.029.
55. 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.
56. Beiser S.M., Erlanger B.F., Agate F.S. et al. Antigenicity of steroid-protein conjugates. *Science.* 1959; 129: 564-565.
57. Creech H.J. Chemical and immunological properties of carcinogen-protein conjugates. *Cancer Res.* 1952; 12: 557-564.
58. Spector S., Parker C.W. Morphine: radioimmunoassay. *Science.* 1970; 168: 1347-1348. doi: 10.1126/science.168.3937.1347.

59. Van Regenmortel M. H. V. From absolute to exquisite specificity. Reflection on the fuzzy nature of speicers, specificity and antigenic sites. *J. Immunol. Methods.* 1998; 216 (1-2): 37-48. doi: 10.1016/s0022-1759(98)00069-6.
60. Beiser S.M., Erlanger B.F. Estimation of steroid hormones by an immunochemical technique. *Nature.* 1967; 214: 1044-1045.
61. Niswender G.D. Influence of the site of conjugation on the specificity of antibodies to progesterone. *Steroids.* 1973; 22: 413-424.
62. 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.
63. Herndon B.L., Paull K., Baeder D.H. et al. Comparison of immunogenecity of opiates bound to protein at different sites on the molecule: N-carboxymorphine-BSA. *Pharmacol. Res. Com.* 1976; 8: 325-335.
64. Findlay J.W.A., Butz R.F., Welch R.M. A codein radioimmunoassay exhibiting insignificant cross-reactivity with morphine. *Life Sci.* 1976; 19: 389-394.
65. Usagawa T., Itoh Y., Hifumi E. et al. Characterization of morphine-specific monoclonal antibodies showing minimal cross-reactivity with codeine. *J. Immunol. Meth.* 1993; 157: 143-148. doi: 10.1016/0022-1759(93)90080-q.
66. Anton B., Leff P. A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine.* 2006; 24(16): 3232-3240. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.01.047.
67. Li Q-Q., Sun C-Y., Luo Y-X., Xue Y-X. et al. A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats. *J. Neurochem.* 2011; 119: 1271-1281. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07502.x
68. Li F., Cheng K., Antoline J.F. et al. Synthesis and immunological effects of heroin vaccines. *Org. Biomol. Chem.* 2014; 1: 7211-7232. doi: 10.1039/c4ob01053a.
69. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Гурьянов Г.А. Гемисукцинат бромистого 2-[N,N-диметил-N-(2-оксиэтил) аммониеметил]-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, рег. в Гос. реестре изобретений 15.05.1990.

70. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Щелканова Л.Б., Гурьянов Г.А. Способ получения конъюгата гаптен-фермент для иммуноферментного анализа: Авторское свидетельство СССР №1351398, приор. 1.09.1984, рег. в Гос. реестре изобретений 8.07.1987.

71. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Гурьянов Г.А. и др. Способ получения эритроцитарного диагностикума для выявления специфических антител (его варианты): Авторское свидетельство СССР №1079247, приор. 8.02.82., рег. в Гос. реестре изобретений 15.11.83.

72. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Дрыгина Л.Б. Гемисукцинат бромистого 8-(2-оксиэтил) 8-метил-8-азоний-бицикло [3,2,1]-окт-3-илового эфира α -окси- α , α -дифенилуксусной кислоты в качестве промежуточного продукта для получения синтетических конъюгированных антигенов, специфичных к глипину: Авторское свидетельство СССР №1587869 приор. 13.12.1988, рег. в Гос. реестре изобретений 22.04.1990.

73. Steiner A.L., Parker C.W., Kipnis D.M. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. J. Biol. Chem. 1972; 247: 1106-1113.

74. Levine L. Antibodies to pharmacologically active molecules: specificities and some applications antiprostaglandins. Parmacol. Rev. 1973; 25(2): 293-307.

75. Grota L.J., Brown G.M. Antibodies to catecholamines. Endocrinology. 1976; 98(3): 615-622. doi: 10.1210/endo-98-3-615.

76. Renadive N.S., Sehon A.H. Antibodies to serotonin. Can. J. Biochem. 1967; 45: 1701-1710. doi: 10.1139/o67-201.

77. Butler V.P., Chen J.P. Digoxin specific antibodies. Proc. Natl. Acad Sci. (USA). 1967; 57(1): 71-78. doi: 10.1073/pnas.57.1.71.

