

В.В. Смирнов,

к.фарм.н., заведующий отделом нормативного обеспечения в сфере обращения лекарственных средств, старший преподаватель кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Д.О. Бокон,

студент пятого курса фармацевтического факультета Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

V.V. Smirnov

PhD, head of the Department of normative support in the field of medicines, senior lecturer of the chair of pharmaceutical and toxicological chemistry of the I.M. Sechenov First MSMU

D.O. Bokov,

student of the 5-th year of the Pharmaceutical faculty of the I.M. Sechenov First MSMU

К ВОПРОСУ СТАНДАРТИЗАЦИИ АЛЛЕРГЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ: ПУТИ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ

ALLERGENIC EXTRACTS STANDARDIZATION: PROSPECTS FOR THE FUTURE

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Валерий Валерьевич Смирнов, заведующий отделом нормативного обеспечения в сфере обращения лекарственных средств

Адрес: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13

Телефон: 8 (495) 691–13–92

E-mail: fmmsu@mail.ru

Статья поступила в редакцию: 25.07.2013

Статья принята к печати: 22.10.2013

CONTACT INFORMATION:

Valerij Valerjevich Smirnov, head of the Department of normative support in the field of medicines

Address: 13 Nikitsky Boulevard, Moscow, 119019

Tel.: 8 (495) 691–13–92

E-mail: fmmsu@mail.ru

The article received: 25.07.2013

The article approved for publication: 22.10.2013

Аннотация. В статье рассмотрены методологические основы протоколов стандартизации аллергенных экстрактов, используемых на данный момент при проведении аллерген-специфической иммунотерапии в мировой практике. Проведен сравнительный анализ нормативной документации, регламентирующей основные технологические этапы производства аллергенных экстрактов. Обобщены данные, касающиеся изготовления и контроля качества данной группы биологических лекарственных препаратов. Показано, что метод тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с высокоэффективной жидкостной хроматографией может с успехом применяться в изучаемой области.

Annotation. This article reviews the methodological basic procedures of the allergenic extracts standardization protocols used for the allergen-specific immunotherapy in the world nowadays. The comparative analysis of the normative documents regulating the basic technological stages of allergenic extracts production was carried out. The data concerning the production and quality control of this biological drugs group was generalized. It is shown that the method of tandem mass spectrometry of high resolution combined with high performance liquid chromatography could be advantageously employed in the study area.

Ключевые слова. Аллерген-специфическая иммунотерапия, аллергенные экстракты, стандартизация, тандемная масс-спектрометрия высокого разрешения.

Keywords. Allergen-specific immunotherapy, allergenic extracts, standardization, tandem high-resolution mass spectrometry.

Наиболее эффективным способом лечения полинозов или так называемых сезонных аллергических риноконъюнктивитов и других аллергических заболеваний на сегодняшний день считается аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) [1]. История ее становления заняла несколько десятилетий: в 1819 г. английский врач Джон Босток описал «сенную лихорадку»; в 1869 г. Дэвид Блекли, пытаясь определить, что являлось причиной обострений

сенной лихорадки, поставил на себе кожные пробы (втирая пыльцу в поврежденные участки кожи); в 1902–1905 гг. врачи из Гамбурга, Прауснитц и Дунбар, страдавшие сенной лихорадкой, установили, независимо от предшествующих работ Д. Блекли, что симптоматика сенной лихорадки со стороны слизистых оболочек полости носа и глаз вызвана пыльцой растений. Впервые в качестве терапевтического метода АСИТ предложили Леонард Нун и

Джон Фримен в 1911 г. при лечении поллиноза: публикация в журнале «Ланцет» сообщала сведения об успешном выздоровлении около 20-ти больных сенной лихорадкой. При лечении астмы иммунотерапия аллерговакцинами с успехом использовалась Кауфилдом в 1921 г. [2, 3].

Следует отметить, что в 1907 г. А.М. Безредка в Париже одним из первых в мире начал работу по созданию аллерговакцины на основе пыльца. Большая заслуга в становлении и развитии метода АСИТ принадлежит аллергологам бывшего СССР и стран постсоветского пространства. Помимо А.М. Безредка в данной области работали А.Д. Беляев, А.А. Богомолец, П.К. Булатов, Ю.С. Гушин, Д.Е. Альперн, И.Н. Моргунов, Х.Л. Галикеев, С.П. Карпов, П.Н. Кашкин, Б.Д. Кветнев, Ю.А. Порошина, И.И. Балаболкин, Т.С. Соколова, А.В. Артомасова и др. Особенно большой вклад внес в развитие и становление метода АСИТ основатель современной отечественной аллергологии академик А.Д. Адо. Именно под его личным руководством было организовано производство терапевтических и диагностических аллергенов в СССР, и метод АСИТ нашел широкое распространение в самых дальних аллергологических кабинетах нашей страны [4].

На данный момент АСИТ — это единственный патогенетический метод лечения, направленный исключительно на составляющие этапов механизма развития аллергических реакций. Данный метод терапии заключается в применении возрастающих доз специальным образом приготовленных водно-солевых (или других видов) аллергенных экстрактов, а так же модифицированных или адсорбированных на разных носителях препаратов [5]. Причем подбор аллергена осуществляется с тем расчетом, чтобы именно он вызывал основные симптоматические проявления заболевания у больного с повышенной чувствительностью. Основной задачей терапии является специфическая гипосенсибилизация — постепенное снижение чувствительности пациента вплоть до полной индифферентности к естественной экспозиции этого аллергена (или группы аллергенов) в окружающей среде [6].

