

## Аллергенные и иммуногенные свойства аллергоида из пыльцы полыни горькой

Д.Р. Есаулова<sup>1</sup>, К.О. Нечай<sup>1</sup>, А.И. Андреев<sup>1</sup>, И.В. Андреев<sup>1</sup>, Т.В. Латышева<sup>1</sup>, Н.Х. Сетдикова<sup>1</sup>, Е.А. Латышева<sup>1, 2</sup>, Г.О. Гудима<sup>1, 3</sup>, В.В. Смирнов<sup>1, 4</sup>, А.И. Мартынов<sup>1</sup>, М.Р. Хаитов<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр «Институт иммунологии», Москва, Россия;

<sup>2</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия;

<sup>3</sup> Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий, Москва, Россия;

<sup>4</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

### АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Аллергены из пыльцы полыни горькой (лат. *Artemisia absinthium*) – одни из наиболее опасных с точки зрения аллергизации в средней полосе России, в Европе и ряде других регионов. Применение аллергоидов, созданных с использованием глутаральдегида, вместо нативных экстрактов аллергенов обусловлено сниженным риском развития аллергических реакций при сохранности иммуногенности и исключении из процесса производства высокотоксичного элемента формалина, что делает аллергоиды более безопасными для использования в аллерген-специфической иммунотерапии.

**Цель исследования** – получение аллергоида из пыльцы полыни горькой путем обработки глутаровым альдегидом для оценки его свойств, предшествующей доклиническим испытаниям.

**Материалы и методы.** Очищенный экстракт пыльцы полыни горькой, выделенный путем обезжиривания и водно-солевой экстракции, растворяли в фосфатно-буферном физиологическом растворе (PBS) pH 7,5, после чего проводили его полимеризацию в 0,1 % растворе глутарового альдегида. Стабилизацию проводили раствором боргидрида натрия. Экстракт и аллергоид пыльцы полыни исследовали с помощью хроматографического анализа и конкурентного иммуноферментного анализа. Затем проводили внутрибрюшинную иммунизацию полученным аллергоидом мышей линии СВА × С57В1/6 (F1).

**Результаты.** После оценки специфической аллергенной активности с использованием конкурентного иммуноферментного анализа при помощи биотинилированного экстракта аллергена пыльцы полыни было показано, что точка ингибирования в 50 % для аллергоида определяется при концентрации препарата 0,0333 мг/мл, а для аллергена – уже при 0,0008 мг/мл. Следовательно, аллергенность аллергоида пыльцы полыни горькой значительно снижена по сравнению с таковой у исходного экстракта. Кроме того, была подтверждена иммуногенная активность полученного аллергоида на мышах: отмечена разница в уровнях иммуноглобулина G в 1,5 раза в сравнении с экстрактом аллергена.

**Заключение.** В ходе работы получен экстракт, содержащий аллергены пыльцы полыни горькой. На его основе получен аллергоид путем полимеризации глутаровым альдегидом. Полученный аллергоид имеет большую молекулярную массу (диапазон сместился до 44–66 кДа), при этом имеет низкую аллергенную активность в сравнении с исходным

экстрактом, а также сохраняет иммуногенность. В связи с этим данный алергоид может стать основой для получения новых препаратов алерген-специфической иммунотерапии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** алергоид; полынь; алерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ); стандартизация; пылевые алергены; иммуноферментный анализ (ИФА); иммунизация мышей.

**Как цитировать:**

Есаулова Д.Р., Нечай К.О., Андреев А.И., Андреев И.В., Латышева Т.В., Сетдикова Н.Х., Латышева Е.А., Гудима Г.О., Смирнов В.В., Мартынов А.И., Хаитов М.Р. Алергенные и иммуногенные свойства алергоида из пыльцы полыни горькой // Российский алергологический журнал. 2024. Т. 21, № 4. С. 000–000. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA16964>

Рукопись получена: 28.08.2024 Рукопись одобрена: 17.12.2024 Опубликовано online: 23.12.2024

**STUDY OF THE COMMON WORMWOOD ALLERGOID**

Daria R. Esaulova<sup>1</sup>, Ksenia O. Nechay<sup>1</sup>, Alexandr I. Andreev<sup>1</sup>, Igor V. Andreev<sup>1</sup>, Tatyana V. Latysheva<sup>1</sup>, Nailya Kh. Setdikova<sup>1</sup>, Elena A. Latysheva<sup>1, 2</sup>, Georgii O. Gudima<sup>1</sup>, Valery V. Smirnov<sup>1, 4</sup>, Alexander I. Martynov<sup>1</sup>, Musa R. Khaitov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> The Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia;

<sup>3</sup> Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Major Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, Russia;

<sup>4</sup> The First Sechenov Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

**ABSTRACT**

**Background:** Allergens from the pollen of wormwood (Latin: *Artemisia absinthium*) are among the most dangerous in terms of allergization in central Russia, Europe and a number of other regions. The use of allergoids created using glutaraldehyde instead of native allergen extracts is due to the reduced risk of developing allergic reactions while maintaining immunogenicity and eliminating the highly toxic element formalin from the production process, which makes allergoids safer for use in allergen-specific immunotherapy.

**Aim:** Obtaining an allergoid from wormwood pollen by treatment with glutaraldehyde to evaluate its properties prior to preclinical testing.

**Materials and methods:** Purified extract of wormwood pollen, isolated by defatting and water-salt extraction, was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.5, after which it was polymerized in 0.1 % glutaraldehyde solution. Stabilization was performed with sodium borohydride solution. The extract and allergoid of wormwood pollen were studied using chromatographic analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then,

intraperitoneal immunization with the obtained allergoid was carried out in CBA × C57Bl/6 (F1) mice.

