

## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ВОДНО-СОЛЕВОГО МИКСТ-АЛЛЕРГЕНА ИЗ КЛЕЩЕЙ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ФОРМЫ

Бержец В.М.<sup>1</sup>, Хлгатян С.В.<sup>1</sup>, Петрова С.Ю.<sup>1</sup>, Хрулева В.А.<sup>1</sup>,  
Ефремов М.А.<sup>2</sup>, Васильева А.В.<sup>1</sup>, Петрова Н.С.<sup>1</sup>, Акутина В.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

**Резюме.** В настоящее время аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является наиболее патогенетически обоснованным методом лечения IgE-зависимых аллергических заболеваний. В широкой клинической практике в настоящий момент используют подкожный (ПКИТ) и сублингвальный (СЛИТ) способы АСИТ. Сублингвальная иммунотерапия отличается удобством применения, выраженным снижением системных и местных побочных эффектов и доказанной клинической эффективностью. В России, к сожалению, в настоящее время сублингвальных форм клещевых аллергенов для проведения АСИТ не производится. Ранее в нашей лаборатории была разработана технология получения сублингвального препарата аллергена из клещей *D. farina* и было показано, что полученный препарат не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов. Целью настоящего исследования является получение препарата микст-аллергена из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*, предназначенного для проведения аллерген-специфической иммунотерапии сублингвальным способом. Задачи исследования: изучение физико-химических и иммунобиологических свойств полученного без фенольного водно-солевого микст-экстракта (БВСМЭ) из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*. Изучали свойства полученного БВСМЭ из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) и *Dermatophagoides farinae* (Der f), прошедшего стерилизующую фильтрацию. БВСМЭ анализировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецил-сульфата натрия и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией. Проводили ИФА с кроличьими поликлональными сыворотками, полученными в результате сенсибилизации животных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2. В ИФА показана положительная реакция БВСМЭ с IgG-антителами кроликов. Изучали острую и хроническую токсичность полученного микст-аллергенного препарата на лабораторных животных. Согласно проведенному патоморфологическому анализу было показано, что препарат не обладает токсичностью и не вызывает местного раздражающего действия у испытуемых животных. Полученный БВСМЭ содержит нативные белки, сохраняет иммуногенные свойства, не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов. Данный экстракт может быть использован в качестве основы для создания сублингвальной формы клещевого микст-аллергена, что особенно перспективно для применения в педиатрической практике.

**Ключевые слова:** клещи домашней пыли, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, сублингвальная форма, аллергия, АСИТ

### Адрес для переписки:

Петрова Станислава Юрьевна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин  
и сывороток имени И.И. Мечникова»  
105064, Россия, Москва, М. Казенный пер., 5а.  
Тел.: 8 (495) 917-52-64.  
E-mail: laball@yandex.ru

### Address for correspondence:

Petrova Stanislava Yu.  
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera  
105064, Russian Federation, Moscow,  
Maliy Kazenny lane, 5a.  
Phone: 7 (495) 917-52-64.  
E-mail: laball@yandex.ru

### Образец цитирования:

В.М. Бержец, С.В. Хлгатян, С.Ю. Петрова,  
В.А. Хрулева, М.А. Ефремов, А.В. Васильева, Н.С. Петрова,  
В.А. Акутина «Изучение свойств водно-солевого микст-  
аллергена из клещей домашней пыли с целью создания  
сублингвальной формы» // Медицинская иммунология, 2018.  
Т. 20, № 4. С. 597-600.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600

© Бержец В.М. и соавт., 2018

### For citation:

V.M. Berzhets, S.V. Khlgatian, S.Yu. Petrova, V.A. Khruleva,  
M.A. Efremov, A.V. Vasilyeva, N.S. Petrova, V.A. Akutina  
“Study of the properties of the mixed water/salt house dust mite  
allergen aiming to design its sublingual form”, *Medical  
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20,  
no. 4, pp. 597-600.  
doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-4-597-600