78. Полевая О.Ю., Башарова Л.А., Ковалев И.Е. Иммунохимический метод количественного определения аминазина. Хим.-фарм. журн. 1983; 17(1): 32-37.

79. Козлов В.К., Дрыгина Л.Б., Беспалов А.Я. Идентификация и количественное определение в биожидкостях нейролептиков и антидепрессантов фенотиазинового ряда иммуноферментным методом. В кн.: Острые токсикозы в клинической практике: Мат. науч. конф. Баку; 1989: 35-36.

80. Lau H.P., Gaur P.K., Chu F.S. Preparation and characterization of aflatoxin B₂-hemiglutarate and its use for production of antibody against aflatoxin B₁. J. Food. Sci. 1981; 3: 1-13. doi:10.1111/j.1745-4565.1980.tb00404.x.

81. Sizaret P., Malavcill C. Preparation of aflatoxin B1-BSA conjugate with high hapten/carrier molar ratio. *J.Immunol. Methods*. 1983; 69: 159-162.

82. Гурьянов Г.А., Козлов В.К., Любимов Ю.А. Иммунофармакологические аспекты лиганд-рецепторного взаимодействия. В кн.: *Фармакология и научно-технический прогресс: Мат. VI Всесоюзн. съезда фармакологов*. Ташкент; 1988: 104.

83. Гурьянов Г.А., Козлов В.К., Любимов Ю.А. Специфическая антитоксическая иммунотерапия: достижения и реальные перспективы. В кн.: *Острые токсикозы в клинической практике: Мат. научн. конф.* Баку; 1989: 36-37.

84. Cuculis I.I., Meyer H.G., Sim V.M. Toxic chemical vaccines: US Patent кл. 424 (88 A6 УК 27/00) No 3642981, fill. 4.05.70; publ. 15.02.72.

85. Lenz D.E., Brimfield A.A., Hunter K.W., Jr. et al. Studies using a monoclonal antibody against soman. *Fundam Appl. Toxicol.* 1984; 4(2, Pt. 2): 156-164. doi: 10.1016/0272-0590(84)90148-9.

86. Козлов В.К., Гурьянов Г.А., Дрыгина Л.Б., Беспалов А.Я., Иммуноферментный способ идентификации и определения уровня содержания атропиноподобных соединений в биожидкостях и тканях. В кн.: *Острые токсикозы в клинической практике: Мат. науч. конф.* Баку; 1989: 38-39.

87. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Гурьянов Г.А. Способ получения специфической сыворотки к низкомолекулярным гаптенам, содержащим третичную аминогруппу: Авторское свидетельство СССР № 1602197, приор. 13.12.1988, рег. в Гос. реестре изобретений 22.06.1990.

88. Virtanen R., Kanto J., Iisalo E. Radioimmunoassay for atropine and l-hyoscyamine. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 1980; 47(3): 208-212. doi: 10.1111/j.1600-0773.1980.tb01561.x.

89. Verma P. S. et al. Sensitive radioimmunoassay using antibodies to l-hyoscyamine: Patent 5,196,351 US, Int. Pat. Cl.2 G01N 33/56. /; No 535190, fill. 09.23.1983; publ. 05.27.1986.

90. Wurzburger R., Miller R., Boxenbaum H. et al. Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977; 203(2): 435-441.

91. Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate chemistry*. 1992; 3: 3-12. doi: 10.1021/bc00013a001.

92. Scholl L., Seth P., Kariisa M. et al. Drug and opioid-involved overdose deaths – United States, 2013–2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2019; 67(5152): 1419–1427. doi: 10.15585/mmwr.mm675152e1.

93. Головкин А.И., Ивницкий Ю.Ю., Иванов М.Б., Рейнюк В.Л., Козлов В.К. О биологической активности дизайнерских наркотиков из группы синтетических опиоидов. *Успехи современной биологии.* 2020; 140(5): 464-477. doi: 10.31857/S0042132420040067.

94. Кулешов В.И., Голиков С.Н., Козлов В.К. и др. Способ введения атропина: Авторское свидетельство СССР № 1113094, приор. 5.05. 1982, рег. в Гос. реестре изобретений 15.05.1984.

95. Голиков С.Н., Гурьянов Г.А., Козлов В.К. Специфические антитела – модуляторы эффектов физиологически активных веществ и ксенобиотиков. Основные феномены. *Успехи современной биологии.* 1986; 102(25): 193-206.