**Results:** After evaluation of the specific allergenic activity using competitive immune assay ELISA with biotinylated extract of wormwood pollen allergen, it was shown that the 50 % inhibition point for the allergoid is determined at a drug concentration of 0.03 mg/ml, and for the allergen – already at 0.0008 mg/ml. Consequently, the allergenicity of wormwood pollen allergoid is significantly reduced compared to that of the original extract. In addition, the immunogenic activity of the obtained allergoid was confirmed in mice: the average optical density of the ELISA reaction, indicating the amount of IgG, in the group immunized with the allergoid was more than at least 1.5 times higher than the values for the allergen extract.

**Conclusions:** During the work, an extract containing allergens of wormwood pollen was obtained. An allergoid was obtained on its basis by polymerization with glutaraldehyde. The obtained allergoid has a high molecular weight (the range shifted to 44–66 kDa), while it has low allergenic activity, in comparison with the original extract, and also retains immunogenicity. In this regard, this allergoid can become the basis for obtaining new ASIT treatments.

**KEYWORDS:** allergoid; wormwood; ASIT; standardization; pollen allergens; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); mouse immunization.

#### To cite this article:

Esaulova DR, Nechay KO, Andreev AI, Andreev IV, Latysheva TV, Setdikova NK, Latysheva EA, Gudima GO, Smirnov VV, Martynov AI, Khaitov MR. Study of the common wormwood allergoid. *Russian Journal of Allergy*. 2024;21(4):000–000. DOI: <https://doi.org/10.36691/RJA16964>

Received: 28.08.2024 Accepted: 17.12.2024 Published online: 23.12.2024

## ОБОСНОВАНИЕ

Аллергены из пыльцы полыни горькой (лат. *Artemisia absinthium*) – одни из наиболее аллергеногенных в средней полосе России, в Европе и ряде других регионов. Полынь является многолетним травянистым растением семейства астровых, которое легко приспособляется к различным условиям, вытесняя другие виды. Поэтому во многих регионах она является инвазивным видом [1–3].

Ботаническое родство полыни с другими растениями семейства астровых (например, с амброзией, ромашкой и одуванчиком) может вызывать перекрестную реактивность, что, в свою очередь, приводит к клинически значимым реакциям. Белок Art v 1, который присутствует в полыни, является мажорным [1–3].

Несмотря на то, что полынь известна на протяжении веков и используется в народной медицине при заболеваниях желудочно-кишечного тракта и мочевыводящих путей, лихорадке и гельминтозах, у подверженных людей вызывает аллергию. Клинические симптомы весьма разнообразны: аллергический риноконъюнктивит, бронхиальная астма, атопический дерматит, пищевая аллергия [1–3].

Аллерген-специфическая терапия (АСИТ) в настоящее время считается единственным продуктивным методом лечения аллергии, поскольку она непосредственно влияет на разные

фазы развития болезни, корректируя реакцию тела на аллерген. Уровень эффективности данной терапии достигает 80–90 % и показывает снижение клинических проявлений и уменьшение потребности в медицинских препаратах. Аллергоиды отличаются от аллергенов тем, что сохраняют свою иммуногенность, значительно снижая при этом вероятность аллергических реакций, что делает их более безопасными для использования в АСИТ [4–6].

Использование нативных экстрактов аллергенов для подкожного введения в рамках АСИТ сопряжено с риском возникновения иммуноглобулин (Ig)E-опосредованных реакций. Использование аллергоидов в значительной мере решает данную проблему, обеспечивая иммуногенность, но значительно снижая аллергенность, что и делает их более безопасным для использования в АСИТ [4–6].

Аллергоиды, производимые в России компанией «Микроген», создаются путем полимеризации с использованием 1 % формалина. Этот метод позволяет исключить из производственного процесса высокотоксичный элемент. Применение глутаральдегида также ускоряет этот процесс до 24 ч по сравнению с 30 сут, затрачиваемыми при использовании только формалина [2, 7, 8].

Сама структура аллергоида, полученная с помощью химической модификации аллергена, более стабильна, что делает ее устойчивой к денатурации. Кроме стабилизации структуры происходит химическая инактивация IgE-комплементарных антигенных детерминант, что в свою очередь приводит к снижению аллергенности. Именно снижение аллергенности делает использование аллергоида безопасным, минимизируя риск развития анафилаксии. Увеличение размеров молекул белка также способствует повышению их иммуногенности [2, 7, 8].

**Цель исследования** – после получения очищенного экстракта аллергена из пыльцы полыни горькой изготовить аллергоид методом глутарирования. Провести оценку свойств полученного аллергоида перед доклиническими испытаниями.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Дизайн исследования

Объект исследования: пыльца полыни горькой, собранная в 2020 г. в окрестностях города Приволжск Ивановской области в период цветения. Остаточная влажность после высушивания  $3 \pm 0,5$  %. Пыльцу характеризовали по морфологическим признакам (диаметр пыльцевого зерна, структура экзимы, форма пыльцевого зерна). Допускалось не более 10 % примесей других видов пыльцы (определялось микроскопическим способом). Содержание тяжелых металлов в сульфатной золе из 1 г пыльцы (точная навеска) – не более 0,001 %. Зараженность растительной пыльцы амбарными вредителями не превышала I степени чистоты (что отвечает требованиям). Все показатели отвечали требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

После обезжиривания пыльцы диэтиловым эфиром раствор фильтровали и высушивали с помощью складчатого фильтра. Далее проводили водно-солевую экстракцию раствором бикарбоната аммония. Полученный экстракт центрифугировали, собирали надосадочную жидкость и последовательно фильтровали через фильтры с различным диаметром пор с целью очистки экстракта. Затем проводили диализ надосадочной жидкости против апиrogenной воды. Диализат повторно центрифугировали, выполняли стерилизующую фильтрацию. Полученные аллергены лиофильно высушивали и использовали в дальнейших исследованиях.

