

**ИСКУССТВЕННЫЕ КОНЬЮГИРОВАННЫЕ АНТИГЕНЫ
С ГАПТЕНАМИ-АНАЛОГАМИ ПСИХОАКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ И ТОКСИКАНТОВ: АЛГОРИТМЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
СТРУКТУРЫ ГАПТЕННЫХ ЭПИТОПОВ СИНТЕТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ 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 низкомолекулярных психоактивных лекарственных соединений и фосфорорганических нейротоксикантов, включая синтетические наркотики, описаны принципы создания иммунодоминантных гаптенных эпитопов в составе антигенов (иммуногенов) и подходы (алгоритмы) моделирования молекулярной структуры и антигенной специфичности гаптенных эпитопов. 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 лекарственных препаратов и нейротоксичных фосфорорганических соединений: синтетических наркотиков – метамфетамина, фенциклидина; вызывающих психическую зависимость трициклических антидепрессантов и нейролептиков – перфеназина, имипрамина, хлорпромазина, трифлюоперазина, флуфеназина и других; антидепрессантов других фармакологических групп (например, производных 1,4-бензодиазепина); синтетических центральных холиноблокаторов с психодислептической (психотомиметической) активностью – тригексифенидила, бензтропина, пирензепина, глипина; ингибиторов холинэстераз – фосфорорганических соединений и аминостигмина. Обобщены также наиболее часто используемые подходы оптимизации способов синтеза гаптен-аналогов этих психоактивных

или токсичных соединений и соответствующих конъюгированных антигенов. Постулировано, что алгоритм такой оптимизации определяется молекулярной структурой целевого химического соединения и выбором конкретной реакционноспособной (функциональной) группы, которая вводится в гаптен-аналог. Для получения гаптен-аналогов психоактивных лекарственных препаратов и нейротоксикантов с реакционноспособной карбоксильной группой универсальным алгоритмом оптимизации является синтез их гемисукцинатных производных. На конкретных примерах гаптен-аналогов с реакционноспособными карбокси- и аминогруппами также описаны и обобщены способы их конъюгирования к макромолекулярным, преимущественно белковым, носителям.

Ключевые слова: психоактивные вещества; синтетические наркотики; фосфорорганические нейротоксиканты; конъюгированные антигены (конъюгаты гаптен-носитель); гаптены-аналоги синтетических психоактивных веществ и фосфорорганических нейротоксикантов; 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 SYNTHETIC COMPOUNDS HAPTENE EPITOPES IN DESIGNING OF IMMUNOGENIC ANTIGENS

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

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

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

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

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

Summary. Based on the analysis of the available literature data and the authors' own experience in the field of constructing hapten-carrier conjugates with haptens-analogues of low molecular weight chemical compounds (including psychoactive medicines, synthetic drugs,

organophosphorus neurotoxicants), the ways and algorithms for creating immunodominant hapten epitopes in the composition of such immunogens 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 chemical compounds: synthetic drugs (methamphetamine, phencyclidine); psychoactive tricyclic antidepressants and neuroleptics (for example, perphenazine, imipramine, chlorpromazine, trifluoperazine, fluphenazine and others); antidepressants of other pharmacological groups (for example, derivatives of 1,4-benzodiazepine); synthetic central anticholinergics with psychodysleptic (psychotomimetic) activity (trihexyphenidyl, benztropine, pirenzepine, glipin); cholinesterase inhibitors – organophosphorus compounds and aminostigmine. The most frequently used approaches for optimizing the methods for the synthesis of hapten analogs of these psychoactive or toxic compounds and the corresponding conjugated antigens are also summarized. It is postulated that the algorithm for such optimization is determined by the molecular structure of target chemical compound and the choice of a specific reactive (functional) group that is introduced into the hapten analog. For the purposes of obtaining haptens analogs of psychoactive medicines and drugs or toxic chemical compounds 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 and generalized too.

Keywords: psychoactive substances; synthetic drugs; organophosphate neurotoxicants; conjugated antigens (hapten-carrier conjugates); hapten analogues of synthetic psychoactive substances and organophosphorus neurotoxicants; hapten determinants (epitopes); immunochemical specificity; modeling of biological activity and specificity.

Введение

Искусственные конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами низкомолекулярных психоактивных лекарств, синтетических наркотиков, нейротоксичных соединений, в том числе с гаптенами-аналогами фосфорорганических нейротоксикантов, активно используются в современной биомедицине с задачами получения при активной иммунизации специфических антител с последующим их использованием в качестве иммунохимических реагентов для количественного определения целевых химических соединений и в попытках реализации принципов активной иммунизации (вакцинации) для модификации биологической активности целевых лигандов [1-6]. В предыдущей публикации детально описаны и обобщены результаты проводимых разработок в области синтеза гаптен-аналогов природных соединений –

алкалоидов растений, обладающих психоактивностью и нейротоксичностью, и конъюгированных антигенов с данными гаптенами-аналогами.

Целью предлагаемого вниманию заинтересованных специалистов исследования являлась систематизация и обобщение имеющейся информации по конструированию искусственных конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами синтетических низкомолекулярных психоактивных лекарственных соединений, некоторых синтетических наркотиков и фосфорорганических нейротоксикантов с изложением (в контексте общих принципов) ряда известных конкретных технических решений по достижению иммунодоминантности гаптенных эпитопов и их целевой иммунохимической специфичности в составе создаваемых конъюгированных антигенов. Наличие конъюгированных антигенов (иммуногенов) и использование методологии активной иммунизации этими антигенами животных позволяет получать поликлональные специфические антисыворотки для их последующего 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 лиц с зависимостью от синтетических наркотиков – метамфетамина и фенциклидина и других психоактивных лекарственных препаратов, в частности делириогенов с психодислептической активностью, антидепрессантов и транквилизаторов.

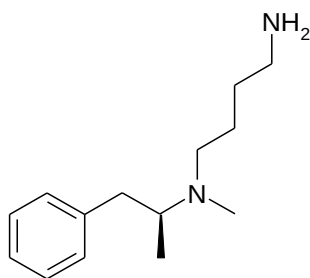
Конструирование конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами синтетических психоактивных веществ, способных вызывать наркотическую зависимость: моделирование иммунодоминантности и специфичности гаптенных эпитопов

Моделирование структуры гаптенов-аналогов амфетаминов. Производные амфетамина, в частности метамфетамин, широко используются как рекреационные наркотики. Так, метамфетамин является мощным стимулятором центральной нервной системы, активирует дофаминэргические и серотонинэргические нейроны среднего мозга [7, 8]. В высоких дозах метамфетамин вызывает психоз и галлюцинации, а также резко активирует повышенную сексуальность. Депрессия от отмены метамфетамина более тяжелая, чем при кокаиновой абстиненции.

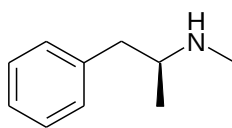
Известно несколько вариантов получения гаптенов-аналогов производных амфетамина, в частности метамфетамина. В раннем исследовании был получен гаптен-аналог метамфетамина – N-(4-аминобутил)-метамфетамин, который конъюгировали с БСА с помощью карбодиимида [9]. С использованием данного конъюгированного антигена были получены поликлональные кроличьи сыворотки, применяя которые в качестве иммунохимического реагента удалось

разработать метод RIA определения амфетаминов в моче. Для проведения анализа требовалось всего около 50 мкл мочи. Метод RIA был специфичен и позволял улавливать 1,5 нг амфетамина в образцах мочи.

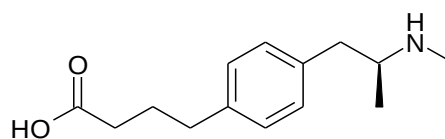
Позднее были синтезированы гаптены-аналоги метамфетамина различного строения, которые обладали разными реакционноспособными группами, с использованием которых осуществили конъюгирование этих гаптен-аналогов с макромолекулярными носителями, в частности с белками. Ниже представлены синтезированные гаптены-аналоги метамфетамина:



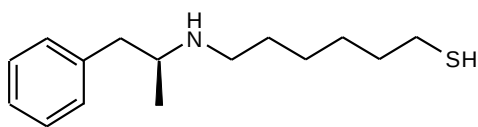
ГАМ-1



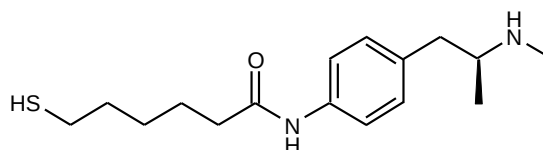
метамфетамин



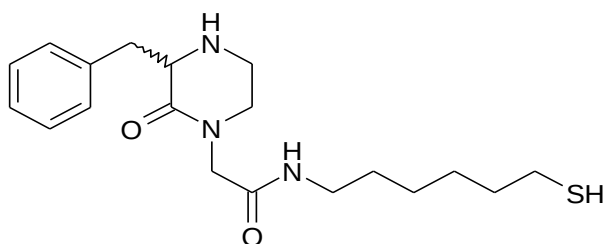
ГАМ-2



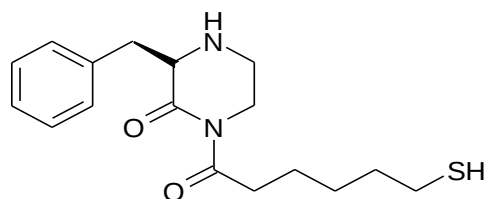
ГАМ-3



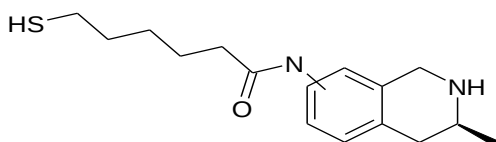
ГАМ-4



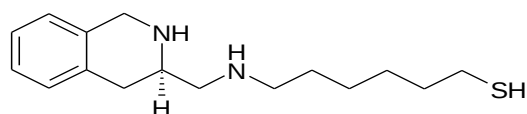
ГАМ-5



ГАМ-6



ГАМ-7



ГАМ-8

Рассматривая структуру гаптен-аналогов метамфетамина (ГАМ-1, ГАМ-2, ГАМ-3, ГАМ-4, ГАМ-5, ГАМ-6, ГАМ-7, ГАМ-8), необходимо заметить, что наряду с «классическими

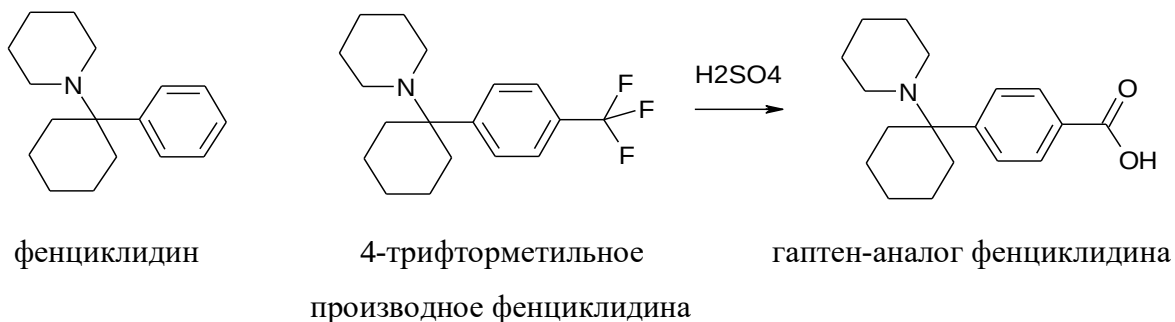
гаптенами», которые получили путем введения в молекулу метамфетамина амино-, карбокси- или сульфгидрильной реакционноспособной группы (ГАМ-1 [10]; ГАМ-2, ГАМ-3, ГАМ-4 [11]), были синтезированы также гаптены-аналоги этого наркотика, в которых с целью изменения специфичности далее получаемых антител (а, соответственно, и разрабатываемых методов иммунохимического анализа или же модельных вакцин) алифатический фрагмент целевого лиганда включали в циклическую структуру пиперазина (ГАМ-5 и ГАМ-6) или тетрагидроизохинолина (ГАМ-7 и ГАМ-8) [11].

Экспериментальные образцы вакцин с подобными гаптенами конъюгировали со специально разработанными пептидными макромолекулярными комплексами, которые содержали встроенный в их конформацию и селективный в отношении инициации иммунного ответа молекулярный адъювант [10].

Моделирование структуры гаптен-аналогов фенциклидина.

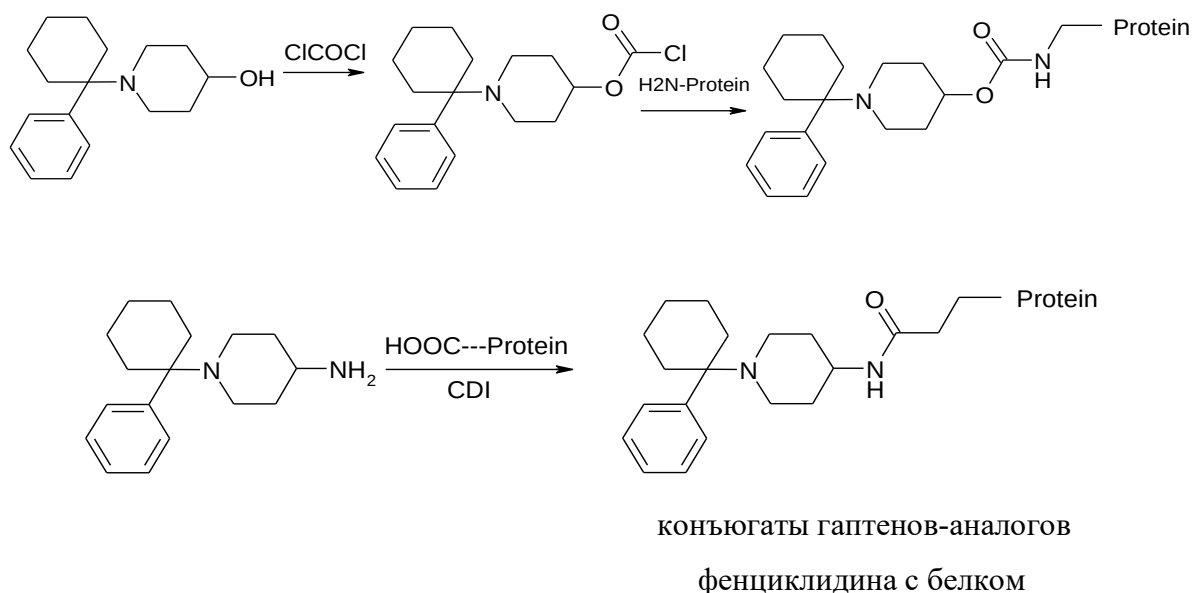
Фенциклидин [1-(1-фенилциклогексил)-пиперидин] изначально был создан и использовался как лекарственное средство для внутривенного наркоза. Применение в этом качестве было прекращено из-за чрезмерной нейротоксичности препарата. В частности, было установлено, что фенциклидин способен вызывать значительные нарушения психических функций с развитием делириозного состояния, сопровождаемого галлюцинациями [12]. В настоящее время распространено использование данного препарата с не медицинскими, а другими целями, поэтому фенциклидин включен в список контролируемых веществ как наркотическое средство. Как наркотик, фенциклидин применяется наркозависимыми лицами сам по себе или же в комбинации с другими наркотическими средствами (алкоголь, каннабиноиды) путем курения смесей с растительными добавками, в частности с марихуаной, или же перорально. Хроническое употребление данного психотропа крайне опасно, сопровождается формированием физиологической зависимости, достаточно быстро у принимающих данный наркотик лиц развиваются тяжелые депрессивные расстройства психики, а при сочетании фенциклидина с алкоголем или бензодиазепинами возможно развитие коматозного состояния. При передозировке наркотика в таких комбинациях смерть наступает от остановки дыхания.

В исследованиях [13, 14] в качестве гаптен-аналога фенциклидина использовали 1-[1-(4-карбоксифенил) циклогексил] пиперидин, получаемый гидролизом 4-трифторметильного производного фенциклидина в среде концентрированной серной кислоты:



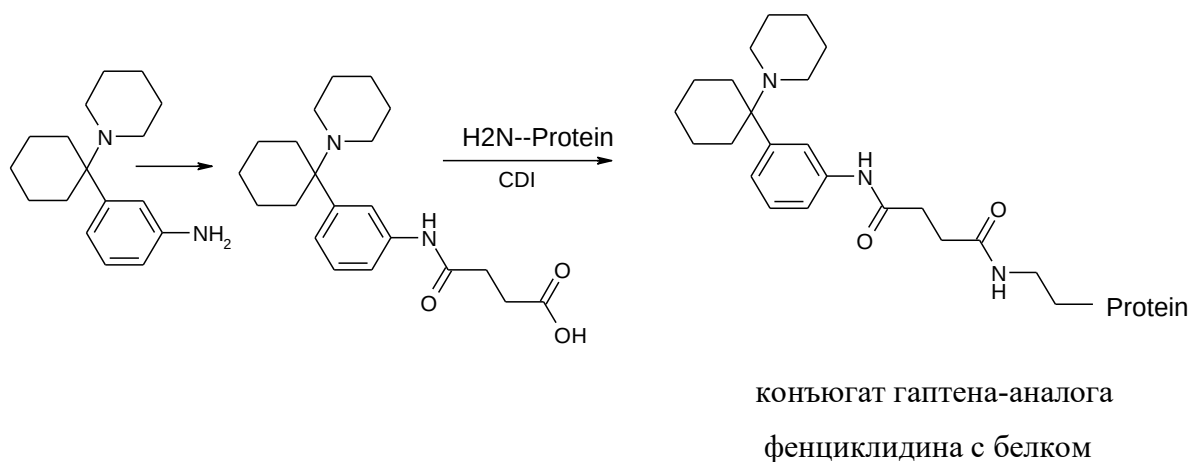
Данный гаптен-аналог фенциклидина, содержащий реакционноспособную карбоксильную группу, конъюгировали с белками, в частности с БСА, карбодиимидным методом. С поликлональными сыворотками был разработан метод RIA, позволяющий с высокой специфичностью количественно определять фенциклидин в моче наркоманов в диапазоне концентраций от 5 до 25 нг/мл [99].

В исследованиях, описанных в патенте [15], 4-гидрокси-аналог фенциклидина при взаимодействии с фосгеном по пиперидиновому кольцу превращается в соответствующий хлорэфир, который затем вводится в реакцию с водным раствором белка при pH 8.0 и реагирует с его свободными аминогруппами с образованием карбаматной связи, а 4-амино-аналог фенциклидина конъюгируют со свободными карбоксильными группами белка с помощью водорастворимого карбодиимида:



3-Аминопроизводное фенциклидина, но по ароматическому кольцу, было получено путем сукцинилирования фенциклидина. Это соединение использовали в качестве гаптена-

аналога при получении соответствующего конъюгированного антигена. Конъюгирование данного гаптена-аналога фенциклидина с белком проводили карбодиимидным методом [15]:



К фенциклидину получены также высокоаффинные мышинные моноклональные антитела, с использованием которых в экспериментах на крысах продемонстрирована их способность частично нейтрализовать фармакологическую активность фенциклидина, в том числе при его введении животным в больших дозах [14, 16, 17].

