

**ИСКУССТВЕННЫЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ
С ГАПТЕНАМИ-АНАЛОГАМИ ПСИХОАКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ И ТОКСИКАНТОВ: АЛГОРИТМЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ ГАПТЕННЫХ ЭПИТОПОВ АЛКАЛОИДОВ ПРИ
КОНСТРУИРОВАНИИ ИММУНОГЕННЫХ АНТИГЕНОВ**

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.*

Резюме. На основании анализа имеющихся литературных данных и собственного опыта авторов в области конструирования конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных и нейротоксичных алкалоидов описаны принципы придания гаптенным эпитопам свойства иммунодоминантности в составе антигенов (иммуногенов) и подходы (алгоритмы) моделирования молекулярной структуры гаптенных эпитопов, определяющие их специфичность. Алгоритмы обеспечения целевой специфичности гаптенных эпитопов в составе конъюгированных антигенов (иммуногенов), используемых для целей активной иммунизации, обобщены на конкретных примерах получения конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных и нейротоксичных алкалоидов: морфинановых алкалоидов — опиатов; тропановых алкалоидов — кокаина, атропина, скополамина, гиосциамин; трополонового алкалоида — колхицина; проапорфинового алкалоида — стефарина и некоторых других алкалоидов (например, алкалоида табака — никотина и алкалоида лукович подснежников — галантамина). На примерах гаптен-аналогов и конъюгированных антигенов психоактивных и нейротоксичных алкалоидов: морфинановых и тропановых алкалоидов, алкалоидов табака, которые широко используются с немедицинскими целями в качестве наркотиков (опиаты, кокаин, алкалоиды-психодислептики, никотин), обобщены также наиболее часто используемые подходы оптимизации способов их синтеза. Постулировано, что алгоритм такой оптимизации определяется молекулярной структурой целевого алкалоида и

выбором конкретной реакционноспособной (функциональной) группы, которая вводится в молекулу гаптена-аналога. Способы синтеза гаптен-аналогов алкалоидов весьма разнообразны. Для получения гаптен-аналогов психоактивных и токсичных алкалоидов с реакционноспособной карбоксильной группой универсальным алгоритмом оптимизации является синтез их гемисукцинатных производных. На конкретных примерах гаптен-аналогов алкалоидов с реакционноспособными карбокси- и аминогруппами описаны также способы их конъюгирования к макромолекулярным, преимущественно белковым, носителям. Наиболее широко используемые способы химического конъюгирования позволяют получать иммуногены с оптимальными молекулярными и иммунохимическими характеристиками для индуцирования интенсивного и специфичного гуморального иммунного ответа на гаптенный эпитоп.

Ключевые слова: психоактивные и нейротоксичные алкалоиды; наркотические вещества; конъюгированные антигены (конъюгаты гаптен-носитель); гаптены-аналоги алкалоидов; гаптенные детерминанты (эпитопы); иммунохимическая специфичность; моделирование биологической активности и специфичности.

HAPTEN-CARRIER CONJUGATES WITH HAPTENS-ANALOGUES OF PSYCHOACTIVE SUBSTANCES AND TOXICANTS: ALGORITHMS FOR MODELING THE MOLECULAR STRUCTURE OF ALKALOID HAPTENE EPITOPES IN DESIGNING OF IMMUNOGENIC ANTIGENS

Kozlov V.K.^{1,2*}, Bespalov 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.

Summary. Based on the analysis of the available literature data and the authors' own experience in the field of constructing conjugated antigens with hapten analogues of psychoactive and neurotoxic alkaloids, the principles of giving hapten epitopes the property of immunodominance

in the composition of antigens (immunogens) and approaches (algorithms) for modeling the molecular structure of hapten epitopes that determine their specificity are described. Algorithms for ensuring the target specificity of hapten epitopes in the composition of conjugated antigens (immunogens) used for the purposes of active immunization are summarized on specific examples of obtaining conjugated antigens with hapten analogues of psychoactive and neurotoxic alkaloids: morphine alkaloids – opiates; tropane alkaloids – cocaine, atropine, scopolamine, hyoscyamine; tropolone alkaloid – colchicine; proaporphine alkaloid – stefarin and some other alkaloids (for example, tobacco alkaloid – nicotine and alkaloid of snowdrop bulbs – galanthamine). Using examples of the synthesis of hapten analogs of psychoactive and neurotoxic alkaloids: morphine and tropane alkaloids, tobacco alkaloids, which are widely used for non-medical purposes as drugs (opiates, cocaine, psychodysleptic alkaloids, nicotine), the most commonly used approaches to optimizing synthesis methods are summarized too. It is postulated that the algorithm for such optimization is determined by the molecular structure of the target ligand and the choice of a specific reactive (functional) group that is introduced into the hapten analog. The methods of hapten analogs synthesis are very diverse. For the purposes of obtaining haptens analogs of psychoactive and toxic alkaloids with a reactive carboxyl group, a universal optimization algorithm is the synthesis of their hemisuccinate derivatives. Using specific examples of hapten analogs with reactive carboxy and amino groups, methods for their conjugation to macromolecular, predominantly protein, carriers are described. Thus, the most widely used methods of chemical conjugation make it possible to obtain immunogens with optimal molecular and immunochemical characteristics for inducing an intense and specific humoral immune response to the hapten epitope.

Keywords: psychoactive and neurotoxic alkaloids; narcotic substances; conjugated antigens (hapten-carrier conjugates); haptens analogs of alkaloids; hapten determinants (epitopes); immunochemical specificity; modeling of biological activity and specificity.

Введение

Искусственные конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами низкомолекулярных соединений активно используются в современной биомедицине. Наибольшие успехи их использования достигнуты в области создания современных методов иммунохимического анализа, в которых полученные при иммунизации этими антигенами поликлональные (от животных-доноров антисывороток) или моноклональные (в клеточных культурах – гибридомах) антитела применяются как реагенты для количественного определения целевых биоактивных соединений, лекарственных веществ, наркотиков и токсикантов [1-4, 9-11]. Как ранее было отмечено, при конструировании конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами низкомолекулярных психоактивных веществ и токсикантов

решаются пять ключевых задач [3, 5-8]: 1) достижение достаточной иммуногенности конъюгированного антигена при активной иммунизации (вакцинации) этим антигеном; 2) обеспечение при вакцинации преимущественной направленности гуморального иммунного ответа в отношении гаптенного эпитопа конъюгированного антигена, что достижимо при иммунодоминантности гаптенного эпитопа в качестве детерминанты иммунохимической специфичности используемого для вакцинации антигена; 3) достижение при синтезе гаптена-аналога максимально возможного соответствия структуры гаптенного эпитопа в составе конъюгированного антигена структуре целевого биоактивного соединения в том случае, если конечной целью является получение антител узкой специфичности, 4) синтез гаптена-аналога с молекулярной структурой, моделирующей структуру ряда молекулярно похожих соединений (фармакологически активных веществ, экотоксикантов, включая их метаболиты) в том случае, если конечной целью является получение антител групповой специфичности; 5) выбор метода химического конъюгирования целевого соединения с носителем (при наличии в его структуре реакционноспособной химической группировки) или же введение в состав целевого соединения подобной группировки (при её отсутствии) с синтезом соответствующего гаптена-аналога и его конъюгированием с носителем [3, 7, 8].

При этом, достижение высокой иммуногенности конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами низкомолекулярных психоактивных веществ и токсикантов определяется: 1) природой и свойствами макромолекулярного носителя гаптенных эпитопов, 2) оптимально выбранными условиями активной иммунизации (доза и способ введения антигена, интервалы между введениями антигена, общая продолжительность иммунизации), 3) использованием при активной иммунизации совместно с конъюгированными антигенами эффективных усилителей иммуногенности – адекватных адъювантов [3-5, 8].

В свою очередь специфичность гуморального иммунного ответа на гаптенный эпитоп критично зависит от: 1) возможности придания гаптенному эпитопу свойства доминантной детерминанты иммунохимической специфичности, 2) молекулярной структуры синтезируемого гаптена-аналога. Иммунодоминантность гаптенного эпитопа обеспечивается оптимальной эпитопной плотностью гаптена (т.е. оптимальным числом гаптенных эпитопов на молекуле носителя), адекватной ориентацией и стереохимией гаптенного эпитопа (т.е. его расположением на поверхности макромолекулярной конформации носителя), наличием молекулярного спейсера – вставки из нескольких атомов углерода между гаптенным эпитопом и носителем [5, 7-9]. В совокупности перечисленные требования создают условия доступности иммунохимической детерминанты гаптена для молекулярных структур антигенного распознавания иммунцитов и обеспечивают возможность инициации иммунного ответа.

Конъюгированные антигены с гаптенными эпитопами различных фармакологически активных веществ и токсикантов получают, используя общую методологию и конкретные способы синтеза гаптен-аналогов необходимых молекулярных характеристик, а также методы их конъюгирования с исходно иммуногенными макромолекулярными носителями.

Целью предлагаемого вниманию заинтересованных специалистов исследования являлась систематизация имеющейся информации по конструированию искусственных конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных и нейротоксичных алкалоидов с изложением, в контексте общих принципов, ряда известных технических решений по достижению иммунодоминантности гаптенных эпитопов и их целевой иммунохимической специфичности в составе конъюгированных антигенов. Рассматриваемые технические решения также имеют прямое отношение к методам синтеза конъюгированных антигенов на основе макромолекулярных (преимущественно белковых) носителей. Наличие конъюгированных антигенов (иммуногенов) и использование активной иммунизации этими антигенами животных позволяет получать поликлональные специфические антисыворотки для последующего их применения как реагентов в методах иммунохимического анализа целевых соединений. Конъюгированные антигены также могут использоваться как перспективные образцы молекулярных вакцин с гаптенными эпитопами целевых веществ (например, в широко проводимых в настоящее время исследованиях по разработке иммунологического подхода к проблеме вторичной профилактики наркозависимых лиц [12]).

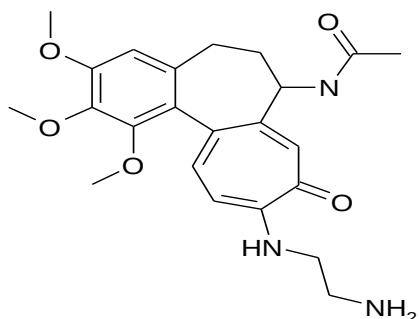
Далее на конкретных примерах создания конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами природных психоактивных и нейротоксичных химических соединений, иллюстрируются принципы и подходы моделирования структуры гаптенных эпитопов в составе конъюгированных антигенов, в соответствии с которыми были получены антигены и специфические антитела оптимальных биологических характеристик.

Конструирование конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами алкалоидов с выраженной нейротоксичностью: моделирование иммунодоминантности и специфичности гаптенных эпитопов

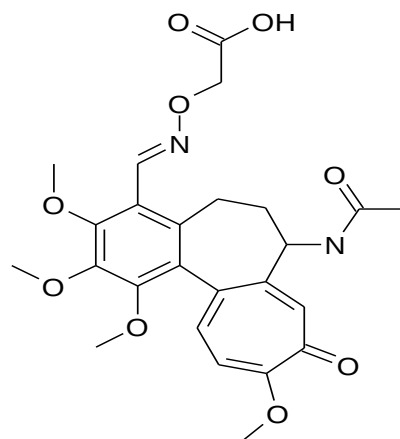
Моделирование структуры гаптен-аналогов колхициновых алкалоидов. Наиболее известные алкалоиды этой группы колхицин и колхамин относятся к алкалоидам трополонового ряда. Наряду с другими родственными алкалоидами колхицин содержится в луковцах растений родов *Colchicum*, *Merendera lamont*, *Gloriosa*, в частности в *Colchicum autumnale* (*Безвременник осенний*), из которых этот алкалоид и получают. Колхицин и его производные получены также путем химического синтеза.

Колхицин является чрезвычайно активным мутагеном и нервно-паралитическим ядом. Активен также как антиконвульсант. На сегодня колхицин – лучшее средство против средиземноморской лихорадки. При подагре и суставном ревматизме – заболеваниях с иммунным воспалением в патогенезе, при котором значимы альтерационные эффекты иммунных факторов и иммуноопосредованных механизмов аутоповреждения, колхицин применяют в качестве противовоспалительного средства. В специальной литературе активно обсуждаются также перспективы применения колхицина для лечения пациентов с COVID-19 [13, 14]. Колхицин обладает и выраженной противоопухолевой активностью, поэтому ранее лекарственные препараты с этим алкалоидом применяли с целью циторедукции опухолевых клеток при некоторых злокачественных новообразованиях.

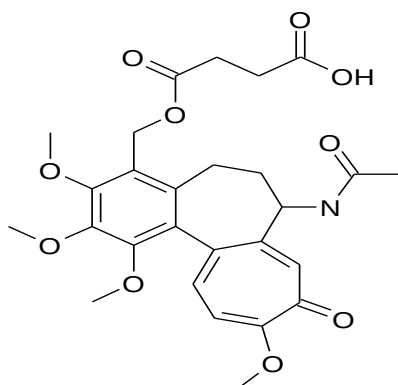
Для использования в качестве гаптен-аналогов при получении конъюгированных антигенов синтезировано как минимум три производных колхицина с различными функциональными группами, вводимыми в разные части молекулы этого алкалоида: N-этиламиноколхицинамид (гаптен-аналог колхицина-1 /ГАКол-1/), 4-формилколхицина О-карбоксиметил оксим (гаптен-аналог колхицина-2 /ГАКол-2/), гемисукцинат 4-гидроксиметилколхицина (гаптен-аналог колхицина-3 /ГАКол-3/) [15].



N-этиламиноколхицинамид
(гаптен-аналог колхицина-1 /ГАКол-1/)

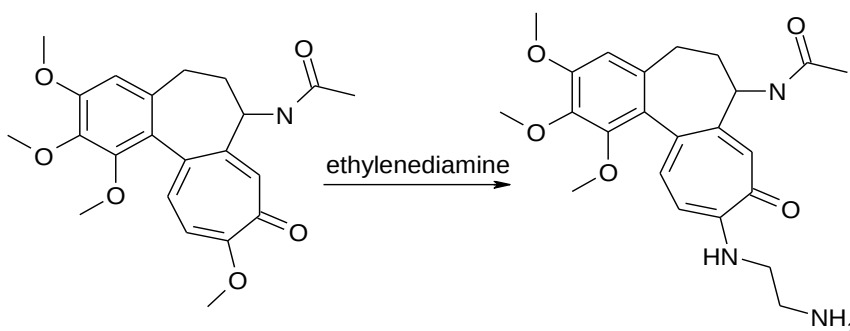


4-формилколхицина О-карбоксиметил оксим
(гаптен-аналог колхицина-2 /ГАКол-2/)



гемисукцинат 4-гидроксиметилколхицина
(гаптен-аналог колхицина-3 /ГАКол-3/)

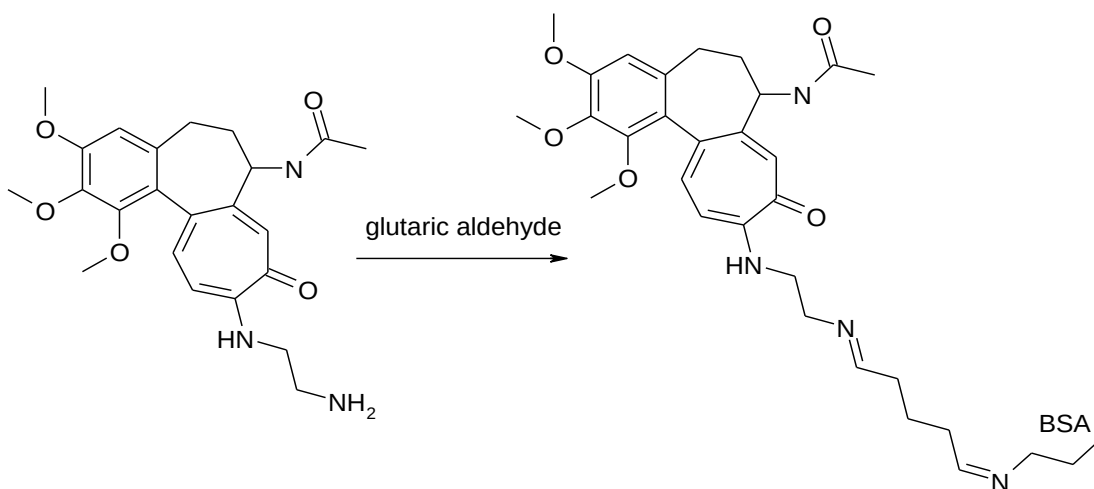
N-этиламиноколхицинамид (ГАКол-1) получают, обрабатывая колхицин этилендиамином в спиртовом растворе:



колхицин

N-этиламиноколхицинамид

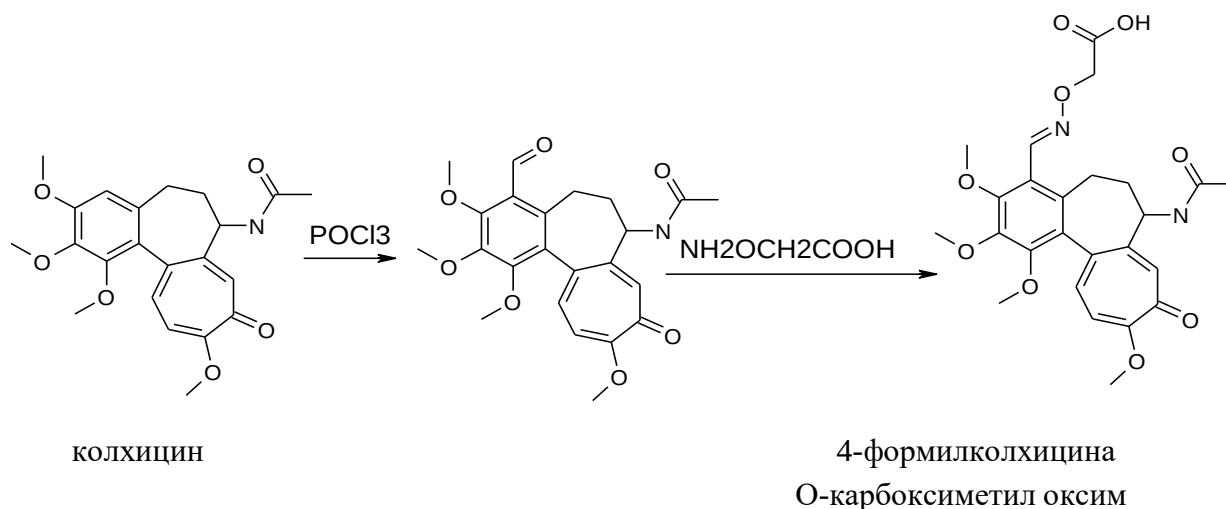
При получении конъюгированного антигена с этим гаптен-аналогом его ковалентное связывание с белком (БСА /BSA/) осуществляли в фосфатном буфере (pH=7.0) с помощью глутарового альдегида:



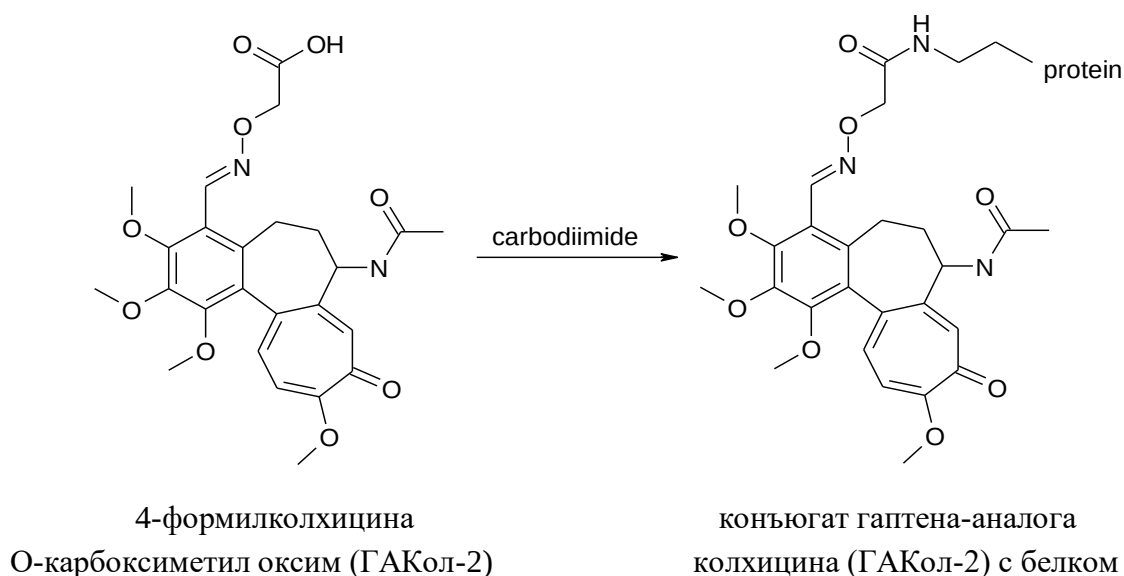
N-этиламиноколхицинамид (ГАКол-1)