Очищенный экстракт растворяли в фосфатно-буферном физиологическом растворе (phosphate-buffered saline – PBS) pH 7,5 и проводили полимеризацию в 0,1 % растворе глутарового альдегида. Реакционную смесь инкубировали сутки при температуре 8–10 °С, периодически перемешивая. Полученный раствор аллергоида по окончании срока инкубации стабилизировали раствором боргидрида натрия в течение 2 ч при комнатной температуре, затем диализовали против апиrogenной воды на холоде в течение 24 ч. Диализат центрифугировали и проводили стерилизующую фильтрацию. Полученный аллергоид лиофильно высушивали и использовали в дальнейших исследованиях. Оценка содержания белка проводилась по методу Лоури (метод А).

Хроматографический анализ аллергенов полыни горькой выполняли с помощью хроматографической системы среднего давления FPLC Pharmacia Biotech (Швеция). Использовали колонку Superdex 200HR 10×30, предварительно откалиброванную по белкам с известной молекулярной массой (IgG 150 кДа, бычий сывороточный альбумин 66 кДа, пероксидаза хрена 44 кДа). Скорость потока 0,5 мл/мин, детектирование при 280 нм, объем образца 0,2 мл.

Специфические IgE человека определяли с помощью конкурентного иммуноферментного анализа (ИФА). Постановка проводилась с использованием набора реагентов «АллергоИФА-специфические IgE» фирмы «Алкор Био» (Россия), необходимого для количественного определения в сыворотке крови человека специфических IgE. В данном наборе сорбция моноклональных антител против IgE человека была проведена на твердой фазе (планшет для ИФА).

В авторской модификации (внесение исследуемого аллергена в конкуренции с биотинилированным аллергеном) проводили конкурентный анализ. В каждую лунку планшета было внесено по 50 мкл пулированной сыворотки лиц с высокой сенсibilизацией к исследуемому аллергену. Далее вносили 50 мкл исследуемого препарата в заданных количествах (0,0333; 0,0167; 0,0083; 0,0042; 0,0021 и 0,0008 мг/мл) и 50 мкл коммерческого биотинилированного аллергена. Исследуемый препарат – исследуемый аллерген, разведенный на фосфатном солевом буфере (Sigma Aldrich, США). В контрольную лунку были внесены только 50 мкл биотинилированного экстракта аллергена пыльцы полыни обыкновенной (W6, «Алкор Био», Россия) и 50 мкл фосфатного солевого буфера (Sigma Aldrich, США).

После выдерживания на шейкере в течение 1 ч при температуре  $37 \pm 3$  °С 5-кратно промывали раствором для промывания. Далее в каждую лунку вносили по 150 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидазы хрена («Алкор Био», Россия). Снова выдерживали на шейкере в течение 1 ч при температуре  $37 \pm 3$  °С и 5-кратно промывали раствором для промывания. В конце вносили в каждую лунку по 100 мкл хромогена (тетраметилбензидин, ТМБ двухкомпонентный, «Алкор Био», Россия) и выдерживали на шейкере 15 мин при температуре  $37 \pm 3$  °С. Реакцию останавливали стоп-реагентом (серной кислотой). Результаты колориметрической реакции определяли, измеряя оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм с помощью многоканального спектрофотометра Multiscan msc/340 (Labsystems Titertek, Finland).

Иммуногенную активность препарата исследовали на мышах, разделенных на 4 опытных группы по 24 мыши, и интактную группу из 8 мышей. Через 1, 2, 3 и 4 нед после начала иммунизации животных выводили из эксперимента и в их сыворотке методом ИФА определяли количество циркулирующих специфических IgG.

#### Описание вмешательства



Иммунизацию лабораторных животных проводили на самцах мышей весом 18–22 г линии CBA × C57Bl/6 (F1). Доза экстракта аллергена или аллергоида, вводимая внутривенно 1 особи, составила 20 мкг/мышь (группы 1 и 2) и 100 мкг/мышь (группы 3 и 4). В качестве растворителя использован PBS (Sigma Aldrich, США), pH 7,2–7,4. Для создания депо препарата в организме животного использовали адъювант — гидроксид алюминия Al(OH)<sub>3</sub> в дозе 2 мг/особь. Соотношение объемов препарата и адъюванта 1:1, на одну особь — 100 мкг аллергоида или аллергена в 0,1 мл PBS и 2 мг Al(OH)<sub>3</sub> в 0,1 мл PBS, pH 7,2–7,4. Общий объем смеси, вводимой внутривенно, на 1 животное составил 0,2 мл [3, 9–12].

### Основной исход исследования

Полученный аллергоид превосходит экстракт по показателям иммуногенности и безопасности, поскольку была снижена аллергенность. Это открывает широкие перспективы для дальнейшего исследования и потенциального применения препарата для лечения аллергии на пыльцу полыни.