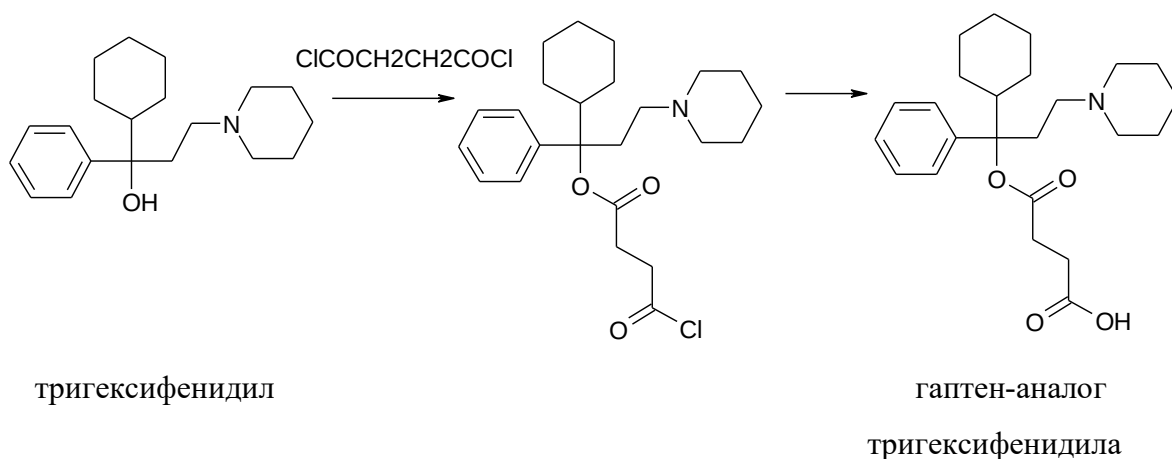
Моделирование структуры гаптен-аналогов синтетических холиноблокаторов с выраженной психодислептической (психотомиметической) активностью. Лекарственными препаратами, способными вызывать значительные нарушения психических функций, являются синтетические холинолитики с выраженными центральными М-холиноблокирующими эффектами, которые в высоких дозах вызывают расстройства высшей нервной деятельности и поведения, сопровождаемые возбуждением, бредом, галлюцинациями, в ряде случаев эйфорией, вплоть до развития делириозного состояния [18, 19]. Совокупность этих эффектов обозначают как психотомиметическое действие ПАВ, а вызывающие эти эффекты ПАВ относят к психотомиметикам. Наиболее выражены подобные эффекты у 3-хинуклидилового эфира бензиловой кислоты – хинукледил-3-бензилата (BZ).

В научной и патентной литературе достаточно широко представлены варианты синтеза гаптен-аналогов психоактивных соединений из группы центральных М-холиноблокаторов: тригексифенидила, бензтропина, пирензепина и конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами этих ПАВ, используемых для последующего получения антител со специфичностью к данным соединениям.

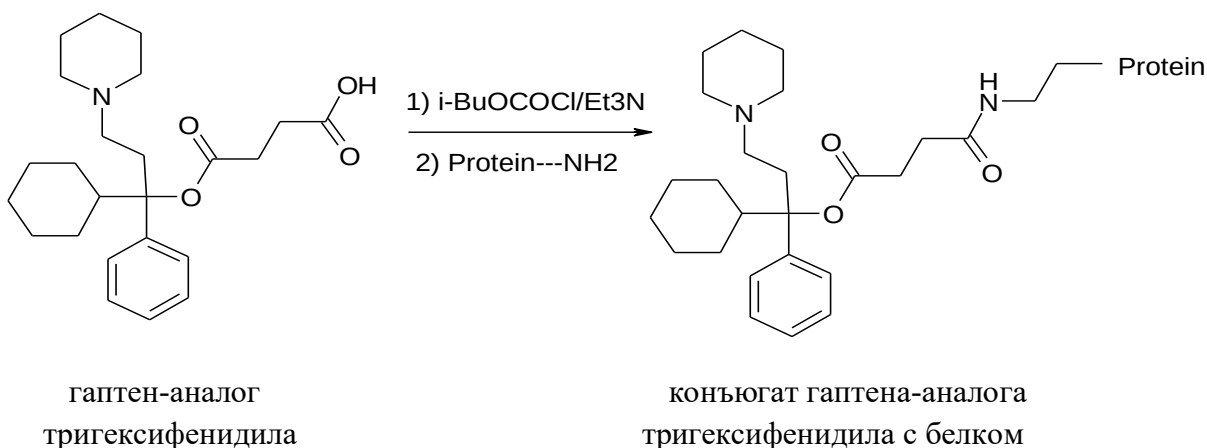
Тригексифенидил (циклодол) – один из наиболее активных синтетических холинолитиков. Препарат обладает выраженной центральной М- и Н-холинолитической активностью, а также вызывает и периферические

М-холинолитические эффекты [20]. Тригексифенидил используется как лечебное средство при болезни Паркинсона [21].

При получении гаптена-аналога тригексифенидила [22] основание тригексифенидила ацилируют дихлорангидридом янтарной кислоты, полученный промежуточный хлорангидридоэфир затем гидролизуют до соответствующей кислоты, которая, имея реакционноспособную карбоксильную группу, может использоваться как гаптен-аналог тригексифенидила при последующем получении конъюгированного антигена:

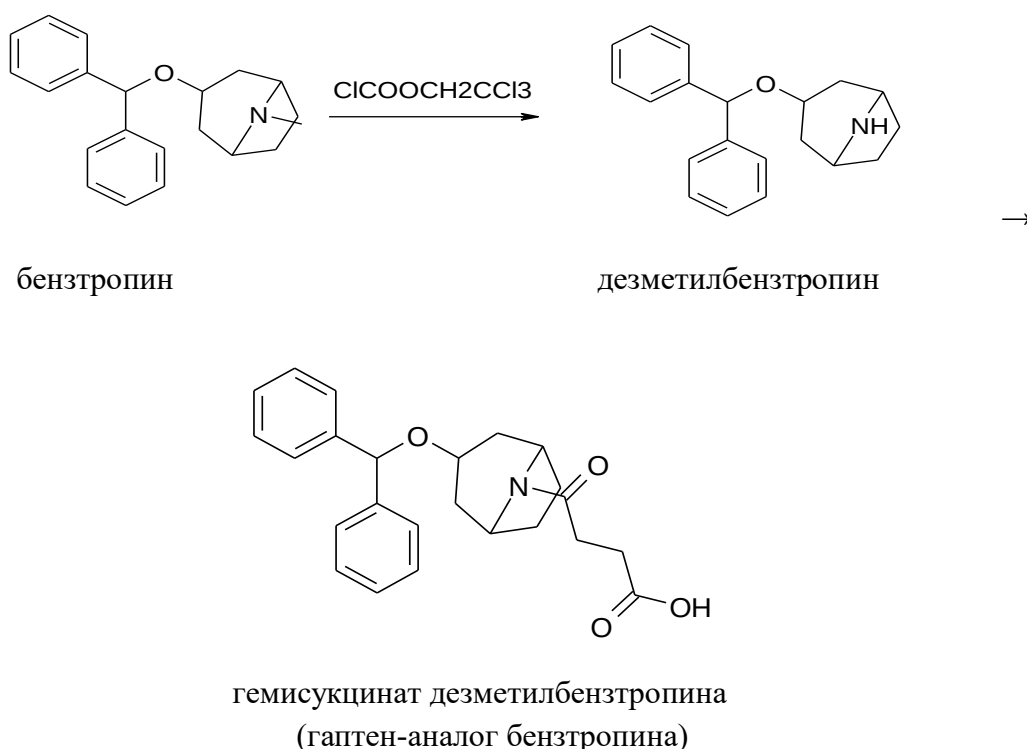


Конъюгат этого гаптена-аналога тригексифенидила с бычьим тироглобулином был получен методом смешанных ангидридов:



С кроличьими поликлональными сыворотками, полученными при активной иммунизации этим конъюгатом, был разработан метод RIA, который позволял количественно определять 7,8 пг тригексифенидила в 0,2 мл плазмы человека. Метод RIA имел минимальную перекрестную специфичность к основным метаболитам тригексифенидила, таким как N-оксид тригексифенидила (2%), гидрокситригексифенидил (1%) и антипсихотическим препаратам: флуфеназину (<1%) и флупентиксолу (<1 %) [22].

При получении гаптен-аналогов таких синтетических холиноблокаторов, как бензтропин, пирензепин и глипин была реализована также методология синтеза гаптен-аналогов целевых ПАВ путем получения их гемисукцинатных производных. Так, при синтезе гаптена-аналога бензтропина, представляющего собой простой эфир тропина и бензгидрола, сначала бензтропин деметилируют с помощью 2,2,2-трихлорэтилхлорформата, а затем полученный таким образом дезметилбензтропин ацилируют янтарным ангидридом, получая соответствующий гемисукцинат [23]:

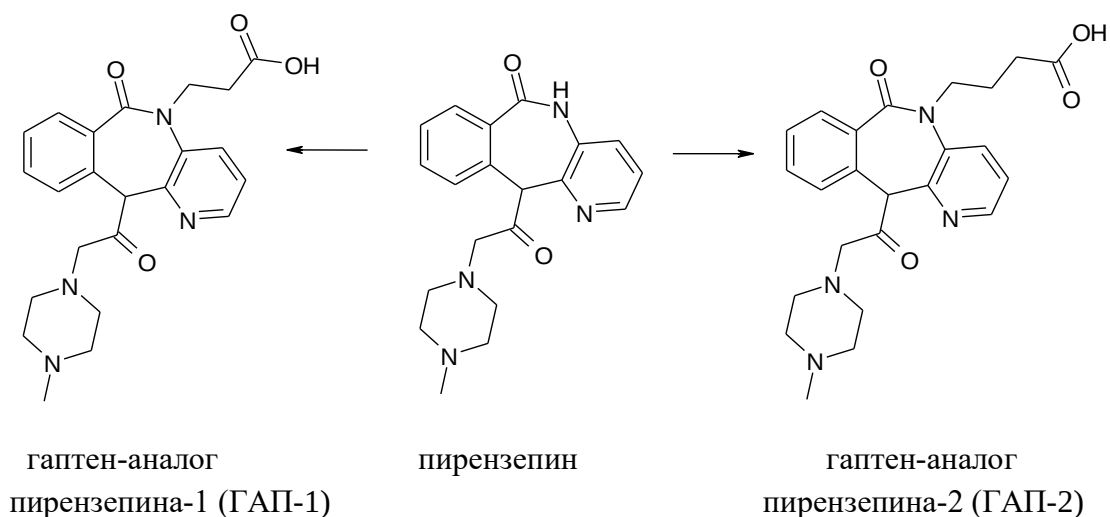


Гемисукцинат дезметилбензтропина можно конъюгировать с белком карбодиимидным методом. Синтезированный таким образом конъюгированный антиген с этим гаптен-аналогом оказался пригоден для получения антител со специфичностью к бензтропину [23].

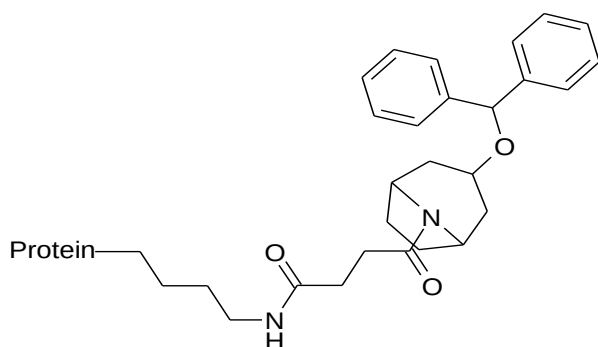
С кроличьими поликлональными сыворотками, полученными при активной иммунизации конъюгатом с этим гаптен-аналогом, был разработан специфичный и чувствительный метод RIA. Метод РИА применяли при анализе образцов плазмы от пациентов, проходящих лечение бензтропином [23]. Образцы сывороток в RIA практически не имели перекрестной реактивности с другими ПАВ. Так, перекрестная реактивность референс-сыворотки в RIA с N-дезметилбензтропином составила 4%, а с нейролептиками – флуфеназином, флупентиксолом, хлорпромазином и галоперидолом была минимальной (для всех ПАВ <1%). Метод RIA позволял количественно определять бензтропин в плазме в

диапазоне концентраций от 0,156 до 100 нг/мл со средним коэффициентом вариации < 6%. Для проведения анализа, было достаточно образца плазмы объемом 0,2 мл.

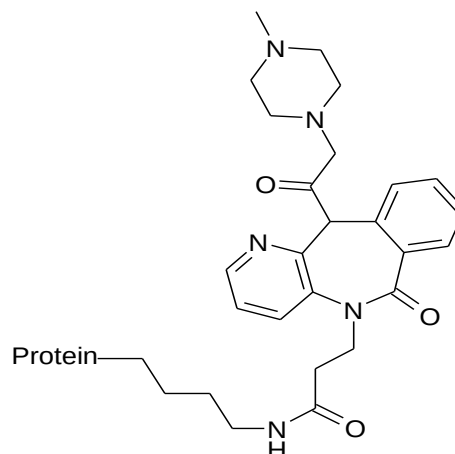
Гаптены-аналоги селективного M1-холиноблокатора пирензепина, конъюгированные антигены с гаптенными эпитопами этого соединения и специфичные антитела для использования в методах иммунохимического анализа получали, применяя методы синтеза гаптен-аналогов, сходные с теми, что были использованы в случае бензтропина [24].



Ковалентное связывание с белковыми носителями гаптен-аналогов пирензепина (пирензепин-5-N-пропионат /ГАП-1/ и пирензепин-5-N-бутират /ГАП-2/), отличающихся только длиной боковой цепи и стерическим расположением реакционноспособной карбоксильной группы, проводили аналогично конъюгированию гаптена-аналога бензтропина (т.е. с помощью водорастворимого карбодимида). В итоге были получены белковые конъюгаты (в качестве белковых носителей использовали HSA, BSA и эдестин) обоих гаптен-аналогов: пирензепин-5-N-пропионат-протеин и пирензепин-5-N-бутират-протеин с такой же структурой места связи гаптенного эпитопа с молекулой носителя, как и в случае конъюгата с гаптен-аналогом бензтропина:



конъюгат с гаптеном-аналогом
бензтропина

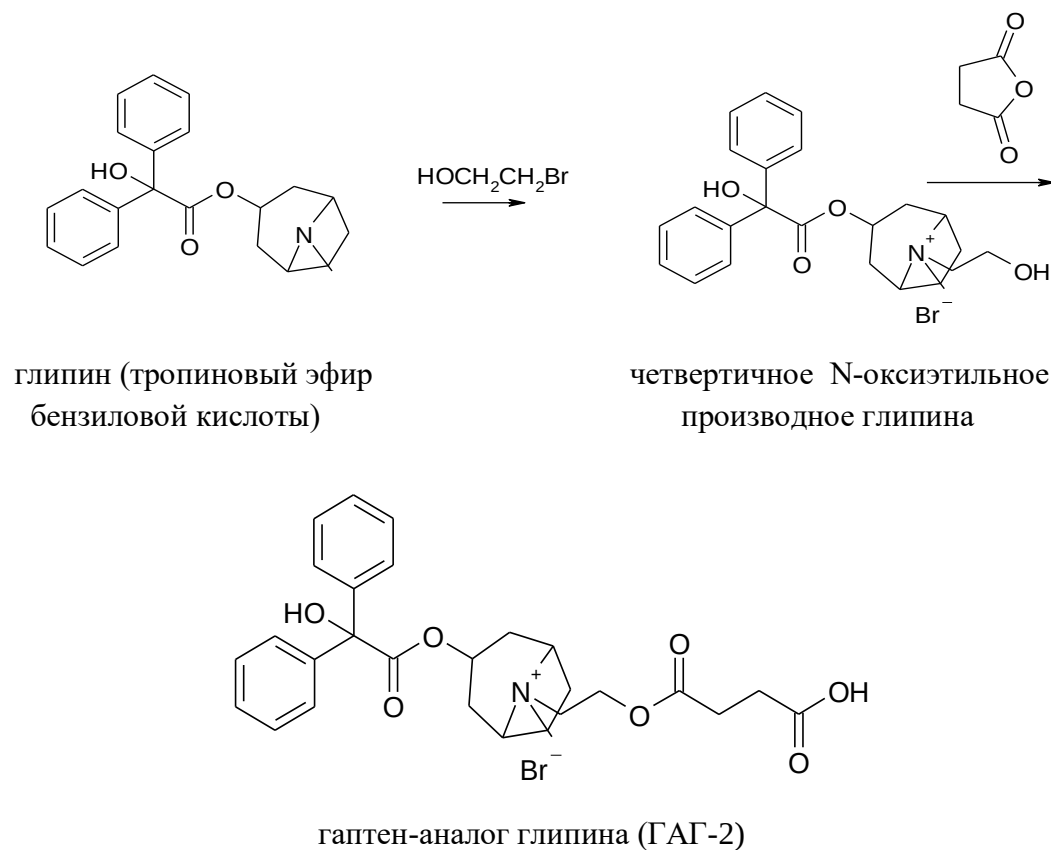


один из конъюгатов с гаптеном-аналогом
пирензепина

Путем слияния миеломной линии X63-Ag8.653 с клетками селезенки мышей BALB/c, иммунизированных конъюгатами пирензепин-5-N-пропионат (ГАП-1)-белок, были получены моноклональные антитела (MAb) со специфичностью к пирензепину. Из трех использованных для получения конъюгатов с гаптенами-аналогами пирензепина белков-носителей гаптенных эпитопов: HSA, BSA и эдестина оптимальные характеристики гуморального иммунного ответа (титры и аффинность MAb) были достигнуты при использовании HSA в качестве белка-носителя.

С моноклональными антителами, специфичными к конъюгату пирензепин-5-N-пропионат-HSA, и пирензепином, меченным тритием, был разработан конкурентный твердофазный метод RIA [24]. Пределы обнаружения пирензепина разработанным методом RIA составили 0,25 нг/мл в плазме и 4 нг/мл в моче. Для анализа требовалось наличие образца объемом 0,1 мл. При проведении анализа коэффициент вариации составил 4%. При определении пирензепина в плазме наблюдалась отличная корреляция между разработанным методом РИА с моноклональными антителами и использовавшимся до этого методом РИА с поликлональными сыворотками ($n = 106$, $r = 0,994$), а при определении пирензепина в моче между разработанным методом РИА с моноклональными антителами и использовавшимся до этого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) ($n = 82$, $r = 0,998$).

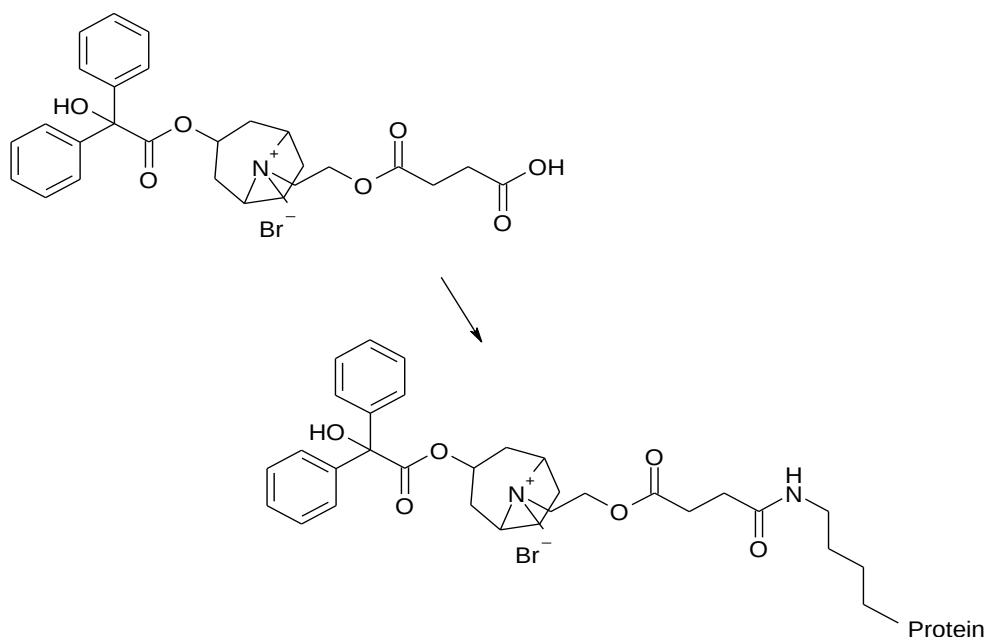
При получении гаптена-аналога глипина в исследованиях, проведенных на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, была осуществлена модификацию молекулы исходного соединения через азот тропинового фрагмента глипина [25]. При этом была реализована следующая схема синтеза гаптена-аналога глипина:



При синтезе этого гаптена-аналога основание глипина сначала кватернизируют 2-бромэтанолом. Четвертичное N-β-оксиэтильное производное глипина, полученное таким образом, затем обрабатывают янтарным ангидридом, получая гемисукцинат глипина, в котором реакционноспособная карбоксильная группа введена в молекулу исходного соединения через третичный азот тропинового фрагмента глипина.