конъюгат гаптена-аналога
колхицина (ГАКол-1) с белком

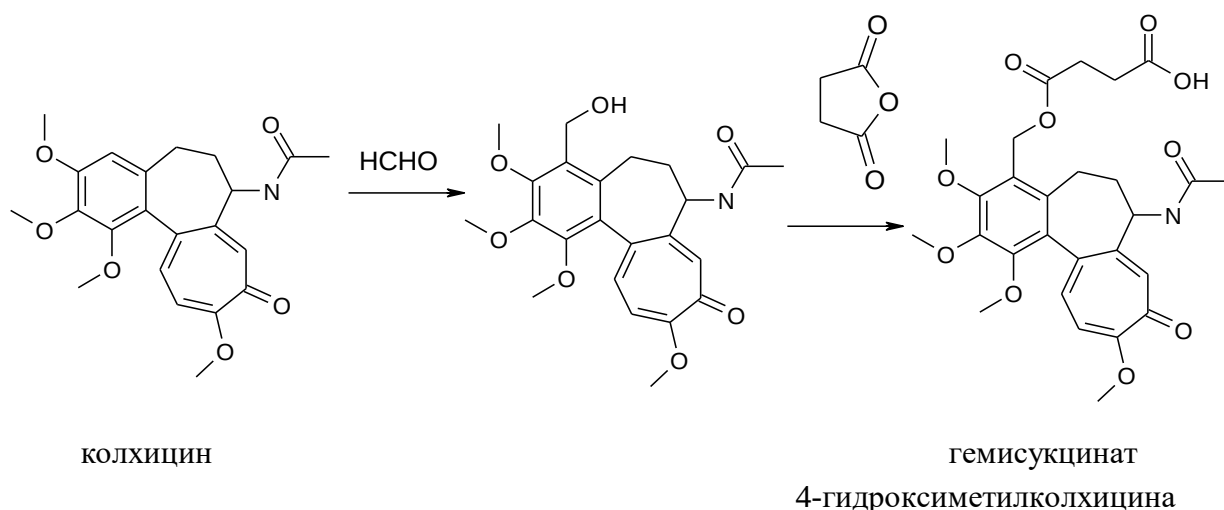
4-формилколхицина О-карбоксиметил оксим (ГАКол-2) синтезируют в две стадии: на первой стадии колхицин формилируют по Вильсмейеру-Хааку с получением 4-формилколхицина, который на второй стадии конденсируют с О-карбоксиметилоксимом:



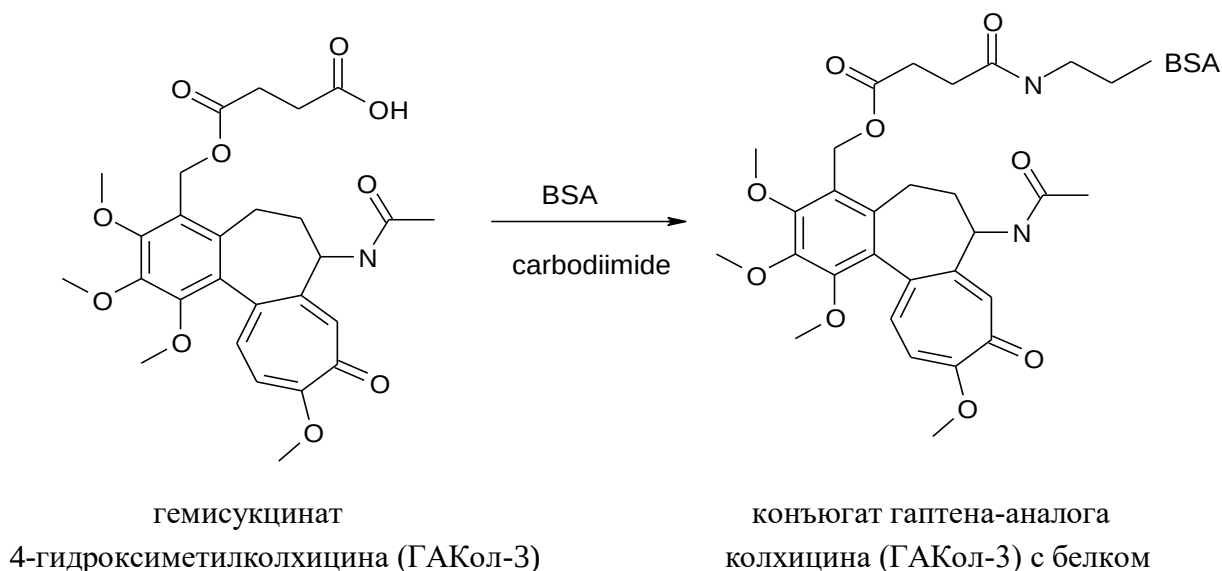
При получении конъюгированного антигена с этим гаптеном-аналогом его конъюгацию с белком осуществляли карбодиимидным методом:



Гемисукцинат 4-гидроксиметилколхицина (ГАКол-3) также синтезируют в две стадии. На первой стадии синтеза колхицин гидроксиметилируют формалином, а на второй стадии 4-гидроксиметильное производное колхицина вводят в реакцию с янтарным ангидридом, получая соответствующий гемисукцинат:



При получении конъюгированного антигена с этим гаптеном-аналогом его конъюгацию с белком (BCA /BSA/) также осуществляли карбодиимидным методом:



Следует обратить внимание на тот факт, что в полученных конъюгированных антигенах с гаптенами-аналогами колхицина присутствуют низкомолекулярные вставки – спейсеры незначительной длины между гаптенным эпитопом и белком, появление которых в процессе проведения реакции конъюгирования обеспечивается используемыми химическими реагентами – глутаровым альдегидом или же карбодиимидом. Синтезированные гаптены-аналоги колхицина были связаны с белками носителями при конъюгировании через разные точки связывания на трех кольцах колхицина, т.е. как гаптенные эпитопы имели различную специфичность.

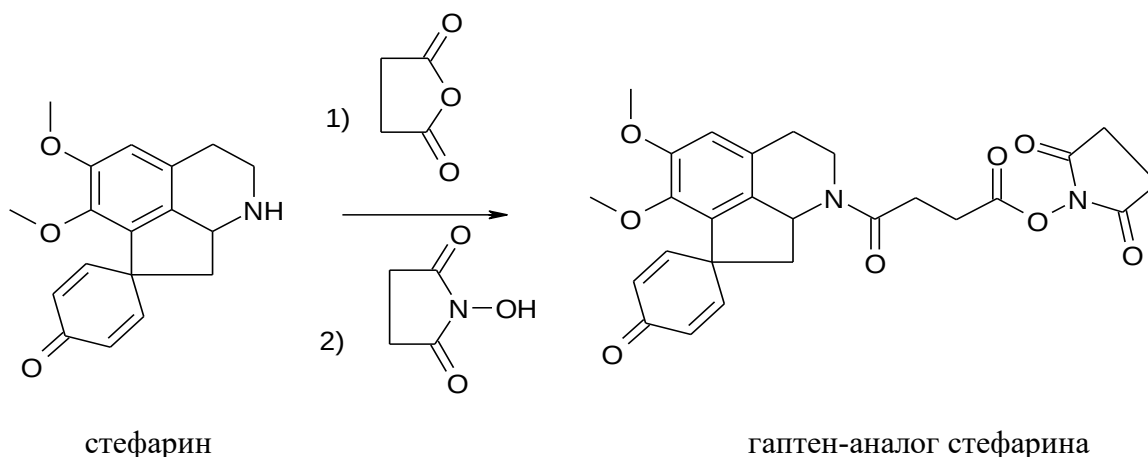
С использованием поликлональных сывороток, полученных от животных-доноров, которых иммунизировали конъюгатами колхицина разного строения, были разработаны

методы радиоиммунного анализа (RIA) [16]. Предел обнаружения колхицина в крови здоровых добровольцев, получивших перорально 1 мг колхицина, для всех трех методов RIA составил 0,2 нг/мл. Дополнительно, при параллельном использовании всех трех методов, определяли концентрацию колхицина в плазме крови пациентов, которые длительно принимали колхицин, и не выявили значимых различий в определяемой концентрации алкалоида. Разработанные методы RIA имели определенную перекрестную специфичность в отношении метаболитов и структурных аналогов колхицина. Выявленная перекрестная специфичность зависела от сайта, через который колхицин был конъюгирован с белком-носителем.

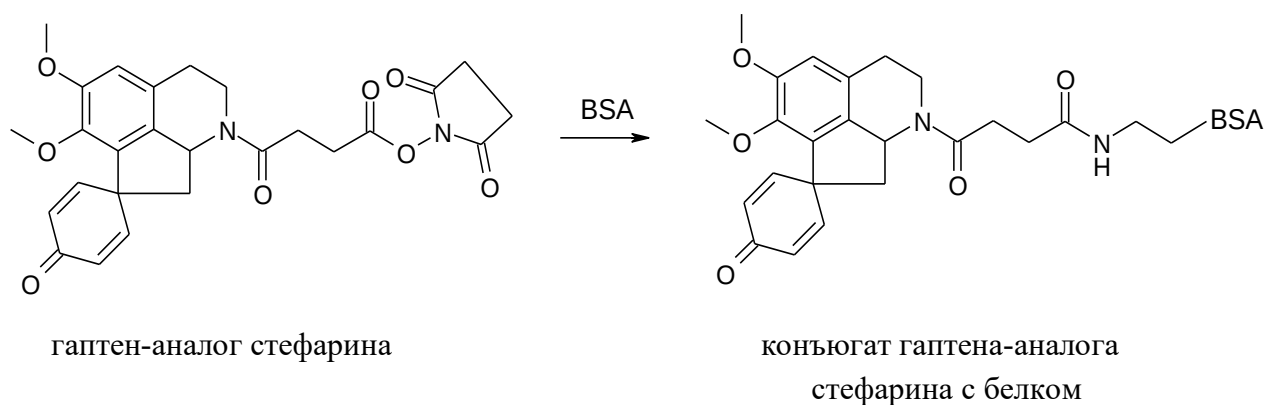
В 1975 году был разработан RIA колхицина, в котором использовались поликлональные сыворотки, полученные при иммунизации животных конъюгатом ещё одного гаптена-аналога колхицина – N-деацетилтиоколхицина с БСА и колхицин, меченный тритием [17]. Метод позволял определять колхицин в биологических жидкостях в диапазоне 5-50 нг. Метод также имел перекрестную специфичность: перекрестная реакция N-деацетилтиоколхицина с N-деацетил-N-метилтиоколхицином составила 8%. Позднее были получены моноклональные антитела к вышеописанному гаптену-аналогу колхицина [18], с использованием которых удалось значительно повысить специфичность определения колхицина методом RIA.

Моделирование структуры гаптена-аналога проапорфинового алкалоида стефарина. Стефарин – алкалоид, выделенный из растения *Stephania glabra* (*Стефания гладкая*). Алкалоид нейротоксичен и обладает антихолинэстеразной активностью. Используется как субстанция в лекарственных препаратах, применяемых при лечении заболеваний периферической нервной системы: бокового амиотрофического склероза, парезов лицевого нерва, миопатии.

Гаптен-аналог стефарина синтезируют, последовательно обрабатывая стефарин янтарным ангидридом, а затем N-гидроксисукцинимидом в присутствии N,N'-дициклогексилкарбодиимида:



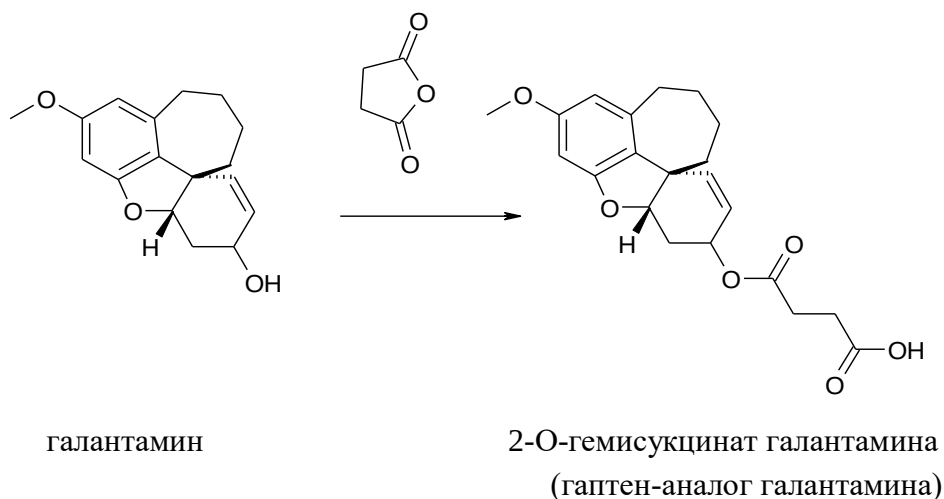
Гаптен-аналог сефарины, будучи активированным эфиром, легко конъюгируется с белком (БСА /BSA/) при pH 8-9.



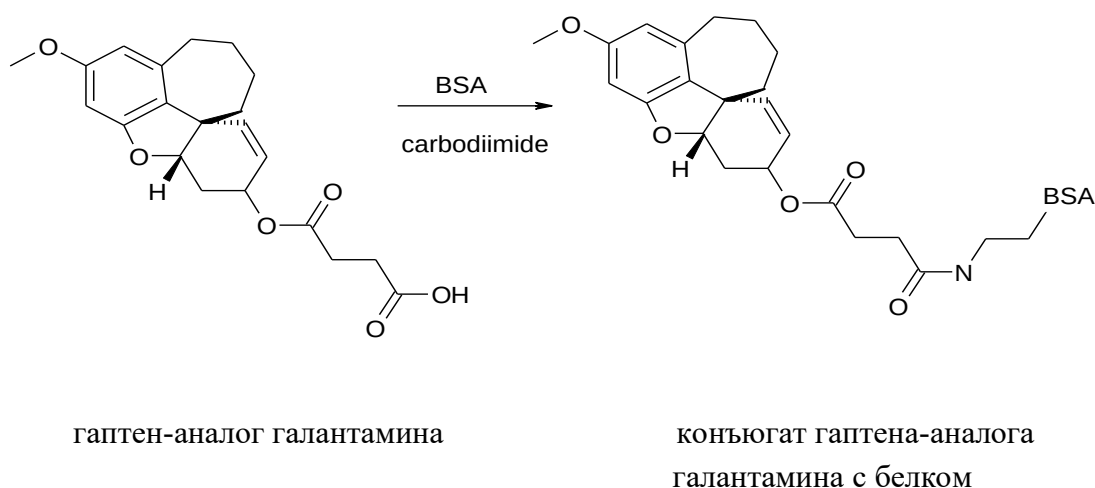
Конъюгат гаптена-аналога сефарины с БСА был использован для получения поликлональных антител, с применением которых в свою очередь был разработан метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) [19]. При определении сефарины в крови пациентов установили, что ELISA-метод был специфичен и имел чувствительность 10 пг/мл.

Моделирование структуры гаптена-аналога алкалоида группы физостигмина – галантамина. Галантамин (нивалин) – алкалоид, выделенный из корней подснежников *Galanthus woronowii* и *Galanthus nivalis*. Галантамин нейротоксичен, способен обратимо ингибировать ацетилхолинэстеразу и считается эталонным ингибитором этого фермента [20, 21]. В медицинской практике показаниями для назначения галантамина являются: необходимость снижения внутриглазного давления, лечение нервных болезней, усиление перистальтики кишечника.

Галантамин имеет реакционноспособную гидроксильную группу. При синтезе иммуногенного конъюгата галантамин обрабатывают янтарным ангидридом, получая его гаптен-аналог – 2-О-гемисукцинат галантамина.



Синтезированный 2-О-гемисукцинат галантамина далее конъюгировали с БСА (BSA) с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида [22].



С поликлональными антителами, полученными при иммунизации этим конъюгатом животных – доноров специфичных сывороток, был разработан метод RIA, позволявший быстро и точно определять галантамин в неочищенных растительных экстрактах в диапазоне 0,5 – 100 нг. Разработанный метод RIA позволял обнаруживать всего 3,5 пмоль галантамина [22]. RIA обладал высокой специфичностью к галантамину. Используемые поликлональные сыворотки имели индивидуальную иммунохимическую специфичность к галантамину и практически не проявляли перекрестной реактивности с различными другими алкалоидами растений этого вида. Вскоре был разработан иммуноферментный метод количественного определения галантамина в растительном сырье и в биологических жидкостях с рабочим диапазоном 2 – 100 нг и столь же специфичный [23]. При получении поликлональных антител для целей иммуноферментного анализа использовали конъюгат галантамина той же структуры, что при получении сывороток для использования в RIA.

Моделирование структуры гаптенов-аналогов тропановых алкалоидов – атропина, гиосциамина, скополамина. Наиболее известные алкалоиды этой группы: атропин, гиосциамин, скополамин. Все названные соединения способны блокировать эффекты ацетилхолина – медиатора передачи нервных импульсов в холинэргических синапсах, то есть являются фармакологическими антагонистами ацетилхолина – холиноблокаторами или холинолитиками.

К тропановым алкалоидам относят и алкалоиды группы кокаина [24] (алгоритмы моделирования структуры гаптенов-аналогов кокаина при получении конъюгированных антигенов этого тропанового алкалоида будут рассмотрены далее в разделе, посвященном гаптенам-аналогам наркотиков).

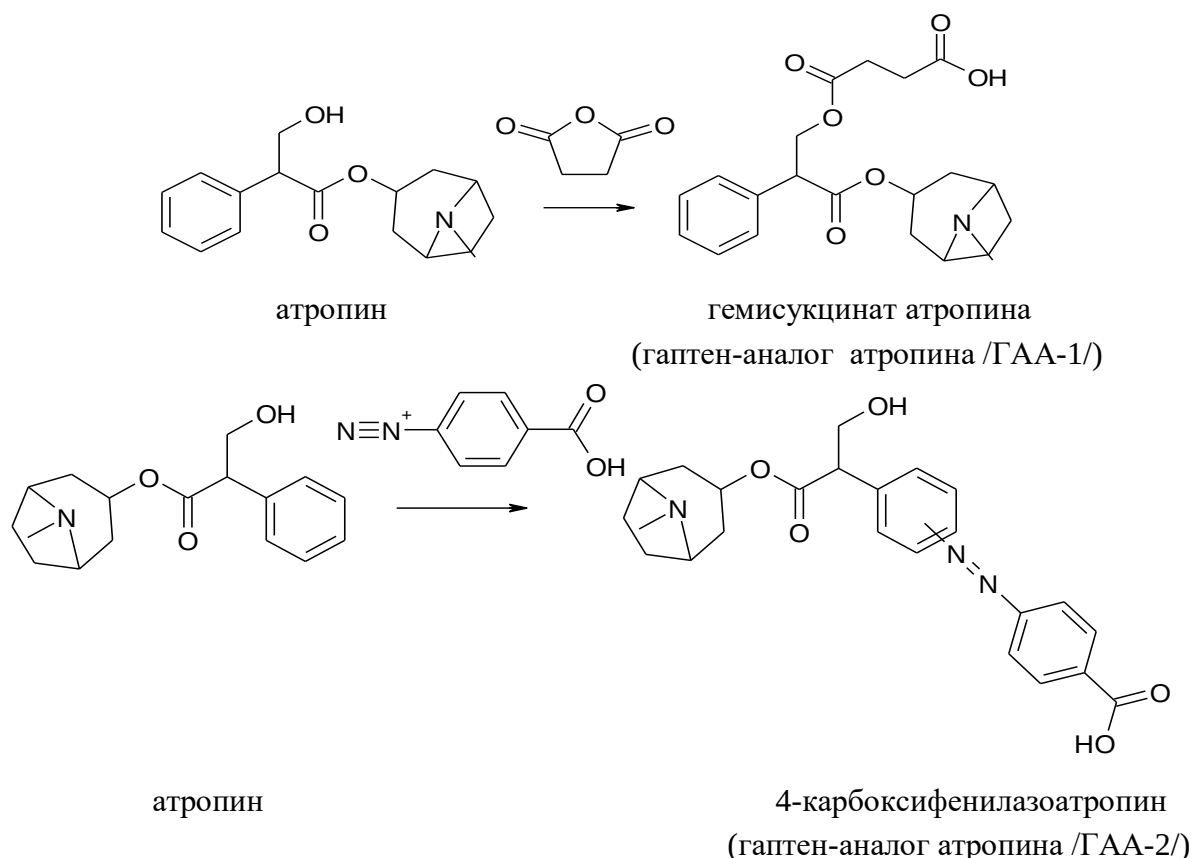
Атропин является рацемической формой гиосциамина, образующейся при выделении алкалоидов из растительного сырья, в частности из *Красавки обыкновенной* (*Atropa belladonna*) [24]. Как атропин, так и гиосциамин являются М-холиноблокаторами, обладающими преимущественно периферической холинолитической активностью. Центральные М-холинолитические (психодислептические) эффекты характерны для высоких доз атропина и клинически значимы при острых отравлениях белладонной [25, 26].