При введении в организм пациента аллергена наблюдается повышение резистентности к его действию на иммунологическом уровне, что имеет некоторые общие черты с процедурой вакцинации. Сегодня возможно использование и других терминов наряду с «аллергенными экстрактами»: например, «аллергенные вакцины». С момента первого использования АСИТ накопилось достаточно клинических данных применения этого метода. Сегодня он широко используется в качестве терапии Ig E-опосредованных типовых аллергических процессов [7, 8].

Достижения в области эффективности и безопасности современной АСИТ были бы невозмож-

ны без разработки и внедрения стандартизованных экстрактов аллергенов. Сейчас наблюдаются значительные успехи в изготовлении аллергенных экстрактов. В то же время существует ряд проблем, которые связаны со стандартизацией и контролем качества данных препаратов [9–11]. С применением водно-солевых аллергенных экстрактов пыльцы растений началось широкое распространение лечебных аллергенов в медицинской практике. В дальнейшем лечебные формы аллергенов совершенствовались с учетом их безопасности при сохранении главного критерия — иммуногенности. Были также предприняты попытки модифицировать аллергены путем их полимеризации (глутаровым альдегидом, формальдегидом), получения сорбированных форм (с гидроксидом алюминия, L-тирозином), разработке пролонгированных форм с применением многочисленных как синтетических, так и природных носителей [12, 13].

Состав аллергенных экстрактов чрезвычайно разнообразен: это и белки, пептиды, гликопротеиды, полисахариды, производные липидов и т. д. Объясняется это тем, что для получения аллергенных экстрактов используются различные источники сырья, методы изготовления и способы очистки. Из-за этого препараты разных фирм-производителей также отличаются значительной вариабельностью по составу антигенных компонент и биологической активности. Обеспечить одинаковый состав и иммунологическую активность аллергенов (нативных экстрактов) различных производителей и партий препаратов одного конкретного производителя возможно при соблюдении требований к проведению стандартизации, чтобы данные препараты стали полноценными фармакопейными продуктами [14, 15].

Определение специфической активности аллергенных экстрактов является основной, а также наиболее сложной составляющей стандартизации. Проблемы связаны с различными способами получения сырьевого материала, методами его химической и физической модификации, использованием разного рода растворителей, нормативами заполнения тары (флаконов и ампул), способами хранения и транспортировки и т. д. [7, 9, 14]. В процессе изготовления аллергенных экстрактов зачастую приходится сталкиваться с проблемами, которые связаны с невозможностью выделения из ряда препаратов химически чистых аллергенных компонентов, нестабильностью физико-химических свойств сырьевого материала, неполной корреляцией между биологической активностью отдельных аллергенных компонент и их количественным соотношением.

Так, с финансовой поддержкой Европейского союза был сформирован проект «CREATE» или «Сертифицированные эталоны (референсы) аллергенов для оценки качества продукции» («Certified

References used for Allergen and Test Evaluation»), который должен был решить проблемы, связанные со стандартизацией аллергенов на уровне фармакопейных препаратов и способствовать внесению унифицированных методик и характеристик независимо от конкретной компании-производителя в соответствующие фармакопейные статьи. В основе данного проекта были заложены идеи широкого введения унифицированных стандартизированных методов количественного содержания главных (мажорных) аллергенных компонент с использованием стандартных протоколов [16]. К клинически значимым, мажорным аллергенам относятся те аллергены, которые способны вызывать иммунологический ответ более чем у половины пациентов и связывать более половины IgE-АТ у сенситивизированных к этому аллергену пациентов [14]. Несмотря на всю амбициозность проекта, его постиг ряд неудач, связанных прежде всего с трудновыполнимостью поставленных задач. В результате сложной, кропотливой работы участников проекта всего лишь две молекулы аллергенов белков (аллерген пыльцы березы — Bet v 1 и аллерген пыльцы тимотея — Phl p 5b) смогли пройти валидацию в лабораториях, для того чтобы их можно было включить в соответствующие статьи Европейской фармакопеи [17].

Самым старым методом изготовления аллергенных экстрактов для лечебных и диагностических целей является экстрагирование необходимых аллергенов из природной матрицы (биообъектов). Выделение аллергенов проводят путем экстрагирования сырьевого материала различными растворителями. Перед экстракцией производят дезинтеграцию природного сырья путем разрушения природной матрицы, далее полученные таким образом экстракты подвергают различного рода очистке. Итак, приготовление экстрактов аллергенов на основе природного сырья состоит из следующих этапов: измельчения, экстракции, очистки, диализа, стерилизации, пробы на токсичность.

Для обеспечения стандартности продукта предварительно проводят оценку качества самого сырья. Его источником являются организмы-продуценты аллергенов: растения (березовые, злаки), клещи домашней пыли, насекомые, грибы и др. Их культивируют в лабораторных условиях (клещи, микроорганизмы, насекомые) либо проводят сбор в естественных условиях обитания (пыльца различных растений). К сырью предъявляется ряд требований: определение видовой принадлежности, регламентирование присутствия посторонних примесей. Так, при проведении визуального и микробиологического анализов возможно присутствие не более 1% любых посторонних примесей в исследуемом образце [18].