### Методы регистрации исходов

Количество циркулирующих специфических IgG в сыворотках мышей определяли с использованием модифицированных коммерческих наборов Mouse IgG ELISA Kit (Sigma Aldrich, США). Вместо планшета из набора с сорбированными антителами против IgG мыши мы использовали планшеты Grainer high binding с сорбированным на них очищенным экстрактом аллергена. Сорбцию раствором аллергена в концентрации 10 мкг/мл в карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,5–9,7 (таблетированный, «ПанЭко», Россия) проводили в течение 24 ч при 8 °C. Далее исследование выполняли согласно инструкции к набору Mouse IgG ELISA Kit (Sigma Aldrich, США). Оптическую плотность определяли на многоканальном спектрофотометре Multiscan msc/340 (Labsystems Titertek, Финляндия) при длине волны 450 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Объекты исследования

Иммунизацию лабораторных животных проводили на 104 особях самцов мышей весом 18–22 г линии CBA × C57Bl/6 (F1), разделенных на 4 опытных группы по 24 мыши и интактную группу из 8 мышей.

### Основные результаты исследования

В результате исследования экстракта пыльцы полыни и соответствующего аллергоида методом гель-хроматографии, представленном на **рис. 1**, был зафиксирован процесс полимеризации. На хроматограмме видно, что исходный продукт представляет собой многокомпонентный пик в диапазоне ниже 44 кДа. Полученный аллергоид также представляет собой многокомпонентный пик, где наибольшее количество белка в аллергоиде находится в диапазоне молекулярных масс 44–66 кДа. Видно, что в результате полимеризации произошло увеличение молекулярной массы аллергоида в сравнении с исходным экстрактом. Предварительно колонка была откалибрована по белкам с известной молекулярной массой, вершины пиков калибраторов обозначены стрелками на верхней границе хроматограмм.

Известно, что аллергоиды после полимеризации характеризуются снижением способности связываться со специфическим IgE в сравнении с исходным аллергеном, что подтверждает снижение аллергенности. В конкурентном ИФА сравнивали IgE-связывающую способность экстракта аллергена и конечного продукта — аллергоида. При выполнении ИФА

использовали жидкий биотинилированный аллерген («Алкор Био», Россия). Результаты оценивали по точке 50 % снижения ОП исследуемого образца по отношению к положительному контролю (точка 50 % ингибирования). Результаты представлены в табл. 1. Как видно из данных, приведенных в табл. 1, точка 50 % ингибирования в конкурентном ИФА для аллергоида определяется при концентрации препарата 0,0333 мг/мл, а при конкуренции с биотинилированным аллергеном эта точка находится между 0,0021 и 0,0008 мг/мл. Значения оптической плотности колориметрической реакции приведены при 450 нм в конкурентном ИФА (ОП450) (в числителе) и % ингибирования (в знаменателе).

Как видно из табл. 2, большей иммуногенной активностью при однократной иммунизации, особенно в дозе 100 мкг/мышь, обладал аллергоид в сравнении с исходным аллергеном. Уровни специфических IgG при однократной иммунизации животных постепенно возрастали до 4-й недели исследования. При этом средняя оптическая плотность реакции ИФА, свидетельствующая о количестве IgG, в группе иммунизированных аллергоидом не менее чем в 1,5 раза превышала значения для аллергена, его исходного продукта. Следовательно, в результате полимеризации глутаровым альдегидом усилилась способность аллергоида к индукции синтеза специфических IgG, что необходимо для эффективного проведения АСИТ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

### Резюме основного результата исследования

Был получен очищенный экстракт аллергена из пыльцы полыни горькой (лат. *Artemisia absinthium*), методом глутарирования был изготовлен аллергоид. Оценка свойств полученного аллергоида перед доклиническими испытаниями проводили на иммунизированных мышах с определением количества циркулирующих специфических IgG и получили нарастающие уровни специфических IgG по сравнению с аллергеном.

### Обсуждение основного результата исследования

С помощью экстракции из образцов пыльцы полыни горькой, собранной в 2020 г. в период цветения, был получен препарат аллергена, который стал основой для создания аллергоида. Для повышения безопасности препарата для химической модификации аллергена был использован глутаральдегид вместо формальдегида [13]. Это позволило исключить из итогового продукта формальдегид и метанол, образующиеся в результате инактивации альдегидных групп боргидридом натрия.

Снижение аллергенной активности являлось немаловажной задачей при получении аллергоида [14]. Это продемонстрировано с помощью конкурентного реверсивного ИФА в сравнении с исходным аллергеном и полученным аллергоидом. Гораздо более высокая концентрация препарата аллергоида, требуемая для 50 % ингибирования в конкурентном ИФА, по сравнению с аллергеном, позволяет сделать вывод о снижении аллергенной активности, что с практической точки зрения говорит о снижении возможных анафилактических реакций [15].

Увеличение молекулярной массы аллергоида полыни, изготовленного методом глутарирования, не только снизило аллергенность препарата за счет уменьшения общего количества активных антигенных детерминант, но и повысило его иммуногенную активность. Подобные результаты в снижении аллергенности получаемых препаратов и повышении при этом их иммуногенной активности получены в том числе в ходе зарубежных исследований [16]. Повышение индукции синтеза специфических IgG у группы мышей, иммунизированных аллергоидом полыни, также демонстрирует перспективность для дальнейшего изучения препарата для использования при АСИТ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Безопасность и эффективность являются неотъемлемыми свойствами каждого препарата. В настоящий момент главным болезнью-модифицирующим методом лечения IgE-опосредованных аллергических заболеваний остается АСИТ. Препараты АСИТ, основанные на нативных экстрактах, сохраняют высокий риск развития возможных анафилактических реакций.

Замена формальдегида на глутаральдегид повысила скорость и безопасность производства, а также безопасность самого продукта, исключив возможность остаточных следов формальдегида и метанола, образующихся при инаktivации альдегидных групп с использованием боргидрида натрия.

