

DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1476>

Изучение лечебных форм клещевых аллергенов, предназначенных для аллергенспецифической иммунологической терапии



В.М. Бержец, А.В. Васильева, Н.С. Петрова, С.В. Хлгатян, С.Ю. Петрова,
О.Ю. Емельянова, Л.Н. Нестеренко

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,
Москва, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

ОБОСНОВАНИЕ. Рост аллергических заболеваний диктует необходимость разработки новых форм лечебных аллергенов, так как терапия нативными водно-солевыми экстрактами аллергенов не является безопасной и удобной. Риск системных побочных эффектов при проведении аллергенспецифической иммунотерапии (АСИТ) ставит перед исследователями задачу создания современных лечебных форм аллергенов, обладающих высокой иммуногенной и низкой аллергенной активностью. Наша лаборатория в течение многих лет занимается разработкой препаратов для диагностики и лечения клещевой аллергии.

ЦЕЛЬ — создание современных лечебных форм препаратов аллергенов из клещей домашней пыли рода *Dermatophagoides*, предназначенных для АСИТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для исследования полученных препаратов применяли физико-химические и иммунобиологические методы: электрофорез в полиакриламидном геле; микроточечный иммуноблот; твердофазный иммуноферментный анализ; реакцию торможения связывания аллергенспецифического IgE в сыворотках крови пациентов.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Разработана технология получения гранулированной лекарственной формы микст-аллергена из клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae*, предназначенной для сублингвального использования. Данная лекарственная форма успешно прошла доклинические испытания, обладает выраженной иммуногенной активностью, сниженной аллергенностью и удобна для применения в педиатрической практике. Для снижения аллергенности и увеличения иммуногенности лечебных аллергенов получают химически модифицированные препараты — алергоиды. Совместно с ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России был создан и изучен сукцинизированный мономерный клещевой алергоид *Dermatophagoides pteronyssinus*. Исследование иммунобиологических свойств полученного препарата показало, что мономерный алергоид в отличие от нативного водно-солевого экстракта обладает повышенной иммуногенной и сниженной аллергенной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Созданные формы клещевых аллергенов после проведения клинических испытаний могут быть использованы для лечения пациентов, сенсibilизированных к клещам домашней пыли рода *Dermatophagoides*.

Ключевые слова: клещи домашней пыли; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Dermatophagoides farinae*; гранулированная форма аллергена; модифицированные алергены

Для цитирования: Бержец В.М., Васильева А.В., Петрова Н.С., Хлгатян С.В., Петрова С.Ю., Емельянова О.Ю., Нестеренко Л.Н. Изучение лечебных форм клещевых аллергенов, предназначенных для аллергенспецифической иммунологической терапии // *Российский аллергологический журнал*. 2021. Т. 18. № 4. С. 126–134. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1476>

Treatment forms of house dust mites allergens intended for allergen-specific immunological therapy

V.M. Berzhets, A.V. Vasilyeva, N.S. Petrova, S.V. Khlgatyan, S.Yu. Petrova,
O.Yu. Emelyanova, L.N. Nesterenko

I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: The growth of allergic diseases dictates the necessity to develop new forms of therapeutic allergens since therapy with native water-salt extracts of allergens is unsafe and convenient. The risk of systemic side effects during allergen-specific immunotherapy sets the task for researchers to create modern therapeutic forms of allergens with high immunogenic and low allergenic activity. Our laboratory has been developing preparations for the diagnosis and treatment of house dust mites allergies for many years.

AIMS: To create modern therapeutic forms of allergen preparations from house dust mites of the genus *Dermatophagoides* that are intended for allergen-specific immunotherapy

MATERIALS AND METHODS: Physicochemical and immunobiological methods, such as electrophoresis in polyacrylamide gel, micropoint immunoblot, solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay, and the reaction of binding inhibition of allergen-specific immunoglobulin E in the sera of patients were used to study the obtained preparations.

RESULTS: A technology has been developed to obtain a granular dosage form of a mixed allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* mites for sublingual use. This treatment form has successfully passed pre-clinical tests, has a pronounced immunogenic activity, and reduced allergenicity, and is convenient for pediatric practice. Allergoids, which are chemically modified preparations, are obtained to reduce allergenicity and increase therapeutic allergen immunogenicity. A succinylated monomeric house dust mites allergoid *Dermatophagoides pteronyssinus* was created and studied with the National Research Center, Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia. The study of the immunobiological properties of the obtained preparation showed that the monomeric allergoid has increased immunogenic and decreased allergenic activity contrary to the native water-salt extract.

CONCLUSIONS: The created forms of mite allergens can be used to treat patients who are sensitized to house dust mites of the genus *Dermatophagoides* after clinical trials.

