

УДК 615.012+615.371

DOI: 10.36979/1694-500X-2026-26-5-205-211

**КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДНЫЕ ВАКЦИНЫ:
ХИМИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ,
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВАЦИИ ПРИ СИНТЕЗЕ КОНЬЮГАТОВ**

А.Т. Уметалиева, А.А. Белянкин

Аннотация. Вакцинация полисахаридными и конъюгированными вакцинами от различных заболеваний на сегодняшний день является одним из эффективных способов их предупреждения. Актуальность заключается в том, что полисахаридные вакцины вызывают Т-независимый иммунный ответ, при котором иммунитет детей младше двух лет не способен продуцировать клетки памяти с участием Т-хелперов. В связи с этим были разработаны конъюгированные вакцины, в которых полисахарид ковалентно связывают с белковым носителем. В роли белковых носителей обычно используют анатоксины различных бактерий. В статье проводится обзор актуальной научной литературы, рассматриваются капсульные полисахариды бактерий, их строение, биосинтез и биологическая роль, что из себя представляют полисахаридные и конъюгированные вакцины, какие существуют методы определения степени активации полисахаридов для синтеза конъюгатов. Таким образом, конъюгированные вакцины повышают иммуногенность капсульного полисахарида и становятся Т-зависимыми антигенами.

Ключевые слова: капсульный полисахарид; полисахарид клеточной стенки; конъюгированные вакцины; полисахаридные вакцины; иммунная система; Т-независимый иммунный ответ; Т-зависимый иммунный ответ; цианирование; периодатное окисление.

**КОНЬЮГАЦИЯЛАНГАН ПОЛИСАХАРИДДИК ВАКЦИНАЛАР:
ПОЛИСАХАРИДДЕРДИ ХИМИЯЛЫК АКТИВДЕШТИРҮҮ,
КОНЬЮГАТ СИНТЕЗИНДЕ АКТИВДЕШТИРҮҮНҮ АНЫКТОО ЫКМАЛАРЫ**

А.Т. Уметалиева, А.А. Белянкин

Аннотация. Полисахарид жана конъюгацияланган вакциналар менен ар кандай ооруларга каршы эмдөө алардын алдын алуунун эффективдүү жолдорунун бири болуп саналат. Актуалдуулугу полисахариддик вакциналар Т-көзкарандысыз иммундук жоопту жаратат, анда эки жашка чейинки балдардын иммунитети Т-жардамчылары катышкан эс тутум клеткаларын өндүрө албайт. Ушуга байланыштуу полисахаридди белок ташуучу менен коваленттик байланышта болгон конъюгацияланган вакциналар иштелип чыккан. Белок алып жүрүүчүлөрдүн ролунда адатта ар кандай бактериялардын токсиндери колдонулат. Макалада актуалдуу илимий адабияттарга сереп салынып, бактериялардын капсула полисахариддери, алардын түзүлүшү, биосинтези жана биологиялык ролу, полисахарид жана конъюгат вакциналары деген эмне, конъюгат синтези үчүн полисахариддердин активдешүү даражасын аныктоонун кандай ыкмалары бар. Ошентип, конъюгацияланган вакциналар капсула полисахаридинин иммуногендүүлүгүн жогорулатат жана Т-көз каранды антигендерге айланат.

Түйүндүү сөздөр: капсула полисахариди; клетка дубалынын полисахариди; конъюгацияланган вакциналар; полисахарид вакциналары; иммундук система; Т-көз карандысыз иммундук жооп; Т-көз каранды иммундук жооп; цианирлөө; мезгилдүү кычкылдануу.

CONJUGATED POLYSACCHARIDE VACCINES: CHEMICAL ACTIVATION OF POLYSACCHARIDES, METHODS FOR DETERMINING ACTIVATION DURING CONJUGATE SYNTHESIS

A.T. Umetalieva, A.A. Belyankin

Abstract. Vaccination with polysaccharide and conjugated vaccines against various diseases is currently one of the most effective ways to prevent them. The relevance lies in the fact that polysaccharide vaccines cause a T-independent immune response, in which the immune system of children under two years of age is unable to produce memory cells with the participation of T-helpers. In this regard, conjugated vaccines have been developed in which the polysaccharide is covalently bound to a protein carrier. Anatoxins of various bacteria are usually used as protein carriers. The article provides an overview of current scientific literature, examines bacterial capsular polysaccharides, their structure, biosynthesis and biological role, what polysaccharide and conjugate vaccines are, and what methods exist to determine the degree of polysaccharide activation for conjugate synthesis. Thus, conjugated vaccines increase the immunogenicity of the capsular polysaccharide and become T-dependent antigens.