Полученный методом глутарирования алергоид из пыльцы полыни горькой обладает высокой иммуногенностью и низкой аллергенной активностью по сравнению с исходным экстрактом алергена. Это открывает возможности для его дальнейшего изучения и применения для АСИТ.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Источник финансирования.** Исследование проводили в рамках государственного задания ФМБА по теме «Разработка технологий, создание и испытание противоаллергических лекарственных препаратов» (шифр: «Аллергобиотехнологии-16»).

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

**Вклад авторов.** 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). Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.Р. Есаулова — анализ литературных источников, написание и редактирование текста статьи, получение алергоида из пыльцы полыни горькой, проведение конкурентного иммуноферментного анализа; К.О. Нечай — написание и редактирование текста статьи, получение алергена из пыльцы полыни горькой; А.И. Андреев — проведение конкурентного иммуноферментного анализа, получение алергоида из пыльцы полыни горькой; И.В. Андреев — дизайн исследования, получение алергоида из пыльцы полыни горькой; Т.В. Латышева — дизайн исследования, сбор и анализ клинического материала; Н.Х. Сетдикова — сбор и анализ клинического материала; Е.А. Латышева — дизайн исследования, сбор и анализ клинического материала; Г.О. Гудима — анализ литературных источников, редактирование текста статьи; В.В. Смирнов — проведение хроматографического анализа; А.И. Мартынов — концепция и дизайн исследования; М.Р. Хаитов — концепция, дизайн и организация исследования.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** The study was conducted within the framework of the FMBA state task on the topic «Development of technologies, creation and testing of anti-allergic drugs» (code: «Allergobiotechnologies-16»).

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



**Authors' contribution.** 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. D. R. Esaulova — analysis of literary sources, writing and editing the text of the article, obtaining an allergoid from the of pollen wormwood, conducting competitive immune assay; K. O. Nechay — writing and editing the text of the article, obtaining an allergen from the of pollen wormwood; A. I. Andreev — conducting competitive immune assay, obtaining an allergoid from the of pollen wormwood; I. V. Andreev — research design, obtaining an allergoid from the of pollen wormwood; T. V. Latysheva — design of the study, collection and analysis of clinical material; N. Kh. Setdikova — collection and analysis of clinical material; E. A. Latysheva — design of the study, collection and analysis of clinical material; G. O. Gudima — analysis of literary sources, editing the text of the article; V. V. Smirnov — conducting chromatographic analysis; A. I. Martynov — the concept and design of the study; M. R. Khaitov — the concept, organization and design of the study.

### Список литературы

1. Бала А.М., Гудима Г.О., Хаитов М.Р. Молекулярные механизмы аллергии. В кн.: Хаитов М.Р., Шиловский И.П. Антицитокинотерапия аллергических заболеваний: молекулярно-иммунологические механизмы и клинические основы. М.: Медиа Сфера, 2021. С. 66–125.
2. Авоян Г.Э., Кулага О.С., Нечай К.О., и др. Разработка и экспериментальная оценка аллергоида из пчелиного яда // Иммунология. 2023. Т. 44, № 3. С. 345–357. doi: 10.33029/0206-4952-2023-44-3-345-357
3. Смирнов В.В., Гудима Г.О., Кудлай Д.А., Шиловский И.П. Клиническая фармакокинетика моноклональных антител и малых интерферирующих РНК. В кн.: Хаитов М.Р., Шиловский И.П. Антицитокинотерапия аллергических заболеваний: молекулярно-иммунологические механизмы и клинические основы. М.: Медиа Сфера, 2021. С. 218–240.
4. Kim E.H., Keet C.A., Virkud Y.V., et al. Open-label study of the efficacy, safety, and durability of peanut sublingual immunotherapy in peanut-allergic children // *J Allergy Clin Immunol*. 2023. Vol. 151, N 6. P. 1558–1565.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2023.01.036
5. Narisety S.D., Frischmeyer-Guerrerio P.A., Keet C.A., et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy // *J Allergy Clin Immunol*. 2015. Vol. 135, N 5. P. 1275–1282. e1-6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.005
6. Frati F., Moingeon P., Marcucci F., et al. Mucosal immunization application to allergic disease: sublingual immunotherapy // *Allergy Asthma Proc*. 2007. Vol. 28, N 1. P. 35–39. doi: 10.2500/aap.2007.28.2919
7. Enrique E., Pineda F., Malek T., et al. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract // *J Allergy Clin Immunol*. 2005. Vol. 116, N 5. P. 1073–1079. doi: 10.1016/j.jaci.2005.08.027
8. Cafone J., Capucilli P., Hill D.A., Spergel J.M. Eosinophilic esophagitis during sublingual and oral allergen immunotherapy // *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019. Vol. 19, N 4. P. 350–357. doi: 10.1097/ACI.0000000000000537

9. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981.
10. Общая фармакопейная статья «Определение белка. ОФС.1.2.3.0012.15». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. М., 2018. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/554031266> от 12.04.2024.
11. Козлов И.Б., Лебедин М.Ю., Гудима Г.О., и др. Фоторегулируемое отщепление олигонуклеотида как способ повышения эффективности полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией при анализе единичных клеток // Иммунология. 2021. Т. 42, № 6. С. 662–669. doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-662-669
12. Курсаков С.В., Кузнецова Е.Г., Курылева О.М., и др. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Иммунология. 2020. Т. 41, № 1. С. 74–82. doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82
13. Versteeg S.A., Bulder I., Himly M., van Ree R. Glutaraldehyde-Modified Recombinant Fel d 1: A Hypoallergen With Negligible Biological Activity but Retained Immunogenicity // World Allergy Organ J. 2011. Vol. 4, N 3. P. 113–120. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182228a39
14. Gupta P., Saltoun C. Allergen immunotherapy: definition, indications, and reactions // Allergy and Asthma Proceedings. 2019. Vol. 40, N 6. P. 369–371. doi: 10.2500/aap.2019.40.4249
15. Carnes J., Gallego M., Moya R., Iraola V. Allergoids for allergy treatment. Allergoids for Allergy Treatment // Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2018. Vol. 12, N 2. P. 110–119. doi: 10.2174/1872213X12666180221155908
16. Moreno Aguilar C., Eguiluz-Gracia I., Planelles Asensio I., Rondón C. Allergen immunotherapy: the need for higher quality clinical trials // Allergol Immunopathol (Madr). 2016. Vol. 44, N 5. P. 398–400. doi: 10.1016/j.aller.2016.08.008

## REFERENCES

1. Bala AM, Gudima GO, Khaitov MR. Molecular mechanisms of allergy. In: Khaitov MR, Shilovsky IP. Anticytokine therapy of allergic diseases: molecular immunological mechanisms and clinical bases. Moscow: Media Sfera, 2021. P. 66–125. (In Russ).
2. Avoyan GE, Kulaga OS, Nechay KO, et al. Development and experimental evaluation of the bee venom allergoid. *Immunologiya*. 2023;44(3):345–357. (In Russ). doi: 10.33029/0206-4952-2023-44-3-345-357
3. Smirnov VV, Gudima GO, Kudlay DA, Shilovsky IP. Clinical pharmacokinetics of monoclonal antibodies and small interfering RNAs. In: Khaitov MR, Shilovsky IP. Anticytokine therapy of allergic diseases: molecular immunological mechanisms and clinical bases. Moscow: Media Sfera, 2021. P. 218–240. (In Russ).
4. Kim EH, Keet CA, Virkud YV, et al. Open-label study of the efficacy, safety, and durability of peanut sublingual immunotherapy in peanut-allergic children. *J Allergy Clin Immunol*. 2023;151(6):1558–1565.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2023.01.036

5. Narisety SD, Frischmeyer-Guerrero PA, Keet CA, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of sublingual versus oral immunotherapy for the treatment of peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(5):1275–1282.e1-6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.11.005
6. Frati F, Moingeon P, Marcucci F, et al. Mucosal immunization application to allergic disease: sublingual immunotherapy. *Allergy Asthma Proc*. 2007;28(1):35–39. doi: 10.2500/aap.2007.28.2919
7. Enrique E, Pineda F, Malek T, et al. Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):1073–1079. doi: 10.1016/j.jaci.2005.08.027
8. Cafone J, Capucilli P, Hill DA, Spergel JM. Eosinophilic esophagitis during sublingual and oral allergen immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2019;19(4):350–357. doi: 10.1097/ACI.0000000000000537
9. Osterman LA. *Methods of Protein and Nucleic Acid Research: Electrophoresis and Ultracentrifugation (practical guide)*. Moscow: Nauka; 1981. (In Russ).
10. General pharmacopoeia article “Determination of protein. OFS.1.2.3.0012.15”. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. Moscow, 2018. (In Russ). Available from: <https://docs.cntd.ru/document/554031266>. Accessed: 12.04.2012.
11. Kozlov IB, Lebedin MYu, Gudima GO, et al. Photoregulated oligonucleotide detachment as a way to improve the efficiency of polymerase chain reaction with reverse transcription for analysis at the single cell level. *Immunologiya*. 2021;46(6):662–669. (In Russ). doi: 10.33029/0206-4952-2021-42-6-662-669
12. Kursakov SV, Kuznetsova EG, Kuryleva OM, et al. Development and validation of a method for glucosaminyl muramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high performance liquid chromatography. *Immunology*. 2020;41(1):74–82. (In Russ). doi: 10.33029/0206-4952-2020-41-1-74-82
13. Versteeg SA, Bulder I, Himly M, van Ree R. Glutaraldehyde-Modified Recombinant Fel d 1: A Hypoallergen With Negligible Biological Activity but Retained Immunogenicity. *World Allergy Organ J*. 2011;4(3):113–120. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182228a39
14. Gupta P, Saltoun C. Allergen immunotherapy: definition, indications, and reactions. *Allergy and Asthma Proceedings*. 2019;40(6):369–371. doi: 10.2500/aap.2019.40.4249
15. Carnes J, Gallego M, Moya R, Iraola V. Allergoids for allergy treatment. Allergoids for Allergy Treatment. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2018;12(2):110–119. doi: 10.2174/1872213X12666180221155908
16. Moreno Aguilar C, Eguiluz-Gracia I, Planelles Asensio I, Rondón C. Allergen immunotherapy: the need for higher quality clinical trials. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2016;44(5):398–400. doi: 10.1016/j.aller.2016.08.008

Таблица 1. Анализ конкурентного связывания аллергена и алергоида (по изменениям параметров оптической плотности) в зависимости от концентрации при конкуренции с биотинилированным аллергеном к пыльце полыни

Table 1. Analysis of the competitive binding of ANB, ADB (by changes in optical density parameters), depending on the concentration, in competition with a biotinylated allergen to birch pollen.