Keywords: House dust mites allergy; *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Dermatophagoides farinae*; sublingual immunotherapy; monomeric allergoid

For citation: Berzhets VM, Vasilyeva AV, Petrova NS, Khlgatyan SV, Petrova SYu, Emelyanova OYu, Nesterenko LN. Treatment forms of house dust mites allergens intended for allergen-specific immunological therapy. *Russian Journal of Allergy*. 2021;18(4):126–134. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA1476>

Статья поступила 29.08.2021
Received: 29.08.2021

Принята к печати 15.11.2021
Accepted: 15.11.2021

Опубликована 30.11.2021
Published: 30.11.2021

Введение

В последние десятилетия наблюдается неуклонный рост аллергических заболеваний как в России, так и в странах зарубежья. По оценке Всемирной организации по аллергии (World Allergy Organization, WAO), около 30–40% населения Земли страдает аллергией различной этиологии. По результатам многочисленных исследований степень тяжести проявления аллергических заболеваний постепенно возрастает, а темпы распространения аллергопатологий сохраняются и даже растут [1, 2]. По данным статистического анализа, различными формами аллергии страдает от 17,5 до 30% населения России [3]. Основным алергизирующим компонентом жилища человека, инициирующим формирование атопических заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, являются пироглифидные клещи рода *Dermatophagoides*. Во всём мире до 85% больных бронхиальной астмой имеют гиперчувствительность к клещам домашней пыли рода *Dermatophagoides* [4].

Согласно нашим исследованиям, приблизительно у 20% пациентов, страдающих ингаляционной

аллергией ($n=2546$), выявлена сенсibilизация к клещам домашней пыли рода *Dermatophagoides*, причём более чем у половины обследованных обнаружена гиперчувствительность одновременно к двум видам клещей рода *Dermatophagoides* — *D. pteronyssinus* и *D. farinae*.

Для лечения аллергических заболеваний необходима разработка новых эффективных подходов к терапии и профилактике состояний, вызванных клещевой сенсibilизацией. Сублингвальная иммунотерапия является перспективным способом лечения и достойной альтернативой парентеральной алерговакцинации. К преимуществам этого метода лечения можно отнести снижение риска побочных реакций, отмену инъекционных процедур, удобный режим использования, безболезненность лечения, уменьшение зависимости пациента от врача. Побочные реакции при сублингвальной иммунотерапии минимальные. Для детей такая форма лечебного алергена особенно удобна в применении, поэтому создание пероральной формы микст-алергена из двух клинически значимых клещевых алергенов рода *Dermatophagoides* явля-

ется актуальным направлением, особенно для педиатрической практики.

Другим актуальным направлением в разработке современных препаратов для проведения аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) является создание лечебных форм со сниженной аллергенностью и сохранённой иммуногенностью. Такие лечебные формы аллергенов можно получить путём модификации водно-солевых экстрактов аллергенов различными химическими агентами, в том числе и янтарным ангидридом. Мономерный аллергоид из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* был разработан на основе совместного договора ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова и ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА о научном сотрудничестве «Разработка и внедрение в клиническую практику здравоохранения РФ мономерных аллергоидов из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* и *D. farinae* для лечения аллергии к клещам домашней пыли».

Цель — создание новых форм лечебных препаратов клещевых аллергенов.

Перед нами стояли следующие задачи:

- 1) разработка технологии получения гранулированной сублингвальной лекарственной формы микст-аллергена из клещей *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der.p) и *Dermatophagoides farinae* (Der.f);
- 2) получение мономерного клещевого аллергоида Der.p (методом сукцинирования);
- 3) изучение свойств полученных лечебных препаратов клещевых аллергенов.

Материал и методы

*Приготовление гранулированной сублингвальной формы микст-аллергена из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae**

Для создания гранулированной сублингвальной формы микст-аллергена из клещей Der.p и Der.f использовали бесфенольные водно-солевые экстракты одноимённых клещевых аллергенов в соотношении 1:1. Способ получения бесфенольных водно-солевых экстрактов каждого из видов включает водно-солевою экстракцию исходного сырья с применением экстрагирующей жидкости Эванс—Кока. Культивирование клещей домашней пыли *D. farinae* и *D. pteronyssinus* проводят в отдельных боксах в течение 3–4 мес в термостатах при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $73 \pm 3\%$ на субстрате из домашней пыли и щетины. В качестве исходного сырья используют смесь культуры каждого из видов этих клещей и среды их культивирования. Водно-солевою экстракцию исходного сырья проводят после смешивания и гомогенизации его со стеклянным порошком в течение трёх суток. После окончания экстраги-

рования надосадочную жидкость сливают, проводят центрифугирование при 5000–6000 об/мин в течение 30–40 мин с последующей фильтрацией через бумажный барьер, осуществляют стерилизующую фильтрацию, стабилизацию маточного раствора в течение 3–4 мес, разлив и получение готовой формы препарата. Данная технология обеспечивает создание высокоэффективного лечебного аллергена при упрощении технологического процесса. Далее смешивают полученные маточные растворы в соотношении 1:1.