В процессе измельчения предварительно отобранного сырья происходит разрушение клеточных

мембран, что приводит к значительному увеличению общей поверхности сырьевого материала. Для проведения измельчения используют специальную аппаратуру (лабораторный миксер, ультразвуковые протираторы и др.). Больше всего проблем технологического характера возникает при пробоподготовке таких материалов, как перо, шерсть животных, шелк и т. п.

Для экстракции используют слабощелочную среду (pH=7,5–8,5), поскольку в процессе экстрагирования зачастую происходит подкисление раствора. Для обеспечения постоянного pH целесообразно использовать буферные растворы: щелочной раствор Кока (Coca A., 1922) применяется для приготовления экстрактов из грибов, домашней пыли, пыльцы и др.; буферный раствор с NaCl чаще всего используется для экстрактов из овощей, орехов, фруктов, эпидермиса животных и т. д. Обезжиренный материал смешивают с наиболее подходящим раствором, затем проводят экстрагирование при комнатной температуре в тест-системе от 17 до 24 ч. при постоянном встряхивании. Согласно технике Frugoni, экстракцию проводят 12% раствором этилового спирта (соотношение материала к экстрагенту — 1:9) продолжительностью 48–72 ч. в холодильной камере.

Процесс очистки сырьевого материала может включать осаждение, центрифугирование, фильтрацию, либо комплекс этих методов. Получение по возможности максимального количества высокоочищенного экстракта аллергена, а также минимизация потерь при изготовлении являются основными техническими задачами на данном этапе.

После предварительной очистки следует диализ, в процессе которого происходит удаление низкомолекулярных веществ и пигментов, способных вызвать нежелательные побочные реакции (раздражения кожи и др.). Использование данного метода необходимо для экстракции некоторых продуктов питания, домашней пыли. Высокомолекулярные примеси возможно исключить благодаря применению каскадного способа фильтрации. Несмотря на все меры предосторожности, в готовом экстракте все равно остается некоторое количество сопутствующих компонентов, которые не проявляют иммунологических свойств, что является одним из недостатков данного метода.

Поскольку экстракты аллергенов предназначены по большей части для инъекционного введения, следующим этапом изготовления является стерилизация. Фильтрация через бактериальные фильтры — наиболее приемлемый способ стерилизации, позволяющий сохранить структуру термолабильных веществ. После стерилизации экстракт переносят в стерильную посуду. Так же необходим дополнительный контроль на стерильность перед использованием: для этого проводят посев и обна-

руживают возможный рост аэробных и анаэробных микроорганизмов.

Испытание на токсичность состоит в определении рН (значение должно быть равно примерно 7), обязательном проведении микробиологического и токсикологического контролей. Таким образом, полученный экстракт должен представлять собой высокоочищенный препарат с точным указанием качественного и количественного состава [12, 19].

Получать аллергенные экстракты, кроме как из природных источников, также возможно с помощью биотехнологического производства (высокоочищенные экстракты, содержащие одну фракцию активного аллергенного белка). Новые технологии получения клонированных молекул белка уже сейчас позволяют использовать большое количество важных аллергенов (аллергены пыльцы растений, эпидермиса животных, постельного клеща, ядов перепончатокрылых, насекомых и др.), представляющих собой индивидуальные рекомбинантные белки, которые обладают иммунологической активностью, сопоставимой с аналогичными белковыми аллергенами, встречающимися в природе [20]. Такая технология облегчает стандартизацию аллергенных препаратов, позволяя с высокой точностью определить содержание главных (мажорных) аллергенов в произведенных сериях лекарственных препаратов. Однако в любом случае необходима соответствующая процедура стандартизации аллергенного экстракта, полученного тем или иным способом.

На данный момент, как уже было отмечено ранее, отсутствуют единые протоколы стандартизации аллергенных экстрактов для всех производителей. Так, в Европе оценкой экстрактов аллергенов на их соответствие всем требованиям, прописанным в Европейской Фармакопее, занимается Европейское агентство по лекарственным средствам (ЕАЛС) — European Medicines Agency (ЕМЕА). В США основной организацией, занимающейся вопросами стандартизации аллергенных экстрактов, является Управление по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств — Food and Drug Administration (FDA). Суммарная аллергенная активность лекарственного препарата определяется из соотношения проявления кожной реакции на аллерген (прик-тест) к аналогичной кожной реакции, вызываемой гистамином у больных, сенсibilизированных (чувствительных) к данному аллергену [10]. Таким образом, основным методом стандартизации экстрактов аллергенов во всем мире является определение биологической активности препарата посредством способности связывания комплекса АГ-АТ [14].

Что касается природного сырья (нереконбинантных молекул), состав и иммунологическая активность аллергенных экстрактов имеют довольно значительные расхождения не только у нескольких

производителей, но также и у одного производителя от одной партии препарата к другой. Возникает потребность в проведении сравнительных анализов иммунологической активности производимых экстрактов. При проведении сравнительного анализа необходимо определить метод, стандарт и единицы измерения иммунологической активности препарата.