Keywords: capsule polysaccharide; cell wall polysaccharide; conjugated vaccines; polysaccharide vaccines; immune system; T-independent immune response; T-dependent immune response; cyanidation; periodate oxidation.

Введение. Инкапсулированные бактерии, такие как *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae b* и др., вызывают ряд тяжелых заболеваний. Среди таких заболеваний: менингит, пневмония, сепсис, гемофильная инфекция. Чистые полисахаридные вакцины на основе капсульного полисахарида клеточной стенки этих бактерий вызывают преимущественно Т-независимый иммунный ответ у детей младше двух лет. Причиной является то, что они не распознаются незрелым иммунитетом. Решением этой проблемы стала разработка конъюгированных вакцин, где полисахаридный антиген клеточной стенки бактерий ковалентно связывается с белковым носителем. Такая вакцина позволяет переводить Т-независимый иммунный ответ в Т-зависимый с участием Т-хелперов, которые способствуют продуцированию высокоаффинных IgG-антител.

Этот обзор посвящен нынешним знаниям о капсульных полисахаридах бактерий и их химической активации для синтеза конъюгированных вакцин. В работе рассмотрены структура и пути биосинтеза капсульных полисахаридов, их биологическая роль и иммунологическое значение, проблемы иммуногенности чистых полисахаридных вакцин, основные принципы химической активации полисахаридов, методы анализа степени активации и значение химической модификации для создания эффективных конъюгированных вакцин.

Цель – обобщение и систематизация сегодняшней информации по конъюгированным вакцинам, какие на данный момент существуют методы активации полисахарида для ковалентного связывания с белковым носителем, методы определения степени активации, иммунологическое значение полисахаридных вакцин.

Методы сбора информации включали поиск, анализ и сравнительное сопоставление научных публикаций из международных реферативных баз данных (PubMed, Nature, SpringerLink, ScienceDirect, Elsevier).

Строение и биосинтез капсульных полисахаридов у бактерий. Капсульные полисахариды (КПС) образуются на периферии клеточной стенки, обеспечивая защитную оболочку на поверхности многих бактерий. У грамположительных бактерий КПС связываются с пептидогликаном, у грамотрицательных – с цитоплазматической мембраной, ковалентно связываясь с фосфолипидом или липидом-А. Такие оболочки могут состоять из полисахаридов, полипептидов или сочетая в себе и полисахариды, и полипептиды [1].

КПС представляют собой длинные, обычно отрицательно заряженные цепи, формирующие сильно гидратированную капсулу вокруг бактериальной клетки. У некоторых штаммов *E. coli* толщина капсулы достигает 100–400 нм, а отдельные гликановые цепи могут содержать более 200 моносахаридов [2]. Поскольку капсула располагается на поверхности клетки, она

первой контактирует с иммунной системой хозяина и играет ключевую роль в уклонении от иммунного ответа. Бактерии, потерявшие капсулу, как правило, становятся непатогенными, что подчеркивает её значение. Благодаря этому КПС нашли широкое применение в вакцинах против *Neisseria meningitidis* серогрупп А, С, W-135 и Y, а также *Haemophilus influenzae* типа b [3, 4].

В рамках ABC-транспортер-зависимого пути биосинтеза КПС сначала синтезируются в виде гликолипидов на цитозольной стороне внутренней мембраны, после чего экспортируются через клеточную оболочку [5, 6]. Секретия КПС осуществляется ABC-транспортером, включающим белки KpsT и KpsM, которые выполняют функции нуклеотид-связывающего домена (NBD) и трансмембранного домена, соответственно [7]. Этот транспортер функционирует совместно с периплазматическим и связанным с внутренней мембраной белком KpsE, относящимся к полисахаридным кополимеразам класса 3 (PCP), а также с KpsD, который предположительно формирует пору во внешней мембране.

Проблемы иммуногенности полисахаридных вакцин. Чистые полисахариды относятся к Т-независимым антигенам. Они напрямую активируют В-клетки за счет перекрестного связывания их рецепторов. Такая активация приводит к образованию плазматических клеток, которые продуцируют выработку антител, но не формирует серотип-специфические клетки памяти. Поэтому иммунный ответ остаётся кратковременным и менее эффективным [8].