Для получения пероральной гранулированной лекарственной формы микст-аллергена сначала проводят восьмикратное десятичное разведение маточного раствора микст-аллергена на растворе этилового спирта, далее проводят нанесение полученных разведений на сахарную крупку, предварительно пропитанную 45% этиловым спиртом, с периодическим встряхиванием крупки в течение 10–15 мин и сушкой сахарной крупки с лекарственным препаратом до полного испарения спирта. Техническим результатом является создание эффективной и удобной в применении гранулированной лекарственной формы микст-аллергена из клещей рода *Dermatophagoides*.

Концентрацию белка в бесфенольном водно-солевом экстракте микст-аллергена измеряли классическими методами Несслера и Бредфорда [5]. Для определения мажорных аллергенов проводили очистку методом аффинной хроматографии на Ni-активированной сефарозе (Cytiva™, США) [6] и электрофорез водно-солевых экстрактов клещевых аллергенов и их модификаций в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Na; Applichem, Германия) [7]. Для определения pH применяли потенциометрический метод [5].

Для определения аллергенной активности гранулированной формы микст-аллергена из клещей домашней пыли рода *Dermatophagoides* в экспериментальных сериях препарата использовали метод микроточечного иммуоблота (иммуодот). На нитроцеллюлозную мембрану Immobilon® PVDF (Merck KGaA, Дармштадт, Германия) наносили следующие контрольные и экспериментальные препараты: разводящую жидкость с ТВИН-80 (отрицательный контроль), сахарную крупку (отрицательный контроль), цельный аллерген берёзы висячей (отрицательный контроль), цельный аллерген из Der.p или Der.f (312,5 мкг/мл) (положительный контроль); стандартный водно-солевой аллерген Der.p. или Der.f (0,5 мкг/мл); гранулированную форму микст-аллергена Der.p. и Der.f (1 мкг/мл). В качестве проявляющих антител использовали конъюгаты анти-IgE-антител человека с щелочной фосфатазой (Dr. Foote, Германия). Для выявления специфических антител использовали сыворотки пациентов, сенсибилизированных к Der.p. или Der.f

(IV класс). Исследовали три серии экспериментального аллергена, каждая из которых включала пять определений специфических IgE-антител к Der.p и Der.f. Данные иммуноблота оценивали визуально и денситометрически по интенсивности окрашивания в условных единицах с использованием программного обеспечения ImageQuant 5.2 (GE Healthcare, США) [8].

Исследование иммуногенных свойств гранулированного клещевого микст-аллергена проводили на морских свинках. В эксперименте животные были поделены на две группы. В 1-й группе животным ($n=10$) вводили гранулированную форму микст-аллергена перорально шприцем в полость рта в виде раствора по 0,25 г в 1 мл дистиллированной воды ежедневно 1 раз в день в 8 разведениях. Каждое разведение аллергена вводилось в течение 7 дней. Общая продолжительность приёма препарата составила 60 дней. Во 2-й, контрольной, группе животным ($n=10$) вводили чистую сахарную крупку по 7 гранул ежедневно 1 раз в день, 60 дней.

Уровень специфических IgG к Der.p и Der.f в сыворотках животных определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Стандартный водно-солевой экстракт аллергена Der.p или стандартный водно-солевой экстракт Der.f сорбировали в лунках полистиролового планшета.

Перед постановкой реакции проводили обработку планшетов раствором бычьего сывороточного альбумина для нейтрализации неспецифической сорбции. На аллергосорбент наносили образцы сывороток крови морских свинок. Фиксировали образование комплекса антиген–антитело. К образовавшемуся в лунке планшета комплексу антиген–антитело добавляли диагностические антитела против IgG (H+L) морских свинок, меченные пероксидазой хрена (НИИ эпидемиологии и микробиологии, предприятие по производству бакпрепаратов имени Н.Ф. Гамалеи, Россия), и индикатор — тетраметилбензидин в субстратном буфере. ИФА на обнаружение специфических IgG к Der.p и Der.f проводили по отдельности. Оценку результатов осуществляли по оптической плотности (D) на спектрофотометре Dynatech MR-5000 (DYNATECH, США).

Приготовление мономерного клещевого аллергоида D. pteronyssinus

На основе вышеописанной технологии производства водно-солевого экстракта методом сукцинирования был создан модифицированный клещевой аллерген Der.p.

Изучение аллергенных свойств полученного сукцинированного мономерного аллергоида из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* проводили методом торможения реакции связывания аллергенспецифического IgE, используя сыворотки пациентов, сенсibilизированных к *D. pteronyssinus* (III–V классы).

Сравнительную оценку иммуногенности нативного аллергена и аллергоида осуществляли на мышах-самках линии BALB/c стандартным методом ИФА, согласно ОФС.1.7.2.0033.15¹. Использовались здоровые особи женского пола линии BALB/c в возрасте от 2 до 5 мес, весом 20–22 г. Первая группа мышей ($n=16$) была 4-кратно иммунизирована мономерным аллергоидом Der.p, а вторая ($n=16$) — водно-солевым экстрактом аллергена Der.p.