Скополамин выделяют из растений вида *Datura* и *Duboisia* (*Solanaceae*). Скополамин проявляет выраженную парасимпатолитическую активность, а по мощности центральных холинолитических эффектов значительно превосходит атропин.

При передозировках алкалоиды этой группы способны вызывать расстройства психики и нарушения сознания. М-холиноблокаторы с выраженными центральными эффектами (например, скополамин, а в высоких дозах и атропин) проявляют психотомиметическую активность, вызывают галлюцинации и изменяют сознание, потому их относят к психодислептикам – делириогенам.

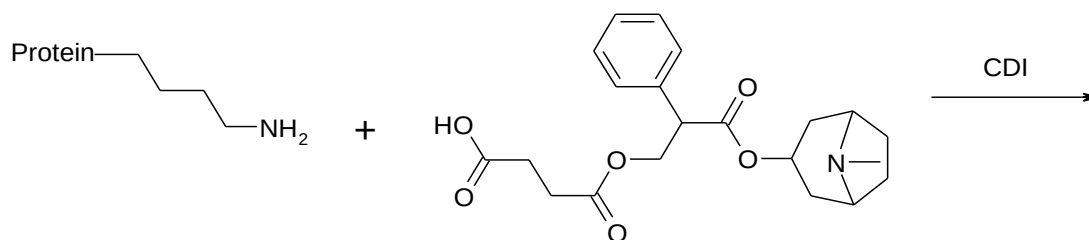
В научной и патентной литературе достаточно широко представлены варианты синтеза гаптенов-аналогов психоактивных веществ (ПАВ) из группы природных тропановых алкалоидов с активностью М-холиноблокаторов: атропина, гиосциамина, скополамина. Подобие структур (как было выше отмечено, все эти соединения являются тропановыми алкалоидами) подразумевает схожесть их химической модификации с целью получения гаптенов-аналогов.

В качестве гаптенов-аналогов атропина при синтезе конъюгированных антигенов с целью последующего получения при активной иммунизации этими конъюгатами поликлональных специфических антител используют либо гемисукцинат атропина [27, 28], либо продукт азосочетания атропина с диазотированной п-аминобензойной кислотой [29-32].

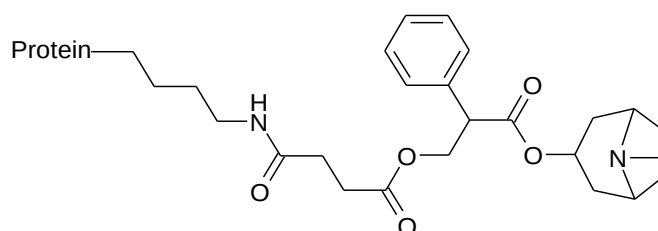


В обоих полученных путем химической модификации производных атропина имеется реакционноспособная карбоксильная группа, поэтому последующее конъюгирование этих гаптен-аналогов с белковыми носителями возможно различными методами, в частности с помощью водорастворимого карбодиимида.

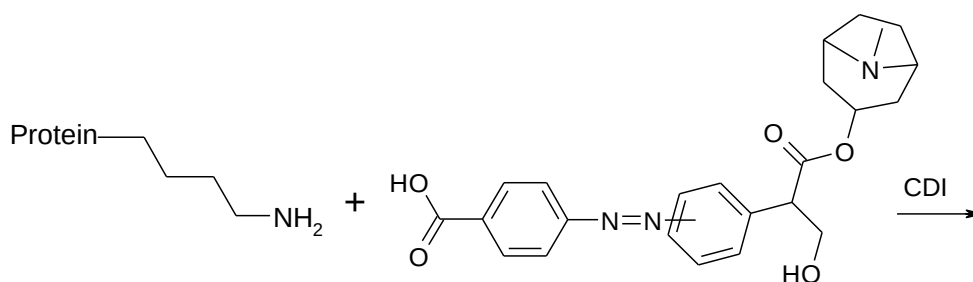
При выполнении исследований, проведенных на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, описанные выше гаптены-аналоги атропина были ресинтезированы и использованы при получении гаптенных эритроцитарных диагностикумов (на основе формализированных эритроцитов барана), применяемых в иммунохимическом анализе для реакции торможения непрямой гемагглютинации, и конъюгатов гаптен-фермент (в качестве фермента использовали пероксидазу хрена) для гомогенного иммуноферментного анализа атропина [33, 34]. Используя данные гаптены-аналоги атропина, получили также конъюгированные антигены на основе БСА, яичного альбумина (ЯА) и гемоцианина виноградной улитки (Keyhole Limpet Немосуанин – KLH) в качестве носителей гаптенных эпитопов. При получении этих иммунохимических реагентов гаптены-аналоги атропина (ГАА-1, ГАА-2) конъюгировали с макромолекулярными носителями (эритроциты барана, пероксидаза хрена, различные белки) с помощью обычно применяемых для имеющих карбоксильную группу гаптен-аналогов химических методов (например, карбодиимидным методом):



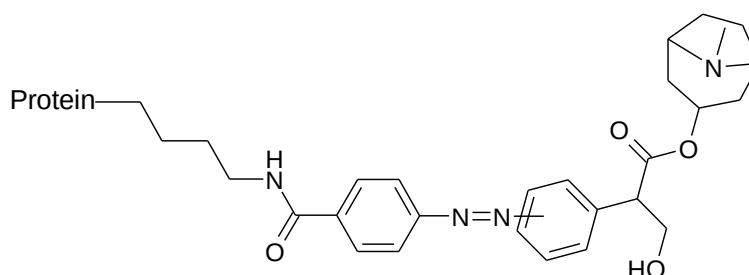
гемисукцинат атропина (ГАА-1)



конъюгат ГАА-1 с белком



4-карбоксифенилазоатропин (ГАА-2)

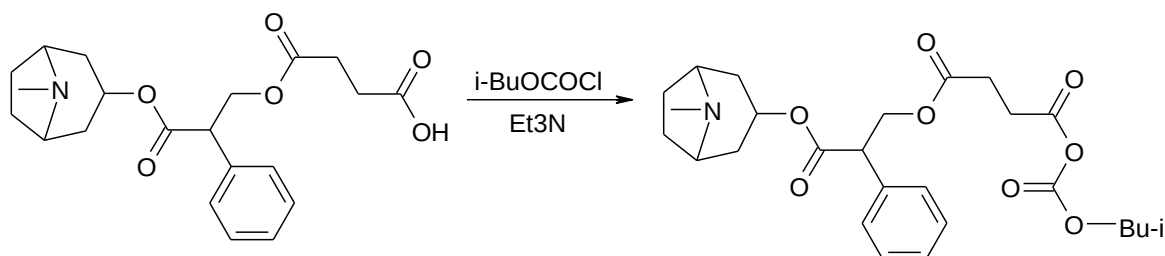


конъюгат ГАА-2 с белком

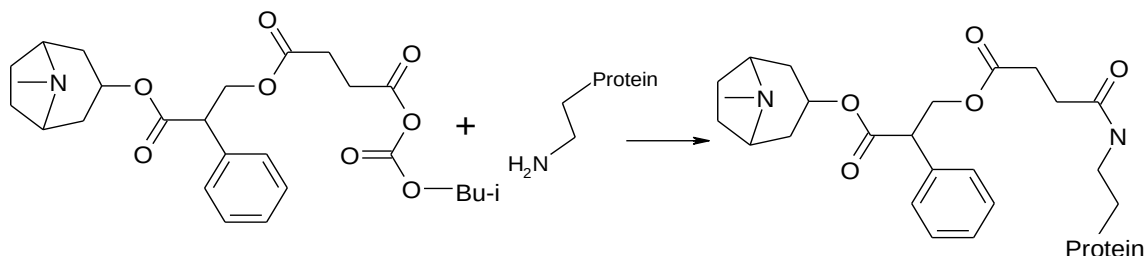
С конъюгатом «пероксидаза хрена - гемисукцинат атропина» и поликлональными кроличьими антисыворотками, полученными при многократной иммунизации конъюгатом гемисукцината атропина с БСА, был разработан метод гомогенного конкурентного иммуноферментного анализа, позволяющий надежно определять атропин в плазме

(сыворотке) крови в концентрации до 0,1 нг/мл. Для анализа было достаточно 0,1 мл биологической жидкости [34].

Ранее при выполнении исследований, проведенных на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, на примере гемисукцината атропина в качестве гаптена-аналога, установили, что наиболее эффективным среди известных методов активации карбоксильной группы при конъюгировании подобных гаптен-аналогов с белковыми носителями – карбодиимидного метода, метода активированных эфиров, метода смешанных ангидридов, метода с использованием карбонилдиимидазола или метода, реализующего возможность превращения карбоксилсодержащих соединений в соответствующие ацилазиды, является метод смешанных ангидридов:



гемисукцинат атропина



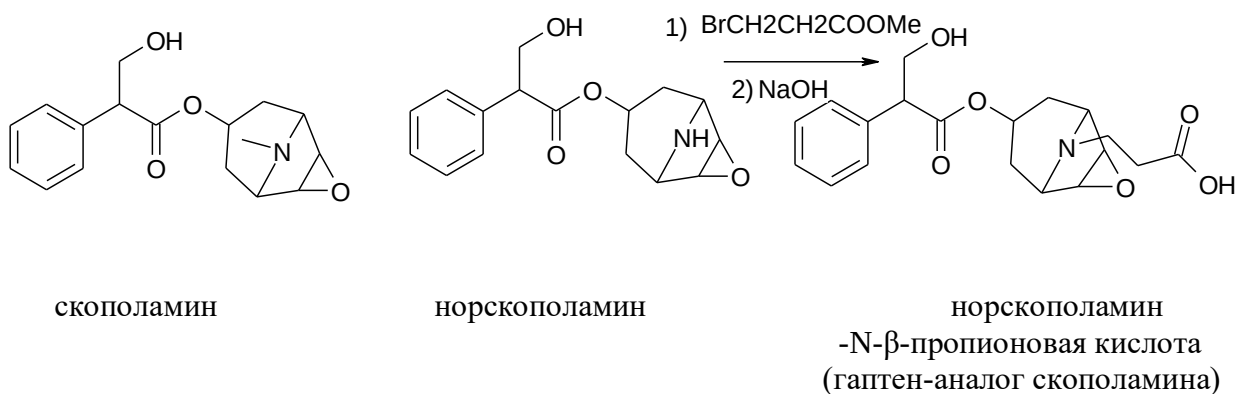
конъюгат гаптена-аналога атропина
(ГАА-1) с белком

При сравнении схем получения конъюгированных антигенов с гемисукцинатом атропина в качестве гаптена (карбодиимидный метод и метод смешанных ангидридов) видно, что наиболее удаленная от места связи с носителем часть гаптенного эпитопа и участок ковалентной связи с носителем – амидная группа идентичны для конъюгатов гемисукцината атропина с белком, полученным как карбодиимидным методом, так и методом смешанных ангидридов. Однако было показано, что метод смешанных ангидридов предпочтителен, так как в результате удастся получать белковые конъюгаты атропина (и других гемисукцинатных

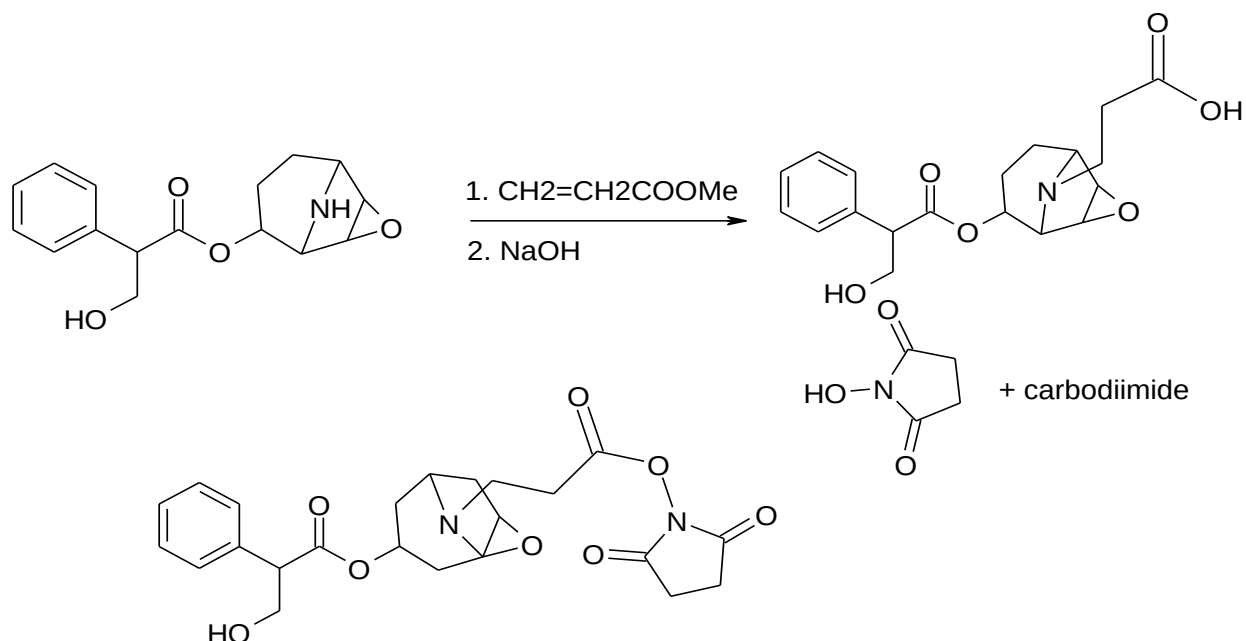
гаптенов-аналогов) с более высокой эпитопной плотностью гаптенного эпитопа на носителе [8].

С использованием кроличьих антисывороток, полученных при иммунизации животных конъюгатом 4-карбоксифенилазотропина (ГАА-2) с белком, был разработан метод RIA атропина и *l*-гиосциамина в биосредах организма [30] с чувствительностью 6,25 нг/мл. Антисыворотки обладали высокой аффинностью связывания меченного тритием атропина и были достаточно специфичны. Для проведения анализа было достаточно образца плазмы или сыворотки объемом 0,1 мл. Перекрестная специфичность с другим тропановым алкалоидом – скополамином или же холиноблокатором, имеющим схожую с атропином структуру молекулы, – гоматропином отсутствовала. Продукты гидролиза атропина – тропин и троповая кислота также перекрестно не определялись разработанным методом RIA. Метод был использован для изучения фармакокинетики атропина у собак.

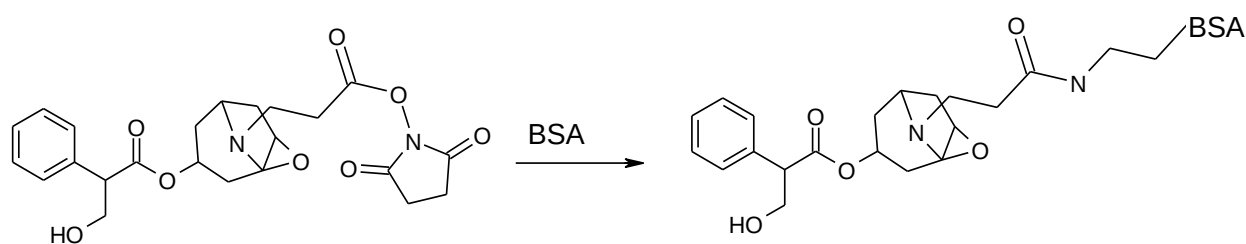
Для получения конъюгированного антигена и моноклональных антител к еще одному представителю ряда тропановых алкалоидов – скополамину гаптен-аналог этого соединения, а именно норскополамин-N-β-пропионовая кислота, может быть синтезирован путем ацилирования норскополамина метилакрилатом с последующим гидролизом соответствующего эфира до кислоты [35-37]:



Норскополамин-N-β-пропионовую кислоту затем активируют путем получения N-гидроксисукцинимидного эфира и затем конъюгируют с белком (БСА/BSA/) (например, карбодиимидным методом):



N-гидроксисукцинимидный эфир
гаптена-аналога скополамина



конъюгат гаптена-аналога
скополамина с белком

С поликлональными сыворотками, полученными от иммунизированных данным конъюгатом животных, был разработан RIA метод определения содержания тропановых алкалоидов в растительном сырье. С использованием данного метода определяли скополамин в диапазоне от 0,15 до 3,0 нг. Процент перекрестной реакции со структурно родственными тропановыми алкалоидами – *l*-гиосциамином составлял 5,2% [38]. С применением моноклональных антител, полученных с использованием конъюгированных антигенов, несущих гаптенные эпитопы вышеописанной структуры, был также разработан специфичный, селективный и чувствительный метод гомогенного конкурентного иммуноферментного анализа для количественного определения скополамина с пределом обнаружения данного алкалоида 0,1 нг/мл в растительном экстракте или 0,5 нг/мл в сыворотке. В этом иммуноферментном методе в качестве индикатора использовали нор-скополамин-N- β -пропионовую кислоту, связанную со щелочной фосфатазой. Калибровочная кривая, построенная с моноклональными антителами лучших характеристик, была линейной в

диапазоне от 10 пг до 10 нг скополамина. Процент перекрестных реакций со структурно родственными тропановыми алкалоидами – *l*-гиосциамином и атропином не превышал 0,21 % [36].

Конструирование конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами алкалоидов, вызывающих наркотическую зависимость: моделирование иммунодоминантности и специфичности гаптенных эпитопов

В мире наиболее распространена наркомания, связанная с приемом алкоголя и каннабиноидов (из каннабиноидов наиболее активен дельта-9-тетрагидроканнабинол). Каннабиноиды содержатся в индийской конопле и употребляются путем курения марихуаны и/или гашиша. Тем не менее, по комплексному критерию приносимого вреда (острая и хроническая токсичность, способность вызывать привыкание и вредоносное воздействие на социум) как наркотики наиболее опасны психоактивные соединения группы опиатов: природный опий, морфин и его производные (например, метилморфин – кодеин), героин; кокаин, LSD, некоторые синтетические психотропные вещества (амфетамин, метамфетамин, фенциклидин) и никотин [39-43].

С использованием конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных веществ, в частности с гаптенами-аналогами наркотиков, на протяжении многих лет предпринимаются попытки создания молекулярных вакцин, применяемых для вакцинации наркозависимых лиц с целями вторичной профилактики наркотической зависимости [12, 44-47]. Иммунопрофилактика наркоманий – вакцинация от наркотической зависимости расценивается как новое направление в наркологии, имеющее важное практическое значение и до сих пор не потерявшее актуальность. Применительно к решаемым в рамках этого направления задачам получение вакцин оптимальных характеристик, прежде всего, по способности конъюгированных антигенов инициировать интенсивный и максимально специфичный к целевому наркотику гуморальный иммунный ответ, является ключевой прикладной целью проводимых исследований.

Задаче количественного и специфичного определения целевых наркотиков иммунохимическими методами [4, 10, 24], несмотря на очевидную успешность и практическую востребованность данного направления научных изысканий, в настоящее время уделяется меньшее внимание. Вполне вероятно, что данное обстоятельство является следствием того, что эти методы уже стали компонентом рутины практики лабораторного анализа и активно используются в клинической медицине [1, 3, 9].

Моделирование структуры гаптен-аналогов алкалоидов мака – опиатов. Кроме морфина к алкалоидам мака и их производным относятся:

3-метилморфин – кодеин, ряд других производных морфина, включая героин; наркотин, папаверин, тебаин и другие вещества.

Морфин – основной алкалоид, который вместе с двумя десятками других алкалоидов этой группы выделен из *Мака снотворного* (*Papaver somniferum*). Морфин является болеутоляющим средством – наркотическим анальгетиком и одновременно вызывает сильную эйфорию с яркими видениями и чувством блаженства, что и лежит в основе формирования психологической зависимости от наркотика. Психоактивное действие морфина обусловлено его специфическим взаимодействием с опиоидными рецепторами центральной нервной системы, которые локализованы в нейронах головного и спинного мозга и в меньшем количестве – в кишечнике. Опиаты выступают как агонисты μ -опиатных рецепторов [76, 77]. Результатом специфического взаимодействия опиатов с рецепторами является выброс эндорфинов и катехоламинов. В итоге, прием морфина купирует болевой синдром, параллельно развиваются симптомы наркотического опьянения. При отмене поступления морфина в организм развивается синдром отмены – абстинентный синдром.