## STUDY OF THE PROPERTIES OF THE MIXED WATER/SALT HOUSE DUST MITE ALLERGEN AIMING TO DESIGN ITS SUBLINGUAL FORM

Berzhets V.M.<sup>a</sup>, Khlgtatian S.V.<sup>a</sup>, Petrova S.Yu.<sup>a</sup>, Khruleva V.A.<sup>a</sup>, Efremov M.A.<sup>b</sup>, Vasilyeva A.V.<sup>a</sup>, Petrova N.S.<sup>a</sup>, Akutina V.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Current allergen-specific immunotherapy (AIT) is the most pathogenetically justified method of the IgE-dependent treatment of allergic diseases. Subcutaneous (SCIT) and sublingual (SLIT) AIT are currently used in wide clinical practice. Sublingual immunotherapy is characterized by the convenience of use, decreased incidence of systemic and local side effects, and proven clinical efficacy. However, sublingual form of home dust mite allergen for AIT is not yet produced in Russia. Previously, the technology for sublingual form of *D. farinae* (Der f) mites allergen was developed in our laboratory, and this extract was shown to be non-toxic and free of any significant side effects. We obtained a sublingual form of mixed *D. pteronyssinus* (Der p)/*D. farinae* mites allergen for sublingually allergen-specific immunotherapy. We studied physico-chemical and immunobiological properties of the Der p and Der f mites phenol-free water-salt mixed extract (WWSME). WWSME was studied after sterilizing filtration. WWSME was analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gel in the presence of dodecyl-sodium sulfate and reverse-phase high-performance liquid chromatography. ELISA was performed with polyclonal rabbit serum, obtained by sensitization of animals with recombinant Der f1 and Der f2 allergens. ELISA shows positive reaction of WWSME with IgG-antibodies of rabbits. We studied acute and chronic toxicity of received mixed allergen in laboratory animals. Pathomorphological studies have shown that WWSME has no detectable toxicity and does not cause local irritation in the animals. The WWSME product contains native proteins, retains immunogenic properties, is non-toxic and does not cause significant side effects. This extract can be used as the basis for designing a sublingual form of dust mite mixed allergen, which is especially promising for pediatric applications.

**Keywords:** home dust mite allergens, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, sublingual form, allergy, allergen-specific immunotherapy

В настоящее время аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является наиболее патогенетически обоснованным методом лечения IgE-зависимых аллергических заболеваний [1]. АСИТ можно рассматривать как проявление адаптационных иммунологических реакций организма на постепенное введение возрастающих доз аллергена, к которому выявлена сенсибилизация. АСИТ приводит к снижению аллергочувствительности к вводимому аллергену и в конечном итоге вызывает уменьшение или полное исчезновение клинических симптомов при естественной экспозиции аллергена [7]. В широкой клинической практике в настоящий момент используют подкожный (ПКИТ) и сублингвальный (СЛИТ) способы АСИТ [6, 9]. Сублингвальная иммунотерапия отличается удобством применения, выраженным снижением системных и местных побочных эффектов и доказанной клинической эффективностью [1, 4]. На международном

фармакологическом рынке существует немало препаратов, предназначенных для сублингвального применения. В России, к сожалению, в настоящее время подобных препаратов нет [1, 3, 8].

Ранее в нашей лаборатории была разработана технология получения сублингвального препарата аллергена из клещей *D. farinae*. Нами показано, что полученный препарат не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов, благодаря отсутствию в нем консерванта — фенола [2].

**Целью настоящего исследования** является получение лечебной формы микст-аллергена из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*, предназначенной для проведения аллерген-специфической иммунотерапии сублингвальным способом. Задачи исследования: изучение физико-химических и иммунобиологических свойств полученного бесфенольного водно-солевого микст-экстракта (БВСМЭ) из клещей *D. pteronyssinus* и *D. farinae*.

## Материалы и методы

Изучали свойства полученного БВСМЭ из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) и *Dermatophagoides farinae* (Der f), прошедшего стерилизующую фильтрацию. Концентрация белка составила  $10150 \pm 750$  PNU. Длительность хранения 12-24 дней при t от -3 до -6 °С. БВСМЭ анализировали методом электрофореза в ПААГ в присутствии додецил-сульфата натрия и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ). Проводили ИФА с кроличьими поликлональными сыворотками, полученными в результате сенсибилизации животных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2. Изучали острую и хроническую токсичность полученного микст-аллергенного препарата на лабораторных животных.

## Результаты и обсуждение

Согласно проведенному патоморфологическому анализу, было показано, что препарат не обладает токсичностью и не вызывает местного раздражающего действия у испытуемых животных.

Электрофореграмма выявила, что в данном препарате имеются белки с молекулярной массой приблизительно 26 кДа, что согласуется

с данными литературы и соответствует главным клещевым аллергенам Der p1/Der f1(cysteine protease) [5]. Минорные аллергены не определяются на фореграмме, что, вероятно, связано с их низкой концентрацией в анализируемом препарате. В ИФА показана положительная реакция БВСМЭ с IgG кроликов, сенсибилизированных рекомбинантными аллергенами Der f1 и Der f2. ОФ ВЭЖХ выявила наличие от двух до восьми белковых фракций в растворе (в зависимости от условий проведения эксперимента), а также присутствие множественных фрагментированных пептидных молекул. Для идентификации выявленных белковых фракций нами проводится сравнительный анализ полученных пиков удерживания белков с пиками удерживания главных нативных аллергенов.