Животные

Содержание и уход за животными проводился согласно ГОСТ 33216-2014². В работе использованы морские свинки (здоровые особи мужского пола в возрасте от 1,5 до 2 лет весом 1000–1500 г); мыши (здоровые особи женского пола линии BALB/c в возрасте от 2 до 5 мес весом 20–22 г).

Этическая экспертиза

Исследования с животными были одобрены на заседании Этического комитета НИИ вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова (протокол № 2 от 19 февраля 2019 г.).

Статистический анализ

Результаты обрабатывали с помощью пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel, версия 2010 (США) с анализом количественных признаков. Вычисляли следующие величины: выборочное среднее (\bar{x}), выборочное стандартное отклонение (s). Достоверность различий в группах узнавали методом дисперсионного анализа Фишера (F). Достоверность различий между группами (>2) изучали с помощью 95% доверительного интервала для среднего (95% ДИ). Критической величиной уровня значимости считали $\alpha=0,05$.

Результаты

Изучение гранулированной сублингвальной формы микст-аллергена из клещей D. pteronyssinus и D. farinae

Содержание белкового азота в бесфенольном микст-растворе составило 5000 ± 2000 PNU, pH раствора — $7,0 \pm 0,25$. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле в присутствии ДДС-Na.

¹ Метод иммуноферментного анализа. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание. Общие фармакопейные статьи. Режим доступа: <https://pharmaseroeia.ru/ofs-1-7-2-0033-15-metod-immunofermentnogo-analiza/>. Дата обращения: 15.10.2021.

² ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200127506>. Дата обращения: 15.10.2021.

При исследовании предварительно очищенного от низкомолекулярных примесей бесфенольного водно-солевого аллергена с концентрацией белка 1,8 мг/мл выявлена многокомпонентная смесь белков различной молекулярной массы. Так, основные фракции белков имели молекулярную массу 26–27 кДа, что соответствует главным мажорным аллергенам Der p1/Der f1. Кроме того, выявлены и высокомолекулярные белковые фракции в интервалах 50–60 и 98–100 кДа (рисунок).

Для определения аллергенной активности гранулированной формы микст-аллергена в экспериментальных сериях препарата использовали метод микроточечного иммуноблота (иммунодот). Полученные в результате реакции пятна в точках нанесения гранулированной формы микст-аллергена и стандартного водно-солевого аллергена Der.p или Der.f не различались статистически значимо по интенсивности окрашивания во всех сериях экспериментов ни визуально, ни денситометрически [9] (таблица).

Исследование иммуногенных свойств гранулированного клещевого микст-аллергена на морских свинках показало статистически значимое повышение уровня оптической плотности специфических IgG-антител к Der.p и Der.f в сыворотках крови животных, получавших экспериментальный препарат, в сравнении с контрольной группой ($p < 0,01$) [9]. В ИФА минимальное значение оптической плотности специфических IgG к Der.f в контрольной группе составило 0,180 у.е., максимальное — 1,088 у.е., среднее значение оптической плотности специфических IgG к Der.f — $0,515 \pm 0,28$ у.е.; в основной группе — 0,887; 1,861 и $1,381 \pm 0,322$ у.е.

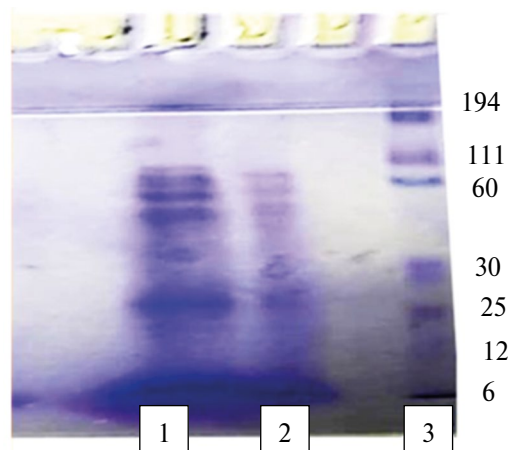


Рис. Электрофорез бесфенольного водно-солевого экстракта микст-аллергена (БВСА) в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Примечание. 1 — БВСА клещей домашней пыли Der.p и Der.f с концентрацией белка 1,8 мг/мл; 2 — БВСА клещей домашней пыли Der.p и Der.f с концентрацией белка 0,9 мг/мл; 3 — маркеры молекулярного веса белков.

Fig. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of phenol-free water-salt allergen (PWSA).

Note. 1 — PWSA house dust mites Der.p. and Der.f with a protein concentration of 1.8 mg/ml; 2 — PWSA of house dust mites Der.p and Der.f, with a protein concentration of 0.9 mg/ml; 3 — markers of molecular weights of proteins.