В конъюгированных вакцинах полисахарид химически связан с белком-носителем, и иммунный ответ становится Т-зависимым. Полисахарид распознаётся наивными В-клетками, после чего внутри В-клетки происходит процессинг белкового носителя. Пептиды белка-носителя представляются на молекулах МНС II и распознаются специфическими Т-хелперами [9].

Принципы химической активации полисахаридов: CDAP, периодатное окисление. Перед ковалентным связыванием полисахарида с белком, его сначала нужно химически активировать. Существуют различные методы активации КПС. Наиболее распространенными методами активации являются реакции

восстановительного аминирования, амидирования и этерификации, а конъюгированная вакцина, полученная с помощью комбинации методов, демонстрирует высокую степень стабильности [10]. Однако сейчас в основном применяют два типа химической активации – периодатное окисление и цианирование.

В периодатном окислении главным реагентом является периодат натрия (NaIO_4), который расщепляет диолы (два соседних атома углерода с гидроксильными группами) до альдегидов. В процессе он далее разрывает связи С-С. В конечном итоге, в зависимости от структуры КПС, активация периодатом может фрагментировать КПС и открыть кольцевые структуры сахаров. Если диол находится в боковой цепи (например, глицероловой или рибитоловой), эта цепь разрушается полностью. Образованные альдегидные группы способны реагировать со свободными аминок группами белков. В присутствии цианоборгидрида натрия ($\text{NaBH}_3(\text{CN})$) альдегиды конденсируются с ϵ -аминогруппами лизина, образуя стабильные вторичные амины – этот процесс идет медленно и может занимать несколько дней. Непрореагировавшие альдегидные группы затем восстанавливают с помощью боргидрида натрия (NaBH_4), превращая их обратно в гидроксильные группы. Главным недостатком этого метода является изменение пространственной структуры КПС с утерей важных эпитопов для иммуногенности [11].

В методе цианирования сначала использовался бромциан (CNBr) для получения реакционноспособных цианоэфирных групп на КПС. Затем метод улучшили, заменив бромциан на более усовершенствованный реагент CDAP (1-циано-4-диметиламинопиридиний тетрафторборат) [12]. Низкая эффективность CNBr требовала, чтобы для конъюгатов использовали реакционноспособные линкеры, такие как дигидразид адипиновой кислоты (ADH). CDAP реагирует с КПС, добавляя к гидроксильным группам циановые, таким образом образуются цианоэфирные группы на КПС. Этот цианоэфир обладает высокой реакционной способностью. Активация лучше всего проводится в щелочной среде при pH 9–10. Затем цианоэфиры реагируют с ϵ -аминами лизина, образуя стабильную

О-алкил-изомочевинную связь. Активация CDAP занимает всего несколько минут, а конъюгация завершается за несколько часов. Затем реакция гасится с помощью аминокислотного реагента, такого как глицин [11].

Методы анализа степени активации. Контроль степени активации полисахарида является важным этапом при синтезе конъюгата. Ниже приведены методы для контроля степени активации полисахарида.

Размерная эксклюзионная хроматография (SEC). SEC применяется по механизму разделения по размерам частиц за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. Поскольку полисахариды имеют определенную молекулярную массу, следовательно, этим способом возможно оценить распределение размеров в полисахаридных вакцинах. Он отличается высокой скоростью анализа и достоверной воспроизводимостью [13]. Изначально метод применяли на агарозных гелях.

В 1989 году Newland и соавторы предложили вариант высокоэффективной SEC (HPSEC), основанный на последовательном использовании колонок TSK G5000 PW и TSK G2500 PW (Toyo Soda, Токио, Япония) с применением 0,2 М раствора ацетата аммония в качестве элюента. Этот метод дает сравнимые результаты за существенно меньшее время, требует минимального количества пробы и обеспечивает обнаружение изменений молекулярной массы, возникающих вследствие деполимеризации полисахаридов при хранении вакцины [14].

В полисахаридных конъюгированных вакцинах важно также контролировать белковые компоненты. SEC широко применяется для выявления белковых агрегатов (димеров и мультимеров), так как они могут серьезно повлиять на эффективность и иммуногенность терапевтических белков [13].

Высокоэффективная анионообменная хроматография в сочетании с импульсным амперометрическим детектированием (HPAEC-PAD). Для определения свободных и общих сахаров применяется высокоэффективная анионообменная хроматография с импульсной амперометрической детекцией (HPAEC-PAD). Этот метод обладает высокой селективностью

и чувствительностью, не требует флуоресцентных или абсорбционных меток и был разработан в 1990 году [15, 16]. HPAEC-PAD эффективно разделяет нейтральные, кислотные и восстанавливающие сахара [17] и позволяет анализировать природные олигосахариды без искажения результатов, связанных с образованием производных соединений [18].