## Выводы

Полученный БВСМЭ содержит нативные белки, сохраняет иммуногенные свойства, не токсичен и не вызывает выраженных побочных эффектов. Данный экстракт может быть использован в качестве основы для создания сублингвальной формы клещевого микст-аллергена, что особенно перспективно для применения в педиатрической практике. Полученный препарат может быть рекомендован для дальнейшего изучения.

## Список литературы / References

1. Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н., Перфилова И.А., Кобзев Д.Ю., Вачугова Л.К. Место аллергенспецифической иммунотерапии в лечении атопии // *Consilium medicum*, 2013. № 3. С. 55-61. [Astafyeva N.G., Gamova I.V., Udovichenko E.N., Perfilova I.A., Kobzev D.Yu., Vachugova L.K. Place of the allergen-specific immunotherapy in the atopy's treatment. *Consilium medicum*, 2013, no. 3, pp. 55-61. (In Russ.)]
2. Бержец В.М., Коренева Е.А., Петрова Н.С., Пищулина Л.А. Способ получения гранулированной лекарственной формы из аллергена клещей рода *Dermatophagoides farinae* // Патент на изобретение №: 2216353. 2002. С. 1. [Berzhets V.M., Koreneva E.A., Petrova N.S., Pishchulina L.A. A method of preparing a granular medicine form from *Dermatophagoides farinae* allergen. Patent for innovation No. 2216353, 2002, p. 1.]
3. Бжедугова Е.Р., Ненашева Н.М. Эффективность и безопасность сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии аллергенами клещей домашней пыли // *Российский аллергологический журнал*, 2008. № 6. С. 67-73. [Bzhedugova E.R., Nenasheva N.M. Efficacy and safety of house dust mite sublingual immunotherapy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2008, no. 6, pp. 67-73. (In Russ.)]
4. Воробьева О.В., Гушчин И.С. Контролируемые исследования эффективности и безопасности аллерген-специфической иммунотерапии: исторический аспект // *Российский аллергологический журнал*, 2011. № 4. С. 3-14. [Vorobyeva O.V., Guschin I.S. Controlled trials of the efficacy and safety of allergen-specific immunotherapy: historical aspect. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2011, no. 4, pp. 3-14. (In Russ.)]
5. Коровкина Е.С., Мокроносова М.А. Аллергия к клещам домашней пыли с позиций молекулярной аллергологии // *Медицинская иммунология*, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 279-288. [Korovkina E.S., Mokronosova M.A. House dust mite allergy in view of molecular allergology. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 279-288. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-279-288.
6. Сублингвальная иммунотерапия. Меморандум Всемирной организации по аллергии (WAO) // *Астма*, 2010. Т. 11, № 1. С. 5-57. [Sublingual Immunotherapy: Memorandum WAO (WAO). *Astma = Asthma*, 2010, Vol. 11, no. 1, pp. 5-57. (In Russ.)]

7. Хутеева С.Х., Федосеева В.Н. Аллергенспецифическая иммунотерапия бронхиальной астмы. М.: Экон, 2000. С. 250. [Khuteeva S.Kh., Fedoseeva V.N. Allergen-specific immunotherapy of Asthma]. Moscow: Ekon, 2000, p. 250.
8. Park K.H., Son M., Choi S.Y., Park H.J., Lee J.H., Jeong K.Y., Lee J.S., Park J.W. *In vitro* evaluation of allergen potencies of commercial house dust mite sublingual immunotherapy reagents. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2015, Vol. 7, no. 2, pp. 124-129.
9. Yuta A., Miyamoto Y., Ogihara H., Hattori R., Okubo K. Antigen specific sublingual immunotherapy for pediatric Japanese cedar pollinosis. *Alerugi*, 2009, Vol. 58, no. 2, pp. 124-132.

---

**Авторы:**

**Бержец В.М.** — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Хлгатаян С.В.** — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Петрова С.Ю.** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Хрулева В.А.** — младший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Ефремов М.А.** — младший научный сотрудник лаборатории клеточных взаимодействий ФГБНУ «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», Москва, Россия

**Васильева А.В.** — научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Петрова Н.С.** — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Акутина В.А.** — младший научный сотрудник лаборатории по разработке аллергенов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

**Authors:**

**Berzhets V.M.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Khlgatian S.V.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Petrova S.Yu.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Khruleva V.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Efremov M.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Vasilyeva A.V.**, Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Petrova N.S.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

**Akutina V.A.**, Junior Research Associate, Laboratory of Allergens, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

---

Поступила 15.12.2017  
Отправлена на доработку 18.12.2017  
Принята к печати 21.12.2017

---

Received 15.12.2017  
Revision received 18.12.2017  
Accepted 21.12.2017