При оценке биологической активности экстрактов аллергенов возможно использование нескольких методов. Различают диагностику *in vitro* и *in vivo*. К методам *in vitro* относят следующие: вестерн-блоттинг, изоэлектрофокусирование, IgE-иммуноблоттинг, перекрестный радиоиммуноэлектрофорез, иммуноферментный анализ (ИФА), перекрестный радиоиммуноэлектрофорез, ракетный электрофорез по Лореллу, электрофорез в полиакриламидном геле с додецил-сульфатом натрия, радиоаллергосорбентный тест (РАСТ) и др. К методам *in vivo* относятся: кожные пробы (капельные), прик-тесты (тесты уколом), аппликационные (эпикутанный метод), скарификационные, внутрикожные и др. [6, 9, 10, 12, 14].

Следует отметить, что до сегодняшнего дня специфическая активность и концентрация аллергенов каждым производителем определялась посредством методологических подходов, удобных только для него, т. е. с использованием своих внутренних стандартов — In House Reference Standard (IHRС). Поэтому на рынке появилось великое множество препаратов, имеющих различную маркировку своих коммерческих серий лечебных и диагностических аллергенных экстрактов, характеризующих их иммунологическую активность. Среди них следующие: биологическая единица — Biological Unit (BU), биологическая аллергенная единица — Biological Allergenic Unit (BAU), единица аллергенной активности — Allergen Units (AU), единица активности АСИТ — Specific treatment unit (STU), индекс реактивности (ИР) — Index of reactivity (IR-Europe), единица активности радиоаллергосорбентного теста — Activity Units by RAST (AUR-Europe), единица эквивалента гистамина НЕР, таблетка (Т) или единица (U) — вид экстрактов для терапии сенсibilизированных пациентов — Standartisation Quality (SQ-T или SQ-U) [0]. Также встречаются единицы, которые стандартизуются по специфической активности связывания IgG, а не IgE-SU. К ним относятся диагностическая биологическая единица — DBU и лечебная терапевтическая стандартизованная единица TSU. Данные испытания основываются на размерах папулы (кожный прик-тест) с концентрацией гистамина 10 мг/мл в качестве эталона-стандарта. Несмотря на это, даже в случае применения абсолютно одинаковых методик стандартизации, указанная одна и та же активность, которая будет выражаться в одинаковых единицах на упаковках

экстрактов аллергенов, но изготовленных по разным технологическим условиям у разных производителей, в реальности будет вызывать реакцию разной степени выраженности. Данный факт объясняется различной чувствительностью тестируемых больных, а так же проведением большинства исследований на недостаточно больших выборках пациентов и т. д. [7, 8]. Подобное явное непостоянство в оценке активности аллергенов сильно оказывает влияние на результаты метаанализов, резко снижая их однородность, и, как следствие, мешает как проведению систематических обзоров клинических испытаний по установлению эффективности АСИТ, так и разработке новых эффективных и безопасных аллергенных препаратов.

Отсутствие унифицированных методик вынуждает каждого производителя аллергенных экстрактов применять собственные протоколы стандартизации, зачастую значительно отличающиеся от аналогичных у других фирм-производителей. На данный момент универсальные эквиваленты выражения иммунологической активности отсутствуют, у каждого производителя есть свои методы и алгоритмы их интерпретации. Но сегодня для разных фирм-производителей стало принципиально выполнимым определение содержания в лекарственном препарате главных аллергенных белков, которые преимущественно ответственны за гиперчувствительность организма пациента к многокомпонентному составу аллергенного экстракта. Для этого в распоряжение стран мирового сообщества передаются т. наз. международные референс-стандарты, созданные Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) — World Health Organization (WHO), которые содержат определенное количество соответствующих аллергенных компонент. ВОЗ также была предложена система международных единиц (*International Unit, IU*): в данных единицах выражается биологическая активность международных стандартов, разработанных организацией. В феврале 1981 г. на рабочем совещании WHO и Allergen Standardization Subcommittee of the International Union of Immunological Societies (IUIS — Международный союз иммунологических обществ, МСИО) в Женеве была разработана программа по использованию 15-ти международных стандартов аллергенов, в числе которых были аллергены пыльцы березы и клещей домашней пыли. В 1983–1986 гг. Благодаря работе International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee (Экспертного подкомитета стандартизации аллергенных препаратов при Международном союзе иммунологических обществ) были одобрены следующие международные стандарты аллергенов: тимофеевки (*Phleum pratense L.*), клещей домашней пыли (*European house dust mite — Dermatophagoides pteronyssinus, Trouessart, 1897*), пыльцы березы (*Betula pendula*

Roth.) и аллергенов собаки (*Canis lupus familiaris L.*). На этом работа в области стандартизации аллергенных экстрактов не была остановлена: сегодня имеются основные нормативные акты, которые регламентируют национальные и международные стандарты. В европейских странах, несмотря на все достоинства, международные референс-препараты не получили широкого распространения: каждым производителем все так же используется свой IHRS и активность данного стандарта по-прежнему выражается в собственных единицах [7, 10, 14].