Энзимный иммуносорбентный анализ (ELISA). Метод широко используется для количественного анализа полисахаридов и оценки ответа антител после иммунизации конъюгированными полисахаридными вакцинами. Например, титры антител против Hib в сыворотке человека определяются с использованием коммерческих ELISA-наборов [19]. Для повышения специфичности анализа разработаны различные форматы ELISA – прямой, непрямой, сэндвич-ELISA и конкурентный вариант [20].

Однако бактериальные полисахариды плохо адсорбируются на пластиковых поверхностях из-за наличия множества кислотных групп и общего отрицательного заряда. Поэтому было предложено ковалентное связывание полисахарида с белком-носителем, что обеспечивает его устойчивую фиксацию на планшете и делает количественное определение антител технически возможным [21].

Кроме того, были разработаны четыре варианта сэндвич-ELISA для определения капсульных полисахаридов в конъюгированных и неконъюгированных менингококковых вакцинах, продемонстрировав высокую чувствительность, точность и применимость метода для контроля стабильности и межсерийной сопоставимости [22].

Спектрофотометрический метод с реагентом TNBS. Метод позволяет одновременно определить гидразин и гидразиды. Поскольку на гидразиде имеются две NH_2 группы, которыми с одного конца он соединяется с активированным полисахаридом, а другим концом – с 2,4,6-тринитробензосульфоновой кислотой (TNBS). Комплекс с TNBS дает окрашенный раствор желто-оранжевого цвета, у которого можно измерить оптическую плотность. Построив калибровочную кривую из стандартных растворов ADH, можно рассчитать

уравнение регрессии и то количество связанных гидразидных групп с TNBS, которое можно использовать для конъюгации с белковым носителем или судить о степени активации КПС [23].

Значение химической модификации для создания эффективных конъюгированных вакцин. После конъюгации полисахарида с белковым носителем очень важно измерить их соотношение. Это возможно только после полного удаления свободных (несвязанных) компонентов. Для удаления несвязанных компонентов используют ультрафильтрацию, хроматографию, электрофорез или осаждение. Наличие свободного полисахарида делает дозировку неточной, может ухудшить иммуногенность, конкурируя с Т-зависимой формой антигена. Конъюгаты также могут частично распадаться при длительном хранении, что изменяет соотношение полисахарид-белок [24–26].

Также сложно оценить степень перекрестного сшивания и длину неповрежденных цепей между точками связывания конъюгата. Молекулярная масса конъюгата и возможные агрегаты также влияют на процесс иммунизации. Таким образом, оптимальную схему конъюгации необходимо подбирать индивидуально для каждого гаптена-белка [27].

Заключение. Конъюгированные полисахаридные вакцины проложили путь к решению иммуногенности капсульных полисахаридов. Их особенность заключается в способности преобразовывать Т-независимые антигены в полноценные Т-зависимые с участием Т-хелперов, что стимулирует продуцирование и формирование иммунологической памяти. Переход к конъюгированным вакцинам изменил вакцинопрофилактику по таким патогенам, как *Haemophilus influenzae* типа *b*, *Streptococcus pneumoniae* и *Neisseria meningitidis*, приведя к снижению заболеваемости уязвимых групп населения, особенно детей младше двух лет.

В ходе приведенного анализа публикаций было выявлено, что эффективность конъюгированных вакцин во многом определяется особенностями структуры полисахарида, типом и свойствами носителя, количеством точек конъюгации, степенью активации для последующего связывания с белком, стабильностью связи

полисахарида с белком. Рассмотренные методы аналитического контроля позволяют всесторонне оценивать качество полученных конъюгатов, выявлять свободные компоненты, контролировать молекулярную массу, степень активации, количество доступных функциональных групп и следить за структурной целостностью полисахарида после всех стадий конъюгации.

Тем не менее разработка конъюгированных вакцин остается сложной задачей. К основным проблемам относятся недостаточная активация полисахарида в связи с условиями этого процесса (рН, температура), распределение полисахаридных эпитопов на поверхности носителя, соотношение полисахарид/белок, возможная потеря эпитопов на полисахариде в ходе активации. Дополнительные сложности создают проблемы масштабирования, стандартизации и выпуск на доклинические исследования, а также необходимость контроля каждого этапа производства.