96. Голиков С.Н., Гурьянов Г.А., Козлов В.К. Специфические антитела – модуляторы эффектов физиологически активных веществ и ксенобиотиков: механизмы осуществления антителами функции модуляторов. *Вестник АМН СССР.* 1988; 3: 86-93.

97. Козлов В.К., Щелканова Л.Б. Механизмы «векторного» действия ксенобиотиков. Иммунотоксикологические аспекты. В кн.: Проблемы охраны здоровья населения и защиты окружающей среды от химических вредных факторов: Тез. докл. I Всесоюзн. съезда токсикологов. Ростов на Дону; 1986: 303-304.

98. Hieda Y., Keyler D. E., Vandevoort J. T. et al. Active immunization alters the plasma nicotine concentration in rats. *J. Pharm. Exper. Ther.* 1997; 283(3): 1076-1081.

99. Carrera M.R., Ashley J.A., Parsons I.H. et al. Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature.* 1995; 378(6558): 727-730. doi: 10.1038/378727a0.

100. Barbosa-Mendez S., Matus-Ortega M., Hernandez-Miramontes R., Salazar-Juárez A. Synergistic immune and antinociceptive effects induced from the combination of two different vaccines against morphine/heroin in mouse. *Hum. Vaccin Immunother.* 2021;17(10): 3515-3528. doi: 10.1080/21645515.2021.1935171.

101. Orson F.M., Kinsey B.M., Singh R.A., Wu Y. et al. The future of vaccines in the management of addictive disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* 2007; 9: 381–387. doi: 10.1007/s11920-007-0049-z.

102. Orson F.M., Kinsey B.M., Singh R. A. K. et al. Substance abuse vaccines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1141: 257-269. doi: 10.1196/annals.1441.027.
103. Kinsey B.M., Jackson D.C., Orson F.M. Anti-drug vaccines to treat substance abuse. *Immunol. Cell Biol.* 2009; 87(4): 309-314. doi: 10.1038/icb.2009.17.
104. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г. Вакцины от наркотиков – новое перспективное направление профилактики злоупотребления психоактивными веществами. *Наркология.* 2011; 10: 70-83.
105. Zalewska-Kaszukska J. Is immunotherapy an opportunity for effective treatment of drug addiction? *Vaccine.* 2015; 33(48): 6545-6551. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.079.
106. Lee J.C., Janda K.D. Immunopharmacotherapeutic advancements in addressing methamphetamine abuse. *RSC Chem Biol.* 2020; 2(1): 77-93. doi: 10.1039/d0cb00165a.
107. Collins K.C., Schlosburg J.E., Bremer P.T., Janda K.D. Methamphetamine Vaccines: Improvement through Hapten Design. *J Med Chem.* 2016; 59(8): 3878-3885. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00084.
108. Hossain M.K., Davidson M., Kypreos E. et al. Immunotherapies for the treatment of drug addiction. *Vaccines.* 2022; 10(11): 1778. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111778>.
109. Bloom B.T., Bushell M.J. Vaccines against Drug Abuse-Are We There Yet? *Vaccines (Basel).* 2022; 10(6): 860. doi: 10.3390/vaccines10060860.
110. Moreno A. Y., Janda K. D. The impact of distinct chemical structures for the development of a methamphetamine vaccine. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133 (17): 6587-6595. doi: 10.1021/ja108807j.
111. Wee S., Hicks M. J., De P. B. et al. Novel cocaine vaccine linked to a disrupted adenovirus gene transfer vector blocks cocaine psychostimulant and reinforcing effects. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37(5): 1083-1091. doi: 10.1038/npp.2011.200 .
112. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Гафт С.С. Конъюгаты физиологически активных, токсичных и лекарственных соединений. В кн.: В.К. Козлов и др. Основы иммунотоксикологии. Том 1. Общая иммунотоксикология. Иммунотоксичность химических соединений. Иницируемые токсикантами иммунопатологические состояния и заболевания / под ред. В.К. Козлова. М.: Комментарий; 2019: 480 с.
113. Paula S., Tabet M.R., Farr C.D. et al. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship modeling of cocaine binding by a novel human monoclonal antibody. *J. Med. Chem.* 2004; 47: 133-142. doi: 10.1021/jm030351z.