Неоспоримо, что однотипная, унифицированная стандартизация аллергенных экстрактов, как и всех фармакопейных продуктов, смогла бы оказать существенную помощь в определении оптимальной дозировки для больных, которые подвержены сенсibilизации на конкретный определенный аллерген. Но пока, к сожалению, разработка одной унифицированной единицы, по которой бы проводилась стандартизация у хотя бы подавляющего большинства компаний-производителей диагностических и лечебных аллергенов — практически нерешаемая задача. В сложившихся условиях ВОЗ настоятельно рекомендует использовать именно те аллергены, стандартизация которых осуществлялась в соответствии с текущими европейскими требованиями. К подобным критериям качественной оценки аллергенов относятся следующие: обособленность антигенов (максимальная изоляция от компонентов, перекрещивающихся с родственными антигенными детерминантами), специфичность (особое свойство индуцировать аллергическую реакцию исключительно в организме, предварительно сенсibilизированном конкретным аллергеном), антигенная чистота, безвредность, стандартизация биологических и физико-химических свойств, а также рациональный химический состав [7, 14, 21].

В настоящий момент в Российской Федерации для комплексной АСИТ применяют ряд водно-солевых экстрактов, представляющих собой смесь из аллергенных и неаллергенных соединений; депонированные, а также подвергнутые модификации лечебные формы аллергенов. Их, как правило, применяют для лечения различного рода аллергических заболеваний (респираторных, анафилактических реакций и др.). Модифицированные и депонированные терапевтические аллергены выгодно отличаются большей иммуногенностью и в то же время меньшей аллергенностью. Благодаря этим свойствам данные группы аллергенов являются более эффективными и вызывают значительно меньше побочных реакций при проведении АСИТ. В практической медицине широко применяются депонированные аллергены и алергоиды. Первая группа аллергенов представляет собой суспензионную форму, их адсорбируют на гидроксиде алюминия ($Al(OH)_3$), фосфате кальция ($Ca_3(PO_4)_2$) или

химически модифицируют с помощью глutarового альдегида ($C_5H_8O_2$). Вторую группу получают посредством полимеризации молекул аллергена с формальдегидом (CH_2O). ГНЦ Институтом иммунологии ФМБА проводятся исследования, в которых при помощи направленной модификации структуры белковых молекул создаются новые конъюгированные формы аллергенов на основе полиоксиданна (иммуномодулятора) — аллерготропинов. В ходе клинических исследований новой группы препаратов была установлена их высокая эффективность и, что немаловажно, безопасность использования для АСИТ. Исходя из этого, можно судить о перспективности дальнейшей разработки данной группы лекарственных средств [13, 14, 22].

В Российской Федерации достаточно широко применяются лечебные аллергены на основе водно-солевых экстрактов клещей домашней пыли рода *Dermatophagoides*, пыльцы злаковых и сорных трав, деревьев, а также их смеси. Лечебные аллергены, которые разрешены к использованию в РФ, производятся компаниями ФГУП НПО «Микроген» (Ставрополь), «Севафарма» (Чехия), «Биомед» (ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН) стандартизируются преимущественно при помощи уже устаревших технологических приемов (посредством единиц азотного белка (protein nitrogen units — PNU)). Другие формы лечебных аллергенов в РФ не прошли регистрацию или находятся пока на ранней стадии внедрения, поэтому их использование в широкой медицинской практике на данный момент не может осуществляться в полном объеме. Контроль за качественным и количественным составом, чистотой, соответствие стандартам лечебных и диагностических аллергенов в России производится на базе Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича. Стандартизация терапевтических и диагностических аллергенных препаратов, которые на сегодняшний момент выпускаются отечественными производителями, по-прежнему, к сожалению, проводится по параметру количественного содержания в экстракте аллергена единиц белкового азота — Protein nitrogen units. Определение аллергенной активности готовых препаратов возможно также по результатам кожных тестов на пациентах, которые чувствительны к данному аллергену. К сожалению, количественная оценка в испытаниях *in vitro* и *in vivo* не проводится [14].

Суммарная активность, определяемая по азотистым основаниям (PNU), зачастую не совсем эквивалентна таковой биологической активности аллергенного экстракта ввиду достаточно большой разницы в содержании в самом продукте мажорных и сопутствующих аллергенов. В последнее время стали появляться на российском фармацевтиче-