Несмотря на существующие ограничения, перспективы доработки и оптимизации таких вакцин остаются широкими и обоснованными. Современные методы направлены на оптимизацию химии конъюгации (CDAP, AADH, периодатное окисление и т. д.), разработку новых методов активации, внедрение более точных методов структурного анализа. Развитие методов и технологий контроля качества и понимание факторов, которые влияют на иммуногенность, позволяет рассчитывать на создание более безопасных, стабильных и эффективных вакцин.

Таким образом, проведенный литературный анализ подчеркивает необходимость комплексного подхода к процессу конъюгации. Он включает в себя углубленное изучение структуры полисахаридов и их химической модификации, выбор оптимальных условий активации, конъюгации и белкового носителя, аналитический контроль и оценку иммуногенности. Конъюгированные вакцины остаются востребованным направлением профилактики инкапсулированных бактерий, и дальнейшее усовершенствование и оптимизация методов их получения имеет огромное значение для глобального здравоохранения.

Поступила: 12.02.2026;

рецензирована: 26.02.2026; принята: 27.02.2026.

Литература

1. Gao S., Jin W., Quan Y. et al. Bacterial capsules: Occurrence, mechanism, and function. *npj Biofilms Microbiomes*. 2024. 10, 21. URL: <https://doi.org/10.1038/s41522-024-00497-6> (дата обращения: 15.10.2025).
2. Pelkonen S., Häyrynen J., Finne J. Polyacrylamide gel electrophoresis of the capsular polysaccharides of *Escherichia coli* K1 and other bacteria // *J Bacteriol*. 1988. 170. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2646-2653.1988> (дата обращения: 17.11.2025).
3. Matthew J. Bottomley, Davide Serruto, Marco Aurélio Palazzi Sáfdi, Keith P. Klugman. Future challenges in the elimination of bacterial meningitis // *Vaccine*. 2012. Vol. 30, Supplement 2, Pages B78-B86. ISSN 0264-410X.). URL: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.099> (дата обращения: 15.12.2025).
4. Peter B. McIntyre, Katherine L. O'Brien, Brian Greenwood, Diederik van de Beek. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide // *The Lancet*. 2012. Vol. 380, Issue 9854. Pages 1703–1711, ISSN 0140-6736. URL: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61187-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61187-8) (дата обращения: 22.10.2025).
5. Whitfield Chris, Samantha S. Wear, and Caitlin Sande. Assembly of bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides // *Annual Review of Microbiology*. 2020. 74.1. 521–543. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-011420-075607> (дата обращения: 28.11.2025).
6. Caffalette C.A., Kuklewicz J., Spellmon N., Zimmer J. Biosynthesis and Export of Bacterial Glycolipids // *Annu Rev Biochem*. 2020 Jun 20; 89: 741–768. DOI: 10.1146/annurev-biochem-011520-104707. PMID: 32569526.
7. Pavelka M.S. Jr., Wright L.F., Silver R.P. Identification of two genes, kpsM and kpsT, in region 3 of the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1 // *J Bacteriol*. 1991 Aug; 173 (15):4603–10. DOI: 10.1128/jb.173.15.4603-4610.1991. PMID: 1856162; PMCID: PMC208135.
8. Durando P., Faust S.N., Fletcher M., Krizova P., Torres A., Welte T. Experience with pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (conjugated to CRM197 carrier protein) in children and adults // *Clin Microbiol Infect*. 2013 Oct; 19 Suppl 1: 1–9. DOI: 10.1111/1469-0691.12320. PMID: 24083785.
9. Avci F.Y., Li X., Tsuji M., Kasper D.L. A mechanism for glycoconjugate vaccine activation of the adaptive immune system and its implications for vaccine design // *Nat Med*. 2011 Nov 20; 17 (12): 1602–9. DOI: 10.1038/nm.2535. PMID: 22101769; PMCID: PMC3482454.
10. Ada G. Overview of vaccines and vaccination // *Mol Biotechnol*. 2005 Mar; 29 (3): 255–72. DOI: 10.1385/MB:29:3:255. PMID: 15767703; PMCID: PMC7091467.
11. Frasch C.E. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: analytical and manufacturing challenges // *Vaccine*. 2009 Oct 30; 27 (46): 6468–70. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.06.013. Epub 2009 Jun 24. PMID: 19555714.
12. Lees A., Nelson L., Mond J.J. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents // *Vaccine*. 1996 Feb; 14 (3): 190–8. DOI: 10.1016/0264-410x(95)00195-7. PMID: 8920699.
13. Planinc A., Bones J., Dejaegher B., Van Antwerpen P. & Delporte C. (2016). Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives. *Analytica Chimica Acta*, 921, 13–27. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.049> (дата обращения: 25.11.2025).
14. Vuorinen T., Alén R. (1999). Carbohydrates. In: Sjöström, E., Alén, R. (eds) *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*. Springer Series in Wood Science. Springer, Berlin, Heidelberg). URL: https://doi.org/10.1007/978-3-662-03898-7_3 (дата обращения: 15.11.2025).
15. Lin Yi, Yilan Ouyang, Xue Sun, Naiyu Xu, Robert J. Linhardt, Zhenqing Zhang. Qualitative and quantitative analysis of branches in dextran using high-performance anion exchange chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry // *Journal of Chromatography A*. 2015. Vol. 1423. Pages 79–85. ISSN 0021-9673). URL: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.064> (дата обращения: 5.12.2025).
16. Zhang Z., Khan N.M., Nunez K.M., Chess E.K., Szabo C.M. Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection // *Anal Chem*. 2012 May 1; 84 (9): 4104–10. DOI: 10.1021/ac300176z. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22448871.
17. Ricci S., Bardotti A., D'Ascenzi S., Ravenscroft N. Development of a new method for the quantitative analysis of the extracellular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup A by use of high-performance anion-exchange