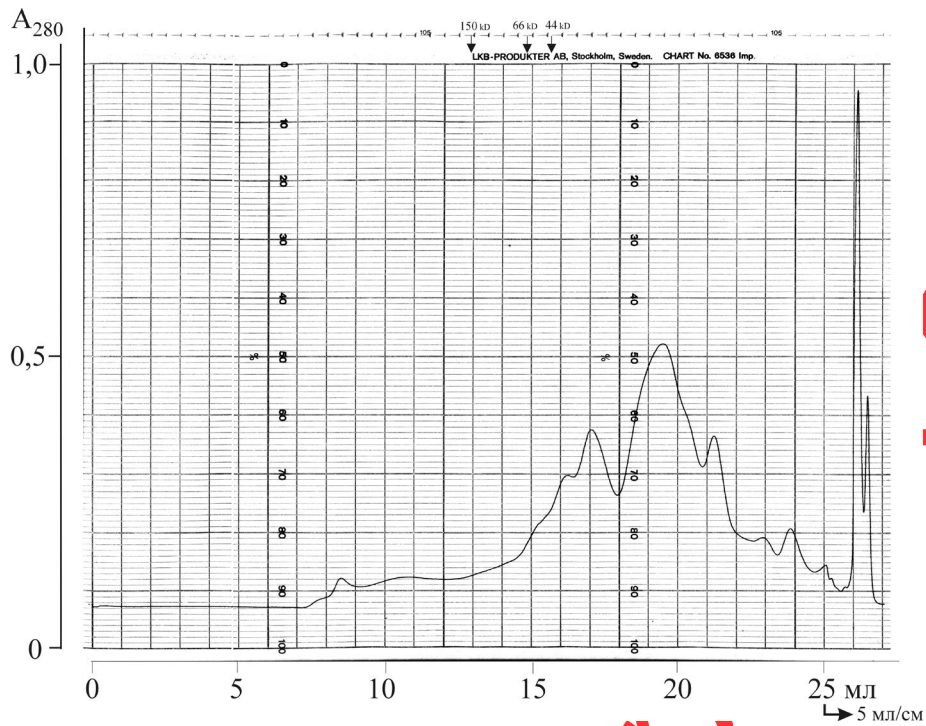
Исследуемый препарат	ОП <sub>450</sub> /% ингибирования						
	Количество препарата, мкг/лунку						
	5	2,5	1,25	0,625	0,31	0,155	0
Аллерген	0,179/ 90,4	0,201/ 89,21	0,233/ 87,45	0,365/ 80,34	0,599/ 73,12	0,964/ 51,9	1,856
Аллергоид	0,916/ 50,65	0,950/ 48,82	1,201/ 35,35	1,321/ 28,83	1,505/ 18,92	1,670/ 10,01	1,856

Таблица 2. Анализ динамики специфических IgG в сыворотке мышей, иммунизированных аллергеном или алергоидом пыльцы полыни (по изменениям параметров оптической плотности)

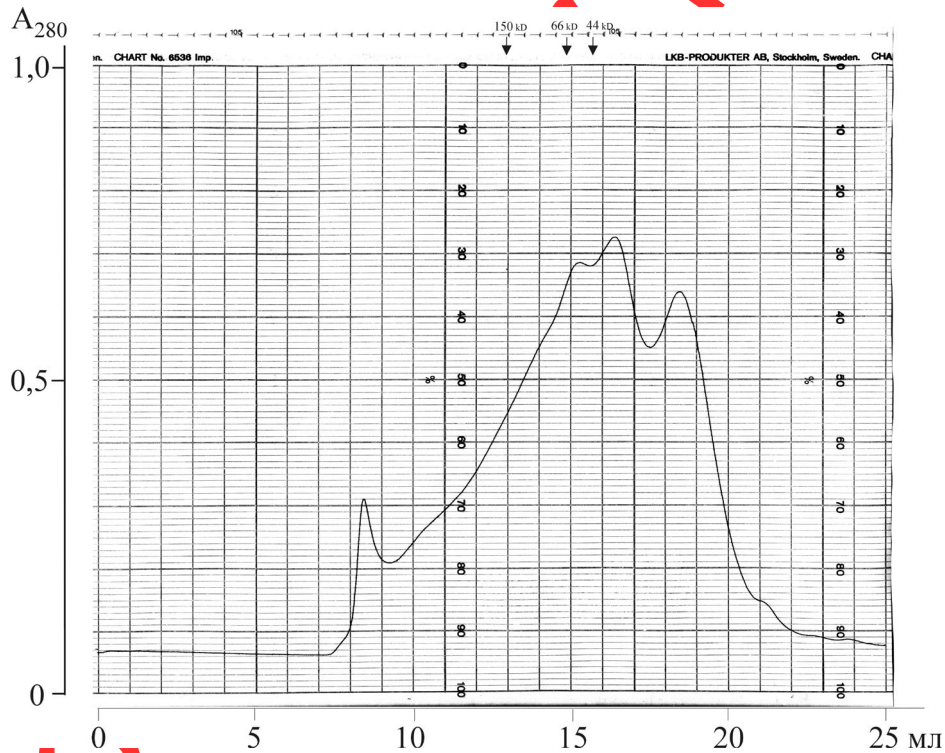
Table 2. Analysis of the dynamics of specific IgG in the serum of mice immunized with an allergen or allergoid of wormwood pollen (based on changes in optical density parameters)

Препарат, доза (мкг/мышь)	Интактные мыши (n=10)	Недели после однократной иммунизации			
		1 (n = 10)	2 (n = 10)	3 (n = 10)	4 (n = 10)
Аллерген, 20	0,099 ± 0,006	0,101 ± 0,021	0,299 ± 0,015	0,398 ± 0,013	0,498 ± 0,011
Аллергоид, 20	0,099 ± 0,006	0,109 ± 0,023	0,364 ± 0,015	0,491 ± 0,011	0,636 ± 0,019
Аллерген, 100	0,099 ± 0,006	0,108 ± 0,019	0,635 ± 0,024	0,790 ± 0,035	0,831 ± 0,03
Аллергоид, 100	0,099 ± 0,006	0,104 ± 0,019	1,109 ± 0,053	1,351 ± 0,051	1,432 ± 0,029

Accepted for publication



a



b

Рис. 1. Результаты исследования экстракта пыльцы (a) и аллергоида (b) полыни горькой методом гель-хроматографии.