Следует заметить, что описанный способ получения гаптена-аналога глипина путем синтеза его гемисукцината с кватернизацией третичного азота исходного соединения на первом этапе синтеза и образованием его четвертичного N-β-оксиэтильного производного является достаточно универсальным и подходит для синтеза гаптен-аналогов многих биологически активных соединений, в составе молекулы которых имеется третичный азот [26].

Конъюгирование гемисукцинатных гаптен-аналогов целевых соединений (в частности, глипина) с белковыми носителями может быть проведено любым универсальным способом (например, карбодиимидным методом или методом смешанных ангидридов):

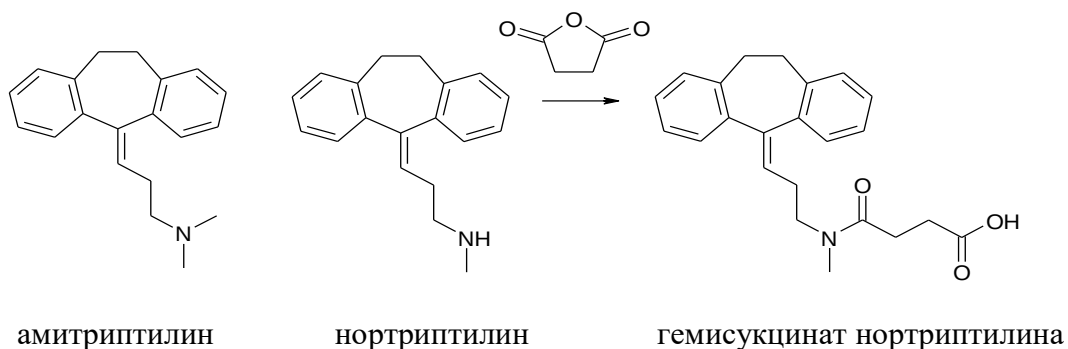


конъюгат гаптена-аналога глипина (ГАГ-2) с белком

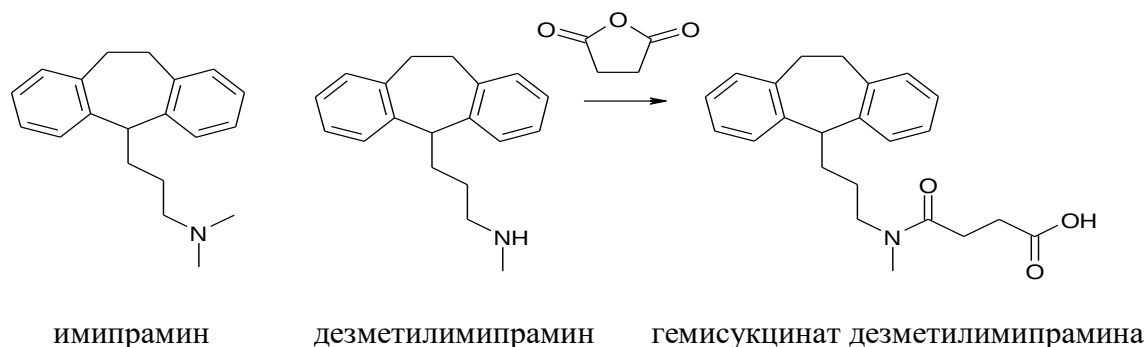
Оказалось, что полученный конъюгированный антиген с гаптен-аналогом глипина такой молекулярной структуры пригоден для получения антител со специфичностью к глипину [25].

Моделирование структуры гаптен-аналогов трициклических антидепрессантов. Достаточной обширной группой веществ, к которым возможно формирование болезненной зависимости и которые в значительных дозах способны вызывать нарушение сознания с развитием делириозного состояния являются трициклические антидепрессанты. В научной литературе имеется огромное количество информации по синтезу гаптен-аналогов этих соединений с целью получения специфических антител.

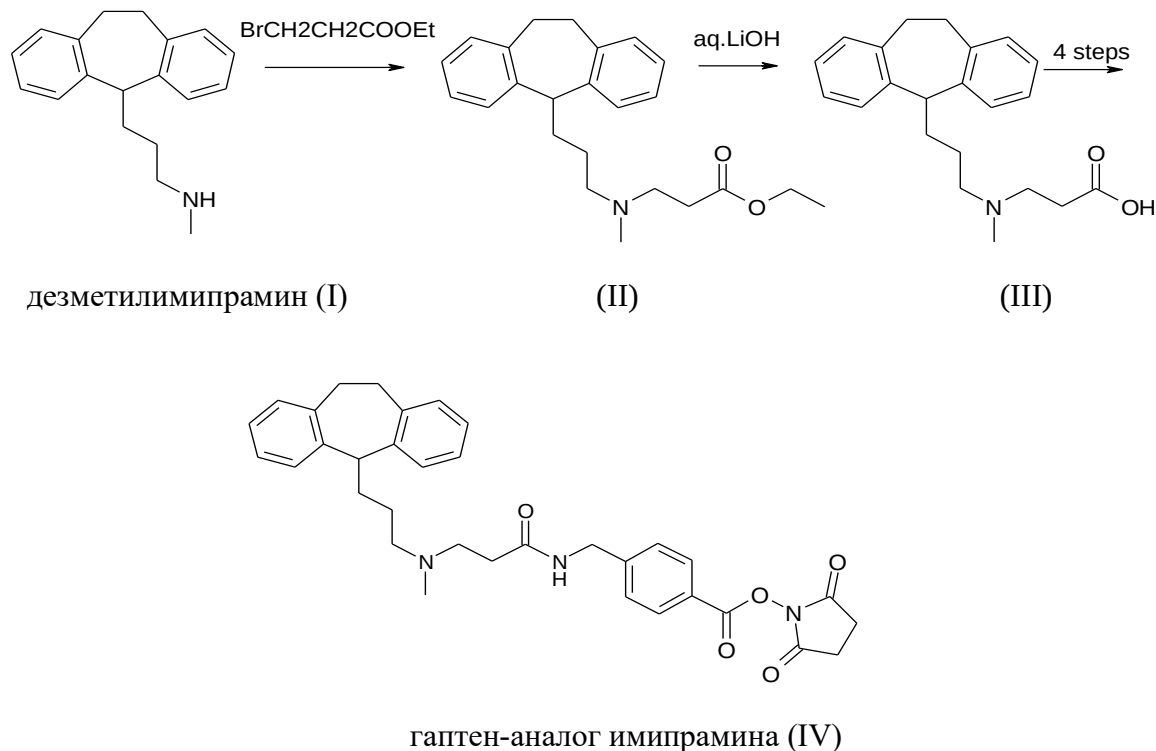
Так, при получении конъюгатов амитриптилина и нортриптилина последний превращали в соответствующий гемисукцинат [27]:



Гаптен-аналог имипрамина также получали, синтезируя гемисукцинатное производное [28]:

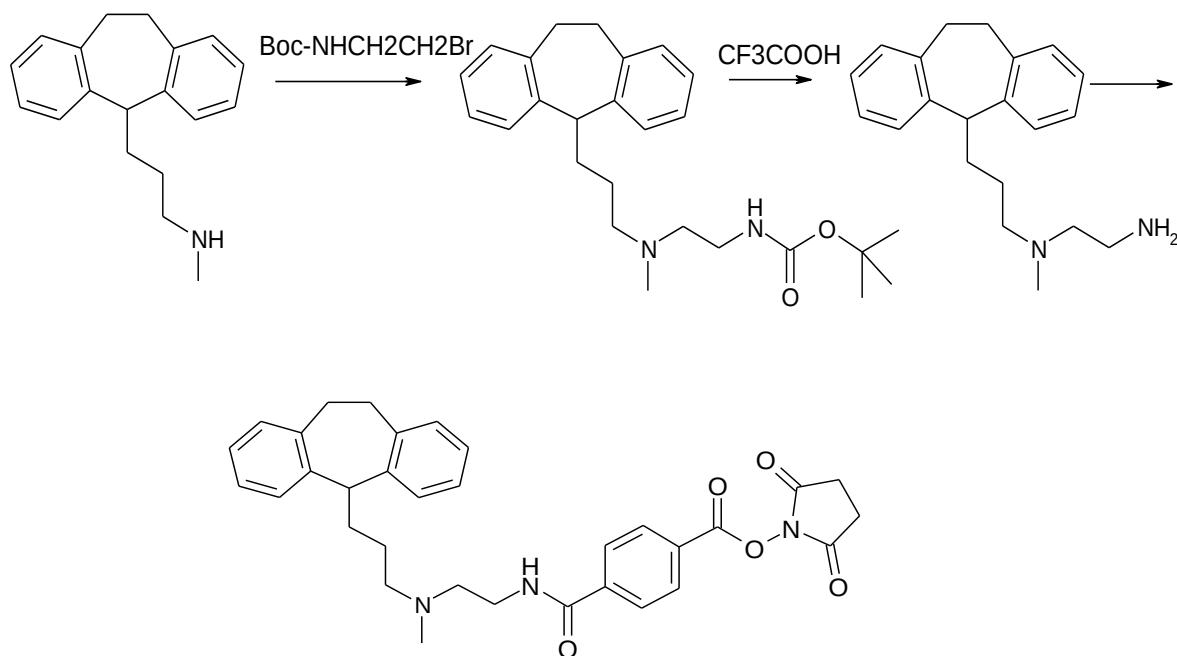


В работах [29, 30] описаны разнообразные методы синтеза других гаптен-аналогов имипрамина как по алифатическому, так и по ароматическому фрагментам молекулы:



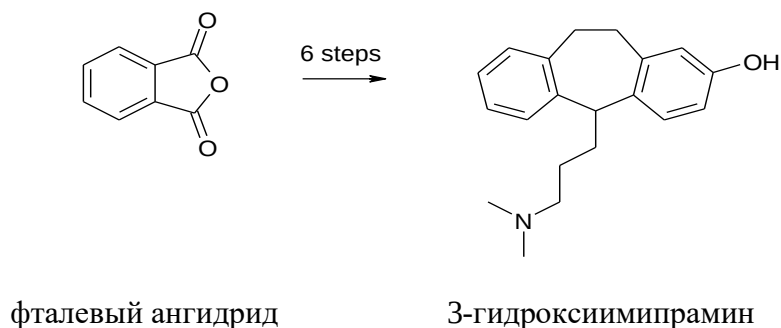
В процессе синтеза гаптена-аналога имипрамина дезметилимипрамин (соединение I) [химические вещества нумеруются римскими цифрами по порядку их следования в каждой из далее описываемых фармакологических групп ПАВ] алкилируют этил 3-бромпропионатом, полученный сложный эфир (соединение II) гидролизуют до кислоты (III). Дезметилимипрамин-N-пропионовую кислоту (соединение III) превращают в ее амид с метиловым эфиром 4-аминометилбензойной кислоты, последний гидролизуют до соответствующей кислоты, которая в реакции с гидроксисукцинимидом и дает представленный гаптен-аналог имипрамина (соединение IV).

Другой вариант модификации дезметилимипрамина с целью получения гаптена-аналога имипрамина (соединение V) заключается в его алкилировании Вос-2-бромэтиламином с последующим снятием Вос-защиты и реакцией с бис-(N-гидроксисукцинил) терефталатом:



гаптен-аналог имипрамина (V)

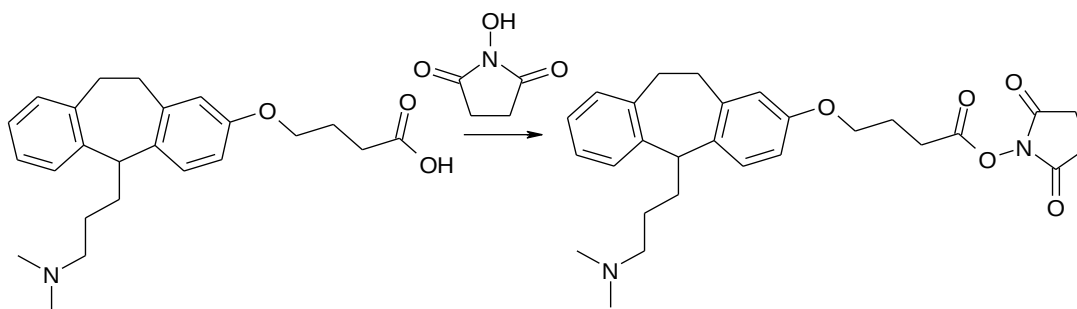
Самым интересным является описанный в уже упоминавшемся патенте [29] способ получения гаптена-аналога имипрамина (соединение VI) с «привязкой» по ароматическому фрагменту трицикла. Для этого сначала получают, исходя из фталевого ангидрида, последовательным синтезом в 6 стадий аналог имипрамина с гидроксильной группой в 3-положении ароматического кольца:



фталевый ангидрид

3-гидроксиимипрамин

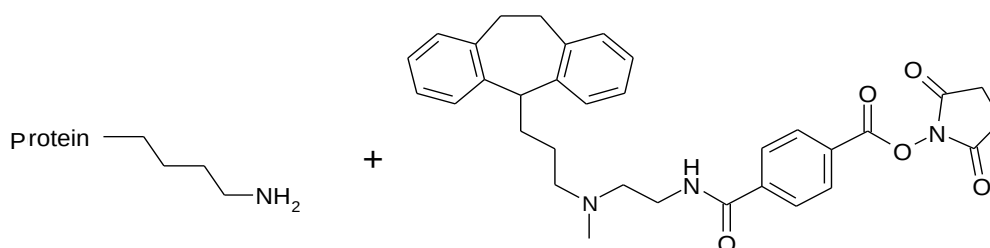
После чего 3-гидроксиимипрамин алкилируют по фенольной гидроксильной группе этил 4-бромбутиратом с последующим гидролизом полученного эфира до кислоты, а кислоту этерифицируют N-гидроксисукцинимидом.



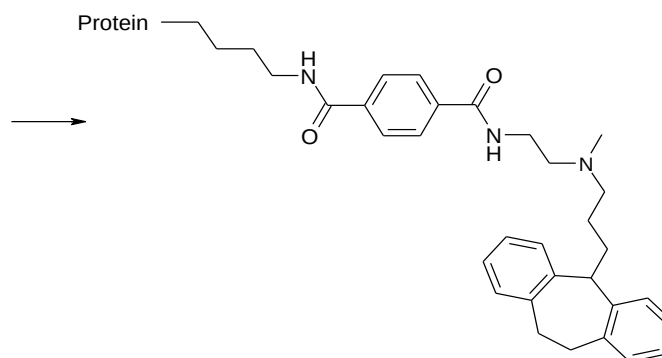
гаптен-аналог имипрамина (VI)

Синтезированный таким образом сложный эфир (соединение VI) затем используют в качестве гаптена-аналога имипрамина при получении конъюгированного антигена.

В случае получения конъюгированных антигенов с гаптенными эпитопами трициклических антидепрессантов методы конъюгирования их гаптен-аналогов с белками достаточно разнообразны. При получении конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами этих психотропов, наряду с карбодиимидным методом, были использованы также метод активированных эфиров и метод смешанных ангидридов. В частности, по результатам исследования было установлено [29], что гаптены-аналоги имипрамина в виде N-гидроксисукцинимидных эфиров, полученных описанными выше методами (соединения IV-VI), способны легко присоединяться к белкам в слабо щелочной среде:



гаптен-аналог имипрамина (V)



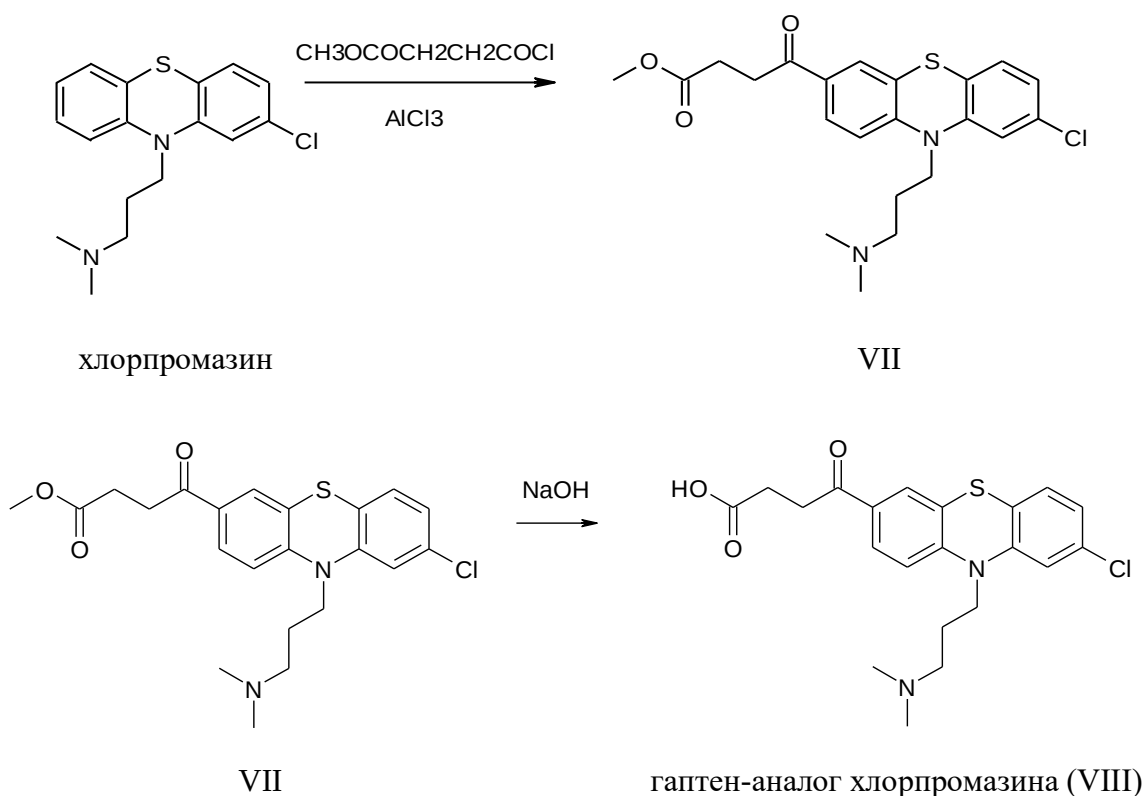
конъюгат гаптена-аналога имипрамина (V) с белком

При активной иммунизации кроликов конъюгатами с сукцинированными гаптенами-аналогами трициклических антидепрессантов были получены поликлональные сыворотки, с использованием которых разработали методы RIA, отличающиеся специфичностью и высокой чувствительностью [27-30]. Так, с кроличьими поликлональными сыворотками к нортриптилину, полученными путем иммунизации кроликов конъюгатом N-сукцинилнортриптилин-БСА, был разработан метод RIA определения амитриптилина и нортриптилина. В конкурентных методах RIA, используя имипрамин и сукцинилнортриптилин, меченные тритием, количественно тестировали уровни амитриптилина и нортриптилина в плазме крови пациентов вплоть до концентраций 2-3 нг/мл. Для анализа было необходимо 0,05 мл плазмы [27].

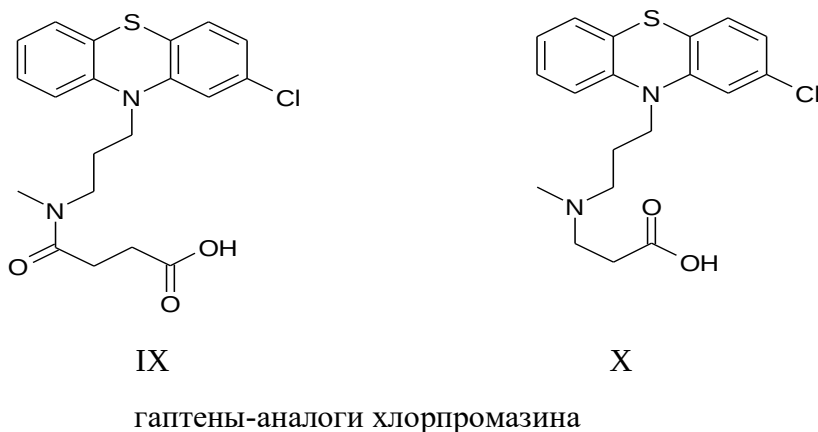
Моделирование структуры гаптенов-аналогов производных фенотиазина.