соответственно. В ИФА с сыворотками животных, получавших экспериментальный препарат, отмечено статистически значимое повышение уровня оптической плотности специфических IgG к Der.f по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$). При исследовании уровня оптической плотности специфических IgG к Der.p. методом ИФА обна-

Таблица. Результаты обработки данных иммунодота денситометрическим методом

Table. The results of analyse of immunodot data by densitometric method

Серия ЭА	Стандартный ВСЭА 0,5 мкг/мл, у.е.			Чистая сахарная крупка, у.е.			ЭА 1 мкг/мл, у.е.		
	\bar{X}	s	95% ДИ*	\bar{X}	s	95%ДИ*	\bar{X}	s	95% ДИ*
<i>Реакция со специфическими IgE к Der.f</i>									
1 (n=5)	57	2,1	54–60	32	15,3	13–51	61	5,8	54–68
2 (n=5)	59	4,1	54–64	34	4,1	29–39	50	6,8	42–58
3 (n=5)	60	3,5	56–64	30	3,5	26–34	58	2,1	55–61
<i>Реакция со специфическими IgE к Der.p</i>									
1 (n=5)	55	4,3	50–60	30	5,3	23–37	59	2,1	56–62
2 (n=5)	57	5,4	50–64	32	5,8	25–39	60	2,2	57–63
3 (n=5)	58	5,3	51–65	31	5,8	24–38	58	8,9	47–69

Примечание. * Критическое значение $t=2,776$ при уровне значимости $\alpha=0,05$ и числе степеней свободы $v=4$. ЭА — экспериментальный микст-аллерген из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae* (гранулированная форма); ВСЭА — водно-солевой экстракт аллергена из клещей *D. pteronyssinus* или *D. farinae*.

Note. * The critical value $t=2.776$ at the significance level $\alpha=0.05$ and the number of degrees of freedom $v=4$. ЭА — experimental mixed allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* mites (granular form); ВСЭА — water-salt extract of the mixed allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* mites.

ружены сходные результаты. Минимальное значение оптической плотности в контрольной группе составило 0,112 у.е., максимальное — 0,993 у.е., среднее значение D — $0,549 \pm 0,305$ у.е.; в основной группе — $0,777$; $2,045$ и $1,434 \pm 0,4$ у.е. соответственно. Выявлено статистически значимое повышение уровня оптической плотности специфических IgG к Der.p в ИФА с сыворотками животных, получавших экспериментальный препарат.

Изучение мономерного клещевого аллергоида D. pteronyssinus

Электрофорез полученного сукцинированного мономерного аллергоида из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* показал, что сукцинирование существенно не изменяет размер молекул белка.

Изучение аллергенных свойств модифицированного экстракта Der.p методом торможения реакции связывания аллергенспецифического IgE в сыворотках сенсibilизированных пациентов показало, что частота связывания специфических IgE-антител к Der.p с мономерным аллергоидом существенно меньше (примерно в 100 раз), чем с водно-солевым экстрактом одноимённого аллергена.

При сравнительной оценке иммуногенности нативного аллергена и мономерного сукцинированного аллергоида методом ИФА было показано, что после 4-й иммунизации IgE-ответ на аллерген был выше в группе мышей, иммунизированных водно-солевым экстрактом, чем в группе мышей, иммунизированных мономерным аллергоидом. В процессе эксперимента были выявлены существенно более высокие уровни анти-Der.p IgG2a при иммунизации мономерным аллергоидом по сравнению с иммунизацией водно-солевым экстрактом.

Обсуждение

АСИТ на сегодняшний день является единственно возможным методом лечения аллергических заболеваний, затрагивающим все патогенетические звенья атопической аллергии. Совершенствование АСИТ связано в том числе с повышением безопасности лечебных препаратов, поэтому наши исследования были направлены на разработку усовершенствованных методов их введения. Сублингвальная форма препаратов аллергенов для АСИТ является не только клинически эффективным, но и безопасным методом, что особенно актуально в педиатрической практике [10–14].

Установлено, что экспериментальный водно-солевой экстракт микст-аллергена из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae* представляет собой многокомпонентную белковую смесь и содержит главные мажорные аллергены Der.f1 и Der.p1. В результате определения аллергенной актив-

ности гранулированной формы микст-аллергена в экспериментальных сериях препарата методом микроточечного иммуноблота было показано, что бесфенольный экстракт сохраняет белковые фракции, свойственные стандартному водно-солевому экстракту аллергена. Исследование иммуногенных свойств гранулированного клещевого микст-аллергена на морских свинках методом определения уровня специфических IgG к Der.p и Der.f методом твердофазного ИФА выявило высокую иммуногенную активность исследуемого препарата, что особенно важно для достижения высокого терапевтического эффекта при проведении АСИТ.

На основе стандартного водно-солевого экстракта микст-аллергена из данных видов клещей, приготовленного по запатентованной методике, разработана технология получения гранулированной лечебной формы для специфической иммуно-терапии сублингвальным методом.