- chromatography with pulsed-amperometric detection // *Vaccine*. 2001 Feb 28; 19 (15–16): 1989–97. DOI: 10.1016/s0264-410x(00)00427-8. PMID: 11228369.
18. Szabo Z., Thayer J., Agroskin Y. et al. In-depth analyses of native N-linked glycans facilitated by high-performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection coupled to mass spectrometry // *Anal Bioanal Chem*. 2017. 409, 3089–3101. URL: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0248-3> (дата обращения: 10.12.2025).
19. Hamidi A., Kreeftenberg H. Use of immuno assays during the development of a Hemophilus influenzae type b vaccine for technology transfer to emerging vaccine manufacturers // *Hum Vaccin Immunother*. 2014; 10 (9): 2697–703. DOI: 10.4161/hv.29300. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25483494; PMCID: PMC4977443.
20. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015 Oct; 72: 4–15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25908411.
21. Gray Barry M. ELISA methodology for polysaccharide antigens: protein coupling of polysaccharides for adsorption to plastic tubes // *Journal of immunological methods*. 1979. 28.1–2: 187–192.
22. Fátima Reyes, Oscar Otero, Maribel Cuello, Nevis Amin, Luis García, Daniel Cardoso, Frank Camacho. Development of four sandwich ELISAs for quantitation of capsular polysaccharides from *Neisseria meningitidis* serogroups A, C, W and Y in multivalent vaccines // *Journal of Immunological Methods*. 2014. Vol. 407. Pages 58–62. ISSN 0022-1759. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.03.020> (дата обращения: 25.11.2025).
23. Qi X.-Y. Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides, and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid / X.-Y. Qi, N.O. Keyhani, Y.C. Lee – Text: direct // *Analytical Biochemistry*. 1988. Vol. 175. № 1. P. 139–144.
24. Braley-Mullen H. Antigen requirements for priming of IgG producing B memory cells specific for Type III pneumococcal polysaccharide // *Immunology*. 1980 Aug; 40 (4): 521–7. PMID: 7000684; PMCID: PMC1458115.
25. Peeters C.C., Tenbergen-Meekes A.M., Poolman J.T., Zegers B.J., Rijkers G.T. Immunogenicity of a Streptococcus pneumoniae type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide // *Vaccine*. 1992; 10 (12): 833–40. DOI: 10.1016/0264-410x(92)90046-m. PMID: 1455909.
26. Wilson D., Braley-Mullen H. Antigen requirements for priming of type III pneumococcal polysaccharide-specific IgG memory responses: suppression of memory with the T-independent form of antigen // *Cell Immunol*. 1981 Oct; 64 (1): 177–86. DOI: 10.1016/0008-8749(81)90468-8. PMID: 6170457.
27. Stein K.E. Glycoconjugate vaccines. What next? // *Int J Technol Assess Health Care*. 1994 Winter; 10 (1): 167–76. DOI: 10.1017/s0266462300014094. PMID: 8157449.