Антидепрессанты и нейролептики фенотиазинового ряда (хлорпромазин /аминазин/, флуфеназин, трифлуоперазин, этаперазин) в больших дозах активны как центральные М-холиноблокаторы, при длительном применении способны изменять сознание и вызывают болезненную зависимость.

Варианты получения гаптенов-аналогов производных фенотиазина широко представлены в научной литературе и разнообразны [31-35]. Так, с целью получения гаптена-аналога хлорпромазина предложено ацилировать это соединение по Фриделю-Крафтцу 3-метоксикарбонилпропионил хлоридом в присутствии хлористого алюминия:

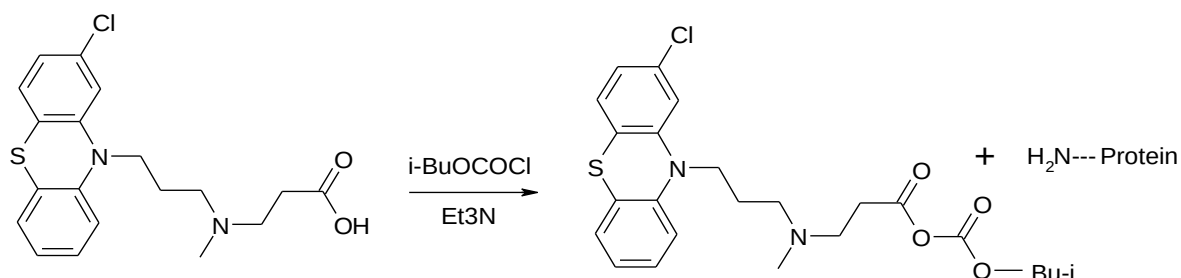


Полученный в результате этой реакции сложный эфир (соединение VII) затем гидролизуют щелочью до соответствующей кислоты (соединение VIII), которую и используют в качестве гаптена-аналога хлорпромазина [31]. В этом же исследовании было получено также два гаптена-аналога хлорпромазина (соединения IX и X) другой структуры, когда в качестве исходного химического соединения для синтеза гаптенов-аналогов брали дезметилхлорпромазин:

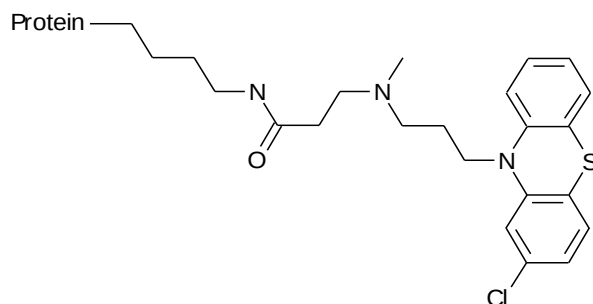


Один из полученных гаптенов-аналогов хлорпромазина (соединение IX) – это продукт реакции дезметилхлорпромазина с янтарным ангидридом, а другой гаптен-аналог (соединение X) – продукт взаимодействия этого же соединения с метилакрилатом и последующего его гидролиза до соответствующей кислоты.

В исследованиях [29-31] гаптены-аналоги нейролептиков фенотиазинового ряда: хлорпромазина, трифлуоперазина и флуфеназина были конъюгированы с белком методом смешанных ангидридов, например, применительно к гаптену-аналогу хлорпромазина (соединение X) конъюгирование осуществляли по следующей схеме:

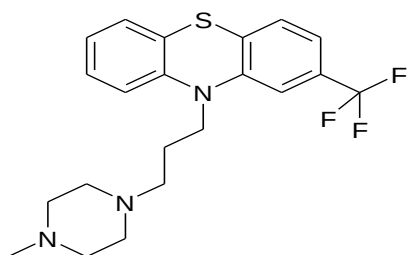


гаптен-аналог хлорпромазина (X)

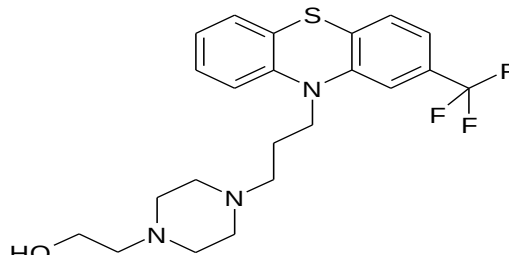


конъюгат гаптена-аналога хлорпромазина (X) с белком

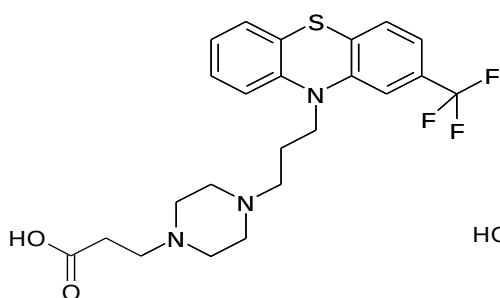
С целью получения конъюгированных антигенов, а затем и специфических антител к другим препаратам этого же ряда, имеющим много общего в химической структуре – трифлуоперазину (трифтазину) и флуфеназину, были получены их гаптены-аналоги (соединения XI, XII) структура которых практически идентична, а различие заключается лишь в длине молекулярной «ножки», предназначенной для связи с макромолекулярным носителем:



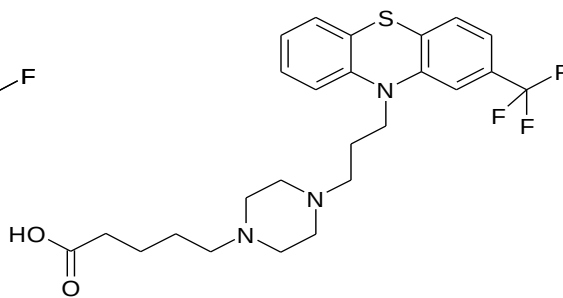
трифлуоперазин (трифтазин)



флуфеназин



XI



XII

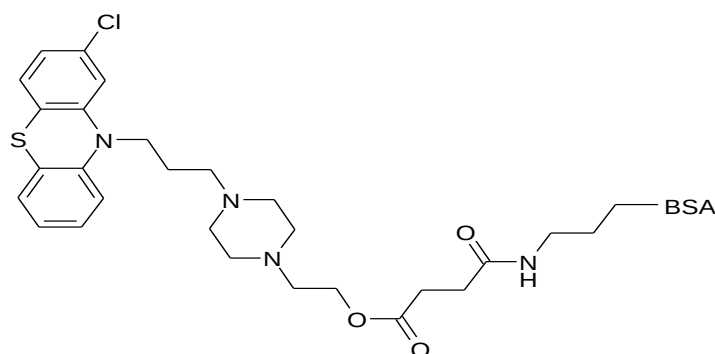
гаптены-аналоги трифлуоперазина (XI) и флуфеназина (XII)

Оба гаптена-аналога этих трициклических антидепрессантов фенотиазинового ряда синтезировали, используя реакции 10-(3-хлорпропил)-2-трифторметилфенотиазина с соответствующими карбометоксикалкил-замещенными пиперазинами с последующим гидролизом полученных продуктов до соответствующих кислот [32, 33].

Гаптены-аналоги хлорпромазина, трифлуоперазина и флуфеназина могут быть конъюгированы с белками разными методами [29-34], однако чаще, чем другие методы химического конъюгирования, используется метод смешанных ангидридов (принцип этого метода описан выше на примере гаптена-аналога хлорпромазина (соединение X), а также при получении конъюгированного антигена с использованием в качестве гаптена-аналога гемисукцината атропина).

Применительно к этаперазину (за границей этот лекарственный препарат фигурирует под названием перфеназин /Perphenazine/), известно о разработке иммунохимических методов анализа перфеназина с использованием поликлональных специфичных антител [34, 35] Описан также метод иммуноферментного анализа, позволяющий количественно определять содержание различных производных фенотиазина в мясной продукции и кормах для животных [120], что свидетельствует о групповой специфичности метода в отношении различных производных фенотиазина.

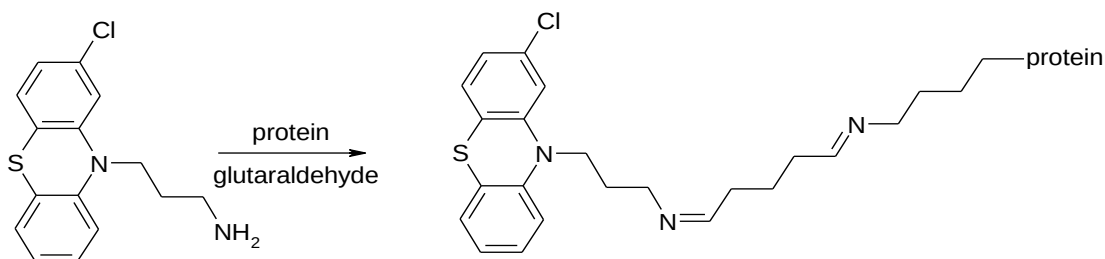
При получении специфических антител для радиоиммунного анализа перфеназина (этаперазина) был синтезирован конъюгат гаптена-аналога перфеназина (использовали гемисукцинатное производное) с бычьим сывороточным альбумином (BSA) следующего строения:



конъюгат гаптена-аналога перфеназина
(гемисукцината этаперазина /XIII/) с белком

В этом конъюгате гаптенный эпитоп представлен сукцинилизированным производным перфеназина (соединение XIII).

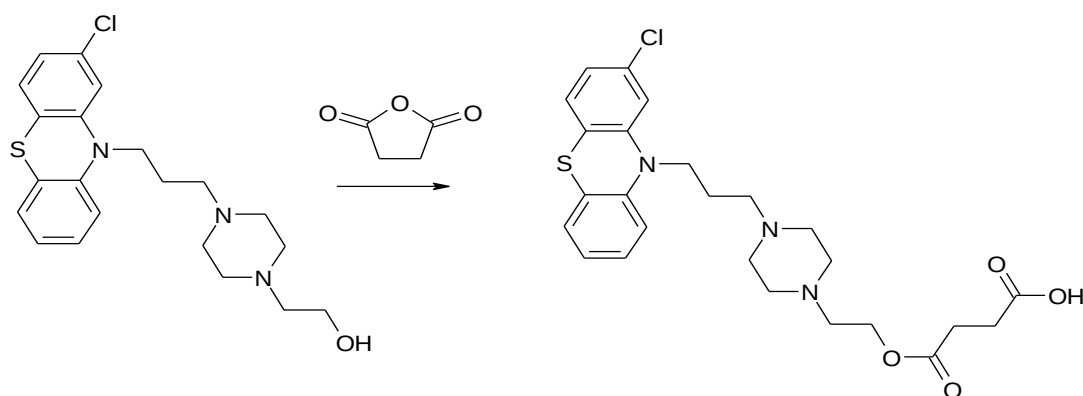
При разработке иммуноферментного метода анализа с групповой специфичностью к фенотиазиновым производным в качестве гаптена-аналога использовали производное фенотиазина с реакционноспособной аминогруппой (соединение XIV), которое конъюгировали с белком-носителем с помощью глутарового альдегида по следующей схеме, получая конъюгированный антиген с иной, чем приведенная выше, структурой гаптенного эпитопа:



конъюгат гаптена-аналога фенотиазина (XIV) с белком

Следует отметить, что полученные с помощью этого конъюгата моноклональные антитела имели выраженную перекрестную иммунохимическую специфичность к хлорпромазину, прометазину и перфеназину (этаперазину) – лекарственным препаратам, содержащим 2-хлорфенотиозиновый трицикл или же незамещенный фенотиазин. В то время, как перекрестная специфичность к ацепромазину и флуфеназину – лекарственным препаратам, содержащим 2-трифторметилфенотиозиновый трицикл, была низкой.

В исследованиях [35], проведенных на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, с целью получения конъюгированных антигенов и специфичных антител для их использования в методах иммунохимического анализа производных фенотиазина нами был воспроизведен способ синтеза гаптена-аналога перфеназина (этаперазина) путем сукцинирования этого соединения и предложены методы получения соответствующих конъюгированных антигенов и эритроцитарного диагностикума. В качестве гаптена аналога этаперазина (ГАЭ) использовали его гемисукцинат, который получали по следующей схеме:



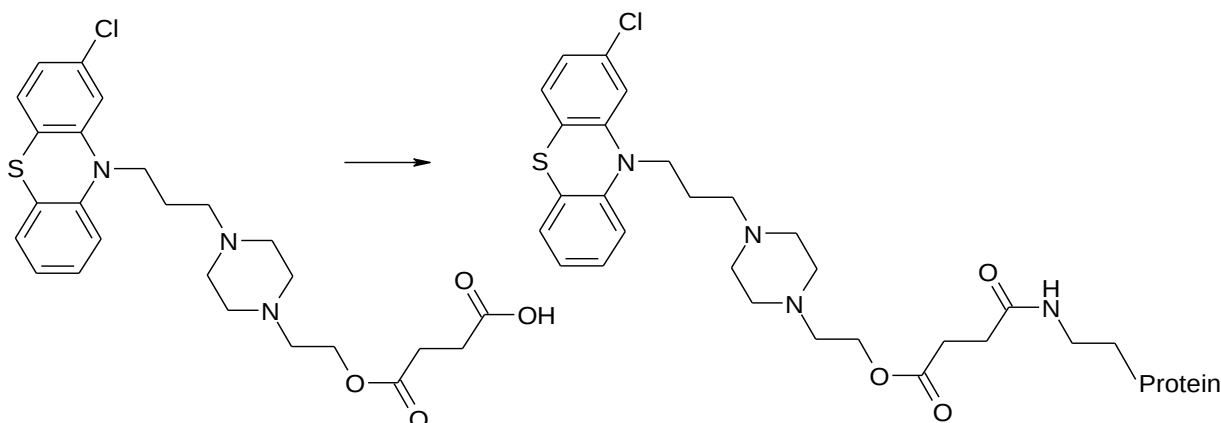
этаперазин

гаптен-аналог этаперазина (XIII)

Основание этаперазина в присутствии хлороформа и пиридина обрабатывают янтарным ангидридом при кипячении реакционной смеси. Затем реакционную массу промывают водой и экстрагируют 2N HCl. Кислый водный раствор испаряют в вакууме, и маслянистый остаток

перекристаллизируют из спирта, получая целевой продукт – гемисукцинат этаперазина (соединение XIII).

Гемисукцинат этаперазина конъюгировали с белками либо с помощью водорастворимого карбодиимида, либо по методу смешанных ангидридов, получая соответствующие конъюгированные антигены (оба метода описаны выше при получении конъюгированных антигенов с использованием гемисукцината атропина в качестве гаптена-аналога этого М-холиноблокатора):



гаптен-аналог этаперазина (XIII)

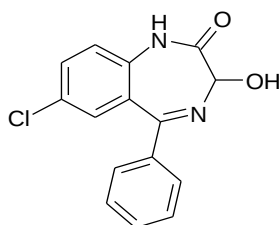
конъюгат гаптена-аналога
этаперазина (XIII) с белком

Конкурентный гомогенный метод иммуноферментного анализа с поликлональными кроличьими сыворотками и пероксидазой хрена, конъюгированной с гемисукцинатом этаперазина, позволял с высокой специфичностью определять этаперазин в сыворотке (плазме) крови в концентрации до 1 нг/мл [35]. Другие трициклические фенотиазиновые лекарственные препараты (фторацизин, хлорацизин, аминазин, левомепромазин, наохлазин, этмозин) со специфическими антителами в иммуноферментном методе не взаимодействовали. Для проведения анализа было достаточно 0,1 мл сыворотки или плазмы крови.

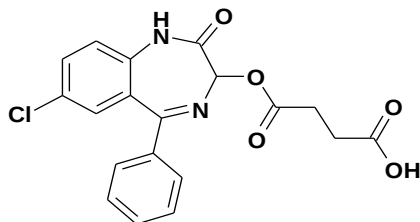
Моделирование структуры гаптен-аналогов производных бензодиазепинов.

Производные бензодиазепинов позиционируются как лекарственные препараты, обладающие высокой транквилизирующей активностью и гипнosedативными свойствами. Бензодиазепины, в частности производные 1,4-бензодиазепина, включая феназепам, способны оказывать также противосудорожное действие. При длительном приеме формируют пристрастие к их применению. Производные бензодиазепина находятся в лидирующей группе психоактивных препаратов по неконтрольному использованию путем самоназначения. При передозировках способны вызывать расстройства психики и нарушение сознания.

Для производных 1,4-бензодиазепаина в научной и патентной литературе имеется достаточное число примеров получения гаптен-аналогов и конъюгированных антигенов. Так, при разработке иммунохимических реагентов со специфичностью к оксазепаму в конъюгированном антигене в качестве гаптена-аналога оксазепам был использован его гемисукцинат [36]:

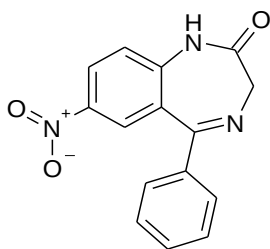


оксазепам

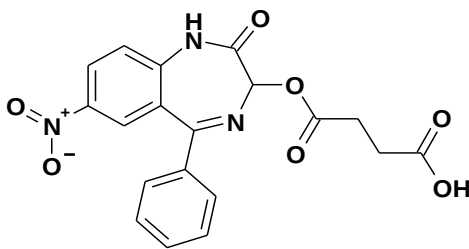


гаптен-аналог оксазепам

При получении антител со специфичностью к клоназепаму в качестве гаптена-аналога в белковом конъюгате для иммунизации также использовали гемисукцинат 3-гидроксипроизводного клоназепам, конъюгированный с БСА [37]:



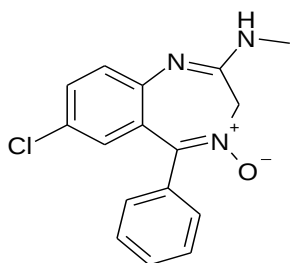
клоназепам



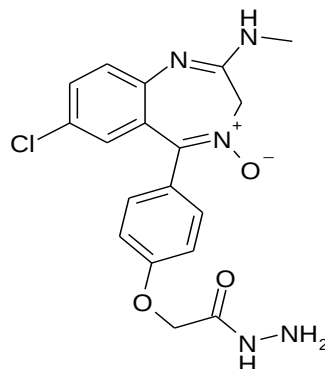
гаптен-аналог клоназепам

С кроличьими поликлональными сыворотками, полученными при активной иммунизации конъюгированным антигеном (3-гемисукцинилокси-производное клоназепам в качестве гаптена-аналога конъюгированное с БСА карбодиимидным методом) был разработан метод RIA. В конкурентном RIA с клоназепамом, меченным тритием, кроличьи сыворотки продемонстрировали высокую аффинность к клоназепаму. Метод RIA имел предел чувствительности определения клоназепам до 5 нг /мл при использовании образца плазмы объемом 0,1 мл. Антитела проявляли высокую степень специфичности к клоназепаму. Перекрестной реактивности антител не наблюдалось ни с метаболитами клоназепам – 7-амино- или 7-ацетиламиноклоназепамом, ни с рядом других широко назначаемых противосудорожных средств, которые могут применяться совместно с клоназепамом [37].