Главным недостатком препаратов для проведения АСИТ на основе нативных водно-солевых экстрактов аллергенов может являться их высокая аллергенная активность, поэтому целью наших дальнейших исследований явились разработки по совершенствованию препаратов для АСИТ в области создания лечебных форм аллергенов со сниженной аллергенностью. Такие препараты получают путём модификации их различными химическими агентами [15]. Для сублингвальной иммуно-терапии лекарственными аллергенами идеально подходят мономерные аллергоиды, так как они, в отличие от полимерных аллергоидов, состоящих из конгломератов большого размера, способны легко всасываться через слизистую [16].

Для получения мономерного клещевого аллергоида из клещей *D. pteronyssinus* был использован метод сукцинирования — химической модификации аллергенов путём обработки янтарным ангидридом [17]. В ходе проведения экспериментов было показано, что полученный сукцинированный мономерный аллергоид из клещей домашней пыли *D. pteronyssinus* обладает сниженной аллергенной активностью (способность связывать аллергенспецифический IgE) и сохранённой иммуногенностью (способность индуцировать аллергенспецифический IgG2a ответ) [18]. Стоит отметить также, что сукцинированный клещевой аллергоид сохраняет мономерность, что будет способствовать его применению в качестве лечебного препарата для эффективного проведения АСИТ безопасным сублингвальным способом.

Можно предположить, что метод сукцинирования, приводящий к конформационным изменениям белковой молекулы, приводит к снижению аллергенной и сохранению иммуногенной активности и теоретически может быть применён

к любому аллергенному экстракту, что расширяет возможности создания новых препаратов мономерных алергоидов для безопасной и эффективной сублингвальной АСИТ.

Заключение

Для проведения АСИТ у пациентов с сенсibilизацией к клещам домашней пыли разработаны два новых препарата с применением различных технологических методик. После проведения клинических испытаний препараты могут быть с успехом применены в лечении пациентов с клещевой сенсibilизацией.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source. This publication was not supported by any external sources of funding.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Промежуточные результаты исследования ранее опубликованы в работах: Бержец В.М., Бабахин А.А., Петрова Н.С., и др. Новые формы клещевых алергоидов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2019. №3. С. 15–21. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-3-15-21; Бержец В.М., Коренева Е.А., Хлгатын С.В., и др. Изучение специфической активности гранулированной формы микст-аллергена из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* для пероральной иммунотерапии // Иммунопатология, алергология, инфектология. 2019. № 2. С. 56–61. DOI: 10.14427/jipai.2019.2.56

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Preliminary data of this study were published in: Berzhets VM, Babakhin AA, Petrova NS, et al. New forms of home dust mite allergoid. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2019;(3):15–21. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-3-15-21; Berzhets VM, Koreneva SV, Khlgatian SV, et al. Study of the specific activity of the granulated form of the mixed-allergen from house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* for oral immunotherapy. *Immunopathology, allergology, infectology* 2019;(2):56–61. DOI: 10.14427/jipai.2019.2.56

Вклад авторов. В.М. Бержец, А.В. Васильева, Н.С. Петрова, С.В. Хлгатын, С.Ю. Петрова, О.Ю. Емельянова, Л.Н. Нестеренко — концепция исследования, написание текста, научное редактирование текста, оформление, редактирование статьи. Все авторы подтверждают соответствие своего

авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Authors' contribution. V.M. Berzhets, A.V. Vasilyeva, N.S. Petrova, S.V. Khlgatian, S.Yu. Petrova, O.Yu. Emelyanova, L.N. Nesterenko — research concept, data analysing, writing and editing the text of the manuscript, scientific editing. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

ЛИТЕРАТУРА

- Grieger J.A., Clifton V.L., Tuck A.R., et al. In utero Programming of Allergic Susceptibility // *Int Arch Allergy Immunol*. 2016. Vol. 169, N 2. P. 80–92. doi: 10.1159/000443961
- Макарова С.Г., Лаврова Т.Е., Вишнёва Е.А., и др. Первичная профилактика как эффективный ответ на эпидемию алергических болезней // *Педиатрическая фармакология*. 2015. № 12. С. 67–73.
- Курбачева О.М., Козулина И.Е. И вновь об алергии: эпидемиология и основы патогенеза, диагностики, терапии // *Российская ринология*. 2014. Т. 22, № 4. С. 46–50. doi: 10.17116/rosrino201422446-50
- Gregory L.G., Lloyd C.M. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung // *Trends Immunol*. 2011. Vol. 32, N 9. P. 402–411. doi: 10.1016/j.it.2011.06.006
- Фрадкин В.А. *Диагностические и лечебные алергены*. Москва: Медицина, 1990. 255 с.
- Ибрагимов А.Н., Бикмуллин А.Г., Сатаева Д.А., и др. *Хроматографические методы очистки белков*. Учебно-методическое пособие. Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2013. 48 с.
- Стручкова И.В., Кальясова Е.А. Теоретические и практические основы электрофореза белков в полиакриламидном геле. *Электронное учебно-методическое пособие*. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. 60 с.
- Руководство по блоттингу белков. *Советы и приемы*. Merck Millipore. 6-е изд. [интернет]. Режим доступа: <https://docplayer.com/56000512-Rukovodstvo-po-blottingu-belkov-sovety-i-priemy.html>. Дата обращения: 15.10.2021.
- Бержец В.М., Коренева Е.А., Хлгатын С.В., и др. Изучение специфической активности гранулированной формы микст-аллергена из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* и *Dermatophagoides farinae* для пероральной иммунотерапии // *Иммунопатология, алергология, инфектология*. 2019. № 2. С. 56–61. doi: 10.14427/jipai.2019.2.56
- Trial J., Christian V., Vibeke B.C. Efficacy of a house dust mite sublingual allergen immunotherapy tablet in adults with allergic asthma: a randomized clinical trial // *JAMA*. 2016. Vol. 315, N 16. P. 1715–1725. doi: 10.1001/jama.2016.3964
- Agostinis F., Tellarini L., Canonica G.W., et al. Safety of sublingual immunotherapy with a monomeric allergoid in