Героин (диацетилморфин) является химически модифицированным аналогом морфина, то есть полусинтетическим опиатом. При метаболизме в печени преобразуется в морфин, то есть фактически является пролекарством морфина. В сравнении с морфином, обладает большей липофильностью, поэтому легко преодолевает гематоэнцефалический барьер. В тканях мозга преобразуется в 6-моноацетилморфин (6-МAM) и морфин, оба соединения вызывают возбуждение нейронов мозга [76, 77]. Героин – один из самых опасных наркотиков. В сравнении с морфином анальгезирующий и психоактивационный эффекты у героина более выражены, но по длительности эти эффекты менее продолжительны.

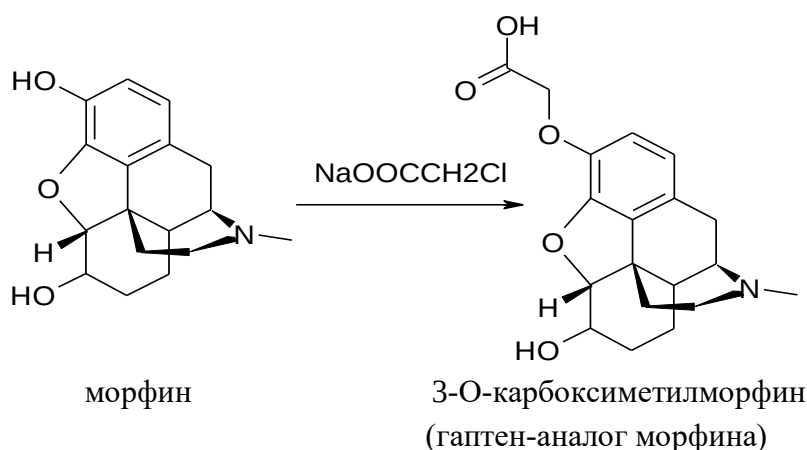
При длительном использовании большинства опиатов, а при использовании героина практически сразу, формируется физическая зависимость. Наркозависимость от героина чрезвычайно сильна. У героиновых наркоманов при невозможности добычи ими наркотика и приема очередной дозы неизбежно развитие тяжелого абстинентного синдрома. При хроническом использовании героина наблюдается большое число побочных эффектов. Героиновая наркомания негативно влияет на нервную систему и достаточно быстро разрушает психику наркозависимых лиц [76]. С каждым новым приемом наркотика наркоман увеличивает принимаемую дозу, что усугубляет ситуацию и увеличивает риск передозировки, так как разница между эффективно действующей и токсичной дозой наркотика сокращается. В большинстве случаев для формирования устойчивой наркозависимости достаточно принимать героин ежедневно на протяжении недели.

Героиновая абстиненция переносится наркоманами крайне тяжело, абстиненция сопровождается апатией и нарушениями сердечной деятельности (брадикардия, аритмии,

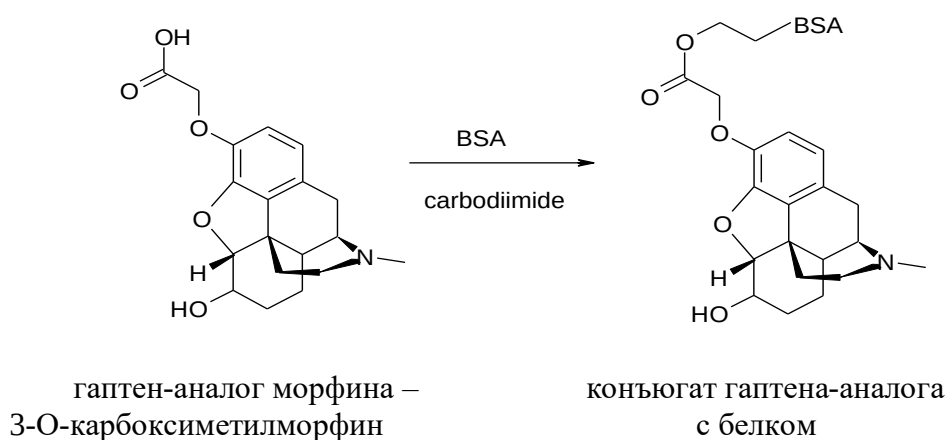
возможны инфаркты миокарда). Героиновые наркоманы, использующие наркотик внутривенно, вероятно, имеют самый высокий, в сравнении с прочими наркотическими веществами, риск преждевременной смерти (передозировка, травмы, инфекционные заболевания, сопутствующие наркотической зависимости заболевания) [39].

При получении конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами как вариантов модельных вакцин опиатов в реализации стратегии синтеза гаптенов-аналогов этих наркотических веществ можно выделить два типа использованных путей химической модификации: по фенольным гидроксильным группам в положениях 3 или 6 и по деметилированному атому азота в положении 17 [48, 49, 81].

Гаптен-аналог морфина – 3-О-гидроксиметилморфин получен реакцией основания морфина с β -хлорацетатом натрия [81]:

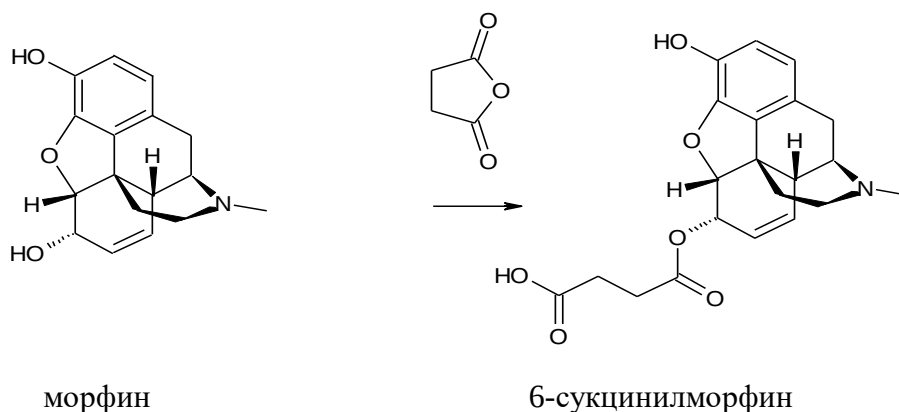


С белками, в частности с БСА (BSA), этот гаптен-аналог морфина конъюгировали карбодиимидным методом:



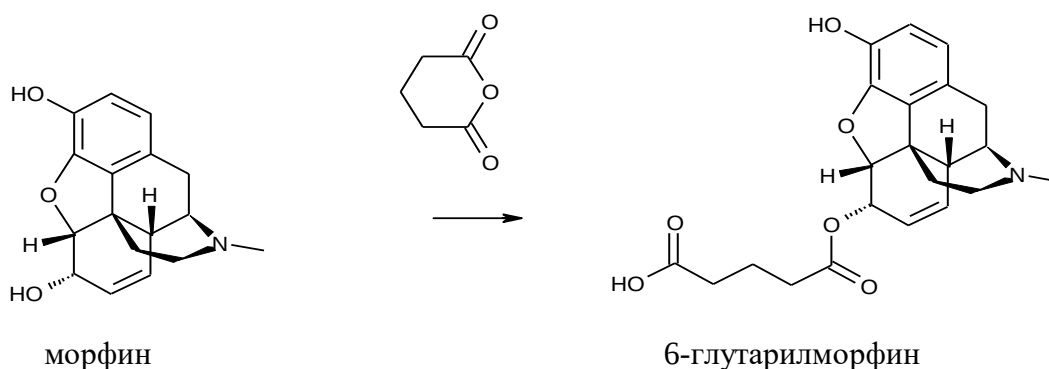
В другом исследовании, результаты которого были опубликованы E.J. Simon et al. (1972), в качестве гаптена-аналога морфина был использован

6-сукцинилморфин, полученный нагреванием основанием морфина с янтарным ангидридом в пиридине [49]:

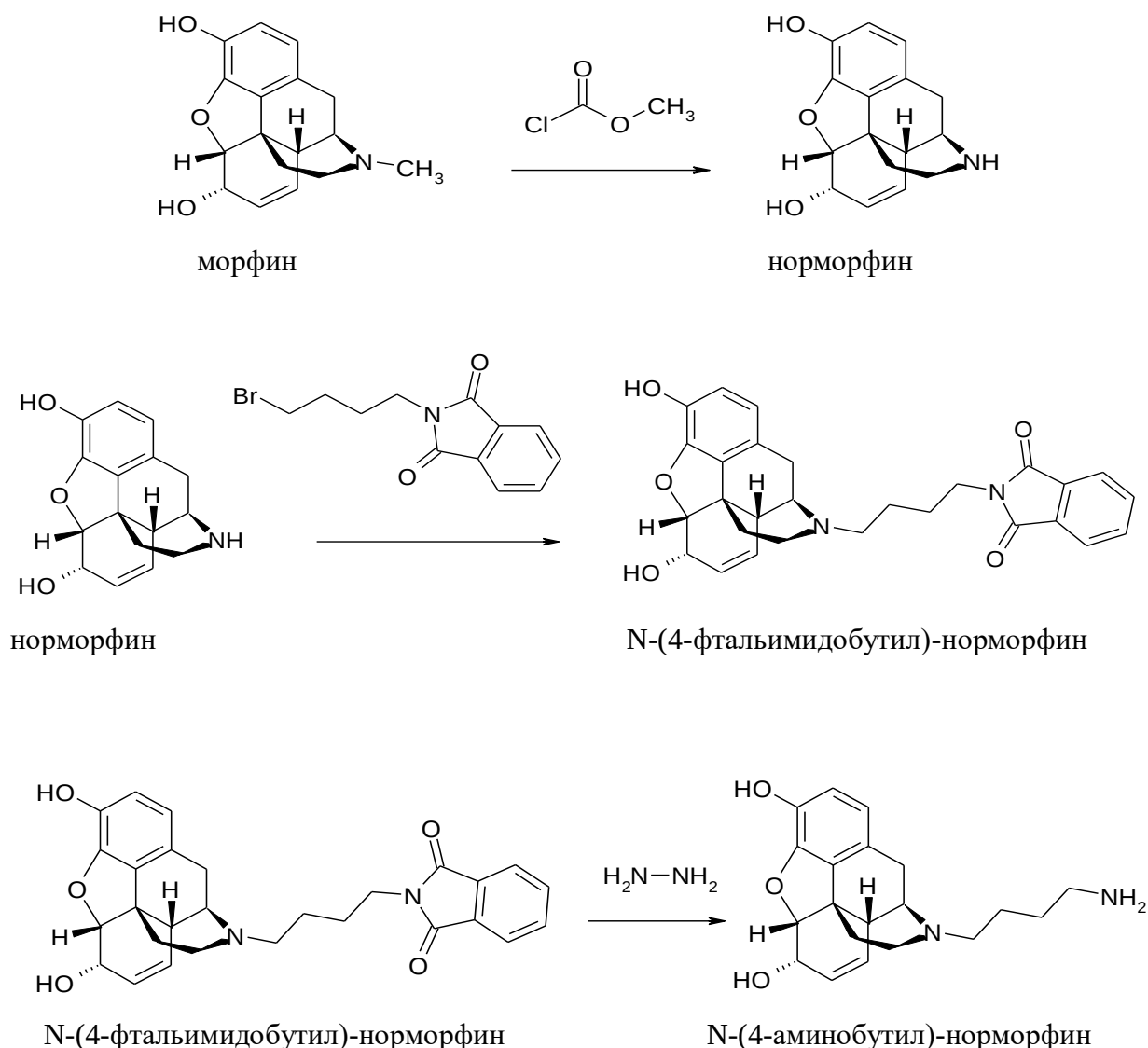


С человеческим сывороточным альбумином этот гаптен-аналог морфина был конъюгирован методом смешанных ангидридов.

В последнее время все чаще в качестве гаптен-аналогов морфина/героина используются такие химические соединения, как 6-глутарилморфин/героин [50], которые получают реакцией соответствующего опиата с глутаровым ангидридом:

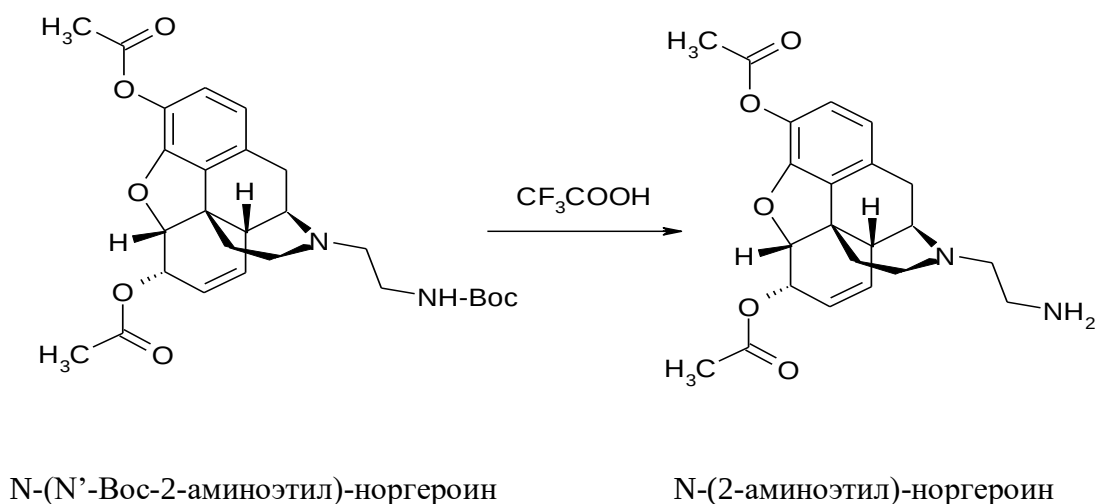
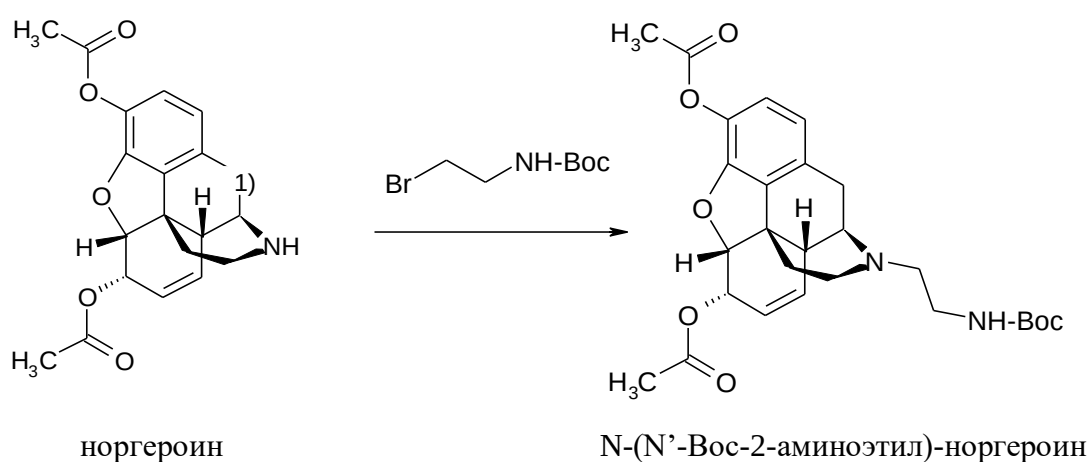
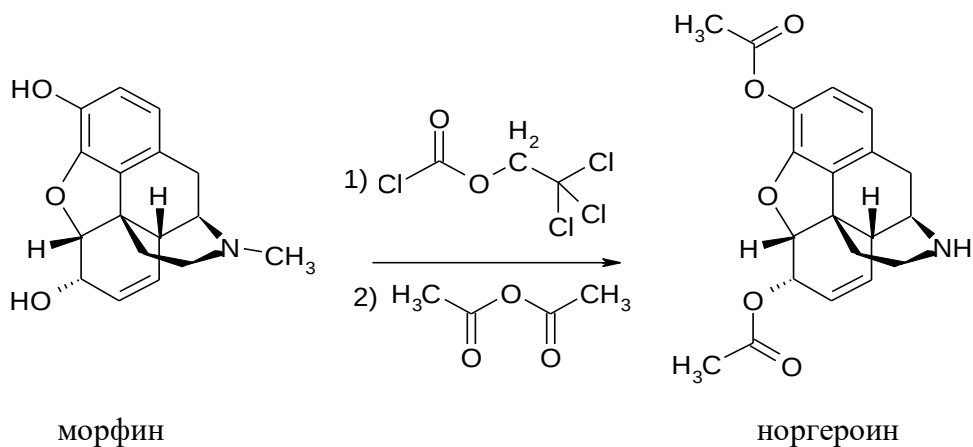


Другой способ модификации опиатов основан на синтезе соответствующих нор-производных – N-деметилованных опиатов, которые могут быть получены при взаимодействии с различными хлормуравьиными эфирами [51-53]. Синтезированные таким путем норопиаты подвергают дальнейшей химической модификации, заключающейся во введении в их молекулы первичной алифатической аминогруппы [54]:



На первой стадии морфин деметилируют под действием метил хлорформата до норморфина, который затем алкилируют N-(4-бромбутил)-фталъимидом. Фталъимидную защитную группу «снимают» гидразин гидратом, получая таким образом гаптен-аналог морфина – N-(4-аминобутил)-норморфин. Часть моноклональных антител, полученных гибридной биотехнологией с использованием конъюгированного антигена с данным гаптен-аналогом, имели высокую специфичность. Перекрестная реактивность этих моноклональных антител с кодеином и метаболитами морфина: морфин-3-глюкуронидом и морфин-6-глюкуронидом была минимальной. Разработанный метод иммуноферментного анализа с использованием этих антител позволял определять морфин в плазме (сыворотке) крови наркоманов в концентрации 100 пг/мл [54].

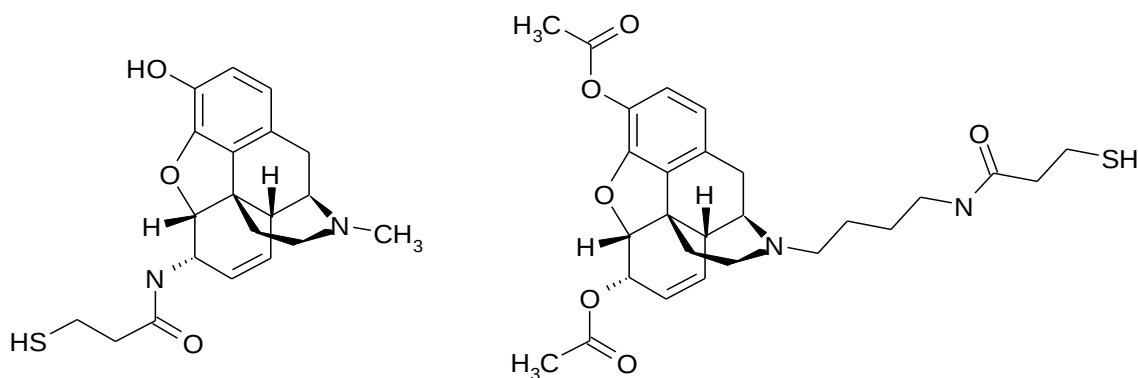
Несколько другим путем, но в рамках весьма похожей общей стратегии химических преобразований был синтезирован гаптен-аналог другого опиата –героина [55, 56]:



Сначала морфин с помощью 2,2,2-трихлорэтил хлорформата деметилируют до норморфина, который затем ацетируют уксусным ангидридом. Синтезированный таким образом норгероин алкилируют N-Бос-бромэтиламином. После удаления Бос-защиты с помощью трифторуксусной кислоты получают искомый гаптен-аналог героина – N-(2-

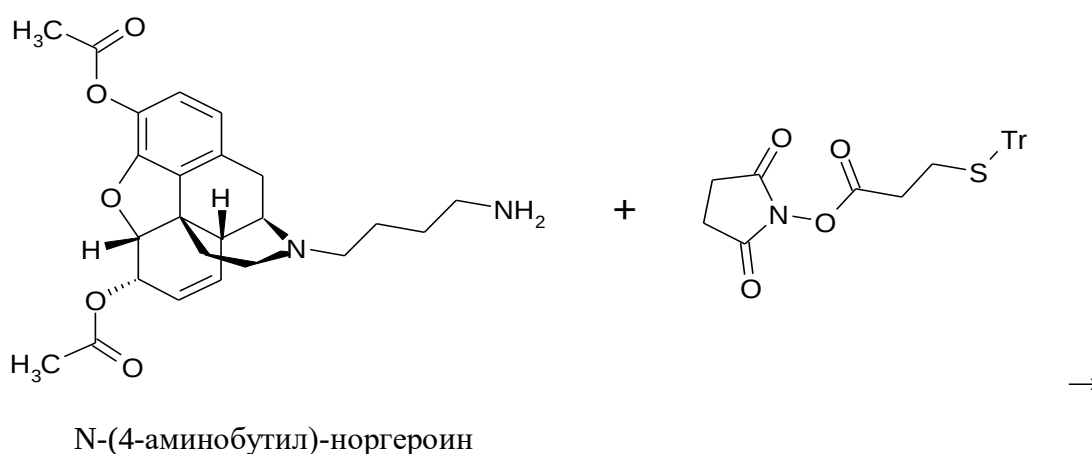
аминоэтил)-норгероин, который использовали при создании экспериментальных образцов модельных вакцин для вторичной профилактики опиатной зависимости [55].