При разработке метода RIA определения хлордiazепоксид в биологических жидкостях [38] для иммунизации кроликов с целью получения поликлональных сывороток было использовано 5-(4-гидразинокарбонилметокси) фенильное производное хлордiazепоксид в качестве гаптена-аналога, конъюгированное с БСА:

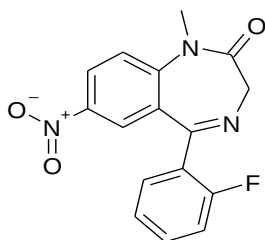


хлордiazепоксид

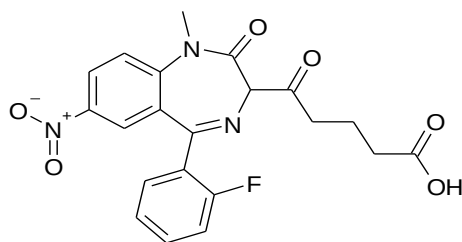


гаптен-аналог хлордiazепоксид

В исследовании, посвященном разработке иммунохимического метода определения флунизепема [39], при получении специфических антител был использован конъюгированный антиген, в котором в качестве гаптена-аналога выступал продукт ацилирования литиевой соли флунизепема глутаровым ангидридом в положении 3:



флунизепем

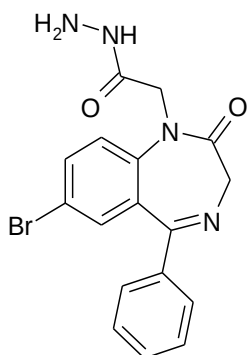


гаптен-аналог флунизепема

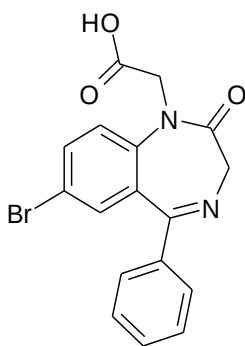
В разработанном с поликлональными кроличьими сыворотками гетерогенном конкурентном методе RIA флунизепема специфичные к гаптенному эпитопу антитела показали высокую иммунохимическую специфичность, надежно определяли флунизепем в биожидкостях и практически не проявляли перекрестной реактивности с родственными 1,4-бензодиазепинами.

При разработке иммуноферментного метода анализа гидазепама в составе конъюгированных антигенов в качестве гаптен-аналогов были использованы: гидазепам,

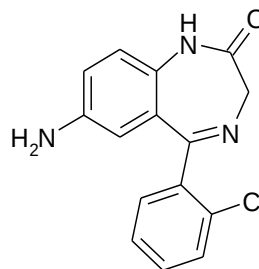
метаболит гидазепама и химическое соединение, представляющее собой восстановленный клоназепам [40]:



гидазепам



метаболит гидазепама

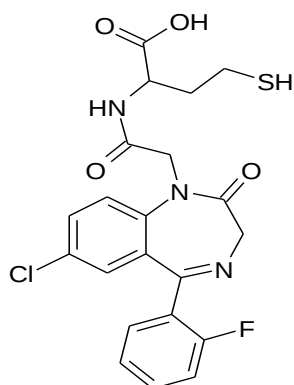
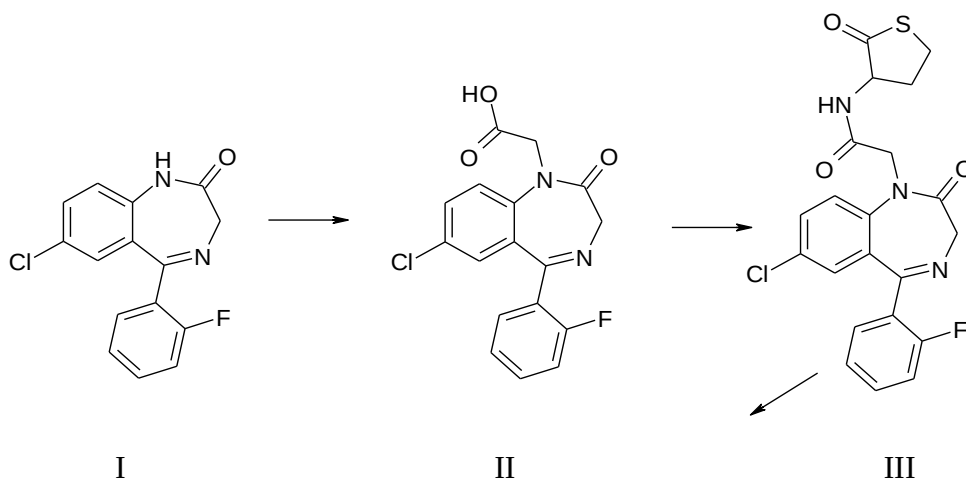


восстановленный клоназепам

Использованные при разработке метода поликлональные сыворотки обладали целевой специфичностью в иммуноферментном анализе.

Наконец, сутью технического решения, на которое получен патент [41], является способ модификации 1,4-бензодиазепин-2-онов для использования полученных соединений в качестве гаптен-аналогов конъюгированных антигенов. В соответствии с предлагаемым техническим решением

N-дезалкилфлуразепам (соединение I) превращают в N1-дезалкилфлуразепамуксусную кислоту (соединение II). Эту кислоту реакцией с DL-гомоцистеин тиолактоном в присутствии карбодиимида переводят в амид (соединение III), который в условиях мягкого щелочного гидролиза дает конечный продукт – N-(цистеин)ацетамид-флуразепам (соединение IV – гаптен-аналог флуразепама). Наличие двух функциональных ионогенных групп в молекуле гаптена-аналога (карбоксильной и тиольной), во-первых, позволяет разнообразить возможности конъюгирования гаптена-аналога с высокомолекулярным носителем, а, во-вторых, резко увеличивает его гидрофильность, что в случае липофильных 1,4-бензодиазепин-2-онов имеет большое значение.



гаптен-аналог флуразепама (IV)

Аналогичная модификация исходного соединения с целью получения его гаптена-аналога была выполнена для лорметазапама по положению 3 [41]:

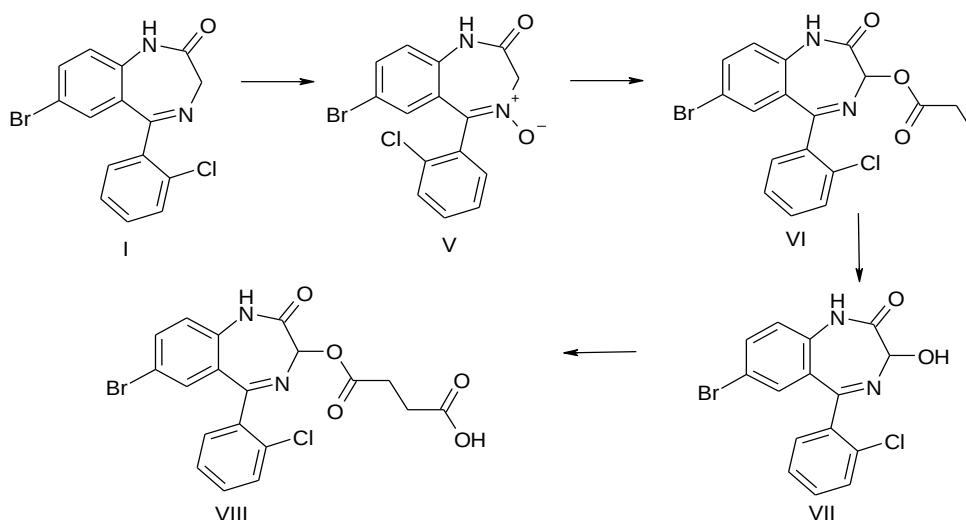


Приведенные выше варианты моделирования структуры производных бензодиазепина как целевых соединений с получением их гаптенов-аналогов для их последующего использования в качестве гаптенных эпитопов соответствующих конъюгированных антигенов свидетельствуют, что при получении гаптенов-аналогов этих лекарственных препаратов

молекула бензодиазепина обычно подвергается химической модификации по положениям 1 или 3.

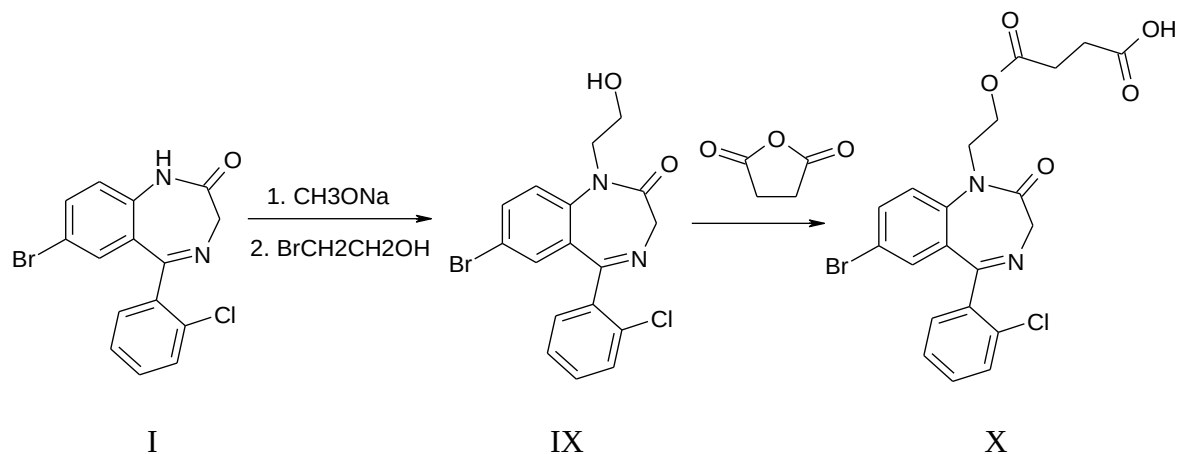
С целью получения гаптена аналога феназепама в исследованиях, проведенных на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, был осуществлен ресинтез известного препарата циназепам, который представляет собой производное 1,4-бензодиазепин-2-онов [42].

Ресинтез был проведен по следующей схеме:



Феназепам (I) окисляют перекисью водорода в уксусной кислоте до его N-окиси (V). Полученную N-окись под действием ангидрида пропионовой кислоты переводят в 3-пропионилокси-производное (VI), которое гидролизуют *in situ* до 3-гидроксифеназепама (VII). Последний в реакции с янтарным ангидридом дает целевое соединение – гемисукцинат 3-гидрокси-7-бром-5-(2'-хлор)фенил -1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-он (VIII). Очевидно, что полученное соединение (VIII), являясь гемисукцинатным производным феназепама, может выступать как гаптен-аналог феназепама (ГАФ-2) при получении его конъюгатов с белками.

Для более полного моделирования специфичности антител в отношении молекулы феназепама в исследованиях, также проведенных на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России, был осуществлен синтез ещё одного производного 1,4-бензодиазепин-2-онов как гаптена-аналога феназепама по следующей схеме:



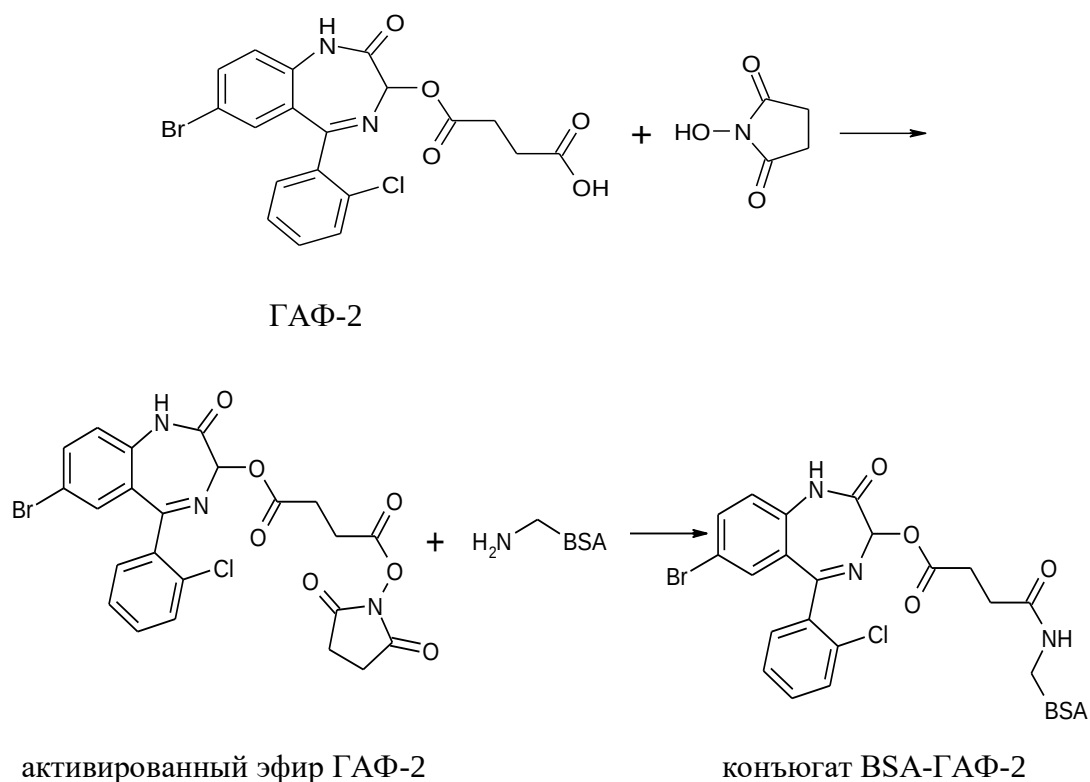
Этот гаптен-аналог феназепама синтезировали в две стадии: на первой феназепам (I) превращают в N-натриевую соль под действием метилата натрия в ДМФА, которую затем алкилируют 2-бромэтанолом, что приводит к получению N-гидроксиэтилфеназепама (IX). Последний в реакции с янтарным ангидридом даёт целевой продукт – гемисукцинат N-гидроксиэтилфеназепама (X), который при получении конъюгированных антигенов также может использоваться как гаптен-аналог феназепама (ГАФ-3), отличающийся иным (чем у гаптена-аналога ГАФ-2) расположением введенной карбоксильной группы в молекуле, а, соответственно, и иной иммунохимической специфичностью гаптенного эпитопа в составе конъюгированного антигена.

Рассмотрение структуры полученных гаптен-аналогов феназепама позволяет заключить, что оба полученных гаптена-аналога являются гемисукцинатными производными и имеют реакционноспособную карбоксильную группу, через которую их можно конъюгировать с белком или другим макромолекулярным носителем, содержащим функциональные группы. В этих гаптенах-аналогах феназепама карбоксильная функциональная группа введена в разные положения молекулы, что расширяет возможности моделирования специфичности антител, которые получают при иммунизации соответствующими конъюгированными антигенами. Применительно к белковым носителям конъюгирование полученных гаптен-аналогов феназепама, содержащих карбоксильную группу, возможно через аминокислотные группы белков с использованием любого из известных методов: карбодиимидного, активированных эфиров или смешанных ангидридов [5].

В процессе выполнения исследований по получению конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами производных 1,4-бензодиазепина содержащие реакционноспособную карбоксильную группу гаптены-аналоги феназепама (ГАФ-2 и ГАФ-3) были нами конъюгированы с двумя широко используемыми высокомолекулярными носителями – БСА

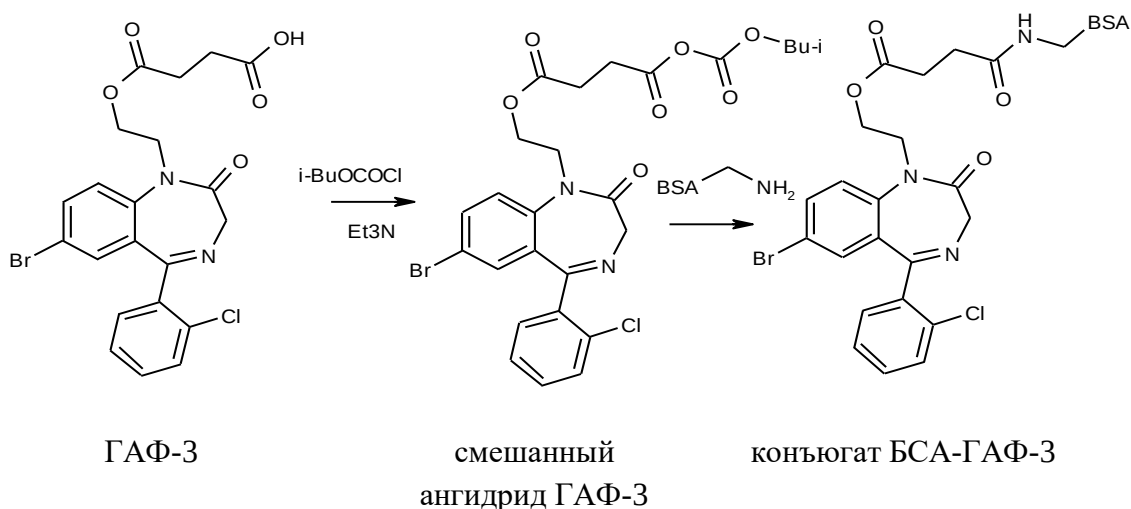
(BSA) и человеческим иммуноглобулином (ЧИГ /HIG/). Конъюгирование проводили двумя разными способами – методом активированных эфиров и методом смешанных ангидридов. Схематически реакции конъюгирования можно представить следующим образом:

Получение конъюгата BSA-гаптен-аналог феназепама (ГАФ-2) методом активированных эфиров:



В соответствии с представленной схемой, гемисукцинат 3-гидрокси-7-бром-5-(2'-хлор) фенил-1,2 дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин (гаптен-аналог феназепама ГАФ-2) при получении антигена конъюгировали с БСА. При этом сначала гаптен-аналог феназепама ГАФ-2 в реакции с N-гидроксисукцинимидом с помощью водорастворимого карбодиимида превращали в активированный эфир. Затем полученный активированный эфир добавляли при рН 9,5 к раствору белка в карбонатном буфере, получая соответствующий конъюгированный антиген.

Получение конъюгата BSA-гаптен-аналог феназепама (ГАФ-3) методом смешанных ангидридов:



В соответствии с представленной схемой, гемисукцинат N-гидроксиэтилфеназепама (гаптен-аналог феназепама ГАФ-3) конъюгировали с БСА. При этом, сначала под действием изобутилхлорформиата в присутствии триэтиламина гаптен-аналог феназепама ГАФ-3 превращали в его смешанный ангидрид, который затем добавляли к раствору белка в щелочной среде, что приводило к получению целевого конъюгата БСА-ГАФ-3.

Аналогичным образом оба синтезированных гаптена-аналога феназепама были конъюгированы с ЧИГ.

Следует подчеркнуть, что конъюгаты, полученные разными методами конъюгирования, имеют одинаковую структуру участка связи гаптенного эпитопа с белком, так как оба гаптена-аналога являются гемисукцинатными производными и присоединение гаптен-аналогов идет по свободным аминогруппам белка.

Ранее на примере гемисукцината-атропина в качестве гаптена-аналога было показано, что наиболее эффективным методом активации карбоксильной группы при конъюгировании подобных гаптен-аналогов с белковыми носителями (помимо карбодимидного метода) является именно метод смешанных ангидридов.

Как продемонстрировано выше на примерах гаптен-аналогов фенотиазиновых (этаперазин), 1,4-бензодиазепиновых (феназепама) психоактивных соединений и холинолитиков-психодислептиков (атропин, глипин) способы введения карбоксильной группы в молекулу гаптен-аналогов целевых ПАВ могут быть достаточно разнообразными, однако для большинства этих способов характерна определенная универсальность (например, посредством синтеза гемисукцинатных производных целевых ПАВ). При последующем получении конъюгированных антигенов с использованием любого из известных методов

конъюгирования: карбодиимидного, активированных эфиров или смешанных ангидридов свободная карбоксильная группа гемисукцинатных производных ПАВ будет реагировать с белками через их аминогруппы [6, 8].

Следует также отметить, что все известные методы присоединения гаптен-аналогов лекарственных соединений (включая ПАВ) к белковым макромолекулярным носителям с использованием для осуществления химической конъюгации с белком изначально имеющейся или же введенной в состав гаптен-аналогов карбоксильной группы позволяют получать конъюгированные антигены с одинаковой химической структурой по месту ковалентной связи гаптена-аналога с белковым носителем. Эту структуру формирует амидная (пептидная) связь между карбоксильной группой гаптена-аналога и первичными аминогруппами белка [2, 5].