- very young children // *Allergy*. 2005. Vol. 60, N 1. P. 133. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00616.x
12. Ozdemir C., Yazi D., Gocmen I., et al. Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma // *Pediatric Allergy Immunology*. 2007. Vol. 18, N 6. P. 508–515. doi: 10.1111/j.1399-3038.2007.00549.x
 13. Meadows A., Kaambwa B., Novielli N., et al. A systematic review and economic evaluation of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy in adults and children with seasonal allergic rhinitis // *Health Technology Assessment*. 2013. Vol. 17. T. 27. P. 1–322. doi: 10.3310/hta17270
 14. Cui L., Li J., Li Y., Xia Z. International archives of allergy and immunology long-term efficacy of sublingual mite immunotherapy in monosensitized and polysensitized children with allergic rhinitis: a 7-year prospective study // *Int Arch Allergy Immunol*. 2019. Vol. 180, N 2. P. 144–149. doi: 10.1159/000500524
 15. Петрова С.Ю., Бержец В.М., Хрулёва В.А., и др. Перспективы развития лечебных форм аллергенов. От абстрактных проблем к конкретным решениям // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2018. № 1. С. 40–47. doi: 10.14427/jipai.2018.1.40
 16. Бабахин А.А., Ласкин А.А., Смирнов В.В., и др. Мономерный аллергоид из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*: иммунологические свойства // *Российский аллергологический журнал*. 2016. № 4-5. С. 29–36.
 17. Бабахин А.А., Андреев С.М., Бабиевский К.К., и др. Аллерген-специфическая иммунотерапия химически модифицированными аллергенами. Часть 1. Аллергенность и иммуногенность сукцинированного аллергена и его комплексов с иммуномодулятором полиоксидонием // *Физиология и патология иммунной системы*. 2011. Т. 15, № 7. С. 17–37.
 18. Ласкин А.А., Бабахин А.А., Андреев С.М., и др. Аллергенность и иммуногенность модифицированного экстракта из клещей домашней пыли *Dermatophagoides Pteronyssinus* // *Российский иммунологический журнал*. 2016. Т. 10, № 2. С. 193–195.
- REFERENCES
1. Grieger JA, Clifton VL, Tuck AR, et al. In utero Programming of Allergic Susceptibility. *Int Arch Allergy Immunol*. 2016;169(2):80–92. doi: 10.1159/000443961
 2. Makarova SG, Lavrova TE, Vishnyova EA, et al. Primary prevention as an effective response. *Pediatric Pharmacology*. 2015;12(1):67–73. (In Russ).
 3. Kurbacheva OM, Kozulina IE. One again about allergy: Epidemiology and the essentials of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Russian Rhinology*. 2014;22(4):46–50. (In Russ). doi: 10.17116/rostrino201422446-50
 4. Gregory LG, Lloyd CM. Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends Immunol*. 2011;32(9):402–411. doi: 10.1016/j.it.2011.06.006
 5. Fradkin VA. Diagnostic and therapeutic allergens. Moscow: Medicine; 1990. 255 p. (In Russ).
 6. Ibragimov AN, Bikmullin AG, Sataeva DA, et al. Chromatographic methods for protein purification. Study guide. Kazan: FGAOU VPO KFU; 2013. 48 p. (In Russ).
 7. Struchkova IV, Kalyasova EA. Theoretical and practical foundations of protein electrophoresis in polyacrylamide gel. Electronic teaching aid. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University; 2012. 60 p. (In Russ).
 8. A guide to protein blotting. Tips and tricks. Merck Millipore. 6th ed. [Internet]. (In Russ). Available from: <https://docplayer.com/56000512-Rukovodstvo-po-blottingu-belkovsoveti-i-priemy.html>. Accessed: 15.10.2021.
 9. Berzhets VM, Koreneva SV, Khlgatian SV, et al. Study of the specific activity of the granulated form of the mixed-allergen from house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* for oral immunotherapy. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2019;(2):56–61. (In Russ). doi: 10.14427/jipai.2019.2.56
 10. Trial J, Christian V, Vibeke BC. Efficacy of a house dust mite sublingual allergen immunotherapy tablet in adults with allergic asthma: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2016;315(16):1715–1725. doi: 10.1001/jama.2016.3964
 11. Agostinis F, Tellarini L, Canonica GW, et al. Safety of sublingual immunotherapy with a monomeric allergoid in very young children. *Allergy*. 2005;60(1):133. doi: 10.1111/j.1398-9995.2004.00616.x
 12. Cevdet O, Didem Y, Izlem G, et al. Efficacy of long-term sublingual immunotherapy as an adjunct to pharmacotherapy in house dust mite-allergic children with asthma. *Pediatr Allergy Immunol*. 2007;18(6):508–515. doi: 10.1111/j.1399-3038.2007.00549.x
 13. Meadows A, Kaambwa B, Novielli N, et al. A systematic review and economic evaluation of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy in adults and children with seasonal allergic rhinitis. *Health Technology Assessment*. 2013;17(27):1–322. doi: 10.3310/hta17270
 14. Cui L, Li J, Li Y, Xia Z. International archives of allergy and immunology long-term efficacy of sublingual mite immunotherapy in monosensitized and polysensitized children with allergic rhinitis: a 7-year prospective study. *Int Arch Allergy Immunol*. 2019;180(2):144–149. doi: 10.1159/000500524
 15. Petrova SYu, Berzhets VM, Petrova NS, et al. Future prospect of allergen therapeutic forms. From abstract problems towards specific solutions. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2018;(1):40–47. (In Russ). doi: 10.14427/jipai.2018.1.40
 16. Babakhin AA, Laskin AA, Smirnov VV, et al. Monomeric allergoid from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*: immunological properties *Russian Journal of Allergy*. 2016;(4-5):29–36. (In Russ).
 17. Babakhin AA, Andreev SM, Babievsky KK, et al. Allergen-specific immunotherapy with chemically modified allergens. Part 1. Allergenicity and immunogenicity of succinylated allergen and its complexes with the immunomodulator polyoxidonium. *Physiology and Pathology of the Immune System*. 2011;(3):7–37. (In Russ).
 18. Laskin AA, Babakhin AA, Andreev SM, et al. Allergenicity and immunogenicity of modified extract from house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Russian Immunological Journal*. 2016;10(2):193–195. (In Russ).