Fig. 1. The results of the study of the extract pollen (a) and allergoid (b) of *Artemisia absinthium* by gel chromatography.



**ОБ АВТОРАХ/ Authors' info**

<p><b>* Есаулова Дарья Ростиславовна;</b> адрес: Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, д. 24; ORCID: 0000-0003-0283-5637; eLibrary SPIN: 4399-8631; e-mail: esaulova.d.r@gmail.com</p>	<p><b>* Daria R. Esaulova, MD;</b> address: 24, Kashirskoe Shosse, 115522, Moscow, Russia; ORCID: 0000-0003-0283-5637; eLibrary SPIN: 4399-8631; e-mail: esaulova.d.r@gmail.com</p>
<b>Соавторы:</b>	
<p><b>Нечай Ксения Олеговна;</b> ORCID: 0000-0001-6052-9721; eLibrary SPIN: 7206-6660; e-mail: xenya.ne4ay2016@yandex.ru</p>	<p><b>Ksenia O. Nechay;</b> ORCID: 0000-0001-6052-9721; eLibrary SPIN: 7206-6660; e-mail: xenya.ne4ay2016@yandex.ru</p>
<p><b>Андреев Александр Игоревич;</b> ORCID: 0000-0002-6257-6289; eLibrary SPIN: 7126-4748; e-mail: cahek_ahdreeb@mail.ru</p>	<p><b>Alexandr I. Andreev;</b> ORCID: 0000-0002-6257-6289; eLibrary SPIN: 7126-4748; e-mail: cahek_ahdreeb@mail.ru</p>
<p><b>Андреев Игорь Владимирович, канд. мед. наук;</b> ORCID: 0000-0001-6162-6726; eLibrary SPIN: 8072-9669; e-mail: iva66@list.ru</p>	<p><b>Igor V. Andreev, MD, Cand. Sci. (Medicine);</b> ORCID: 0000-0001-6162-6726; eLibrary SPIN: 8072-9669; e-mail: iva66@list.ru</p>
<p><b>Латышева Татьяна Васильевна, д-р мед. наук, профессор;</b> ORCID: 0000-0003-1508-0640; eLibrary SPIN: 8929-7644; e-mail: tv.latysheva@nrcki.ru</p>	<p><b>Tatyana V. Latysheva, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;</b> ORCID: 0000-0003-1508-0640; eLibrary SPIN: 8929-7644; e-mail: tv.latysheva@nrcki.ru</p>
<p><b>Сетдикова Наиля Харисовна, д-р мед. наук;</b> ORCID: 0000-0003-2587-7928; eLibrary SPIN: 6339-6945; e-mail: nh.setdikova@nrcki.ru</p>	<p><b>Nailya Kh. Setdikova, MD, Dr. Sci. (Medicine);</b> ORCID: 0000-0003-2587-7928; eLibrary SPIN: 6339-6945; e-mail: nh.setdikova@nrcki.ru</p>
<p><b>Латышева Елена Александровна, д-р мед. наук;</b> ORCID: 0000-0002-1606-205X; eLibrary SPIN: 2063-7973; e-mail: ealat@mail.ru</p>	<p><b>Elena A. Latysheva, MD, Dr. Sci. (Medicine);</b> ORCID: 0000-0002-1606-205X; eLibrary SPIN: 2063-7973; e-mail: ealat@mail.ru</p>
<p><b>Гудима Георгий Олегович, д-р биол. наук, профессор;</b> ORCID: 0000-0003-2864-6949; eLibrary SPIN: 5307-9425; e-mail: g.gudima@nrcki.ru</p>	<p><b>Georgii O. Gudima. MD, Dr. Sci. (Biology), Professor;</b> ORCID: 0000-0003-2864-6949; eLibrary SPIN: 5307-9425; e-mail: g.gudima@nrcki.ru</p>
<p><b>Смирнов Валерий Валерьевич, д-р фарм. наук;</b> ORCID: 0000-0002-8232-6682; eLibrary SPIN: 4171-3871; e-mail: vall@mail.mipt.ru</p>	<p><b>Valery V. Smirnov, MD, Dr. Sci. (Pharmacy);</b> ORCID: 0000-0002-8232-6682; eLibrary SPIN: 4171-3871; e-mail: vall@mail.mipt.ru</p>
<p><b>Мартынов Александр Игоревич, канд. мед.</b></p>	<p><b>Alexander I. Martynov, MD, Cand. Sci.</b></p>

наук; ORCID: 0000-0001-9761-8058; eLibrary SPIN: 5829-5580; e-mail: immune48@mail.ru	(Medicine); ORCID: 0000-0001-9761-8058; eLibrary SPIN: 5829-5580; e-mail: immune48@mail.ru
<b>Хайтов Муса Рахимович.</b> д-р мед. наук, профессор, чл.-корр. РАН; ORCID: 0000-0003-4961-9640; eLibrary SPIN: 3199-9803; e-mail: mr.khaitov@nrcii.ru	<b>Musa R. Khaitov,</b> MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences; ORCID: 0000-0003-4961-9640; eLibrary SPIN: 3199-9803; e-mail: mr.khaitov@nrcii.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Accepted for publication