При проведении исследований по получению конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами феназепама дополнительно, ориентируясь на критерий достижения максимальной эпитопной плотности гаптенного эпитопа на молекуле носителя, оценивали эффективность перечисленных методов ковалентного связывания полученных гаптен-аналогов феназепама с БСА (м.м. ~ 69000 D) (производитель «Acros Organic», Бельгия) и ЧИГ (м.м. ~ 153000 D) (препарат «Иммуновенин» – иммуноглобулин человека нормальный, производитель ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России).

Данные, представленные в таблице 1, иллюстрируют эффективность двух часто используемых методов конъюгирования содержащих карбоксильную группу гаптен-аналогов феназепама с носителем при равных (в обоих методах) молярных отношениях вводимых в реакцию реагентов.

Таблица 1

Эффективность методов получения конъюгатов гаптен-аналогов феназепама по критерию числа гаптенных эпитопов на носителе – эпитопной плотности гаптена

Конъюгат (исходное молярное соотношение носитель/гаптен при конъюгации)	Использованный метод конъюгирования	Эпитопная плотность гаптена *
БСА - ГАФ-2 (1:30)	метод активированных эфиров	5
БСА - ГАФ-2 (1:30)	метод смешанных ангидридов	15
БСА - ГАФ-3 (1:30)	метод активированных эфиров	4
БСА - ГАФ-3 (1:30)	метод смешанных ангидридов	13
БСА - ГАФ-3 (1:60)	метод смешанных ангидридов	18
ЧИГ - ГАФ-2 (1:30)	метод активированных эфиров	4
ЧИГ - ГАФ-2 (1:30)	метод смешанных ангидридов	11
ЧИГ - ГАФ-3 (1:30)	метод активированных эфиров	4
ЧИГ - ГАФ-3 (1:30)	метод смешанных ангидридов	6
ЧИГ - ГАФ-3 (1:60)	метод смешанных ангидридов	9

*Примечание: * - эпитопную плотность гаптена на носителе определяли методом УФ-спектрометрии.*

Видно, что по критерию достижения максимальной эпитопной плотности гаптена на носителе при одинаковых значениях молярного избытка гаптена-аналога, вводимого в реакцию конъюгирования с носителем, наиболее эффективным методом конъюгирования для гаптенных с карбоксильной группой является метод смешанных ангидридов. Этот метод позволяет достигать большей эпитопной плотности, чем метод активированных эфиров. Сформулированное положение справедливо при использовании в качестве носителя как БСА, так и ЧИГ. Двухкратное увеличение молярного избытка гаптена при проведении реакции конъюгирования приводило лишь к 50% увеличению эпитопной плотности гаптена. В расчете на молекулярную массу носителя, достигнутое при использовании метода смешанных ангидридов значение эпитопной плотности гаптенного эпитопа для обоих гаптенных-аналогов феназепама соответствует обычно приводимым в специальной литературе значениям оптимальной эпитопной плотности – 15-20 гаптенных эпитопов на молекулу носителя (в расчете на молекулу БСА) [2-5].

Конструирование конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами других фармакологически активных и токсичных соединений: моделирование иммунодоминантности и специфичности гаптенных эпитопов

Помимо описанных выше подходов и алгоритмов получения гаптенных-аналогов синтетических психоактивных веществ и токсикантов сложной химической структуры, достаточно давно известны способы модификации относительно простых химических соединений с активностью экотоксикантов, которые могут расцениваться как универсальные химические технологии.

Моделирование структуры гаптенных-аналогов токсичных алифатических и ароматических соединений.

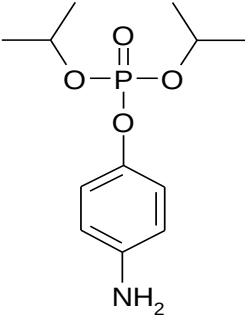
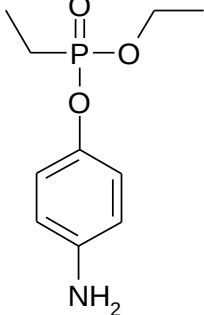
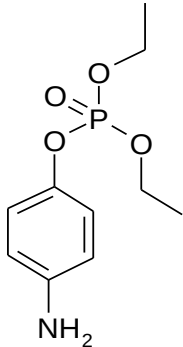
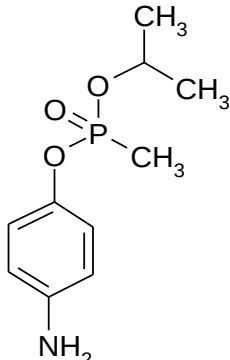
Для многих алифатических соединений классическим вариантом превращения этих соединений в гаптенные эпитопы, приобретающие после конъюгирования с белками иммунохимическую специфичность, является получение их п-аминофениловых эфиров (т.е. включение этих соединений в качестве боковых заместителей в фенольное кольцо в паре-положении по отношению к месту ковалентной связи замещенного фенильного радикала с носителем). Этим же путем обычно получают и гаптенные-аналоги относительно простых ароматических соединений, имеющих в своем составе бензольное кольцо и химические радикалы в разных положениях [2, 43, 44].

Получение гаптенных-аналогов обладающих нейротоксичностью фосфорорганических соединений (ФОС) как алифатических (диизопропилфторфосфат /ДФФ/, другие алифатические эфиры), так и ароматических (этиловый, п-нитрофениловый эфир этилфосфоновой кислоты /армин/, п-нитрофениловый эфир диэтилфосфорной кислоты /фосфакол/, другие ароматические

эфиры), путем синтеза химических производных этих соединений с аминогруппой в ароматическом фрагменте молекулы (т.е. их п-аминофениловых эфиров) является фактически безальтернативным универсальным подходом оптимизации структуры гаптен-аналогов ФОС с целью их последующего использования в качестве гаптенных эпитопов конъюгированных антигенов (таблица 2):

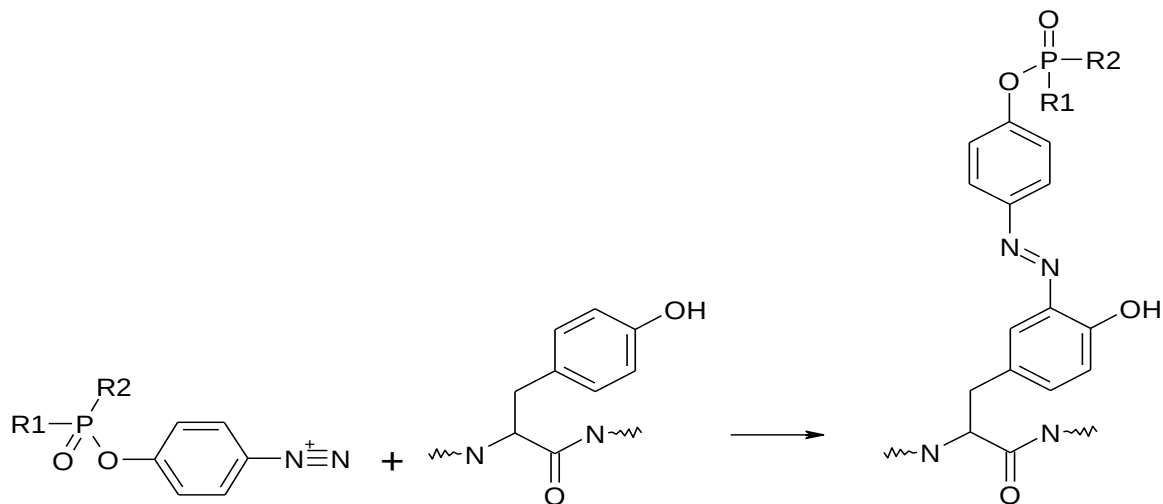
Таблица 2

**П-аминофениловые эфиры фосфорорганических соединений
в качестве гаптен-аналогов**

 4-аминофенилдиизопропилфосфат (гаптен-аналог ДФФ)	 4-аминофенилэтил-этилфосфонат (гаптен-аналог армина)
 4-аминофенилдиэтил фосфат (гаптен-аналог фосфакола)	 4-аминофенил изопропилметилфосфонат (гаптен-аналог ФОС)

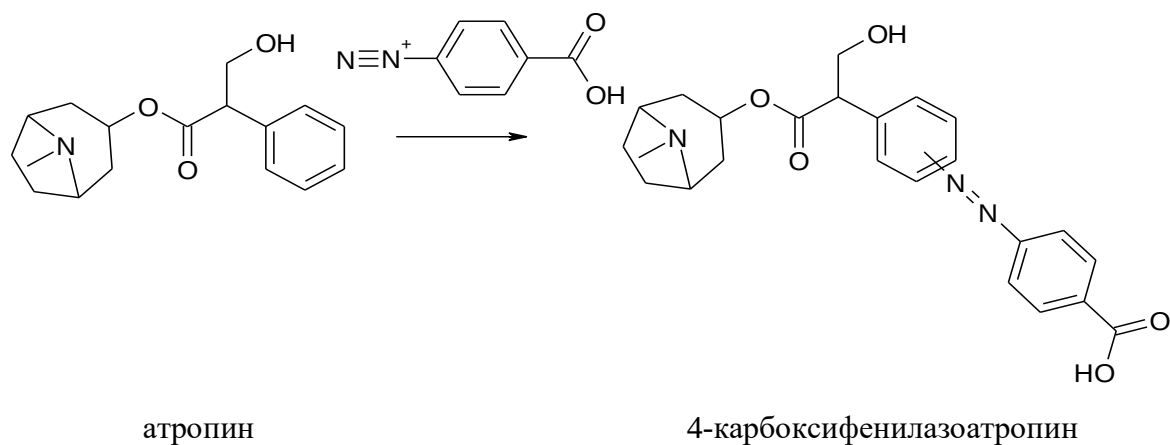
Подобные производные ФОС в виде 4-аминофениловых эфиров легко диазотируются под действием азотистой кислоты, и их diazonium соли [45] способны вступать в реакцию азосочетания с белками в щелочной среде при pH ~ 9,0. Реакция проходит преимущественно по гистидиновым, тирозиновым и триптофановым фрагментам соответствующих аминокислот белков. Так как остатки аминокислот, по которым осуществляется конъюгирование, структурно различны, то это создает неоднородность гаптенных эпитопов, что оказывает влияние на спектр специфичности получаемых конъюгированных антигенов как иммуногенов [2, 5, 43, 44].

Приводимая ниже схема в общем виде иллюстрирует реакцию азосочетания диазониевых солей подобных гаптенов-аналогов с белками по гистидиновым аминокислотным фрагментам белков и структуру образующихся в этом случае гаптенных эпитопов.



По причине сходства в структуре (наличие ароматической аминогруппы в получаемых гаптенах-аналогах ФОС / как и в гаптенах-аналогах прочих ароматических соединений/) также логично утверждение об идентичности способов достижения иммунодоминантности подобных гаптенных эпитопов в составе конъюгированных антигенов после их получения реакцией азосочетания с белками. Следует отметить, что в относительно недавно выполненных исследованиях при синтезе гаптенов-аналогов ФОС [46, 47] применен аналогичный подход к моделированию структуры гаптенов-аналогов целевых фосфорорганических нейротоксикантов в составе конъюгированных антигенов для целей последующего получения с их использованием моноклональных антител.

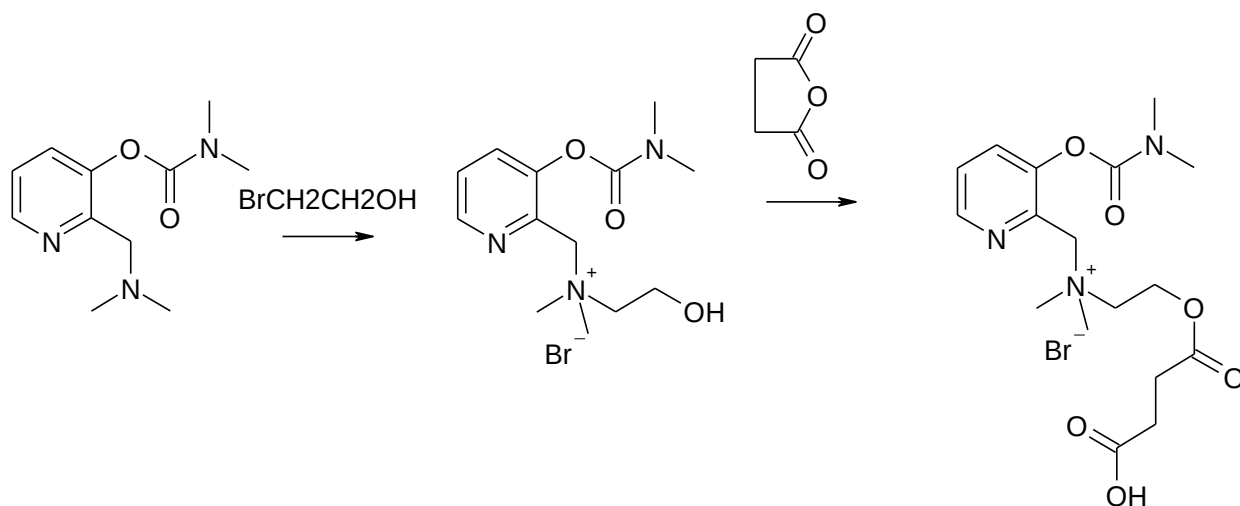
Этот же химический способ модификации структуры целевого лекарственного соединения путем проведения реакции азосочетания был использован и при получении гаптена-аналога соединения с более сложной структурой, в частности холиноблокатора атропина, также имеющего фенильный радикал [48]:



Известны и другие алгоритмы введения в структуру получаемого гаптена-аналога реакционноспособной аминогруппы. Так, алифатические первичные амины могут реагировать с белками в присутствии водорастворимых карбодиимидов. В этом случае конъюгация проходит по свободным карбоксильным группам белка (например, именно так были получены конъюгированные антигены с гаптенами-аналогами стероидных гормонов [49] и серотонина [50]). Известно исследование по разработке метода RIA имипрамина и его метаболита, при выполнении которого на этапе получения гаптена-аналога химическое соединение с вторичной аминогруппой с помощью янтарного ангидрида модифицировалось по этой группе в производное моноамида янтарной кислоты со свободной карбоксильной группой [28], а затем полученный гаптен-аналог конъюгировали с белком с помощью водорастворимого карбодиимида.

Другим распространенным вариантом конъюгирования гаптенов с алифатической аминогруппой является использование бифункциональных реагентов (например, глутарового альдегида) [5].

Моделирование структуры гаптена-аналога обратимого ингибитора холинэстеразы аминостигмина. Аминостигмин нейротоксичен за счет способности этого лекарственного препарата ингибировать холинэстеразу. Процесс ингибирования аминостигмином холинэстеразы обратим [51]. Нами предложен способ получения гаптена-аналога аминостигмина с введением в его молекулу реакционноспособной карбоксильной группы [52]. Согласно предложенному способу, при синтезе гаптена-аналога аминостигмина основание аминостигмина кватернизируют 2-бромэтанолом. Образующееся четвертичное N-гидроксиэтильное производное аминостигмина в реакции с янтарным ангидридом дает соответствующий гемисукцинат – гаптен-аналог аминостигмина:

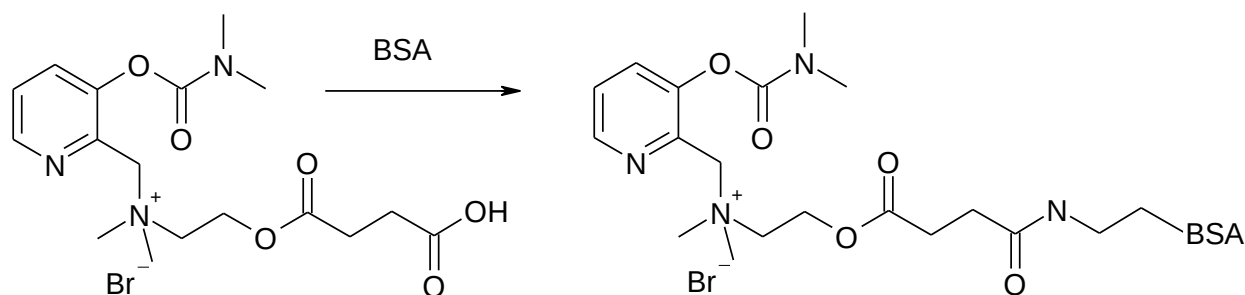


аминостигмин

N-гидроксиэтильное
производное аминостигмина

гемисукцинат
аминостигмина

Гемисукцинат аминостигмина может быть конъюгирован с белком (BCA/BSA/) либо с помощью карбодиимида, либо методом смешанных ангидридов:



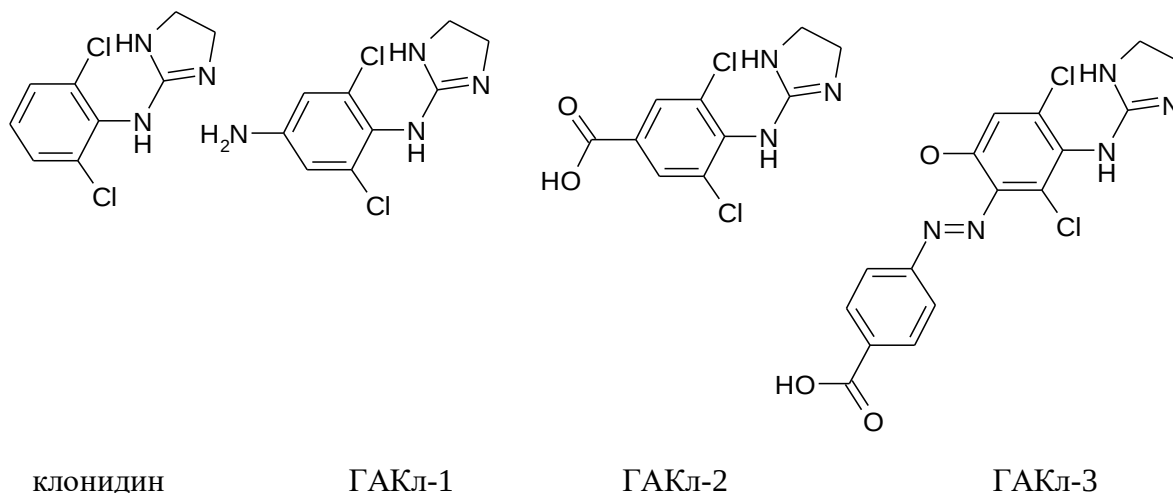
гаптен-аналог аминостигмина

конъюгат гаптена-аналога аминостигмина с
белком

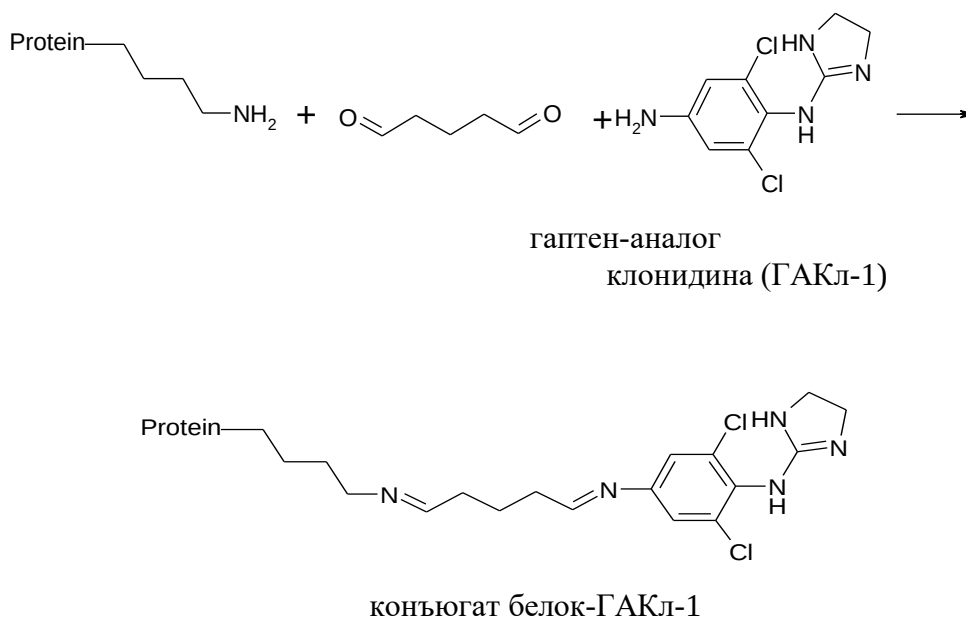
Моделирование структуры гаптен-аналогов клонидина. Клонидин (клофелин) часто используется совместно с алкоголем в криминальных эксцессах как средство, приводящее жертву в бессознательное состояние. При этом, по причине малого терапевтического интервала и из-за потенцирования алкоголем фармакологической активности препарата весьма вероятен летальный исход, что диктует потребность в надежном и специфическом экспертном методе определения этого препарата в биосредах организма. Для этих целей как нельзя лучше подходят иммунохимические методы анализа, но для их реализации на этапе получения специфических антител как иммунохимических реагентов необходимы конъюгированные антигены с соответствующими гаптенными эпитопами.