114. Козлов В.К., Беспалов А.Я. Иммунологическая и фармакологическая активность белковых конъюгатов атропина. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1986; 11: 580-582.
115. Berson S., Yalow R. S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. J. Clin. Invest. 1959; 38(12): 1996-2116.
116. Berson S., Yalow R. S. Radioimmunoassay: A status report. In: Good R.A. and Fisher D.W., eds. Immunobiology: Current Knowledge of Basic Concepts in Immunology and Their Clinical Application. Stamford, Connecticut: Sinauer; 1971: 287-293.
117. Oliver G.C., Parker B.M., Brasfield D.L., Parker C.W. A sensitive radioimmunoassay for digitalis. J. Lab. Clin. Med. 1966; 68: 1002-1009.
118. Oliver G.C., Parker B.M., Brasfield D.L., Parker C.W. The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. J. Clin. Invest. 1968; 47: 1035-1042.
119. Butler V.P., Chen J.P. Digoxin specific antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 1977; 57(1): 71-78. doi: 10.1073/pnas.57.1.71.
120. Bering E., Kitasato S. Uber das Zustandekommen der Diphtherie Immunitet und der Tetanus-Immunitet bei Thieren. Dtsch. Med. Wochenshr. 1890; 16: 113-114.
121. Mehta S.R., Sashindran V.K. Clinical features and management of snake bite. Med. J. Armed Forces India. 2002; 58 (3): 247–249. doi: 10.1016/S0377-1237(02)80140-X.
122. Simpson I.D. Snakebite management in India, the first few hours: a guide for primary care physicians. J. Indian Med. Assoc. 2007; 105 (6): 324–328.
123. Ahmed S. M., Ahmed M., Nadeem A. et al. Emergency treatment of a snake bite: Pearls from literature. J. Emerg. Trauma Shock. 2008; 1 (2): 97–105.
doi: 10.4103/0974-2700.43190.
124. Williams H. F., Layfield H. J., Vallance T. et al. The urgent need to develop novel strategies for the diagnosis and treatment of snakebites. Toxins (Basel). 2019; 11 (6): 363. doi: 10.3390/toxins11060363.
125. Gutierrez J. M., Lomonte B., Leon G. et al. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. Current Pharm. Design. 2007; 13 (28): 2935–2950. doi: 10.2174/138161207782023784.
126. Sami-Merah S., Hammoudi-Triki D., Martin-Eauclaire M.F., Laraba-Djebari F. Combination of two antibody fragments F(ab') (2) / Fab: an alternative for scorpion envenoming treatment. Int. Immunopharmacol. 2008; 8 (10): 1386–1394. doi: 10.1016/j.intimp.2008.05.011.

127. Laustsen A.H., Maria Gutierrez J., Knudsen C. et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*. 2018; 146: 151–175. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.03.004.
128. Liu C.C., Wu C.J., Chou T.Y. et al. Development of a monoclonal scFv against cytotoxin to neutralize cytolytic activity induced by *Naja atra* venom on myoblast C2C12 cells. *Toxins (Basel)*. 2022; 14(7): 459. doi: 10.3390/toxins14070459.
129. Lipman N.S., Jackson L.R., Trudel L.J., Weis-Garcia F. Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*. 2005; 46: 258–268. doi: 10.1093/ilar.46.3.258.
130. Tomita M., Tsumoto K. Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*. 2011; 3(3): 371–380. doi: 10.2217/imt.11.4.
131. Watkins N.A., Ouwehand W.H. Introduction to antibody engineering and phage display. *Vox Sang*. 2000; 78(2): 72–79. doi: 10.1159/000031154.
132. Hammers C.M., Stanley J.R. Antibody phage display: Technique and applications. *J. Investig. Dermatol*. 2014; 134(2): 1–5. doi: 10.1038/jid.2013.521.
133. Frenzel A., Schirrmann T., Hust M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *MAbs*. 2016; 8(7): 1177–1194. doi: 10.1080/19420862.2016.1212149.
134. Roberts D.M., Gallapathy G., Dunuwille A., Chan B.S. Pharmacological treatment of cardiac glycoside poisoning. *Br. J. Clin. Pharmacol*. 2016; 81(3): 488-495. doi: 10.1111/bcp.12814.
135. Flanagan R.J., Jones A.L. Fab antibody fragments: some applications in clinical toxicology. *Drug Saf*. 2004; 27(14): 1115-1133. doi: 10.2165/00002018-200427140-00004.
136. Banner W. Jr, Timmons O.D., Vernon D.D. Advances in the critical care of poisoned paediatric patients. *Drug Saf*. 1994; 10(1): 83-92. doi: 10.2165/00002018-199410010-00006.
137. Chan B.S., Buckley N.A. Digoxin-specific antibody fragments in the treatment of digoxin toxicity. *Clin. Toxicol (Phila)*. 2014; 52(8): 824-836. doi: 10.3109/15563650.2014.943907.
138. Antman E.M., Wenger T.L., Butler V.P. Jr, Haber E., Smith T.W. Treatment of 150 cases of life-threatening digitalis intoxication with digoxin-specific Fab antibody fragments. Final report of a multicenter study. *Circulation*. 1990; 81(6):1744-1752. doi: 10.1161/01.cir.81.6.1744.
139. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада X; 1999: 272 с.