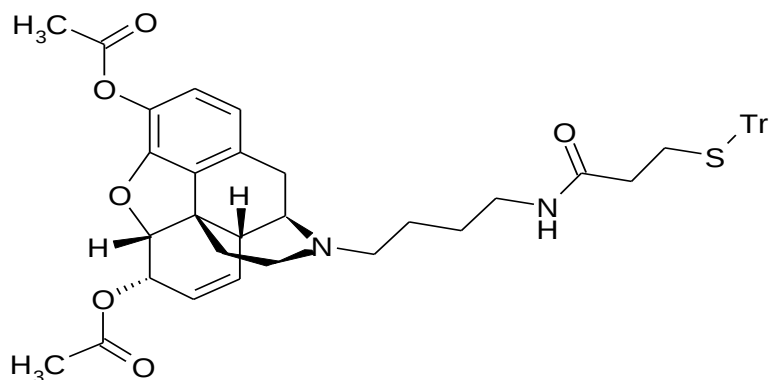
Дополнительно к описанным способам получения гаптенов-аналогов опиатов в последние годы очень часто получают гаптены, которые в качестве реакционноспособной химической группировки имеют сульфгидрильную группу. В частности, при получении конъюгатов и антител к морфину/героину были синтезированы гаптены-аналоги морфина и героина именно такой структуры [57, 58]:



содержащие сульфгидрильную группу
гаптены-аналоги морфина (слева) и героина (справа)

Синтез подобных соединений достаточно сложен. Как пример приводится схема синтеза гаптена-аналога героина [57]:

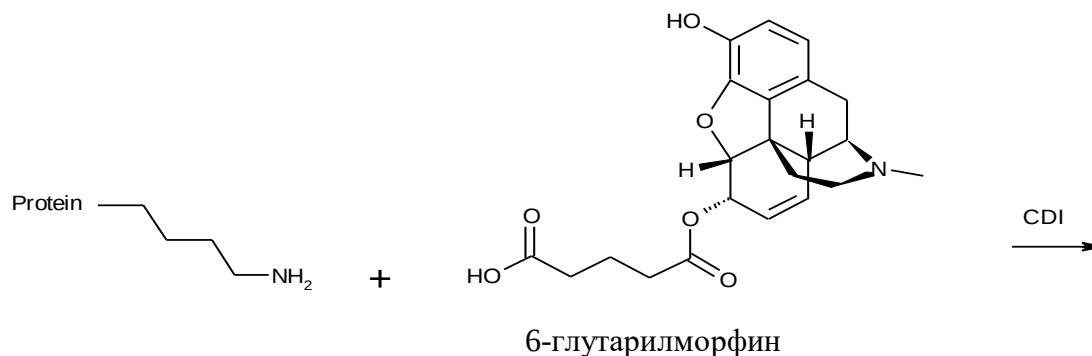


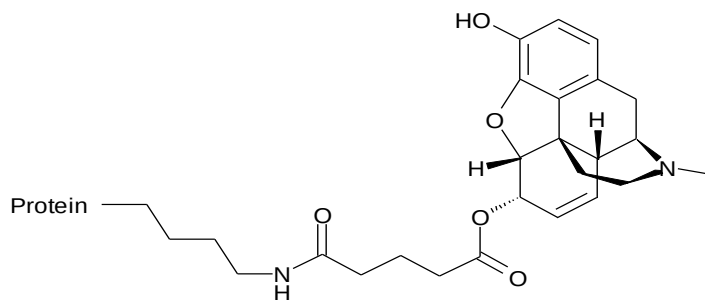


гаптен-аналог героина с сульфгидрильной группой,
которая защищена тритильной группой

В этом способе синтеза N-(4-аминобутил)-норгероин обрабатывают N-гидроксисукцинимидным эфиром меркаптопропионовой кислоты, у которой сульфгидрильная группа защищена тритильной (трифенилметильной) группой, затем при получении конъюгированного антигена эту защитную группу снимают *in situ*.

В публикации, посвященной методам конструирования конъюгированных антигенов и увеличения их иммуногенности в отношении гаптенных эпитопов, нами было отмечено [6], что возможность ковалентного связывания с макромолекулярными носителями гаптен-аналогов психоактивных веществ, а также гаптен-аналогов других лекарственных и токсичных соединений с использованием той или иной конкретной химической технологии конъюгирования определяется наличием у гаптена-аналога реакционноспособной (функциональной) группы, вовлекаемой в образование ковалентной связи. Так, например, в исследовании [50] содержащий карбоксильную группу 6-глутарилморфин в качестве гаптена-аналога морфина конъюгировали с БСА (BSA) или KLH карбодиимидным методом:





конъюгат 6-глутарилморфина с белком

Этот вариант получения конъюгированных антигенов различных биоактивных соединений, включая лекарственные, наркотические и токсичные вещества, с использованием в качестве гаптен-аналогов гемиглутаратов (или гемисукцинатов) данных веществ и карбодиимидного метода химического конъюгирования подобных гаптен-аналогов с белками является достаточно универсальным и поэтому довольно широко используется при получении различных конъюгированных антигенов.

Полученные конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами опиатов далее применяли, руководствуясь двумя различными целями. Так, конъюгированные антигены использовали для получения специфических поликлональных и моноклональных антител с задачей их последующего применения как реагентов в иммунохимических методах количественного определения в биосредах опиатов: в реакции торможения непрямой гемагглютинации с несущими гаптен-аналог эритроцитарными диагностикумами, в РИА, в гомогенном конкурентном иммуноферментном анализе, в твердофазном конкурентном иммуноферментном анализе (ELISA) и в других иммунохимических методах [4, 10, 59-65].

На протяжении последних двадцати лет ещё одним направлением использования конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами опиатов были многочисленные исследования по созданию модельных образцов вакцин с целью их использования для вторичной профилактики наркотической зависимости путем активной иммунизации (вакцинации) наркозависимых лиц [7, 12, 45, 46, 48, 50, 57, 58, 66]. В этих исследованиях, помимо использования более иммуногенных носителей гаптенных эпитопов (например, столбнячных и дифтерийных анатоксинов) при конструировании конъюгированных антигенов, детально проработаны вопросы использования более адекватных задачам этих исследований химических производных опиатных наркотиков в качестве гаптен-аналогов, которые, будучи гаптенными эпитопами конъюгированных антигенов, могли бы быть доминантными детерминантами их иммунохимической специфичности [90].

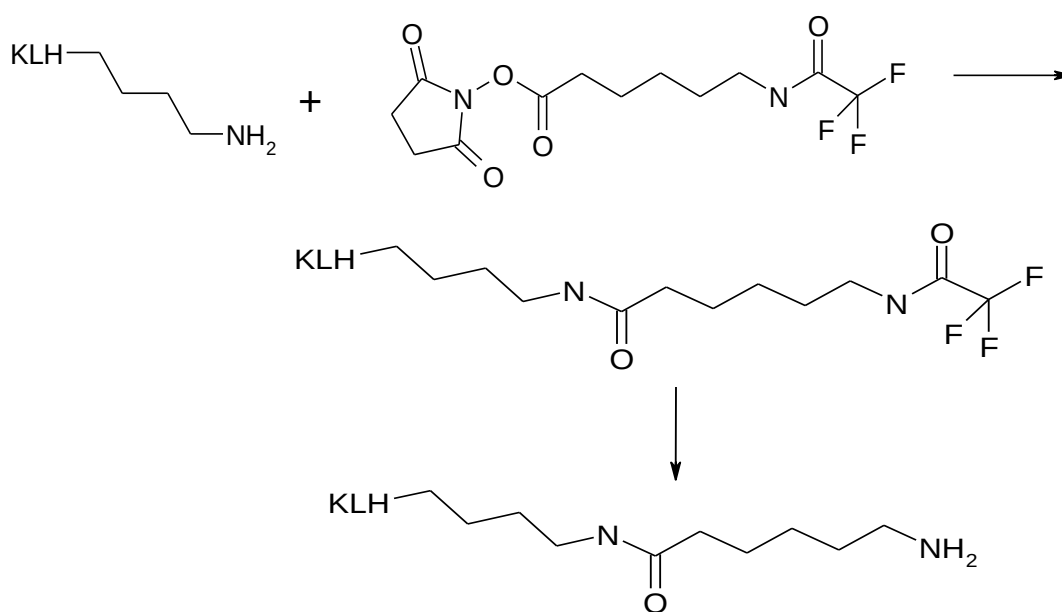
Моделирование структуры гаптен-аналогов опиатов: увеличение иммунодоминантности гаптенного эпитопа в конъюгированных антигенах за счёт

введения спейсерного фрагмента. Все чаще при получении конъюгированных антигенов для оптимизации структуры эпитопа гаптена-аналога в составе антигена используют дополнительные «вставки» (в англоязычной литературе они называются «*spеicer*» или «*linker*») между гаптен-аналогом и макромолекулярным носителем, причем активно ведется дискуссия об оптимальной длине такой вставки и её строении [67, 68]. При конъюгировании гаптен-аналогов с носителями с использованием химических методов, позволяющих формировать спейсерный участок (например, посредством использования при конъюгации коммерчески доступных бифункциональных реагентов [69-72]), таким путем увеличивается дистанция между гаптенным эпитопом и структурами макромолекулярного носителя. При этом возрастает подвижность гаптенного эпитопа по отношению к антигенным эпитопам носителя. В итоге, улучшаются условия распознавания гаптена-аналога антигенраспознающими структурами иммунокомпетентных клеток, что имеет следствием большую иммунодоминантность гаптенного эпитопа в общем спектре иммунохимической специфичности конъюгированного антигена. Увеличивается также специфичность к целевому биологически активному соединению (лекарственному средству, токсичному ксенобиотику) антител, выработка которых инициируется в процессе иммунного ответа при активной иммунизации конъюгированным антигеном подобной структуры.

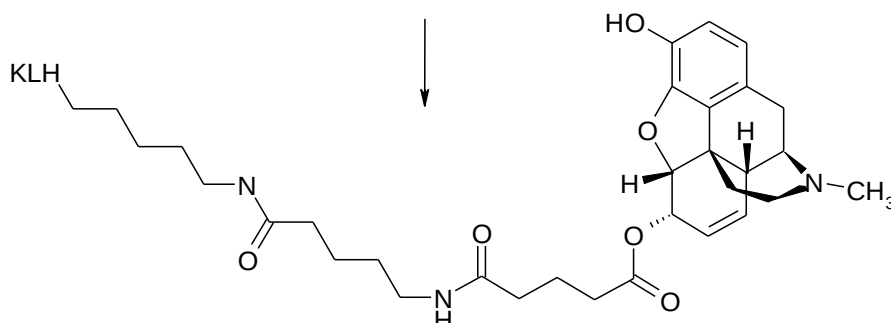
Как правило, спейсер представляет собой неполярную углеродную цепь, которая по возможности не должна содержать других структур, вносящих вклад в иммунохимическую специфичность (например, ароматических или же гетероциклов, а также атомов галогенов). Уже отмечалось, что получение глутаратных или же сукцинатных химических производных целевых соединений при синтезе их гаптен-аналогов автоматически приводит к появлению в структуре конъюгированного антигена короткого (длиной 4-5 атомов углерода) спейсерного участка между гаптенным эпитопом и макромолекулярным носителем. Однако этого может оказаться недостаточно для обеспечения адекватной удаленности гаптенного эпитопа от носителя, а, соответственно, и возрастания иммунодоминантности гаптена-аналога в составе конъюгированного антигена. Идеально увеличивать длину спейсера до 8 и более метиленовых звеньев. Увеличения длины спейсерного участка добиваются, например, использованием ϵ -аминокапроновой кислоты (6-амино-*n*-гексановой кислоты), аминогруппа которой присоединяется к гаптenu, а карбоксильная к белку [73]. Известны и другие способы создания адекватного спейсерного фрагмента между гаптенным эпитопом и макромолекулярным носителем.

В качестве примера использования этого пути оптимизации структуры конъюгированного антигена с достижением иммунодоминантности гаптенного эпитопа далее приводится исследование [50], в котором с целью создания более эффективных образцов

экспериментальных вакцин опиатов гаптен-аналог морфина – 6-глутарилморфин конъюгировали с KLH через фрагмент ϵ -аминокапроновой кислоты. Для этого белок-носитель обрабатывают специальным реагентом – N'-гидроксисукцинимидным эфиром N-трифторацетиламинокапроновой кислоты с последующим снятием трифторацетильной защиты. После чего со свободной аминогруппой связанного таким образом с белком спейсера конъюгируют гаптен-аналог морфина карбодиимидным методом. В итоге, синтезированный гаптен-аналог морфина в составе конъюгированного антигена оказывается расположенным на своеобразной молекулярной «ножке» – спейсере оптимальной длины:



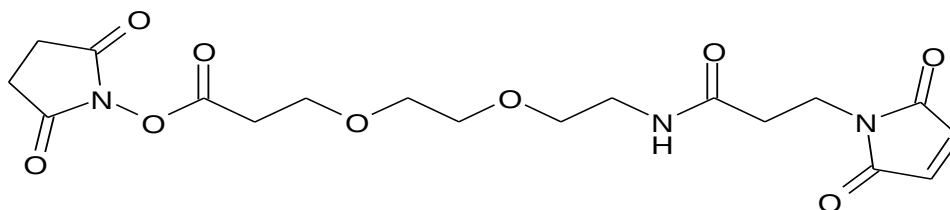
KLH с о спейсерным участком
6-глутарилморфин



конъюгат с белком гаптена-аналога морфина через встроенный спейсер

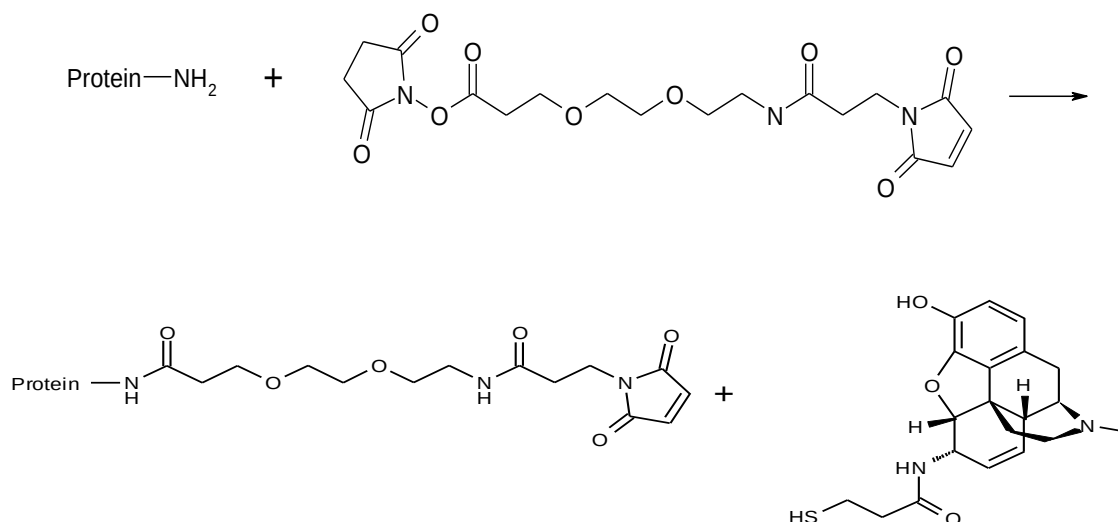
Известно, что сульфгидрильные (тиольные) группы различных гаптенов очень легко и в мягких условиях присоединяются к малеимидной группе других химических соединений.

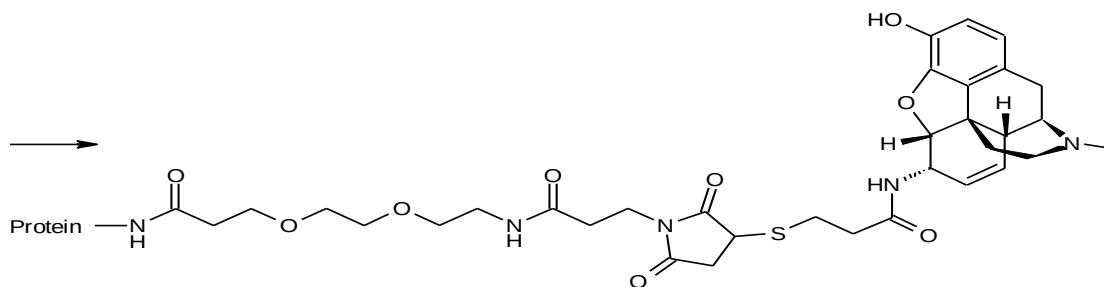
Именно поэтому были созданы и стали коммерчески доступны специальные гетеробифункциональные реагенты, использующиеся для формирования молекулярных «спейсеров». В качестве примера можно привести структуру такого реагента, использованного с целью оптимизации уже упомянутых выше гаптенов-аналогов морфина/героина с реакционноспособной сульфгидрильной (тиольной) группой при их конъюгировании с белковыми носителями:



структура молекулы гетеробифункционального реагента

Гетеробифункциональный реагент представляет собой гидрофильную цепочку, по концам которой находятся две различные реакционноспособные группы – N-гидроксисукцинимидная, за счет которой реагент присоединяется к белку-носителю по его свободным первичным аминогруппам, и малеимидная, к которой легко может быть присоединен гаптен-аналог морфина/героина, содержащий сульфгидрильную (тиольную) группу [55]:





конъюгат гаптена-аналога морфина/героина с белком, имеющий спейсерный фрагмент («ножку») между гаптенным эпитопом и белковым носителем

Следует отметить, что в последнее время «тиолированные» гаптены-аналоги и малеимид-конъюгированные белки в качестве их носителей все более часто используются при создании вакцин к наркотическим веществам [57, 67, 74]. Наличие спейсерного фрагмента создает оптимальные условия доступности вводимого в конъюгированный антиген гаптенного эпитопа для антигенраспознающих структур иммуноцитов, что увеличивает иммунодоминантность гаптенных эпитопов и создает возможность более интенсивного и специфичного антителообразования к гаптену-аналогу при вакцинации, а, соответственно и способность специфических антител изменять фармакокинетику и фармакодинамику целевых лигандов. Этот подход считается одним из самых перспективных вариантов оптимизации экспериментальных образцов вакцин наркотиков. Так, в исследовании [90] приведены результаты разработки экспериментальной бивалентной вакцины против морфина/героина нового структурного состава, в частности с химически модифицированным столбнячным анатоксином в качестве макромолекулярного носителя гаптенных эпитопов, одновременно имеющего так называемые РАР-сайты, и гаптенные эпитопы структурного производного морфина, располагающиеся на молекулярном спейсере нового состава. В экспериментах на животных данная вакцина продемонстрировала высокую иммуногенность. Иницированный при вакцинации гуморальный иммунный ответ на гаптенные эпитопы имел высокие титры специфических антител, которые обладали эквивалентной специфичностью как к морфину, так и к героину, но перекрестно не реагировали со структурно несходными опиоидами. Спейсерный фрагмент между гаптенным эпитопом – 6-сукциниморфином и остовом макромолекулярного носителя в этой вакцине был сформирован алифатической цепью атомов углерода, содержащей две конформационно жесткие амидные связи [90].