В качестве гаптен-аналогов клонидина в составе конъюгированных антигенов, пригодных для получения специфических антител, использовали химические производные

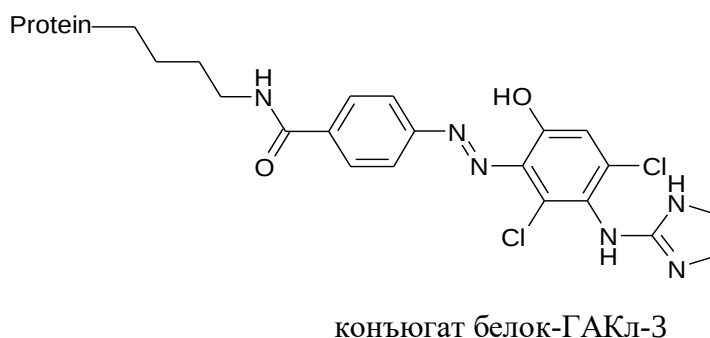
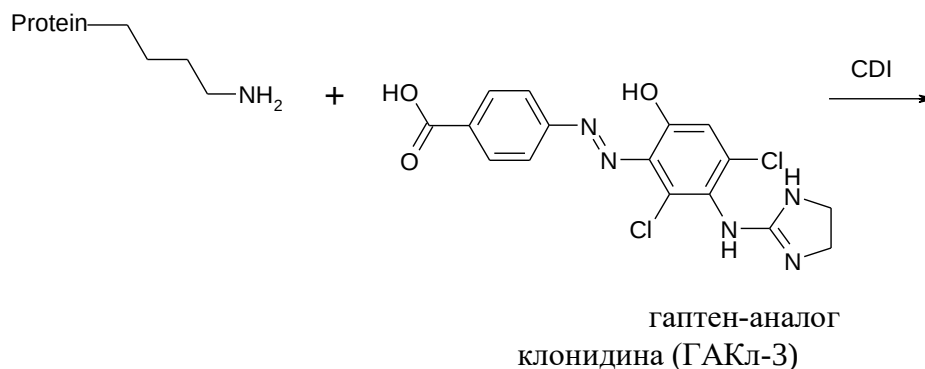
клонидина – имеющий реакционноспособную аминогруппу в 4 положении 4-аминоклонидин (гаптен-аналог клонидина-1 /ГАКл-1/) и обладающие карбоксильной группой: аддукт клонидина с глиоксиловой кислотой (гаптен-аналог клонидина-2 /ГАКл-2/), а также продукт реакции азосочетания 4-гидроксиклонидина с 4-аминобензойной кислотой – 4'-(карбоксифенилазо)-4-гидроксиклонидин (гаптен-аналог клонидина-3 /ГАКл-3/) [53-55]:



4-аминоклонидин (ГАКл-1) конъюгировали с белками (БСА или KLH) с помощью глутарового альдегида:



Согласно материалов патента [56], гаптен-аналог клонидина – 4'-(карбоксифенилазо)-4-гидроксиклонидин (ГАКл-3) был конъюгирован с белковым носителем с помощью водорастворимого карбодиимида:



С поликлональными кроличьими сыворотками, полученными при иммунизации животных конъюгатом БСА-ГАКл-3, был разработан конкурентный гомогенный метод RIA с использованием клонидина, меченного ^{14}C в качестве индикатора, который позволял специфично определять клонидин в плазме (сыворотке) крови с чувствительностью 0,5 нг/мл. Для анализа было достаточно 0,1 мл плазмы (сыворотки) [56].

Конструирование конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами психоактивных веществ и токсикантов: алгоритмы оптимизации (унификации) способов получения гаптен-аналогов и конъюгированных антигенов требуемых биологических характеристик

В статье по конкретизации химических технологий синтеза гаптен-аналогов психоактивных и нейротоксичных алкалоидов тезисно уже излагались подходы унификации способов синтеза гаптен-аналогов для их последующего конъюгирования с макромолекулярными носителями. В данном разделе обозначенные аспекты стратегии получения конъюгированных антигенов с гаптен-аналогами биологически активных соединений излагается более детально.

В способах синтеза гаптен-аналогов различных ПАВ и токсикантов, а также подходах получения конъюгированных антигенов с этими гаптенными эпитопами необходимых биологических характеристик, несмотря на кажущееся разнообразие конкретных химических

технологий синтеза гаптен-аналогов и методов получения антигенов, в действительности реализуется сравнительно узкий перечень предъявляемых с этим способом и подходам требований: введение в состав гаптен-аналога реакционноспособной химической группировки, необходимой для конъюгирования с носителем (карбокси-, amino-, гидроксид-, тио-, другие функциональные группы); подбор максимально иммуногенного носителя и метода химического конъюгирования, который создает условия для эффективного ковалентного связывания гаптен-аналога с выбранным макромолекулярным носителем в мягких условиях проведения реакции конъюгирования.

Имеющиеся данные специальной литературы свидетельствуют, что наиболее часто используемыми для последующего конъюгирования с макромолекулярными носителями оказываются amino- и карбоксильные функциональные группы гаптен-аналогов. Для гаптен-аналогов с ароматической aminoгруппой универсальным методом химического конъюгирования с белковыми носителями следует считать классическую реакцию азосочетания, что подтверждается фактом активного использования этого метода для получения конъюгированных антигенов с гаптенами-аналогами подходящей структуры. Для проведения реакций конъюгирования гаптен-аналогов с aminoгруппой к белковым носителям достаточно широко используются также глутаровый альдегид и водорастворимые карбодиимиды.

Очевидно, что среди конкретных химических технологий и способов, детально рассмотренных в данной и предшествующих публикациях [2-5, 25, 26, 42, 52], широко представлены, прежде всего, химические стратегии и конкретные методы, обеспечивающие получение гаптен-аналогов исходных лигандов с реакционноспособной карбоксильной группой. Одним из распространенных и достаточно универсальных алгоритмов химической модификации целевых соединений с введением в их состав карбоксильной группы, несомненно, является получение гемисукцинатных производных и их последующее использование в качестве гаптен-аналогов при синтезе конъюгированных антигенов. В частности, в соответствующих разделах статьи описано получение гаптен-аналогов различных ПАВ путем синтеза их гемисукцинатных производных: холиноблокаторов с выраженными центральными эффектами – бензтропина, пирензепина, глипина; трициклических антидепрессантов – нортриптилина и имипрамина; нейролептиков и антидепрессантов: фенотиазинового производного – этаперазина; производных 1,4-бензодиазепина – оксазепамы, клоназепамы; обратимого ингибитора холинэстеразы – аминостигмина и других ПАВ. Особенности и эффективность используемых методов химического конъюгирования (карбодиимидный метод, метод активированных эфиров, метод смешанных ангидридов) этих карбоксилсодержащих гаптен-аналогов к макромолекулярным

носителям по имеющимся у носителей, в частности у белков, аминок группам также хорошо известны [2, 5]. Это не кажется удивительным, поскольку способы введения карбоксильной группы в молекулу синтезируемого гаптена-аналога достаточно разнообразны и просты, а методы их последующего химического конъюгирования с аминок группами белков реализуют в мягких условиях, и эти методы исключительно 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 помимо достижения оптимальной эпитопной плотности, также способствует увеличению иммунодоминантности гаптенного эпитопа. Реализовано и получение гемисукцинатных производных исходных соединений с вовлечением в химическую модификацию различных частей молекулы целевого соединения.

Аминок группы макромолекулярных носителей на основе белков в основном представлены ϵ -аминок группами лизина, входящего в их первичную аминокислотную последовательность. Еще одну аминок группу дает N-концевая аминокислота каждой полипептидной цепи белка. Так, у молекулы сывороточного γ -глобулина имеется две полипептидных цепи независимо от принадлежности белка к тому или иному классу иммуноглобулинов. Число гаптенных эпитопов в составе конъюгированного антигена, располагающихся на молекуле носителя после проведения конъюгирования с использованием этих методов, – эпитопная плотность гаптена-аналога на носителе будет определяться числом аминокислотных остатков на молекуле выбранного белка, вступающих в химическую реакцию конъюгирования. У молекулы БСА имеется 59 ϵ -аминок групп боковой цепи остатков лизина, в молекуле столбнячного анатоксина /м.м. ~ 150000 D/ – 106 аминок групп, молекула KLN (в пересчете на одну среднюю мультисубъединицу /м.м. ~ 5000000 D/) содержит более 2000 ϵ -аминок групп боковой цепи остатков лизина) [4, 5]. С ростом молекулярной массы белка-носителя число гаптенных эпитопов, находящихся на соответствующем конъюгате, при использовании эффективного метода химического конъюгирования также будет расти эквивалентно молекулярной массе и, как правило, достигает при проведении реакции конъюгирования эмпирически определенного оптимума – 15-20 эпитопов и выше (в расчете на молекулярную массу сывороточного альбумина) [2, 4].

Вероятность реализации ковалентного взаимодействия между гаптен-аналогом и носителем будет расти и с увеличением молярного соотношения вводимых в химическую реакцию конъюгирования количеств гаптена и носителя. При использовании одного и того же метода конъюгирования увеличение этого соотношения будет приводить к закономерному

увеличению эпитопной плотности гаптенного эпитопа на молекуле носителе, а, следовательно, увеличиться и иммунодоминантность гаптенных эпитопов в составе конъюгированного антигена [4]. Следует заметить, что при проведении химической реакции конъюгирования оптимальное соотношение между гаптенем и носителем, обеспечивающее достижение оптимальной эпитопной плотности, подбирается экспериментально для каждой конкретной пары вводимых в реакцию компонентов – гаптена-аналога и носителя.

Наконец, различные химические методы, с помощью которых проводится конъюгирование, демонстрируют разную эффективность (таблица 1), поэтому при одинаковом молярном соотношения вводимых в химическую реакцию количеств гаптена и носителя, но использовании разных по эффективности методов конъюгирования могут быть получены конъюгаты с большей или меньшей эпитопной плотностью гаптена-аналога на идентичном белке носителе.

Среди часто используемых методов конъюгирования, метод смешанных ангидридов представляется наиболее предпочтительным, и его использование может считаться универсальным алгоритмом оптимизации способов получения конъюгированных антигенов гаптен-аналогов, содержащих карбоксильную группу.

Из представленных выше данных многочисленных исследований следует, что за специфичность антителообразования на гаптенные эпитопы, прежде всего, ответственна молекулярная структура гаптена-аналога – строение гаптенного эпитопа, а за интенсивность гуморального иммунного ответа к гаптенной детерминанте и продолжительность образования антител преимущественно отвечает макромолекулярный носитель этих детерминант [2-5]. Следовательно, возможность оптимизации биологической активности конъюгированных антигенов, прежде всего, их иммуногенности в основном достигается путем использования адекватного макромолекулярного носителя. Этим положением обычно руководствуются при получении конъюгированных антигенов, используя в качестве носителей различные исходно иммуногенные молекулы (например, гетерологичные белки, липосомы, структурные компоненты микроорганизмов или же их молекулярные продукты /инактивированные эндо-, экзотоксины/, искусственные полимеры). При этом установлено, что более иммуногенный носитель с большей вероятностью придает свойство иммуногенности гаптенному эпитопу, ковалентно связанному с этим носителем.

На протяжении многих десятилетий при получении конъюгированных антигенов в качестве носителей наиболее широко использовали доступные белки: яичный альбумин (овальбумин, /м.м. ~ 43000 дальтон/), бычий сывороточный альбумин (БСА /м.м. ~ 69000 дальтон/), тиреоглобулин (м.м. ~ 660000 D), а, например, гемоцианин моллюсков (KLH) имеет м.м. ~ $4,5 \times 10^5$ – $1,3 \times 10^7$ D. Соответственно, этот белок более предпочтителен в качестве

макромолекулярного носителя при создании конъюгированных антигенов [3, 5]. В последнее время в качестве макромолекулярных носителей гаптенных эпитопов низкомолекулярных психоактивных веществ, включая наркотики, все более широко используются токсоидные белки и надмолекулярные комплексные структуры различных микроорганизмов [3, 5, 6, 57-61].

При использовании белков в качестве носителей гаптенных эпитопов возможность оптимизации характеристик получаемых на их основе конъюгированных антигенов определяется: 1) использованием в качестве носителя белков с максимально большой молекулярной массой; 2) использованием в качестве носителя белков с максимально достижимой гетерологичностью используемого белка в отношении биологического объекта, который активно иммунизируется конъюгированным антигеном, полученным на основе данного белка; 3) отсутствием в используемых в качестве носителей белках более низкомолекулярных белковых фракций и химических загрязнителей [3-5].

Из представленных научных данных также можно сделать вывод о том, что высокая иммуногенность конъюгатов с гаптенными эпитопами с сохранением доминантности и специфичности гуморального иммунного ответа на гаптенный эпитоп обычно достигается при использовании в качестве носителей высокомолекулярных белков, полученных от представителей генетически далеко отстоящих от человека и млекопитающих биологических видов (например, уже упомянутого KLN); модифицированных бактериальных липополисахаридов и токсоидных белков, липосом (как обычных, так и с включением в состав этих надмолекулярных объектов иммуногенных компонентов бактериальных и вирусных возбудителей), искусственно модифицированных полиэлектролитами и другими макромолекулами вирусных частиц, искусственно созданных макромолекулярных комплексов особой структуры. Данный подход подразумевает возможность более активной стимуляции подобными конъюгированными антигенами конституционного иммунитета за счет наличия в составе перечисленных биоактивных молекул PAMP-сайтов (Pathogen-associated molecular patterns) [3, 5]. В свою очередь факторы и механизмы конституционного иммунитета, выполняя в иммунореактивности организма роль предиммунного ответа, способствуют более активной и полноценной активации адаптивного иммунного ответа, включая его гуморальную составляющую.

Заключение

Представленные литературные и собственные научные данные позволяют заключить, что в настоящее время общая стратегия и подходы создания конъюгированных антигенов низкомолекулярных психоактивных и токсичных природных и синтетических соединений достаточно хорошо проработаны. Конкретные технологии (алгоритмы) синтеза гаптен-аналогов, которые детально изложены в настоящей и предшествующих публикациях, 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 веществ и токсикантов, о чем свидетельствуют представленные в статье данные по эффективности разработанных методов для количественного определения множества психоактивных веществ и ряда токсикантов. 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 психоактивных веществ и токсикантов продолжает инициировать масштабные исследования по созданию молекулярных антитоксических вакцин, включая вакцины наркотиков.

Анатоксины и инаktivированные токсидные белки микроорганизмов, а также гетерологичные белки большой молекулярной массы (например, гемоцианин моллюсков) представляются наиболее перспективными макромолекулярными носителями гаптен-аналогов целевых низкомолекулярных соединений. Их использование в качестве носителей гаптенных эпитопов в образцах получаемых молекулярных вакцин может иметь дальнейшие перспективы оптимизации биологических характеристик подобных вакцин. Расширяющаяся практика использования таких биологических продуктов в качестве макромолекулярных носителей при создании конъюгированных антигенов для целей иммунохимического анализа подтверждает их уникальные иммуногенные характеристики в качестве носителей, а также обосновывает перспективы их практического использования.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Butler V.P, Jr. The immunological assay of drugs. *Pharmacol. Rev.* 1978; 29(2): 103-184.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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 1. Общая иммунотоксикология. Иммунотоксичность химических соединений. Иницируемые токсикантами иммунопатологические состояния и заболевания* / под ред. В.К. Козлова. М.: Комментарий; 2019: 364-448.
6. 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
7. Murray J.B. Psychophysiological aspects of amphetamine–methamphetamine abuse. *J. Psychol.* 1998; 132: 227–37.
8. Prakash M.D., Tangalakakis K., Antonipillai J. et al. Methamphetamine: Effects on the brain, gut and immune system. *Pharmacol. Res.* 2017; 120: 60–67. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.009
9. Cheng L., Kim S., Chung A., Castro A. Amphetamines: New radioimmunoassay. *FEBS Letters.* 1973; 36(3): 339–342. doi: 10.1016/0014-5793(73)80405-3
10. Duryee M.J., Bevins M.A., Reicyhel C.M. et al. Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines. *Vaccine.* 2009; 27: 2981-2988. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.105
11. Moreno A. Y., Janda K. D. The impact of distinct chemical structures for the development of a methamphetamine vaccine. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133 (17): 6587-6595. doi: 10.1021/ja108807j
12. Анохина И.П., Шамакина И.Ю. Фундаментальные механизмы зависимости от психоактивных веществ. В кн.: *Национальное руководство. Наркология* / под ред. Н.Н. Иванца, И.П. Анохиной, М.А. Винниковой. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2016: 96–115.
13. Focella A., Heveran J.E. *Immunoassay for phencyclidine*: Patent 4196185 US, Int. Pat. Cl2. A61K 43/00.; No 912272; fill. 06.05.1978; publ. 04.01.1980.
14. Egen N.B., Bliss M., Mayersohn M. et al. Isolation of monoclonal antibodies to phencyclidine from ascites fluid by preparative isoelectric focusing in the rotofor. *Anal. Biochem.* 1988; 172(2): 488-494. doi: 10.1016/0003-2697(88)90472-1
15. Lee J.C., Del Corral L.F., Clark R.A. et al. *Phencyclidine analogs for immunoassay*: Patent 5,939,332 US, Int. Pat. Cl.6 G01N 33/544.; No 09/032,158, fill. 02.27.1998; publ. 08.17.1999.
16. Pitas G., Laurenzana E.M., Williams D.K., Owens S.M., Gentry W.B. Anti-phencyclidine monoclonal antibody binding capacity is not the only determinant of effectiveness, disproving the concept that antibody capacity is easily surmounted. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: 906-912. doi: 10.1124/dmd.105.005934