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Васильева Анна Викторовна;
адрес: 105064, Россия, Москва,
пер. Малый Казённый, д. 5а;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7703-2698>;
eLibrary SPIN: 8351-1808; e-mail: annaksu@mail.ru

Соавторы:

Бержец Валентина Михайловна, д.б.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5055-7593>;
eLibrary SPIN: 9097-0947; e-mail: laball@yandex.ru

Петрова Нина Сергеевна, к.б.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2824-1335>;
eLibrary SPIN: 3151-1562; e-mail: s.levina2005@yandex.ru

Хлгатян Светлана Вагинаковна, д.б.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8354-7682>;
eLibrary SPIN: 1476-4605; e-mail: svetkh@gmail.com

Петрова Станислава Юрьевна, к.м.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-0148>;
eLibrary SPIN: 7268-6944;
e-mail: petrovastanislava@yandex.ru

Емельянова Ольга Юрьевна, к.б.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8071-5385>;
eLibrary SPIN: 1721-6502; e-mail: laball@yandex.ru

Нестеренко Любовь Николаевна, к.х.н.;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>;
eLibrary SPIN: 6819-7980;
e-mail: lnesterenko3001@gmail.com

AUTHORS' INFO

Corresponding author:

Anna V. Vasilyeva;
address: 5a, Malyi Kazennyi lane, Moscow,
105064, Russia;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7703-2698>;
eLibrary SPIN: 8351-1808; e-mail: annaksu@mail.ru

Co-authors:

Valentina M. Berzhets, Dr. Sci. (Biol.) Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5055-7593>;
eLibrary SPIN: 9097-0947; e-mail: laball@yandex.ru

Nina S. Petrova, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2824-1335>;
eLibrary SPIN: 3151-1562; e-mail: s.levina2005@yandex.ru

Svetlana V. Khlgatian, Dr. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8354-7682>;
eLibrary SPIN: 1476-4605; e-mail: svetkh@gmail.com

Stanislava Yu. Petrova, MD, Cand. Sci. (Med.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3034-0148>;
eLibrary SPIN: 7268-6944;
e-mail: petrovastanislava@yandex.ru

Olga Yu. Emelyanova, Cand. Sci. (Biol.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8071-5385>;
eLibrary SPIN: 1721-6502; e-mail: laball@yandex.ru

Lyubov N. Nesterenko, Cand. Sci. (Chem.);
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>;
eLibrary SPIN: 6819-7980;
e-mail: lnesterenko3001@gmail.com