ском рынке стандартизированные в ИР препараты, которые зарегистрированы и могут применяться в медицинской практике. Подобная система стандартизации применяется французской компанией «Stallergènes» при изготовлении препаратов «Phostal»® «Аллерген пыльцы деревьев» (аллергенный экстракт, представляющий собой смесь пыльцы древесных растений — березы, граба, ольхи, орешника, используемого для подкожной АСИТ), «Staloral»® «Аллерген пыльцы березы» (аллергенный экстракт, представляющий собой извлечение из пыльцы березы для сублингвальной АСИТ), «Staloral»® «Аллерген клещей» (аллергенный экстракт, представляющий собой смесь нескольких видов клещей домашней пыли *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus* в пропорции 1:1 для сублингвальной АСИТ) [22, 24]. Преимуществами препаратов «Phostal»® и «Staloral»® является то, что ВОЗ, а также группой международных экспертов из ARIA рекомендуется использование подобных стандартизированных аллергенов. Препаратами «Phostal»® и «Staloral»® подобная стандартизация пройдена и поэтому иммунологическая активность данных аллергенных экстрактов может гарантироваться, что, в свою очередь, дает надлежащую уверенность лечащему врачу в отсутствии побочных реакций у пациента и эффективности АСИТ. Наши отечественные препараты, к большому сожалению, не могут «порадовать» подобной стабильностью, и при покупке аллергенных препаратов с таким же наименованием и той же фирмы-производителя не всегда можно быть уверенным в протекании реакций и исхода терапии в целом. Аллергенный экстракт с 100 ИР/мл эквивалентен величине кожной реакции в среднем случае около 7 мм в диаметре на кожной пробе методом уколов (прик-тест) у выборки, составляющей 30 пациентов, которые имеют доказанную реактивность к используемым аллергенам. В каждой партии реактогенность всегда сопоставляется с эталонным препаратом, а именно внутренним референсным продуктом (IHRS). Подобный подход к стандартизации значительно повышает показатели специфичности, эффективности и безопасности терапии, но, к сожалению, в то же время повышает и стоимость курса лечения [10, 14].

Протоколы стандартизации, включающие определение иммунологической активности, на данный момент становятся одними из главных направлений развития современных технологий, благодаря которым стал возможен переход от подкожного введения приготовленных самостоятельно разведений нативных аллергенных экстрактов к обоснованному научному высокотехнологичному стандартизированному продукту.

Появление моноклональных антител к мажорным (клинически значимым) аллергенам вывело

стандартизацию аллергенных экстрактов на совершенно новый уровень, предоставив возможность измерения концентрации этих аллергенов в лекарственных препаратах. Между тем способ стандартизации аллергенных вакцин по биологической активности остается неинформативным в отношении содержания мажорных аллергенов, а именно — благодаря их присутствию обеспечивается эффективность АСИТ у преобладающего числа пациентов. Согласно исследовательским данным, было установлено, что оптимальная концентрация главных аллергенов в большинстве различных аллергенных вакцин лежит в интервале 5–20 мкг в одной инъекции. По этой причине лечащему врачу необходимо точно знать концентрацию мажорных аллергенов в используемом для АСИТ препарате [25]. Поскольку единицы биологической активности трудно сопоставляются среди разных производителей, активность препарата может быть выражена в концентрациях мажорных аллергенов (мкг/мл), определение которой возможно по методу жидкостной хроматографии с хроматомасс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС) — Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [26]. В настоящий момент данное направление является приоритетным в области стандартизации аллергенных экстрактов. Таким образом, производство препаратов для проведения АСИТ стало выходить на более высокий, современный, качественный уровень. Однако все же остается ряд текущих проблем, в первую очередь связанных со стандартизацией как процессов получения препарата, так и готового продукта.

Выпускаемые в настоящий момент немногочисленными отечественными производителями лечебные и диагностические аллергены по-прежнему стандартизируются по количественному содержанию в биологическом препарате единиц белкового азота, в то же время их аллергенная активность устанавливается по результатам кожного тестирования (прик-тестов) на сенсibilизированных к этим аллергенам пациентах, но количественная оценка не проводится ни в испытаниях *in vitro*, ни *in vivo*. Совершенно ясно, что необходимо как можно раньше привести отечественную технологию получения и стандартизации аллергенных экстрактов в полное соответствие с современным мировым уровнем. Выход из сложившейся ситуации может быть найден посредством применения современных физико-химических методов анализа. Таким на данный момент является вышеупомянутый метод LC-MS [26, 27, 28].

Масс-спектрометрический (MS) анализ является одним из высокотехнологичных методов, который позволяет определять качественный и количественный состав многокомпонентных белково-пептидных смесей, обладающих различными физико-

химическими свойствами. Данный вид анализа заключается в ионизации молекул в исследуемом образце с последующим разделением и регистрацией образующихся ионов. С введением такого метода, как ионизация электрораспылением (ИЭР) и метода матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации (МАЛДИ), стало возможным анализировать крупные биоорганические молекулы, в т. ч. молекулы аллергенных белков. Наиболее перспективные исследования связаны именно с анализом белковых молекул. Поскольку масс-спектрометрия обладает целым рядом преимуществ, среди которых высокая чувствительность, экспрессность, информативность, возможность работы с многокомпонентными смесями, ее использование для анализа белковых молекул стало одним из важнейших этапов в их исследовании. Открытие ряда методик перевода биологических молекул из раствора в газообразное состояние с использованием МАЛДИ и ИЭР неизбежно привело к прорыву во всей биологической масс-спектрометрии. Развитию этих методов способствовали характерные для них уникальные аналитические параметры. Благодаря их внедрению стало возможно проводить измерения молекулярных масс с очень высокой точностью. Большие молекулы белков-аллергенов фрагментируются в масс-спектрометрах за довольно короткие промежутки времени, что исключительно необходимо для их оперативного анализа. Быстрота анализа, несравненно высокие чувствительность и разрешение по массе являются ключевыми факторами, сделавшими масс-спектрометрию лидирующим методом среди всех нынешних аналитических способов анализа, которые используются для исследования и идентификации биомолекул [28]. В области LC-MS компанией Shimadzu представлен целый набор инновационных систем, каждая из которых максимально учитывает предъявляемые требования для решения конкретных задач в области стандартизации аллергенных экстрактов. Для определения сверхмалых количеств известных компонентов (например, молекул аллергенов) в таких сложных объектах, как аллергенные экстракты Shimadzu, предлагается новейший tandemный масс-спектрометрический детектор типа «тройной квадруполь». Благодаря поддержке режимов регистрации выбранных ионных переходов достигается высочайшая чувствительность детектирования известных компонентов. Режимы анализа нейтральных потерь, сканирования ионов-предшественников и ионов-продуктов позволяют расшифровывать структуры неизвестных веществ с самой высокой степенью достоверности. Все системы для хромато-масс-спектрометрии внесены или проходят процедуру внесения в Государственный реестр средств измерения РФ, имеют Государственный Метрологический Сертификат РФ. Хромато-масс-