17. Laurenzana E.M., Gunnell M.G., Gentry W.B., Owens S.M. Treatment of adverse effects of excessive phencyclidine exposure in rats with a minimal dose of monoclonal antibody. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 306(3): 1092-1098. doi: 10.1124/jpet.103.053140
18. Авруцкий Г.Я., Гурович И.Я., Громова В.В. *Фармакотерапия психических заболеваний: монография*. М.: Медицина; 1974: 472 с.
19. 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.
20. Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая волна; 2012: 1216 с.
21. *Справочное руководство по психофармакологическим и противоэпилептическим препаратам, разрешенным к применению в России* / под ред. С.Н. Мосолова. 2-е изд. перераб. М.: «Издательство БИНОМ»; 2004: 304 с.
22. He H., McKay G., Wirshing B., Midha K.K. Development and application of a specific and sensitive radioimmunoassay for trihexyphenidyl to a pharmacokinetic study in humans. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84(5): 561-567. doi: 10.1002/jps.2600840509
23. He H., McKay G., Midha K.K. Development of a sensitive and specific radioimmunoassay for benztropine. *J. Pharm. Sci.* 1993; 82 (10): 1027-1032.
24. Tanswell P., Kasper W., Zahn G. Automated monoclonal radioimmunoassay for pirenzepine, a selective muscarinic antagonist, in plasma and urine. *J. Immunol. Meth.* 1986; 93(2): 247-258. doi: 10.1016/0022-1759(86)90197-3
25. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Дрыгина Л.Б. *Гемисукуцинат бромистого 8-(2-оксиэтил) 8-метил-8-азоний-бицикло [3,2,1]-окт-3-илового эфира α-окси-α, α-дифенилуксусной кислоты в качестве промежуточного продукта для получения синтетических конъюгированных антигенов, специфичных к глипину*: Авторское свидетельство СССР №1587869 приор. 13.12.1988, рег. в Гос. реестре изобретений 22.04.1990.
26. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Гурьянов Г.А. *Способ получения специфической сыворотки к низкомолекулярным гаптенам, содержащим третичную аминогруппу*: Авторское свидетельство СССР № 1602197, приор. 13.12.1988, рег. в Гос. реестре изобретений 22.06.1990.
27. Brunswick D.J., Needelman B., Mendel J. Specific radioimmunoassay of amitriptyline and nortriptyline. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1979; 7(4): 343-348. doi: 10.1111/j.1365-2125.1979.tb00943.x
28. Brunswick D.J., Needelman B., Mendel J. Radioimmunoassay of imipramine and desmethyylimipramine. *Life Sci.* 1978; 22(2): 137-146.
29. Ghoshal M. et al. *Tricyclic antidepressant derivatives and immunoassay*: Patent 6,368,814 US, Int. Pat. Cl.7 G01N 33/535.; No 09/747,809, fill. 12.22.2000; publ. 04.09.2002.
30. Hubbard J.W., Midha K.K., Cooper J.K., Charette J.K. Radioimmunoassay for psychotropic Drugs II: Synthesis and properties of haptens for tricyclic antidepressants. *J. Pharm. Sci.* 1978; 67(11): 1571-1578. doi: 10.1002/jps.2600671119
31. Hubbard J.W., Midha K.K., McGilveray I.J., Cooper J.K. Radioimmunoassay for psychotropic Drugs I: Synthesis and properties of hapten for chlorpromazine. *J. Pharm. Sci.* 1978; 67(11): 1563-1571. doi: 10.1002/jps.2600671118
32. Midha K.K., Hubbard J.W., Cooper J.K. Midha K.K., Hawes E.M., Fournier S., Yeung P. Radioimmunoassay for trifluoperazine in human plasma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1981; 12(2): 189-193. doi: 10.1111/j.1365-2125.1981.tb01199.x

33. Hawes E.M., Shetty H.U., Cooper J.K. et al. Radioimmunoassay for psychotropic drugs III: Synthesis and properties of hapten for trifluoperazine and fluphenazine. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73(2): 247-250. doi: 10.1002/jps.2600730226
34. Shi F.S., Liu J., Zhang L. et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the determination of phenothiazine drugs in meat and animal feeds. *J. Environmental Science and Health, Part B.* 2016; 51(10): 715-721.
35. Козлов В.К., Дрыгина Л.Б., Беспалов А.Я. Идентификация и количественное определение в биожидкостях нейролептиков и антидепрессантов фенотиазинового ряда иммуноферментным методом. В кн.: *Острые токсикозы в клинической практике: Мат. науч. конф.* Баку; 1989: 35-36.
36. Schneider R.S. et al. *Oxazepam derivatives for immunoassay reagents*: Patent 4,043,989 US, Int. Pat. Cl.2 C07G7/00., assignee SYVA CO. – 612,425, filed 09.11.1975; publ. 08.23.1977.
37. Dixon W.R., Young R.L., Ning R., Liebman A. Radioimmunoassay of the anti-convulsant agent clonazepam. *J. Pharm. Sci.* 1977; 66(2): 235-237. doi: 10.1002/jps.2600660226
38. Dixon W. R., Earley J., Postma E. Radioimmunoassay of chlordiazepoxide. *J. Pharm. Sci.* 1975; 64(6): 937-939. doi: 10.1002/jps.2600640607
39. West A., Kohler-Schmidt H., Baudner S., Blaschke G. A specific immunoassay for the detection of flunitrazepam. *Int. J. Legal Med.* 1995; 108: 105-109. doi: 10.1007/BF01369915
40. Буркин А.А., Смирнов А.В. Иммуноферментный анализ лекарственных веществ и их метаболитов. Сообщение 3. 1,4-Бензодиазепины. *Химико-фармацевтический журнал.* 2004; 38 (10): 48-52.
41. Buechler K.F. *Benzodiazepine derivatives and protein and polypeptide conjugates thereof*: Patent 93/20067, WO, Int. Pat. Cl.5 C07D403/12, C07K7/10, C07K15/00. /, assignee BIOSITE DIAGNOSTICS INC (US). filed 06.04.1992; int. publ. 10.14.1993.
42. Гордей М.Д., Битенский В.С., Выровщикова С.М. и др. *Гемисукцинат 3-окси-7-бром-5-(о-хлор)фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-ОН, обладающий снотворной, седативной и транквилизирующей активностью*: Пат. 1828645 Российская федерация, МПК 6 C07D243/14, A61K31/55 /, заявитель и патентообладатель Физико-химический институт им. А.В. Богатского. 4847544/04, заявл. 09.07.1990; опублик. 10.01.1996.
43. Landsteiner K., Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 1936; 64: 625-639.
44. Landsteiner K. *The specificity of serological reactions*. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press; 1945.
45. *Химическая энциклопедия в пяти томах. Т. 2.* / под ред. И.Л. Кнунянц и др. М.: Советская энциклопедия, 1990: 671 с.
46. Hunter K.W., Jr., Lenz D.E., Brimfield A.A., Naylor J.A. Quantification of the organophosphorus nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibody. *FEBS Letters.* 1982; 149(1): 147-151.
47. Lenz D.E., Yourick J.J., Dawson J. Sh., Scott J. Monoclonal antibodies against soman: characterization of soman stereoisomers. *Immunol. Letters.* 1992; 31(2): 131 – 135. doi: 10.1016/0165-2478(92)90139-f
48. Wurzbarger R., Miller R., Boxenbaum H. et al. Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977; 203(2): 435-441.

49. Yoshiharu K., Toshio O., Kiyoko A. et al. Enzyme immunoassay for cortisol in serum using cortisol 21-amine. *Steroids*. 1978; 32: 137-144.
50. Pescar B., Spector S. Serotonin: radioimmunoassay. *Immunochemistry*. 1975; 12: 1340–1342.
51. Прозоровский В.Б., Павлова Л.В. Суслова И.М. Фармакологическая характеристика нового антихолинэстеразного средства аминостигмина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 1992; 55(1): 13-16.
52. Беспалов А.Я., Кизимова Г.В., Козлов В.К., Гурьянов Г.А. Гемисукуцинат бромистого 2-[N,N-диметил-N-(2-оксиэтил) аммонийметил]-3-(N,N-диметилкарбамоил) пиридина в качестве промежуточного продукта для получения синтетических конъюгированных антигенов, специфичных к аминостигмину: Авторское свидетельство СССР №1593161, приор. 13.12.1988, регистр. в Гос. реестре изобретений 15.05.1990.
53. Dontenwill M., Bricca G., Molines A. et al. Production and characterization of anti-clonidine antibodies not cross-reacting with catecholamine. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 149(3): 249-255. doi: 10.1016/0014-2999(88)90655-3
54. Dontenwill M., Molines A., Bricca G. et. al. Production and characterization of an iminoimidazoline specific monoclonal antibodies using para-aminoclonidine as antigen. *Life Science*. 1992; 50(24): 1859-1868. doi: 10.1016/0024-3205(92)90546-2
55. Буркин А.А., Буркин М.А. Иммуноферментный анализ клофелина. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2007; 4: 30-32.
56. Juarrott B., Spector S. *Clonidine assay*: Patent 4094964 US, Int. Pat. Cl.2 G01N 33/16. /; No 795576, fill. 05.10.1977; publ. 06.13.1978.
57. 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
58. 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
59. 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
60. 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
61. 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

References:

1. Butler V.P., Jr. The immunological assay of drugs. *Pharmacol. Rev.* 1978; 29(2): 103-184.
2. 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.
3. Kozlov V.K., Bespalov 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)
4. Kozlov V.K., Bespalov 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)

5. 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)
6. 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
7. Murray J.B. Psychophysiological aspects of amphetamine-methamphetamine abuse. *J. Psychol.* 1998; 132: 227-37.
8. Prakash M.D., Tangalakis K., Antonipillai J. et al. Methamphetamine: Effects on the brain, gut and immune system. *Pharmacol. Res.* 2017; 120: 60-67. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.009
9. Cheng L., Kim S., Chung A., Castro A. Amphetamines: New radioimmunoassay. *FEBS Letters.* 1973; 36(3): 339-342. doi: 10.1016/0014-5793(73)80405-3
10. Duryee M.J., Bevins M.A., Reiczyhel C.M. et al. Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines. *Vaccine.* 2009; 27: 2981-2988. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.105
11. Moreno A. Y., Janda K. D. The impact of distinct chemical structures for the development of a methamphetamine vaccine. *J. Am. Chem. Soc.* 2011; 133 (17): 6587-6595. doi: 10.1021/ja108807j
12. Anokhina I.P., Shamakina I.Yu. Fundamental mechanisms of dependence on psychoactive substances. In: *National Leadership. Narcology.* Ivantsa N.N., Anokhina I.P., Vinnikova M.A., eds. Moscow: GEOTAR-Media; 2016: 96-115. (in Russian).
13. Focella A., Heveran J.E. *Immunoassay for phencyclidine*: Patent 4196185 US, Int. Pat. Cl2. A61K 43/00.; No 912272; fill. 06.05.1978; publ. 04.01.1980.
14. Egen N.B., Bliss M., Mayersohn M. et al. Isolation of monoclonal antibodies to phencyclidine from ascites fluid by preparative isoelectric focusing in the rotofor. *Anal. Biochem.* 1988; 172(2): 488-494. doi: 10.1016/0003-2697(88)90472-1
15. Lee J.C., Del Corral L.F., Clark R.A. et al. Phencyclidine analogs for immunoassay: Patent 5,939,332 US, Int. Pat. Cl.6 G01N 33/544.; No 09/032,158, fill. 02.27.1998; publ. 08.17.1999.
16. Pitas G., Laurenzana E.M., Williams D.K., Owens S.M., Gentry W.B. Anti-phencyclidine monoclonal antibody binding capacity is not the only determinant of effectiveness, disproving the concept that antibody capacity is easily surmounted. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34: 906-912. doi: 10.1124/dmd.105.005934
17. Laurenzana E.M., Gunnell M.G., Gentry W.B., Owens S.M. Treatment of adverse effects of excessive phencyclidine exposure in rats with a minimal dose of monoclonal antibody. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 306(3): 1092-1098. doi: 10.1124/jpet.103.053140
18. Avrutsky G.Ya., Gurovich I.Ya., Gromova V.V. *Pharmacotherapy of mental illness: monograph.* M.: Medicine; 1974: 472 p. (in Russian)
19. 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).
20. Mashkovsky M.D. *Medicines.* 16th ed., revised, corrected. and additional M.: New wave; 2012: 1216 p. (in Russian).
21. *Reference guide on psychopharmacological and antiepileptic drugs approved for use in Russia* / ed. S.N. Mosolov. 2nd ed. revised Moscow: BINOM Publishing House; 2004: 304 p. (in Russian).
22. He H., McKay G., Wirshing B., Midha K.K. Development and application of a specific and sensitive radioimmunoassay for trihexyphenidyl to a pharmacokinetic study in humans. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84(5): 561-567. doi: 10.1002/jps.2600840509

23. He H., McKay G., Midha K.K. Development of a sensitive and specific radioimmunoassay for benztropine. *J. Pharm. Sci.* 1993; 82 (10): 1027-1032.
24. Tanswell P., Kasper W., Zahn G. Automated monoclonal radioimmunoassay for pirenzepine, a selective muscarinic antagonist, in plasma and urine. *J. Immunol. Meth.* 1986; 93(2): 247-258. doi: 10.1016/0022-1759(86)90197-3
25. Bepalov A.Ya., Kizimova G.V., Kozlov V.K., Drygina L.B. 8-(2-Hydroxyethyl) 8-methyl-8-azonium-bicyclo[3,2,1]-oct-3-yl ester of α -hydroxy- α , α -diphenylacetic acid bromide hemisuccinate as an intermediate for the preparation of synthetic conjugated antigens specific to glipin: USSR Author's certificate No. 1587869 prior. 12/13/1988, reg. in the State register of inventions 22.04.1990. (in Russian)
26. Bepalov A.Ya., Kizimova G.V., Kozlov V.K., Guryanov G.A. A method for obtaining specific serum to low molecular weight haptens containing a tertiary amino group: USSR Author's certificate No. 1602197, prior. 12/13/1988, reg. in the State register of inventions 06/22/1990. (in Russian)
27. Brunswick D.J., Needelman B., Mendel J. Specific radioimmunoassay of amitriptyline and nortriptyline. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1979; 7(4): 343-348. doi: 10.1111/j.1365-2125.1979.tb00943.x
28. Brunswick D.J., Needelman B., Mendel J. Radioimmunoassay of imipramine and desmethylinipramine. *Life Sci.* 1978; 22(2): 137-146.
29. Ghoshal M. et al. *Tricyclic antidepressant derivatives and immunoassay*: Patent 6,368,814 US, Int. Pat. Cl.7 G01N 33/535.; No 09/747,809, fill. 12.22.2000; publ. 04.09.2002.
30. Hubbard J.W., Midha K.K., Cooper J.K., Charette J.K. Radioimmunoassay for psychotropic Drugs II: Synthesis and properties of haptens for tricyclic antidepressants. *J. Pharm. Sci.* 1978; 67(11): 1571-1578. doi: 10.1002/jps.2600671119
31. Hubbard J.W., Midha K.K., McGilveray I.J., Cooper J.K. Radioimmunoassay for psychotropic Drugs I: Synthesis and properties of hapten for chlorpromazine. *J. Pharm. Sci.* 1978; 67(11): 1563-1571. doi: 10.1002/jps.2600671118
32. Midha K.K., Hubbard J.W., Cooper J.K. Midha K.K., Hawes E.M., Fournier S., Yeung P. Radioimmunoassay for trifluoperazine in human plasma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1981; 12(2): 189-193. doi: 10.1111/j.1365-2125.1981.tb01199.x
33. Hawes E.M., Shetty H.U., Cooper J.K. et al. Radioimmunoassay for psychotropic drugs III: Synthesis and properties of hapten for trifluoperazine and fluphenazine. *J. Pharm. Sci.* 1984; 73(2): 247-250. doi: 10.1002/jps.2600730226
34. Shi F.S., Liu J., Zhang L. et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the determination of phenothiazine drugs in meat and animal feeds. *J. Environmental Science and Health, Part B.* 2016; 51(10): 715-721.
35. Kozlov V.K., Drygina L.B., Bepalov A.Ya. Identification and quantification of antipsychotics and antidepressants of the phenothiazine series in biofluids by enzyme immunoassay. In the book: *Acute toxicoses in clinical practice: Mat. scientific conf.* Baku; 1989: 35-36. (in Russian)
36. Schneider R.S. et al. *Oxazepam derivatives for immunoassay reagents*: Patent 4,043,989 US, Int. Pat. Cl.2 C07G7/00., assignee SYVA CO. – 612,425, filed. 09.11.1975; publ. 08.23.1977.
37. Dixon W.R., Young R.L., Ning R., Liebman A. Radioimmunoassay of the anti-convulsant agent clonazepam. *J. Pharm. Sci.* 1977; 66(2): 235-237. doi: 10.1002/jps.2600660226
38. Dixon W. R., Earley J., Postma E. Radioimmunoassay of chlordiazepoxide. *J. Pharm. Sci.* 1975; 64(6): 937-939. doi: 10.1002/jps.2600640607

39. West A., Kohler-Schmidt H., Baudner S., Blaschke G. A specific immunoassay for the detection of flunitrazepam. *Int. J. Legal Med.* 1995; 108: 105-109. doi: 10.1007/BF01369915
40. Burkin A.A., Smirnov A.V. Enzyme immunoassay of medicinal substances and their metabolites. Report 3. 1,4-Benzodiazepines. *Chemical Pharmaceutical Journal*. 2004; 38(10):48-52. (in Russian).
41. Buechler K.F. *Benzodiazepine derivatives and protein and polypeptide conjugates thereof*: Patent 93/20067, WO, Int. Pat. Cl.5 C07D403/12, C07K7/10, C07K15/00. /, assignee BIOSITE DIAGNOSTICS INC (US). fild. 06.04.1992; int. publ. 10.14.1993.
42. Gordey M.D., Bitensky V.S., Vyrovshchikova S.M. et al. Hemisuccinate 3-hydroxy-7-bromo-5-(o-chloro)phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-OH, with hypnotic, sedative and tranquilizing activity: Pat. 1828645 Russian Federation, IPC 6 C07D243 / 14, A61K31 / 55 /, applicant and patentee Physical and Chemical Institute named after A.V. Bogatsky. 4847544/04, Appl. 07/09/1990; publ. 01/10/1996. (in Russian).
43. Landsteiner K., Jacobs J. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. *J. Exp. Med.* 1936; 64: 625-639.
44. Landsteiner K. *The specificity of serological reactions*. Cambridge, Massachusetts: Harvard Univ. Press; 1945.
45. *Chemical encyclopedia in five volumes*. V. 2. Ed. by I.L. Knunyants et al. Moscow: Soviet Encyclopedia, 1990: 671 p. (in Russian)
46. Hunter K.W., Jr., Lenz D.E., Brimfield A.A., Naylor J.A. Quantification of the organophosphorus nerve agent soman by competitive inhibition enzyme immunoassay using monoclonal antibody. *FEBS Letters*. 1982; 149(1): 147-151.
47. Lenz D.E., Yourick J.J., Dawson J. Sh., Scott J. Monoclonal antibodies against soman: characterization of soman stereoisomers. *Immunol. Letters*. 1992; 31(2): 131 – 135. doi: 10.1016/0165-2478(92)90139-f
48. Wurzbürger R., Miller R., Boxenbaum H. et al. Radioimmunoassay of atropine in plasma. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977; 203(2): 435-441.
49. Yoshiharu K., Toshio O., Kiyoko A. et al. Enzyme immunoassay for cortisol in serum using cortisol 21-amine. *Steroids*. 1978; 32: 137-144.
50. Pescar B., Spector S. Serotonin: radioimmunoassay. *Immunochemistry*. 1975; 12: 1340–1342.
51. 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)
52. Bespalov A.Ya., Kizimova G.V., Kozlov V.K., Guryanov G.A. 2-[N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammoniomethyl]-3-(N,N-dimethylcarbamoyl)pyridine bromide hemisuccinate as an intermediate for the preparation of synthetic conjugated antigens specific to aminostigmine: USSR author's certificate No. 1593161, prior. 12/13/1988, reg. in the State register of inventions 15.05.1990. (in Russian)
53. Dontenwill M., Bricca G., Molines A. et al. Production and characterization of anti-clonidine antibodies not cross-reacting with catecholamine. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; 149(3): 249-255. doi: 10.1016/0014-2999(88)90655-3
54. Dontenwill M., Molines A., Bricca G. et al. Production and characterization of an iminoimidazoline specific monoclonal antibodies using para-aminoclonidine as antigen. *Life Science*. 1992; 50(24): 1859-1868. doi: 10.1016/0024-3205(92)90546-2

55. Burkin A.A., Burkin M.A. ELISA analysis of clonidine. *Forensic-medical examination*. 2007; 4: 30-32. (in Russian).
56. Juarrott B., Spector S. *Clonidine assay*: Patent 4094964 US, Int. Pat. Cl.2 G01N 33/16. /; No 795576, fill. 05.10.1977; publ. 06.13.1978.
57. 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
58. 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
59. 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
60. 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
61. 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