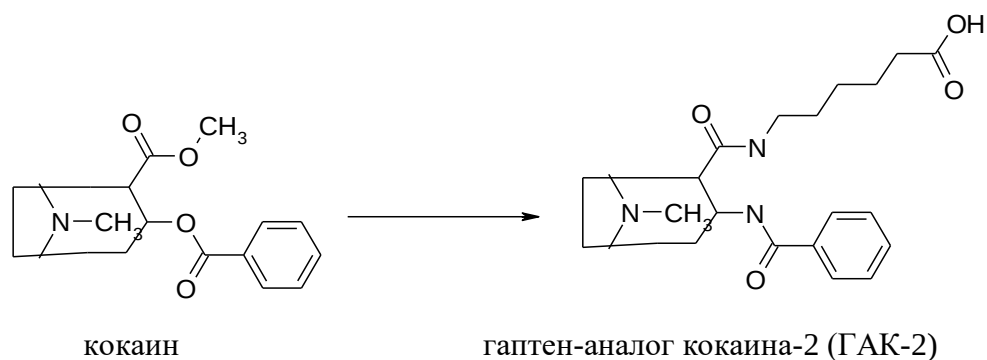
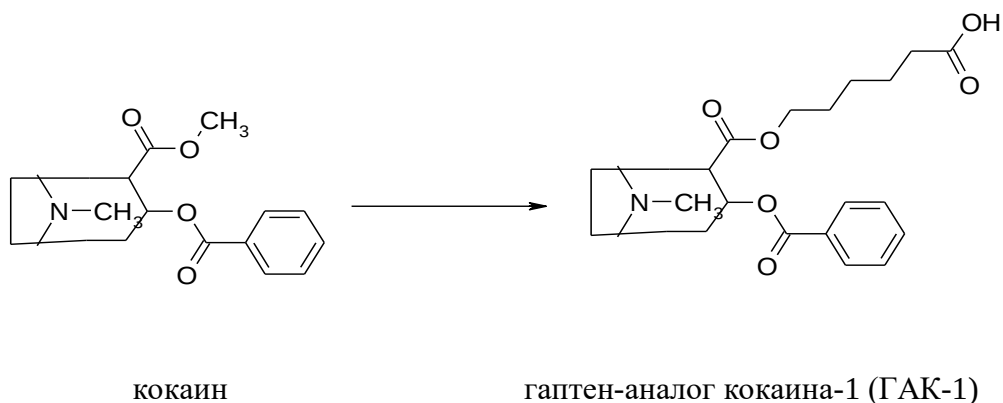
Моделирование структуры гаптен-аналогов тропановых алкалоидов группы кокаина. Кокаин в структуре молекулы (также как атропин, гиосциамин, скопаламин) имеет бициклическую группу тропана, следовательно, является тропановым алкалоидом. К

алкалоидам группы кокаина помимо кокаина относятся и другие тропановые алкалоиды коки, в молекулах которых имеется ядро эгонины (циннамилкокаин, α - и β -труксиллин, бензоилэгонин, другие алкалоиды). Перечисленными алкалоидами, включая кокаин, богаты листья *Кокаинового куста* (*Erythroxylon coca*). Из данного растительного сырья и добывают кокаин. Кокаин получают также полусинтетическим путем и путем химического синтеза.

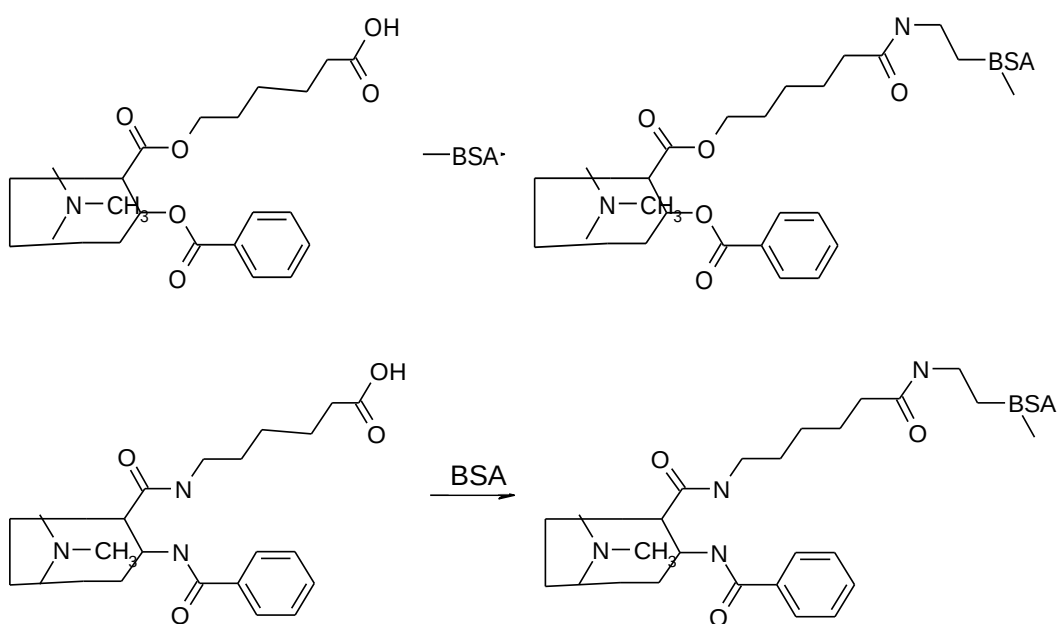
Кокаин обладает выраженной обезболивающей активностью, парализует парасимпатическую нервную систему и оказывает мощный стимулирующий эффект на центральную нервную систему человека, вызывая чувство эйфории и ощущение безграничных возможностей. В настоящее время кокаин является вторым по значимости после опиатов «проблемным наркотиком» [40, 41, 43]. По данным ООН в 2018 году во всем мире насчитывалось 23 миллиона потребителей кокаина [93]. Очевидно, что зависимость от употребления кокаина является серьезной социально-экономической проблемой. При длительном употреблении кокаина состояние здоровья наркозависимых лиц резко ухудшается, появляются и прогрессируют такие клинические эффекты психологической и физической зависимости от наркотика, как нарушения сна, выраженные когнитивные расстройства (утрата памяти, нарушения способности к обучению, расстройства внимания), физическая утомляемость, потеря массы тела, нарушения сердечного ритма, депрессия, суицидальное поведение, навязчивые и бредовые идеи, болезненные галлюцинации. При прогрессировании физической зависимости от кокаина развиваются заболевания внутренних органов: ишемическая болезнь сердца и другие сердечно-сосудистые заболевания, заболевания органов дыхания, возможны церебральные инсульты и инфаркт миокарда. У кокаиновых наркоманов значительно повышен риск преждевременной смерти от передозировки наркотика, в результате травмы, инфекционных заболеваний и заболеваний, сопутствующих наркотической зависимости [75-77].

Самой опасной для здоровья формой распространяемого наркоторговцами кокаина является «Спидбол» – смесь крэка и героина. Особая опасность этой смеси обусловлена феноменом перекрёстного воздействия на организм опиата героина и психостимулятора кокаина. У наркозависимых лиц, использующих «Спидбол», сочетание этих двух наркотиков может вызывать жизнеугрожающие осложнения в функционировании сердечно-сосудистой системы. При длительном употреблении весьма вероятно формирование перекрёстной физической зависимости с тяжелым абстинентным синдромом [77].

При синтезе конъюгированных антигенов, которые далее использовались в качестве модельных экспериментальных вакцин этого наркотика и для получения антител со специфичностью к кокаину, в качестве гаптен-аналогов применяли химические соединения следующей структуры:



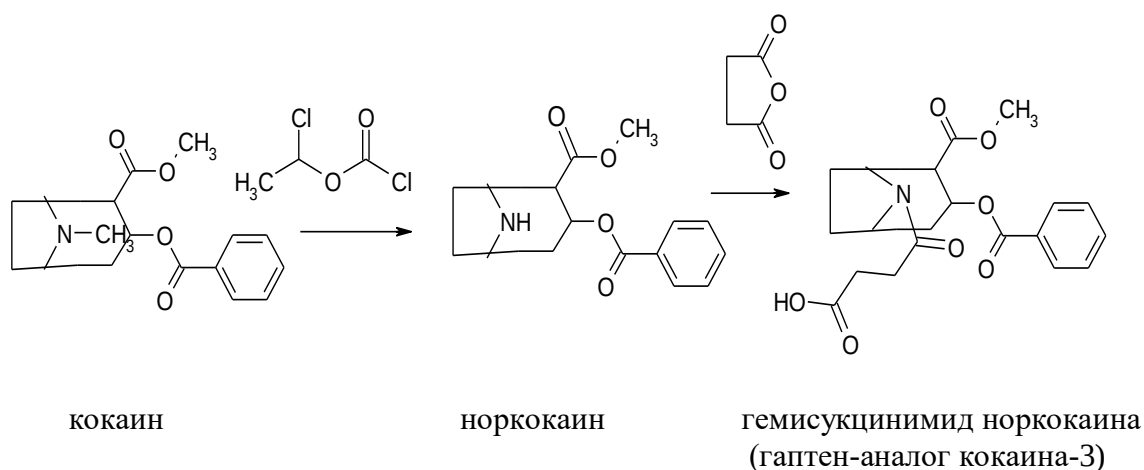
Синтез представленных гаптенов-аналогов кокаина был осуществлен разными группами исследователей [78-80], проводился в несколько стадий и оказался технически достаточно сложным. Оба гаптена-аналога (ГАК-1 и ГАК-2) имеют реакционноспособную карбоксильную группу и могут конъюгироваться с белками (например, БСА /BSA/) карбодиимидным методом или же методом смешанных ангидридов:



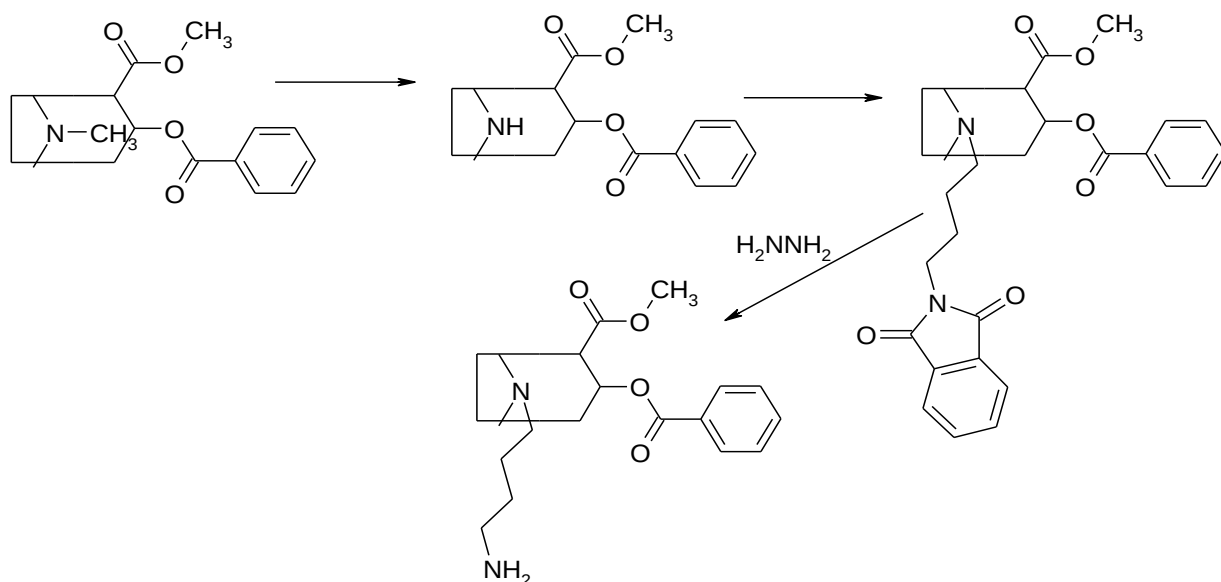
гаптены-аналоги кокаина-1,2

конъюгаты гаптенов-аналогов кокаина с белком (BSA)

Известны также различные способы получения гаптенов-аналогов кокаина с модификацией исходного соединения через третичный азот тропанового фрагмента, что подразумевает на первом этапе синтеза деметилирование кокаина с получением норкокаина [82]. Так, кокаин можно деметилировать с помощью 1-хлорэтилхлорформатата, а затем ацилировать янтарным ангидридом с получением гемисукцинимид норкокаина (гаптен-аналог кокаина-3 /ГАК-3/):

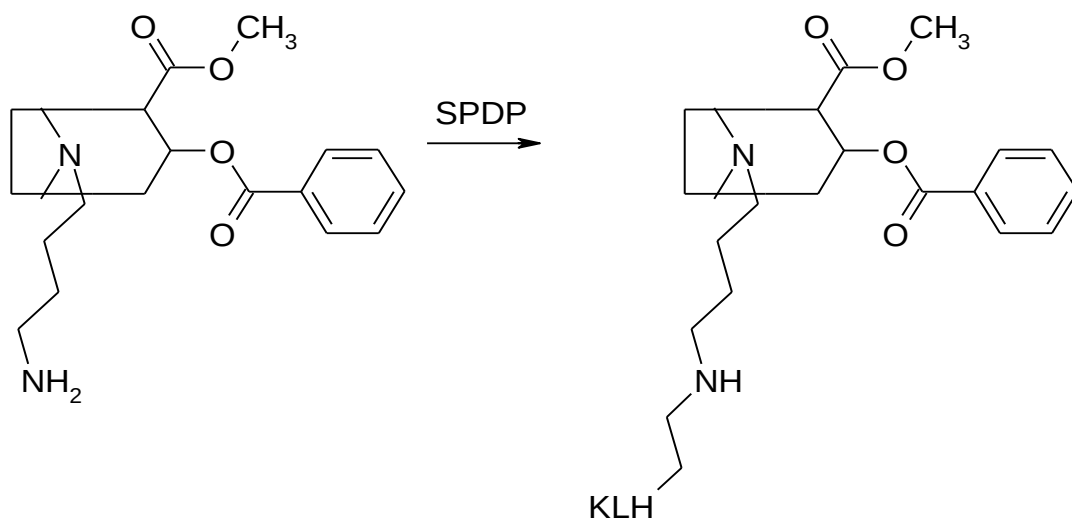


Описан также способ синтеза гаптена-аналога кокаина путем деметилирования исходного кокаина с последующей обработкой норкокаина N-(4-бромбутил)фталымидом, затем полученное химическое производное подвергают гидразинолизу и получают N-(4-аминобутил)-норкокаин (гаптен-аналог кокаина-4 /ГАК-4/):



N-(4-аминобутил)-норкокаин
(гаптен-аналог кокаина-4)

В этом гаптене-аналоге кокаина имеется реакционноспособная аминогруппа, введенная через азот тропинового фрагмента кокаина и расположенная на низкомолекулярном спейсерном фрагменте. При получении конъюгированного антигена этот гаптен-аналог конъюгируют с белковым носителем (например, с KLH), используя бифункциональный перекрестно связывающий реагент – о-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-1-пропионат (SPDP):



гаптен-аналог кокаина-4

конъюгат гаптена-аналога кокаина-4
с белком (KLH)

Синтезированы и другие гаптены-аналоги кокаина с модификацией исходного кокаина по третичному азоту тропанового фрагмента: гексилноркокаин (HNC),

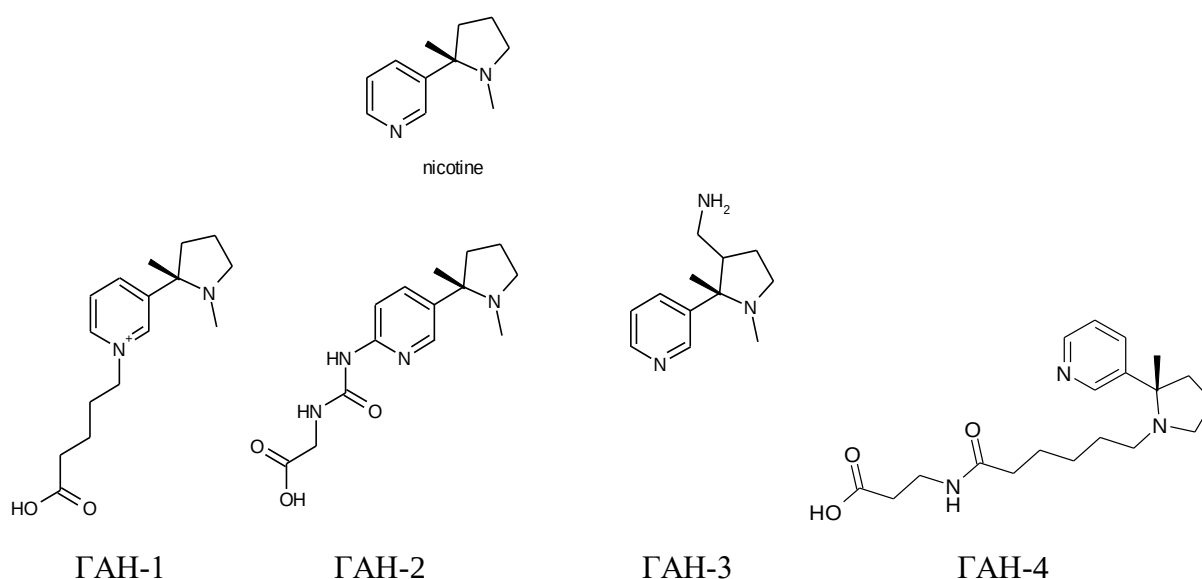
бромацетамидобутилноркокаин (BNC), сукцинилноркокаин (SNC) и сукцинилбутилноркокаин (SBNC), которые выступают как гаптенные эпитопы соответствующих экспериментальных образцов модельных вакцин (в том числе использованных в клинических исследованиях при активной иммунизации наркоманов-добровольцев) как иммунологических средств вторичной профилактики наркотической зависимости [12, 83, 94].

Моделирование структуры гаптен-аналогов алкалоида табака –никотина.

Никотин является алкалоидом табака (*Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*). Для нужд фармации алкалоид выделяют из растительного сырья для получения никотиновой кислоты путем окисления никотина с последующим синтезом на её основе различных лекарственных препаратов. Растительное сырьё используется также в табачной промышленности (производство курительных табаков, сигар, папирос, сигарет). Ограничено никотин используется в ветеринарии как инсектицид.

Известно большое количество исследований, в которых получали антитела к никотину, используя конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами этого соединения. Проводятся исследования по созданию модельных вакцин никотина с целями вторичной профилактики зависимости от никотина путем активной иммунизации (вакцинации) курящих [12, 66, 84-86, 91].

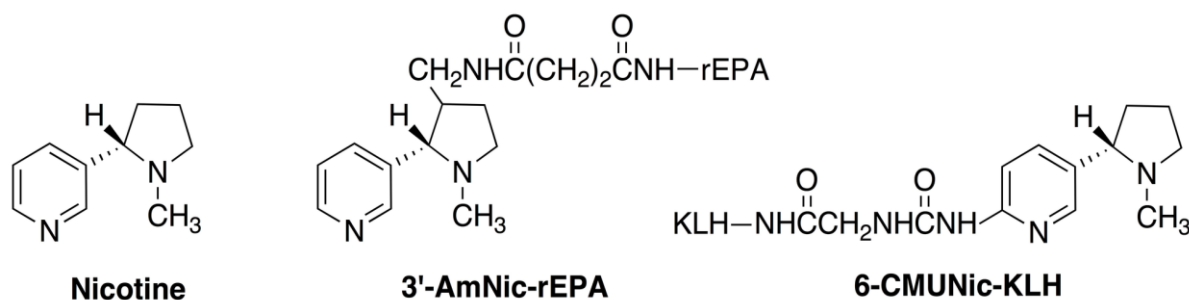
Молекула никотина не имеет реакционноспособной химической группы, поэтому были синтезированы химические производные кокаина с реакционноспособными группировками для последующего применения в качестве гаптен-аналогов никотина при получении конъюгированных антигенов:



Видно, что синтезированные гаптены-аналоги никотина [87-89] различаются молекулярной структурой и имеют реакционноспособные химические группы: либо карбоксильную группу, введенную в различные участки молекулы никотина на коротком спейсерном фрагменте (гаптены аналоги – ГАН-1, ГАН-2, ГАН-4), либо алифатическую аминогруппу (гаптен-аналог – ГАН-3).

При получении конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами никотина, структура которых приведена выше, использовали ориентированные на эти функциональные группы методы химического конъюгирования. Следует заметить, что, выбирая методы химического конъюгирования, обычно используют те методы, для которых характерна определенная универсальность, и этот выбор определяется наличием в составе гаптена-аналога конкретной функциональной группы. В этом контексте гаптены-аналоги никотина не являются исключением. Для гаптен-аналогов никотина с введенной карбоксильной группой универсальными методами химического конъюгирования с макромолекулярными носителями, в частности с белками, могут выступать карбодиимидный метод, метод активированных эфиров и метод смешанных ангидридов [8].