спектрометры Shimadzu активно эксплуатируются в ведущих научных и учебных центрах России [27, 29].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в области стандартизации аллергенных экстрактов прослеживается ряд положительных изменений благодаря которым станет возможным производство качественных лечебных и диагностических аллергенов в Российской Федерации.

Список литературы

1. Маслова Л.В. Поллиноз: методы контроля заболевания // *Рецепт*. 2013; 3: 118–127.
Maslova L.V. Hay fever: disease control methods // *Recept*. 2013; 3: 118–127.
2. Передкова Е.В. Пыльцевая аллергия // *Consilium medicum*. 2009; 11 (3): 63–66.
Peredkova E.V. Pollen allergy // *Consilium medicum*. 2009; 11 (3): 63–66.
3. Пухлик В.М. Метод, проверенный столетием // *Новости медицины и фармации: всеукр. спец. мед.-фармац. изд.* 2012; 1/2: 3–4.
Pukhlik V.M. The method proved in time // *Novosti medicyny i farmacii: vseukr. spec. med.-farmac. izd.* 2012; 1/2: 3–4.
4. Ассоциация аллергологов Украины. [Электронный ресурс]: Из истории аллергологии. Режим доступа: <http://www.aalu.org.ua/history/75-history> (дата обращения: 15.07.2013).
Ukraine Association of allergists. [Electronic resource]: The history of allergy: <http://www.aalu.org.ua/history/75-history>
5. Гушин И.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия (гипосенсибилизация) // *Лечащий врач*. 2001; 3: 10–27.
Guschin I.S. Allergen-specific immunotherapy (hyposensitization) // *Lechaschy vrach*. 2001; 3: 10–27.
6. Курбачева О.М., Павлова К.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия // *Доктор.ру*. 2010; 3: 16–19.
Kurbachyova O.M., Pavlova K.S. Allergen-specific immunotherapy // *Doktor.ru*. 2010; 3: 16–19.
7. Воробьева О.В. Сравнительный и исторический анализ методического прогресса в аллергологии: аллерген-специфическая иммунотерапия. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2012. 24 с.
Vorobyova O.V. Comparative and historical analysis of methodological progress in allergology: allergen-specific immunotherapy. PhD diss. abstract. M. 2012. 24 p.
8. Курбачева О.М. Клинические, патогенетические и экономические аспекты применения аллерген-специфической иммунотерапии. Автореф. дис. ... док. мед. наук. М. 2007. 47 с.
Kurbachyova O.M. Clinical, pathogenetic and economic aspects of allergen-specific immunotherapy. Doctoral diss. abstract. M. 2007. 47 p.
9. Воробьева О.В. Современное состояние проблемы стандартизации аллергенов при аллерген-специфической иммунотерапии // *Российский аллергологический журнал*. 2011; 4 (1): 76–77.
Vorobyova O.V. Current state of standardization of allergens in allergen-specific immunotherapy // *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal*. 2011; 4 (1): 76–77.
10. Желтикова Т.М. Аллергены для аллерген-специфической иммунотерапии: достижения и проблемы // *Consilium medicum (Педиатрия)*. 2012; 1: 29–31.
Zheltikova T.M. Allergens for allergen-specific immunotherapy: Achievements and challenges // *Consilium medicum (Pediatriya)*. 2012; 1: 29–31.
11. Fernández-Caldas E., Zakzuk J., Lockey F.R. et al. Allergen Standardization and Characterization. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/allergen_standardization/ (дата обращения: 24.07.2013).
12. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология: Национальное руководство. М.: *Гэотар-Медиа*. 2009. 649 с.
Khaïtov R.M., Ilyina N.I. Allergology and immunology: National guidelines. M.: *Geotar-Media*. 2009. 649 p.
13. Хаитов Р.М., Федосеева В.Н., Ильина Н.И. и др. Применение для специфической аллергенной иммунотерапии конъюгированных аллергенполимерных вакцин (пыльцевых аллерготропинов новой генерации) // *Терапевтический архив*. 2002; 10: 37–40.
Khaïtov R.M., Fedoseeva V.N., Ilyina N.I. et al. Application for a specific allergen immunotherapy allergenpolymer conjugated vaccines (pollen allergotropine new generation) // *Terapevticheskij arkhiv*. 2002; 10: 37–40.
14. Астафьева Н.Г., Гамова И.В., Удовиченко Е.Н. и др. Место аллергенспецифической иммунотерапии в лечении атопии // *Consilium medicum*. 2013; 3: 55–61.
Astafjeva N.G., Gamova I.V., Udovichenko E.N. et al. The place of allergen-specific immunotherapy in the treatment of atopic dermatitis // *Consilium medicum*. 2013; 3: 55–61.
15. Пухлик В.М., Кязимова А.Т. Роль специфической иммунотерапии в лечении аллергических заболеваний и успехи перорального метода // *Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология*. 2010; 7: 38–43.
Pukhlik V.M., Kyazimova A.T. The role of specific immunotherapy in the treatment of allergic diseases and the oral method advances // *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya*. 2010; 7: 38–43.
16. Van Ree R., Chapman M.D., Ferreira F. et al. The CRE-ATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification // *Allergy*. 2008; 63: 310–326.
17. European pharmacopoeia. 7-th ed. suppl. 7.0. *Strasbourg*: European Department for the Quality of Medicines. 2010; 1: 1207 p.
18. Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (21 680.1) – «Allergenic Products». Vol. 7. Date: 2011–04–01. P. 133–136.
19. Пронькина О.В. Новый диагностический аллерген из растения золотарник канадский (*Solidago canadensis*)