140. Pichichero M.E. Protein carriers of conjugate vaccines: characteristics, development, and clinical trials. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013; 9(12): 2505-2523. doi: 10.4161/hv.26109.

141. Kovac M., Kostanyan L., Mesaros N. et al. Immunogenicity and safety of a second booster dose of an acellular pertussis vaccine combined with reduced antigen content diphtheria-tetanus toxoids 10 years after a first booster in adolescence: An open, phase III, non-randomized, multi-center study. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(8): 1977–1986. doi: 10.1080/21645515.2018.1460292.

142. McCormack P. L. Reduced-antigen, combined diphtheria, tetanus and acellular pertussis vaccine, adsorbed (Boostrix®): a review of its properties and use as a single-dose booster immunization. *Drugs.* 2012; 72(13): 1765–1791. doi: 10.2165/11209630-000000000-00000.

143. Berkowitz B.A., Ceretta K.V., Spector S. Influence of active and passive immunity on the disposition of dihydromorphine-H³. *Life Sci.* 1974; 15(5): 1017-1028. doi: 10.1016/0024-3205(74)90016-2.

144. Bonese K.F., Wainer B.H., Fitch F.W., et al. Changes in heroin self –administration by a rhesus monkey after morphine immunization. *Nature.* 1974; 252(5485): 708-710. doi: 10.1038/252708a0.

145. Basmadjian G.P., Singh S., Sastrojojo 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. doi: 10.1248/cpb.43.1902.

146. Carrera M.R., Ashley J.A., Zhou B. et al. Cocaine vaccines: Antibodies protection against relapse in a rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(11): 6202-6206. doi: 10.1073/pnas.97.11.6202.

147. Anton B., Salazar A., Flores A. et al. Vaccines against morphine/heroin and its use as effective medication for preventing relapse to opiate addictive behaviors. *Human Vaccines.* 2009; 5(4): 214-229. doi: 10.4161/hv.5.4.7556.

148. Hicks M. J., De P. B., Rosenberg J. B. 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. doi: 10.1038/mt.2010.280.

149. Cerny E. H., Cerny T. Vaccines against nicotine. *Human Vaccines.* 2009; 5(4): 200–205. doi: 10.4161/hv.5.4.7310.

150. Kosten T., Rosen M., Bond J. et al. Human therapeutic cocaine vaccine: Safety and immunogenicity. *Vaccines.* 2002; 20(7-8): 1196–1204. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00425-x.

151. Martell B. A., Orson F. M., Poling J. T. et al. Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence: A randomized double-blind placebo controlled efficacy trial. Arch. Gen Psychiatry. 2009; 66(10): 1116–1123. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.128.

152. Vasiliu O. Current Trends and perspectives in the immune therapy for substance use disorders. Front Psychiatry. 2022; 13: 882491. doi: 10.3389/fpsyt.2022.882491.

153. Celik M., Fuehrlein B. A review of immunotherapeutic approaches for substance use disorders: Current status and future prospects. Immunotargets Ther. 2022. 29; 11: 55-66. doi: 10.2147/ITT.S370435.

154. Scendoni R., Bury E., Ribeiro I.L.A. et al. Vaccines as a preventive tool for substance use disorder: A systematic review including a meta-analysis on nicotine vaccines' immunogenicity. Hum. Vaccin. Immunother. 2022; 18(6): 2140552. doi: 10.1080/21645515.2022.2140552.