В связи с развертыванием работ по созданию модельных вакцин наркотических веществ для их использования при активной иммунизации наркозависимых лиц на протяжении первого десятилетия XXI века исследования по созданию конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами никотина были резко интенсифицированы. При выполнении этих исследований были получены конъюгаты гаптен-аналогов никотина с носителями, являющимися продуктами инактивированных инфекционных возбудителей или же высокомолекулярными белками: 3'-аминометилникотин (гаптен-аналог никотина – ГАН-3), конъюгированный с рекомбинантным экзопротеином А синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) (конъюгат 3'-AmNic-rEPA) или же с дифтерийным анатоксином (конъюгат 3'-AmNic-DT); 6-карбоксиметилуреидоникотин (гаптен-аналог никотина – ГАН-2), конъюгированный с KLH (конъюгат 6-CMUNic-KLH):



С образцами этих модельных вакцин были проведены не только экспериментальные исследования на животных, но и клинические испытания

с включением здоровых добровольцев (I, II и отчасти III фаза) с оценкой эффективности активной иммунизации для предотвращения тяги к курению [12, 84, 85, 88, 89, 91, 92].

Конструирование конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных и нейротоксичных алкалоидов: алгоритмы оптимизации (унификации) способов получения гаптенов-аналогов и конъюгированных антигенов требуемых биологических характеристик

В способах синтеза гаптенов-аналогов психоактивных и нейротоксичных алкалоидов, а также подходах получения конъюгированных антигенов с этими гаптенными эпитопами необходимых биологических характеристик, несмотря на кажущееся разнообразия конкретных химических технологий синтеза гаптенов-аналогов и методов их конъюгирования с макромолекулярными носителями, в действительности реализован сравнительно узкий перечень предъявляемых с этим способам и подходам требований. Обычно необходимо определить в целевом соединении реакционноспособную (функциональную) химическую группировку через которую возможно конъюгирование, а если такая группировка отсутствует, то подобрать способ её введения с получением соответствующего гаптена-аналога. Такими реакционноспособными химическими группировками для конъюгирования с носителями являются: карбокси-, amino-, гидроксид-, тио- и некоторые другие функциональные группы (смотри разделы статьи, посвященные получению гаптенов-аналогов колхицина, опиатов, кокаина, никотина). Не менее важен подбор максимально иммуногенного носителя и подходящего метода химического конъюгирования, который позволяет в мягких условиях обеспечивать ковалентное и эффективное связывание гаптена-аналога с выбранным макромолекулярным носителем.

Как свидетельствуют представленные и обобщенные научные данные, наиболее часто используемыми для последующего конъюгирования с макромолекулярными носителями являются amino- и карбоксильные функциональные группы гаптенов-аналогов. Для проведения реакций конъюгирования гаптенов-аналогов алкалоидов с аминогруппой к белковым носителям широко применяются: реакция азосочетания, а также способы с использованием глутарового альдегида и водорастворимых карбодиимидов. Способы введения в состав гаптена-аналога карбоксильной группы широко представлены в химических технологиях получения гаптенов-аналогов алкалоидов [5-8, 27, 28, 31, 33, 34, 36-38, 78-80, 82].

Одним из распространенных и достаточно универсальных алгоритмов химической модификации целевых алкалоидов с введением в их состав карбоксильной группы, несомненно, является получение гемисукцинатных производных и их последующее использование в качестве гаптенов-аналогов при синтезе конъюгированных антигенов. В частности, в соответствующих разделах статьи описано получение гаптенов-аналогов

алкалоидов различной структуры путем синтеза их гемисукцинатных производных: алкалоидов колхицина и галантамина, морфинановых алкалоидов – опиатов и тропановых алкалоидов – атропина, гиосциамина, кокаина и последующее конъюгирование синтезированных гемисукцинатных производных с аминокетонами белков. Синтез имеющих карбоксильную группу гемисукцинатов целевых биоактивных соединений с последующим их химическим конъюгированием с белковыми носителями по аминокетонам последних карбодиимидным методом или методом смешанных ангидридов может рассматриваться как универсальный алгоритм стратегии получения конъюгированных антигенов психоактивных и нейротоксичных алкалоидов. Из названных методов, вероятно, наиболее предпочтителен метод смешанных ангидридов, так как данный метод позволяет получать конъюгаты с большей эпитопной плотностью, а, следовательно, с более высокой доминантностью гаптенного эпитопа в спектре иммунохимической специфичности соответствующего конъюгированного антигена.

Можно также констатировать, что способы введения карбоксильной группы в молекулу синтезируемого гаптена-аналога достаточно разнообразны и просты, а методы их последующего химического конъюгирования с аминокетонами белков реализуются в мягких условиях и эффективны, что проиллюстрировано представленными выше многочисленными литературными и собственными данными. Также необходимо отметить, что гемисукцинатные производные целевых соединений являются теми гаптенами-аналогами исходных соединений, при конъюгировании которых с носителями обеспечивается создание низкомолекулярного спейсерного фрагмента между гаптен-аналогом и носителем, что способствует увеличению иммунодоминантности гаптенного эпитопа. Реализовано также получение гемисукцинатных производных с вовлечением в химическую модификацию различных частей молекулы целевого соединения, что позволяет при последующей иммунизации конъюгированными антигенами с разными по строению гаптенами-аналогами получать антитела различной специфичности.

Заключение

Представленные литературные и собственные научные данные позволяют заключить, что в настоящее время общая стратегия и подходы создания конъюгированных антигенов достаточно хорошо проработаны, а наличие конкретных технологий (алгоритмов) синтеза гаптен-аналогов, которые детально изложены в статье, в сочетании с представлениями об основах антигенности и иммуногенности молекулярных вакцин позволяет в широких пределах моделировать структуру конъюгатов низкомолекулярных психоактивных веществ и токсикантов. Конечной целью моделирования структуры конъюгатов является обеспечение их оптимальной биологической активности, включая способность молекулярных вакцин этого

типа инициировать интенсивное и специфичное антителообразование на гаптенный эпитоп при активной иммунизации (вакцинации) и в условиях *in vitro* (в клеточных культурах гибридом).

Получаемые при использовании подобных антигенов специфические антитела в настоящее время с успехом используются в качестве реагентов в методах иммунохимического анализа для количественного определения психоактивных и нейротоксичных алкалоидов, о чем свидетельствуют представленные в статье данные по эффективности разработанных методов для количественного определения множества подобных биоактивных веществ. Продемонстрированная в экспериментах на животных при их активной иммунизации возможность модифицировать с помощью вырабатываемых иммунной системой при гуморальном ответе на вакцинацию антител фармакологическую активность и токсичность алкалоидов продолжает инициировать масштабные исследования по созданию молекулярных антитоксических вакцин, включая вакцины наркотиков. Эти вакцины могут оказаться эффективными как средства вторичной иммунопрофилактики наркозависимости у людей.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Colburn W.A. Radioimmunoassay and related immunoassay techniques. In: *Pharmaceutical Analysis Modern Methods, Part A*. Munson J.W., ed. New York: Marcel Dekker; 1982.
2. 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.
3. Butler V.P, Jr. The immunological assay of drugs. *Pharmacol. Rev.* 1978; 29(2): 103-184.
4. Ren Z., Zhang H., Wang Z. et al. Progress in immunoassays of toxic alkaloids in plant-derived medicines: A Review. *Toxins (Basel)*. 2022. 14(3): 165; <https://doi.org/10.3390/toxins14030165>
5. De Weck A.L. Low molecular weight antigens. In: *The Antigens*, V.2. Sela M., eds. N.Y. – San Francisco – London: Academic Press; 1974: 141-248.
6. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Кашуро В.А., Батоцыренова Е.Г. Искусственные конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами психоактивных веществ и токсикантов: принципы конструирования и увеличения иммуногенности. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2022; 23: 824-855.
7. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Кашуро В.А. Искусственные конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами психоактивных веществ и токсикантов: общие принципы моделирования специфичности гаптенных эпитопов. *Medline.ru. Российский биомедицинский журнал*. 2022; 23: 856-901.
8. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Гафт С.С. Конъюгаты физиологически активных, токсичных и лекарственных соединений. В кн.: Козлов В.К. и др. *Основы иммунотоксикологии. Том I. Общая иммунотоксикология. Иммунотоксичность химических соединений. Иницилируемые токсикантами иммунопатологические состояния и заболевания* / под ред. В.К. Козлова. М.: Комментарий; 2019: 364-448.

9. Darwish I.A. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: Basic methodology and recent advances. *Int. J. Biomed. Sci.* 2006; 2(3): 217-235.
10. Marks V., Fry D.E. Detection and measurement of drugs in biological fluids: Their relevance to the problem of drug abuse. In: Glatt M.M., ed. *Drug Dependence*. Dordrecht: Springer; 1977: 295-327. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6147-3_13
11. Volkov S.K. Immunoassay of low-molecular-mass physiologically active substances of plant and microbial origin encountered in plants. *Russian Chemical Reviews*. 1994; 63(1): 91. doi: 10.1070/RC1994v063n01ABEH000073
12. Bremer P.T., Janda K.D. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder. *Pharmacol. Rev.* 2017; 69(3): 298-315. doi.org/10.1124/pr.117.013904
13. Reyes A.Z., Hu K.A., Teperman J. et al. Anti-inflammatory therapy for COVID-19 infection: the case for colchicine. *Ann. Rheum. Dis.* 2021; 80(5): 550–557. doi:10.1136/annrheumdis-2020-219174
14. Tardif J.-Cl., Bouabdallaoui N., L'Allier Ph.L. et al. Colchicine for community-treated patients with COVID-19 (COLCORONA): a phase 3, randomised, double-blinded, adaptive, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet Resp. Med.* 2021; 9(8): 924–932. doi:10.1016/S2213-2600(21)00222-8
15. Pontikis R., Scherrmann J.M., Nguyen H.N. et al. Radioimmunoassay for colchicine: Synthesis and properties of three haptens. *J. Immunoassay*. 1980; 1(4): 449-461. doi: 10.1080/15321818008056965
16. Sabouraud A., Cano N, Scherrmann J.M. Radioimmunoassay of colchicine with antisera exhibiting variable cross-reactivity. *Ther. Drug Monit.* 1994; 16(2): 179-185. doi: 10.1097/00007691-199404000-00012
17. Boudene C., Duprey F., Bohuon C. Radioimmunoassay of colchicine. *Biochem J.* 1975; 151(2): 413-415. doi: 10.1042/bj1510413
18. Rouan S.K., Otterness I., Cunningham A.C., Rhodes C.T. Specific, high affinity colchicine binding monoclonal antibodies: development and characterization of the antibodies. *Hybridoma*. 1989; 8(4): 435-448. doi:10.1089/hyb.1989.8.435
19. Данилова Н.П., Луцкова С.Н., Фадеева И.И. и др. Количественное определение стефарина твердофазным иммуноферментным методом в культуре растительной клетки. *Хим.-фарм. журн.* 1990; 1: 156-158.
20. Прозоровский В.Б., Донкопий В.Д., Суслова И.М. Взаимодействие обратимых ингибиторов с каталитическими центрами и аллостерическими участками холинэстераз. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1976; 82(8): 553-556.
21. Прозоровский В.Б., Павлова Л.В. Суслова И.М. Фармакологическая характеристика нового антихолинэстеразного средства аминостигмина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1992; 55(1): 13-16.
22. Tanahashi T., Poulev A., Zenk M.H. Radioimmunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.* 1990; 56(1): 77-81. doi: 10.1055/s-2006-960889
23. Poulev A., Deus-Neumann B., Zenk M.H. Enzyme immunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.* 1993; 59(5): 442-446. doi: 10.1055/s-2006-959728
24. Volkov S.K. Immunoassay of alkaloids. *Russ. Chem. Rev.* 1993; 62(8): 787–798. doi: 10.1070/RC1993v062n08ABEH000047

25. Кузнецов С.Г., Голиков С.Н. *Синтетические атропиноподобные вещества*. Л.: Медгиз, 1962; 224 с.
26. Голиков С.Н., Розенгарт В.И. *Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества*. Л.: Изд-во «Медицина», 1964; 384 с.
27. Fasth A., Sollenberg J., Sorbo B. Production and characterization of antibodies to atropine. *Acta Pharm. Suec.* 1975; 12(4): 311-322.
28. Berghem L., Bergman U., Schuldt B., Sorbo B. Plasma atropine concentrations determined by radioimmunoassay after single-dose i.v. and i.m. administration. *Br. J. Anaesth.* 1980; 52(6): 597-601. doi: 10.1093/bja/52.6.597
29. Wurzbarger R., Miller R., Boxenbaum H. et al. Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977; 203(2): 435-441.
30. 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
31. 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.
32. Martinsen A., Naaranlahti T., Turkia L. et al. Comparison of radioimmunoassay and capillary gas chromatography in the analysis of l-hyoscyamine from plant material. *Phytochemical analysis.* 1991; 2: 163-166. doi: 10.1002/PCA.2800020404
33. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Любимов Ю.А., Гурьянов Г.А., Голиков С.Н. *Способ получения эритроцитарного диагностикума для выявления специфических антител (его варианты)*: Авт. свидетельство СССР №1079247, приор. 8.02.82., регистр. в Гос. реестре изобретений 15.11.83, опубл. 15.03.84, Бюл. № 10.
34. Козлов В.К., Беспалов А.Я., Щелканова Л.Б., Гурьянов Г.А. *Способ получения конъюгата гаптен-фермент для иммуноферментного анализа*: Авт. свидетельство СССР №1351398, приор. 1.09.1984, регистр. в Гос. реестре изобретений 8.07.1987.
35. Weiler E. W., Stockigt J., Zenk M.H. Radioimmunoassay for the quantitative determination of scopolamine. *Phytochemistry.* 1981; 20(8): 2009-2016. doi: 10.1016/0031-9422(81)84054-X
36. Hagemann K., Piek K., Stockigt J., Weiler E. W. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the quantitative determination of the tropane alkaloid, scopolamine. *Planta Med.* 1992; 58(1): 68-72. doi: 10.1055/s-2006-961392
37. Kikuchi Y., Irie M., Yoshimatsu K. et al. A monoclonal antibody to scopolamine and its use for competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytochemistry.* 1991; 30(10): 3273-3276. doi: 10.1016/0031-9422(91)83191-m
38. Savary B.J., Dougall D.K. Scopolamine radioimmunoassay for tissue cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry.* 1990; 29(5): 1567-1569.
39. Gable R.S. Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. *Addiction.* 2004; 99(6): 686-696. doi: 10.1111/j.1360-0443.2004.00744.x
40. Nutt D.J., King L. A., Phillips L.D. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet.* 2010; 376(9752): 1558-1565. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61462-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61462-6)
41. 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

42. Van Amsterdam J., Opperhuizen A., Koeter M., Van den Brink W. Ranking the harm of alcohol, tobacco and illicit drugs for the individual and the population. *Eur Addict Res.* 2010; 16 (4): 202-227. doi: 10.1159/000317249
43. Головки 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
44. 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
45. Vasiliu O. Current Trends and perspectives in the immune therapy for substance use disorders. *Front Psychiatry.* 2022; 13: 882491. doi: 10.3389/fpsy.2022.882491
46. Celik M., Fuehrlein B. A review of immunotherapeutic approaches for substance use disorders: Current status and future prospects. *Immunotargets Ther.* 2022; 11: 55-66. doi: 10.2147/ITT.S370435
47. 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
48. Li F., Cheng K., Antoline J.F. et al. Synthesis and immunological effects of heroin vaccines. *Org. Biomol. Chem.* 2014; 12(37): 7211-7232. doi: 10.1039/c4ob01053a
49. Simon E. J., Dole W. P., Hiller J. M. Coupling of new active morphine derivative to sepharose for affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* 1972; 69(7): 1835-1837. doi: 10.1073/pnas.69.7.1835
50. Li Q-Q., Sun C-Y., Luo Y-X. et al. A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats. *J. Neurochem.* 2011; 119(6): 1271-1281. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07502.x
51. Abdel-Monem M.M., Portoghese P.S. N-Demethylation of morphine and structurally related compounds with chloroformate esters. *J. Med. Chem.* 1972; 15(2): 208-210. doi: 10.1021/jm00272a025
52. Borowitz I.J., Diakiw V. The preparation and synthetic utility of O-substituted normethylmorphine. *J. Het. Chem.* 1975; 12: 1123-1126
53. Brine G.A., Boldt K.G., Hart C.K., Carroll F.I. The demethylation of morphine and codeine using methyl chloroformate. *Org. Prep. Proceed. Int.* 1976; 8(3): 103-106.
54. 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(1-2): 143-148. doi: 10.1016/0022-1759(93)90080-q
55. 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(24): 5927-5937. doi: 10.1007/s00216-014-8035-x
56. Torres O. B., Alving C. R., Matyas G. R. Synthesis of hapten-protein conjugate vaccines with reproducible hapten densities. In: *Vaccine Design. Methods and Protocols: Vol. 1: Vaccines for Human Diseases*, Thomas S., eds. Methods in Molecular Biology, Vol. 1403. New York: Springer Science+Business Media, 2016; 695-712.
57. 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

58. 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: 0.1016/j.vaccine.2014.01.028
59. Spector S., Parker C.W. Morphine: radioimmunoassay. *Science*. 1970; 168 (3937): 1347-1348. doi: 10.1126/science.168.3937.1347
60. Spector S. Quantitative determination of morphine in serum by radioimmunoassay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1971; 178(2): 253–258.
61. Adler F.L., Liu C.T. Detection of morphine by hemagglutination-inhibition. *J. Immunol.* 1971; 106(6): 1684-1685.
62. Catlin D., Cleeland R., Grunberg E. A sensitive rapid radioimmunoassay for morphine and immunologically related substances in urine and serum. *Clin. Chem.* 1973; 19(2): 216-220.
63. Laurie D., Manson A.J., Rowell F.J., Seviour J. A rapid, qualitative ELISA test for the specific detection of morphine in serum or urine. *Clin. Chim. Acta.* 1989; 183(2): 183-195. doi: 10.1016/0009-8981(89)90334-3
64. Colbert D.L., Gallacher G., Ayling P., Turner G.J. Development of fluoroimmunoassays for the specific detection of morphine in urine. *Clin. Chim. Acta.* 1988; 171(1): 37-48. doi: 10.1016/0009-8981(88)90289-6
65. Glare P.A., Walsh T.D. Clinical pharmacokinetics of morphine. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13(1): 1-23. doi: 10.1097/00007691-199101000-00001
66. Гамалея Н.Б., Берзина А.Г. Вакцины от наркотиков – новое перспективное направление профилактики злоупотребления психоактивными веществами. *Наркология*. 2011; 10: 70-83.
67. 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
68. Matyas G.R., Mayorov A.V., Rice K.C. et al. Liposomes containing monophosphoryl lipid A: a potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin hapten analogs. *Vaccine*. 2013; 31(26): 2804-2810. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.04.027
69. Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate chemistry*. 1992; 3(1): 2-13. doi: 10.1021/bc00013a001
70. Lemus R., Karol M.H. Conjugation of haptens. *Methods Mol. Med.* 2008;138: 167-182. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0_14
71. Yin X.G., Gao X.F., Du J.J. et al. Preparation of protein conjugates via homobifunctional diselenoester cross-Linker. *J. Org Lett.* 2016; 18 (22): 5796-5799. doi: 10.1021/acs.orglett.6b02568
72. Fujiwara K., Matsumoto N., Masuyama Y. et al. New hapten-protein conjugation method using N-(m-aminobenzoyloxy) succinimide as a two-level heterobifunctional agent: thyrotropin-releasing hormone as a model peptide without free amino or carboxyl groups. *J. Immunol. Methods.* 1994; 175(1): 123-129. doi: 10.1016/0022-1759(94)90338-7
73. Jourdan P.S., Mansell R.L., Weiler E.W. Radioimmunoassay for the citrus bitter principle, naringin and related flavonoid-7-O-neohesperidosides. *Planta Med.* 1982; 44(2): 82-86. doi: 10.1055/s-2007-971407
74. Carroll F. I., Blough B. E., Pidaparathi R. R. et al. Synthesis of mercapto-(+)-methamphetamine haptens and their use for obtaining improved epitope dencity on (+)-methamphetamine conjugate vaccines. *J. Med. Chem.* 2011; 54 (14): 5221-5228. doi: 10.1021/jm2004943

75. Авруцкий Г.Я., Гурович И.Я., Громова В.В. *Фармакотерапия психических заболеваний: монография*. М.: Медицина; 1974: 472 с.
76. Рохлина М.Х. Клиника наркоманий и токсикоманий. В кн.: *Руководство по наркологии* / под ред. члена-корр. РАМН, проф. Н. Н. Иванца. М.: Медпрактика-М; 2002: 269-366.
77. Веселовская Н.В., Коваленко А.Е. *Наркотики: свойства, действие, фармакокинетика, метаболизм. Пособие для работников наркологических больниц, наркодиспансеров, химико-токсикологических и судебно-химических лабораторий*. М.: Триада-Х, 2000; 196 с.
78. 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
79. Sakurai M., Wirsching P., Janda K. D. Design and synthesis of a cocaine-diamide hapten for vaccine development. *Tetrahedron Letters*. 1996; 37: 5479-5482.
80. 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
81. Biagini R.E., Klineciewicz S.L., Henningsen G.M. et al. Antibodies to morphine in workers exposed to opiates at a narcotics manufacturing facility and evidence for similar antibodies in heroin abusers. *Life Sciences*. 1990; 47(10): 897-908. doi: 10.1016/0024-3205(90)90604-p
82. Hrafnkelsdottir K., Valgeirsson J., Gizurarson S. Induction of Protective and Specific Antibodies against Cocaine by Intranasal Immunisation Using a Glyceride Adjuvant. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28(6): 1038-1042. doi: 10.1248/bpb.28.1038
83. Ramakrishnan M., Kinsey B.M., Singh R.A. et al. Hapten optimization for cocaine vaccine with improved cocaine recognition. *Chem. Biol. Drug Des.* 2014; 84(3):354-363. doi: 10.1111/cbdd.12326
84. Bloom B.T., Bushell M-J. Vaccines against drug abuse-are we there yet? *Vaccines (Basel)*. 2022; 10(6): 860. doi: 10.3390/vaccines10060860
85. Truong T.T., Kosten T.R. Current status of vaccines for substance use disorders: A brief review of human studies. *J. Neurol. Sci.* 2022; 434: 120098. doi: 10.1016/j.jns.2021.120098
86. Shen X.Y., Orson F.M., Kosten T.R. Vaccines against drug abuse. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2012; 91: 60–70. doi: 10.1038/clpt.2011.281
87. 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.
88. 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
89. 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
90. 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
91. Cerny E.H., Cerny T. Vaccines against nicotine. *Human Vaccines*. 2009; 5(4): 200-205. doi: 10.4161/hv.5.4.7310
92. McCluskie M.J., Pryde D.C., Gervais D.P. et al. Enhancing immunogenicity of a 3'-aminomethylnicotine-DT-conjugate anti-nicotine vaccine with CpG adjuvant in mice and non-human primates. *Inter. Immunopharm.* 2013; 16(1): 50-56. doi: 10.1016/j.intimp.2013.03.021

93. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2018 (Set of 5 Booklets); United Nations: San Francisco, CA, USA, 2018. 111.