- и его иммунобиологические свойства. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М. 2008. 22 с.
- Pronkina O.V. New diagnostic allergen of Canadian goldenrod plants (*Solidago canadensis*) and its immunobiological properties. PhD diss. abstract. М. 2008. 22 p.
20. Павлов А.Е., Сейлиева Н.А., Мухортых О.Ю. и др. Получение и оценка свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы березы Bet v 1 // *Российский аллергологический журнал*. 2012; 3: 7–13.
- Pavlov A.E., Sejljeva N.A., Mukhortykh O.Yu. et al. Preparation and evaluation of the properties of recombinant analog of majeure allergen of birch pollen Bet v 1 // *Rossiysky allergologichesky zhurnal*. 2012; 3: 7–13.
21. Никонова М.Ф., Донецкова А.М., Андреев И.В. и др. Биологическое действие препаратов аллергенов из пыльцы растений в культуре лимфоцитов человека // *Иммунология*. 2012; 2: 86–89.
- Nikonova M.F., Donckova A.M., Andreev I.V. et al. Biological effects of drugs of pollen allergens in human lymphocyte culture // *Immunologiya*. 2012; 2: 86–89.
22. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России: Справочник – М.: АстраФармСервис, 2013. 1640 с. Vidal Handbook. Drugs in Russia. М.: AstraFarmServis. 2013. 1640 p.
23. Мокроносова М.А., Коровкина Е.С. Аллерген-специфическая иммунотерапия аллергенным экстрактом пыльцы деревьев, адсорбированным на суспензии кальция фосфата // *Российский аллергологический журнал*. 2010; 4: 79–84.
- Mokronosova M.A., Korovkina E.S. Allergen-specific immunotherapy with pollen allergen extract of trees adsorbed on calcium phosphate suspension // *Rossiysky allergologichesky zhurnal*. 2010; 4: 79–84.
24. Stallergenes S.A. [Электронный ресурс]: Stallergenes group. Режим доступа: <http://www.stallergenes.com/en/stallergenes-group/our-products.html> (дата обращения: 19.07.2013).
25. American Immunization Registry Association. [Электронный ресурс]: Promoting the development, implementation and interoperability of Immunization Information Systems. Режим доступа: <http://www.immregistries.org/about-aira> (дата обращения: 21.07.2013).
26. LC/MS Information. [Электронный ресурс]: Technology Reviews. Режим доступа: http://www.lcms.com/lcms_information/refer_books.html (дата обращения: 19.07.2013).
27. Боков Д.О. Разработка подходов к стандартизации и методов контроля качества аллергенных экстрактов, применяемых при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) // Медицинская весна: сборник материалов Итоговой Всероссийской студенческой научной конференции с международным участием (25–26 апреля 2013 г.). М.: Изд-во Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. 2013: 225–227.
- Bokov D.O. Developing the approaches to standardization and quality control of allergenic extracts used during allergen-specific immunotherapy (SIT) // *Medicinskaya vesna: sbornik materialov Itogovoy Vserossiyskoj studencheskoj nauchnoj konferencii s mezhdunarodnym uchastiem* (25–26 aprelya 2013 g.). М.: *Izd-vo Pervogo MGIMU im. I.M. Sechenova*. 2013: 225–227.
28. Ласкин Дж., Лифшиц Х. Принципы массспектрометрии в приложении к биомолекулам. М.: Техносфера. 2012. 608 с.
- Laskin J., Lifshic Kh. Principles of mass spectrometry in the annex to biomolecules. М.: *Tekhnosfera*. 2012. 608 p.
29. Родин И.А., Варламов В.В. Инновационные хромато-масс-спектрометры Shimadzu в лабораторной практике 21 века // *Аналитика. Оборудование и материалы*. 2012; 1: 6–10.
- Rodin I.A., Varlamov V.V. Innovative chromatography-mass spectrometers Shimadzu in laboratory practice of the 21-st century // *Analitika. Oborudovanie i materialy*. 2012; 1: 6–10.