94. Hossain M.K., Davidson M., Kypreos E., Feehan J., Muir J.A., Nurgali K., Apostolopoulos V. Immunotherapies for the treatment of drug addiction. *Vaccines*. 2022; 10(11):1778. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111778> 112.

References:

1. Colburn W.A. Radioimmunoassay and related immunoassay techniques. In: *Pharmaceutical Analysis Modern Methods, Part A*. Munson J.W., eds. New York: Marcel Dekker; 1982.
2. 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.
3. Butler V.P, Jr. The immunological assay of drugs. *Pharmacol. Rev.* 1978; 29(2): 103-184.
4. Ren Z., Zhang H., Wang Z. et al. Progress in immunoassays of toxic alkaloids in plant-derived medicines: A Review. *Toxins (Basel)*. 2022. 14(3): 165; <https://doi.org/10.3390/toxins14030165>
5. De Weck A.L. Low molecular weight antigens. In: *The Antigens*, V.2. Sela M., eds. N.Y. – San Francisco – London: Academic Press; 1974: 141-248.
6. Kozlov V.K., Beshpalov A.Ya., Kashuro V.A., Batotsyrenova E.G. Hapten-carrier conjugates with haptens-analogues of psychoactive substances and toxicants: Principles for designing and increasing immunogenicity. *Medline.ru*. 2022; 23: 824-855. (in Russian)
7. Kozlov V.K., Beshpalov A.Ya., Kashuro V.A. Hapten-carrier conjugates with haptens-analogues of psychoactive substances and toxicants: General principles of modeling the specificity of hapten epitopes. *Medline.ru*. 2022; 23: 856-901. (in Russian)
8. Kozlov V.K., Beshpalov A.Ya., Gaft S.S. Conjugates of physiologically active, toxic and medicinal compounds. In the book: Kozlov V.K. et al. *Fundamentals of immunotoxicology. Volume 1. General immunotoxicology. Immunotoxicity of chemical compounds. Immunopathological conditions and diseases initiated by toxicants* / ed. V.K. Kozlov. M.: Commentary; 2019: 364-448. (in Russian)
9. Darwish I.A. Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: Basic methodology and recent advances. *Int. J. Biomed. Sci.* 2006; 2(3): 217-235.
10. Marks V., Fry D.E. Detection and measurement of drugs in biological fluids: Their relevance to the problem of drug abuse. In: Glatt M.M., eds. *Drug Dependence*. Dordrecht: Springer; 1977: 295-327. https://doi.org/10.1007/978-94-011-6147-3_13
11. Volkov S.K. Immunoassay of low-molecular-mass physiologically active substances of plant and microbial origin encountered in plants. *Russian Chemical Reviews*. 1994; 63(1): 91. doi: 10.1070/RC1994v063n01ABEH000073
12. Bremer P.T., Janda K.D. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder. *Pharmacol. Rev.* 2017; 69(3): 298-315. doi.org/10.1124/pr.117.013904
13. Reyes A.Z., Hu K.A., Teperman J. et al. Anti-inflammatory therapy for COVID-19 infection: the case for colchicine. *Ann. Rheum. Dis.* 2021; 80(5): 550–557. doi:10.1136/annrheumdis-2020-219174
14. Tardif J.-Cl., Bouabdallaoui N., L'Allier Ph.L. et al. Colchicine for community-treated patients with COVID-19 (COLCORONA): a phase 3, randomised, double-blinded, adaptive, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet Resp. Med.* 2021; 9(8): 924–932. doi:10.1016/S2213-2600(21)00222-8

15. Pontikis R., Scherrmann J.M., Nguyen H.N. et al. Radioimmunoassay for colchicine: Synthesis and properties of three haptens. *J. Immunoassay*. 1980; 1(4): 449-461. doi: 10.1080/15321818008056965
16. Sabouraud A., Cano N, Scherrmann J.M. Radioimmunoassay of colchicine with antisera exhibiting variable cross-reactivity. *Ther. Drug Monit.* 1994; 16(2): 179-185. doi: 10.1097/00007691-199404000-00012
17. Boudene C., Duprey F., Bohuon C. Radioimmunoassay of colchicine. *Biochem J.* 1975; 151(2): 413-415. doi: 10.1042/bj1510413
18. Rouan S.K., Otterness I., Cunningham A.C., Rhodes C.T. Specific, high affinity colchicine binding monoclonal antibodies: development and characterization of the antibodies. *Hybridoma*. 1989; 8(4): 435-448. doi:10.1089/hyb.1989.8.435
19. Danilova N.P., Lutskova S.N., Fadeeva I.I. Quantitative determination of stefarin by enzyme-linked immunosorbent assay in plant cell culture. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 1990; 1:156-158. (in Russian)
20. Prozorovsky V.B., Donkopy V.D., Suslova I.M. Interaction of reversible inhibitors with catalytic centers and allosteric sites of cholinesterases. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1976; 82(8): 553-556. (in Russian)
21. Prozorovsky V.B., Pavlova L.V. Suslova I.M. Pharmacological characteristics of the new anticholinesterase agent aminostigmine. *Experimental and clinical pharmacology*. 1992; 55(1): 13-16. (in Russian)
22. Tanahashi T., Poulev A., Zenk M.H. Radioimmunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.* 1990; 56(1): 77-81. doi: 10.1055/s-2006-960889
23. Poulev A., Deus-Neumann B., Zenk M.H. Enzyme immunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.* 1993; 59(5): 442-446. doi: 10.1055/s-2006-959728
24. Volkov S.K. Immunoassay of alkaloids. *Russ. Chem. Rev.* 1993; 62(8): 787-798. doi: 10.1070/RC1993v062n08ABEH000047
25. Kuznetsov S.G., Golikov S.N. *Synthetic atropine-like substances*. L.: Medgiz, 1962; 224 p. (in Russian)
26. Golikov S.N., Rozengart V.I. *Cholinesterases and anticholinesterase agents*. L.: Publishing house «Medicine», 1964; 384 p. (in Russian)
27. Fasth A., Sollenberg J., Sorbo B. Production and characterization of antibodies to atropine. *Acta Pharm. Suec.* 1975; 12(4): 311-322.
28. Berghem L., Bergman U., Schuldt B., Sorbo B. Plasma atropine concentrations determined by radioimmunoassay after single-dose i.v. and i.m. administration. *Br. J. Anaesth.* 1980; 52(6): 597-601. doi: 10.1093/bja/52.6.597
29. Wurzbarger R., Miller R., Boxenbaum H. et al. Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977; 203(2): 435-441.
30. 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
31. 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.

32. Martinsen A., Naaranlahti T., Turkia L. et al. Comparison of radioimmunoassay and capillary gas chromatography in the analysis of l-hyosциamine from plant material. *Phytochemical analysis*. 1991; 2: 163-166. doi: 10.1002/PCA.2800020404
33. Kozlov V.K., Bepalov A.Ya., Guryanov G.A. et al. A method of obtaining an erythrocyte diagnosticum for the detection of specific antibodies (its variants): Author's certificate of the USSR No.1079247, prior. 8.02.82., reg. in the State register of inventions 15.11.83. (in Russian)
34. Kozlov V.K., Bepalov A.Ya., Shchelkanova L.B., Guryanov G.A. Method for obtaining a hapten-enzyme conjugate for enzyme-linked immunosorbent assay: USSR Author's certificate No. 1351398, prior. 1.09.1984, reg. in the State register of inventions 8.07.1987. (in Russian)
35. Weiler E. W., Stockigt J., Zenk M.H. Radioimmunoassay for the quantitative determination of scopolamine. *Phytochemistry*. 1981; 20(8): 2009-2016. doi: 10.1016/0031-9422(81)84054-X
36. Hagemann K., Piek K., Stockigt J., Weiler E. W. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the quantitative determination of the tropane alkaloid, scopolamine. *Planta Med*. 1992; 58(1): 68-72. doi: 10.1055/s-2006-961392.
37. Kikuchi Y., Irie M., Yoshimatsu K. et al. A monoclonal antibody to scopolamine and its use for competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytochemistry*. 1991; 30(10): 3273-3276. doi: 10.1016/0031-9422(91)83191-m.
38. Savary B.J., Dougall D.K. Scopolamine radioimmunoassay for tissue cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*. 1990; 29(5): 1567-1569.
39. Gable R.S. Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. *Addiction*. 2004; 99(6): 686-696. doi: 10.1111/j.1360-0443.2004.00744.x.
40. Nutt D.J., King L. A., Phillips L.D. Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *Lancet*. 2010; 376(9752): 1558-1565. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61462-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61462-6).
41. 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.
42. Van Amsterdam J., Opperhuizen A., Koeter M., Van den Brink W. Ranking the harm of alcohol, tobacco and illicit drugs for the individual and the population. *Eur Addict Res*. 2010; 16: 202-227. doi: 10.1159/000317249
43. Golovko A.I., Ivitsky Yu.Yu., Ivanov M.B., Reinyuk V.L., Kozlov V.K. On the biological activity of designer drugs from the group of synthetic opioids. *Advances in modern biology*. 2020; 140(5): 464-477. doi: 10.31857/S0042132420040067. (in Russian)
44. 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.
45. Vasiliu O. Current Trends and perspectives in the immune therapy for substance use disorders. *Front Psychiatry*. 2022; 13: 882491. doi: 10.3389/fpsy.2022.882491
46. Celik M., Fuehrlein B. A review of immunotherapeutic approaches for substance use disorders: Current status and future prospects. *Immunotargets Ther*. 2022; 11: 55-66. doi: 10.2147/ITT.S370435
47. 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

48. Li F., Cheng K., Antoline J.F. et al. Synthesis and immunological effects of heroin vaccines. *Org. Biomol. Chem.* 2014; 12(37): 7211-7232. doi: 10.1039/c4ob01053a
49. Simon E. J., Dole W. P., Hiller J. M. Coupling of new active morphine derivative to sepharose for affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*. 1972; 69(7): 1835-1837. doi: 10.1073/pnas.69.7.1835
50. Li Q-Q., Sun C-Y., Luo Y-X. et al. A morphine/heroin vaccine with new hapten design attenuates behavioral effects in rats. *J. Neurochem.* 2011; 119(6): 1271-1281. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07502.x
51. Abdel-Monem M.M., Portoghese P.S. N-Demethylation of morphine and structurally related compounds with chloroformate esters. *J. Med. Chem.* 1972; 15(2): 208-210. doi: 10.1021/jm00272a025
52. Borowitz I.J., Diakiw V. The preparation and synthetic utility of O-substituted normethylmorphine. *J. Het. Chem.* 1975; 12: 1123-1126
53. Brine G.A., Boldt K.G., Hart C.K., Carroll F.I. The demethylation of morphine and codeine using methyl chloroformate. *Org. Prep. Proceed. Int.* 1976; 8(3): 103-106.
54. 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(1-2): 143-148. doi: 10.1016/0022-1759(93)90080-q
55. 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(24): 5927-5937. doi: 10.1007/s00216-014-8035-x
56. Torres O. B., Alving C. R., Matyas G. R. Synthesis of hapten-protein conjugate vaccines with reproducible hapten densities. In: *Vaccine Design. Methods and Protocols: Vol. 1: Vaccines for Human Diseases*, Thomas S., eds. / *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1403. New York: Springer Science+Business Media, 2016; 695-712.
57. 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
58. 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
59. Spector S., Parker C.W. Morphine: radioimmunoassay. *Science.* 1970; 168 (3937): 1347-1348. doi: 10.1126/science.168.3937.1347
60. Spector S. Quantitative determination of morphine in serum by radioimmunoassay. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1971; 178(2): 253-258.
61. Adler F.L., Liu C.T. Detection of morphine by hemagglutination-inhibition. *J. Immunol.* 1971; 106(6): 1684-1685.
62. Catlin D., Cleeland R., Grunberg E. A sensitive rapid radioimmunoassay for morphine and immunologically related substances in urine and serum. *Clin. Chem.* 1973; 19(2): 216-220.
63. Laurie D., Manson A.J., Rowell F.J., Seviour J. A rapid, qualitative ELISA test for the specific detection of morphine in serum or urine. *Clin. Chim. Acta.* 1989; 183(2): 183-195. doi: 10.1016/0009-8981(89)90334-3
64. Colbert D.L., Gallacher G., Ayling P., Turner G.J. Development of fluoroimmunoassays for the specific detection of morphine in urine. *Clin. Chim. Acta.* 1988; 171(1): 37-48. doi: 10.1016/0009-8981(88)90289-6

65. Glare P.A., Walsh T.D. Clinical pharmacokinetics of morphine. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13(1): 1-23. doi: 10.1097/00007691-199101000-00001
66. Gamaleya N.B., Berzina A.G. Drug vaccines are a promising new direction in the prevention of substance abuse. *Narcology.* 2011; 10: 70-83. (in Russian).
67. 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
68. Matyas G.R., Mayorov A.V., Rice K.C. et al. Liposomes containing monophosphoryl lipid A: a potent adjuvant system for inducing antibodies to heroin hapten analogs. *Vaccine.* 2013; 31(26): 2804-2810. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.04.027
69. Brinkley M. A brief survey of methods for preparing protein with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate chemistry.* 1992; 3(1): 2-13. doi: 10.1021/bc00013a001
70. Lemus R., Karol M.H. Conjugation of haptens. *Methods Mol. Med.* 2008; 138: 167-82. doi: 10.1007/978-1-59745-366-0_14
71. Yin X.G., Gao X.F., Du J.J. et al. Preparation of protein conjugates via homobifunctional diselenoester cross-Linker. *J. Org Lett.* 2016; 18(22): 5796-5799. doi: 10.1021/acs.orglett.6b02568
72. Fujiwara K., Matsumoto N., Masuyama Y. et al. New hapten-protein conjugation method using N-(m-aminobenzoyloxy) succinimide as a two-level heterobifunctional agent: thyrotropin-releasing hormone as a model peptide without free amino or carboxyl groups. *J. Immunol. Methods.* 1994; 175(1): 123-129. doi: 10.1016/0022-1759(94)90338-7
73. Jourdan P.S., Mansell R.L., Weiler E.W. Radioimmunoassay for the citrus bitter principle, naringin and related flavonoid-7-O-neohesperidosides. *Planta Med.* 1982; 44(2): 82-86. doi: 10.1055/s-2007-971407
74. Carroll F. I., Blough B. E., Pidaparthi R. R. et al. Synthesis of mercapto-(+)-methamphetamine haptens and their use for obtaining improved epitope dencity on (+)-methamphetamine conjugate vaccines. *J. Med. Chem.* 2011; 54: 5221-5228. doi: 10.1021/jm2004943
75. Avrutsky G.Ya., Gurovich I.Ya., Gromova V.V. *Pharmacotherapy of mental illness: monograph.* M.: Medicine; 1974: 472 p. (in Russian).
76. Rokhlina M.Kh. Clinic of drug addiction and substance abuse. In: *Guide to Narcology /* ed. corresponding member RAMN, prof. N. N. Ivanets. M.: Medpraktika-M; 2002: 269-366. (in Russian).
77. Veselovskaya N.V., Kovalenko A.E. *Drugs: properties, action, pharmacokinetics, metabolism. Manual for employees of narcological hospitals, drug dispensaries, chemical-toxicological and forensic chemical laboratories.* M.: Triada-X, 2000; 196 p. (in Russian).
78. Carrera M.R., Ashley J.A., Parsons I.H. et al. Supression of psychoactive effects of cocaine by active immunization. *Nature.* 1995; 378(6558): 727-730. doi: 10.1038/378727a0.
79. Sakurai M., Wirsching P., Janda K. D. Design and synthesis of a cocaine-diamide hapten for vaccine development. *Tetrahedron Letters.* 1996; 37: 5479-5482.
80. 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

81. Biagini R.E., Klinecicz S.L., Henningsen G.M. et al. Antibodies to morphine in workers exposed to opiates at a narcotics manufacturing facility and evidence for similar antibodies in heroin abusers. *Life Sciences*. 1990; 47(10): 897-908. doi: 10.1016/0024-3205(90)90604-p
82. Hrafnkelsdottir K., Valgeirsson J., Gizurason S. Induction of Protective and Specific Antibodies against Cocaine by Intranasal Immunisation Using a Glyceride Adjuvant. *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28(6): 1038-1042. doi: 10.1248/bpb.28.1038
83. Ramakrishnan M., Kinsey B.M., Singh R.A. et al. Hapten optimization for cocaine vaccine with improved cocaine recognition. *Chem. Biol. Drug Des.* 2014; 84(3):354-363. doi: 10.1111/cbdd.12326
84. Bloom B.T., Bushell M-J. Vaccines against drug abuse-are we there yet? *Vaccines (Basel)*. 2022; 10(6): 860. doi: 10.3390/vaccines10060860
85. Truong T.T., Kosten T.R. Current status of vaccines for substance use disorders: A brief review of human studies. *J. Neurol. Sci.* 2022; 434: 120098. doi: 10.1016/j.jns.2021.120098
86. Shen X.Y., Orson F.M., Kosten T.R. Vaccines against drug abuse. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2012; 91: 60–70. doi: 10.1038/clpt.2011.281
87. Hieda Y., Keyler D. E., Vandevort J. T. et al. Active immunization alters the plasma nicotine concentration in rats. *J. Pharm. Exper. Ther.* 1997; 283(3): 1076-1081.
88. 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
89. 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
90. 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
91. Cerny E.H., Cerny T. Vaccines against nicotine. *Human Vaccines*. 2009; 5(4): 200-205. doi: 10.4161/hv.5.4.7310
92. McCluskie M.J., Pryde D.C., Gervais D.P. et al. Enhancing immunogenicity of a 3'aminomethylnicotine-DT-conjugate anti-nicotine vaccine with CpG adjuvant in mice and non-human primates. *Inter. Immunopharm.* 2013; 16(1): 50-56. doi: 10.1016/j.intimp.2013.03.021
93. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2018 (Set of 5 Booklets); United Nations: San Francisco, CA, USA, 2018.
94. Hossain M.K., Davidson M., Kypreos E., Feehan J., Muir J.A., Nurgali K., Apostolopoulos V. Immunotherapies for the treatment of drug addiction. *Vaccines*. 2022; 10(11):1778. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111778>