

## Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам

И. В. Цымбаревич<sup>1</sup>, И. С. Ефимова<sup>1</sup>, С. П. Калинин<sup>1</sup>, А. В. Зубков<sup>2</sup>, С. А. Мазурина<sup>2</sup>, Н. А. Михайлова<sup>2</sup>, Н. В. Зубкова<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», ул. 1-я Дубровская, д. 15, Москва, 115088, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный пер., 5А, стр. 2, Москва, 105064, Российская Федерация

Лекарственные препараты на основе пыльцевых экстрактов аллергенов широко применяются для лечения и диагностики поллинозов. Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII издания аллергенную активность этих препаратов оценивают относительно аттестованных стандартных образцов (СО), биологическая активность которых была подтверждена *in vivo* у лиц, сенсибилизированных к исследуемому аллергену. Кандидат в СО тимopheевки луговой в виде готовой лекарственной формы (ГЛФ) и соответствующий аллергенный пыльцевой экстракт (полуфабрикат) были охарактеризованы по белковому профилю и аллергенному составу методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и вестерн-блота. Исследование проводили в сравнении с ГЛФ, аллергенными пыльцевыми экстрактами разных периодов сбора пыльцы и даты выпуска, а также международным стандартом аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520). Методами электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ выявлено совпадение белковых профилей кандидата в СО по основным белковым фракциям со всеми аллергенными экстрактами и ГЛФ разных дат выпуска. Метод ВЭЖХ подтвердил сходство белковых профилей кандидата в СО и международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520), показав некоторые различия в соотношении основных белковых фракций. Методом вестерн-блота подтверждено наличие главных специфических аллергенных компонентов с относительными молекулярными массами в области 50–60 и 27–35 кДа. Состав специфических аллергенных компонентов препаратов тимopheевки производства АО «НПО «Микроген» по основным белковым и аллергенным компонентам совпадал с международным стандартом аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520).

**Ключевые слова:** стандартизация; тимopheевка; аллергенные компоненты; аллергенный пыльцевой экстракт; стандартный образец

**Для цитирования:** Цымбаревич ИВ, Ефимова ИС, Калинин СП, Зубков АВ, Мазурина СА, Михайлова НА, Зубкова НВ. Характеристика кандидата в стандартные образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение 2018;18(2):92–97. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-92-97>

\* Контактное лицо: Зубкова Наталия Васильевна; n.v.zubkova@microgen.ru

## Characterization of the Candidate Reference Material of Timothy Pollen Allergen Extract in Terms of Protein Profile and Specific Allergenic Components

I. V. Tsybmarevich<sup>1</sup>, I. S. Efimova<sup>1</sup>, S. P. Kalinin<sup>1</sup>, A. V. Zubkov<sup>2</sup>, S. A. Mazurina<sup>2</sup>, N. A. Mikhailova<sup>2</sup>, N. V. Zubkova<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 15 1st Dubrovskaya St, Moscow 115088, Russian Federation

<sup>2</sup> Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A/2 Maly Kazenny lane, Moscow 105064, Russian Federation

Medicinal products based on pollen allergen extracts are widely used for diagnosis and therapy of pollinosis. According to the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th ed., the allergenic potency of such products is assessed against certified reference materials whose biological activity was confirmed *in vivo* in subjects sensitized to particular tested allergens. The finished dosage form of a candidate In-House Reference Material (IHRM) of timothy pollen allergen extract and the corresponding allergen pollen extract (intermediate) were characterized in terms of protein profile and allergenic composition using SDS-PAGE, gel-filtration HPLC, and western blotting. The test samples were compared to finished pharmaceutical products (FPP) and pollen allergen extracts produced at different dates and made from pollen harvested at different dates, as well as to the WHO International Standard (IS) of Timothy Pollen Extract (NIBSC code: 82/520). SDS-PAGE and gel-filtration HPLC showed that the candidate IHRM protein profile was comparable in terms of major protein fractions to those of all the FPP batches and pollen allergen extracts produced at different dates. HPLC confirmed the comparability of the protein profiles of the candidate IHRM and the IS (NIBSC code: 82/520), but showed minor

variations in the ratio of the main protein fractions. Western blotting confirmed the presence of the main allergenic components with relative molecular masses ranging from 50 to 60 kDa and from 27 to 35 kDa. The composition of specific allergenic components of timothy pollen allergen products manufactured by JSC «SIC «Microgen» was identical with that of the WHO IS of Timothy Pollen Extract in terms of the main protein and allergenic components.

**Key words:** *standardization; timothy; allergenic components; pollen allergen extract; reference materials*

**For citation:** *Tcymbarevich IV, Efimova IS, Kalinin SP, Zubkov AV, Mazurina SA, Mikhailova NA, Zubkova NV. Characterization of the Candidate Reference Material of Timothy Pollen Allergen Extract in Terms of Protein Profile and Specific Allergenic Components. BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment 2018;18(2):92–97. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-92-97>*

**Contact person:** Natalia V. Zubkova; n.v.zubkova@microgen.ru

Пыльца тимopheевки луговой (лат. *Phleum pratense*) относится к одним из самых распространенных природных аллергенов среди луговых трав. До 20 % пациентов с аллергией сенсибилизированы к тимopheевке луговой и родственным видам [1] в связи с высокой степенью перекрестной реактивности между белками-аллергенами. Аллергическая реакция провоцирует клинические проявления: поллиноз, аллергический ринит, бронхиальную астму, аллергический конъюнктивит и др. Для лечения и диагностики таких пациентов в 1960-х годах были разработаны препараты пыльцевых аллергенов, представляющие собой водно-солевые экстракты белково-полисахаридных комплексов, выделенных из сырья природного происхождения и способных вызывать аллергическую реакцию.

Состав аллергенных пыльцевых экстрактов чрезвычайно сложен и разнообразен, в него входят белки, пептиды, гликопротеиды, полисахариды, производные липидов и т.д. Традиционно выделяют главные и второстепенные аллергенные компоненты. Подобное разделение основано на частоте реагирования на них лиц с повышенной чувствительностью к соответствующим аллергенам. За главные аллергены принимают те, на которые реагируют более 50 % лиц, сенсибилизированных к пыльцевому экстракту [2].

Многокомпонентный состав аллергенных экстрактов, получаемых из природных источников, создает трудности для стандартизации готовых форм препаратов, изготовленных на их основе. До настоящего времени по-прежнему не разработаны унифицированные методы определения специфической активности и характеристики белкового состава. Для этой цели применяются разные системы и единицы измерения [3], среди них: биологическая единица — BU (Biological Unit), биологическая аллергенная единица — BAU (Biological Allergenic Unit), аллергенная единица — AU (Allergen Units), индекс реактивности — IR (Index of Reactivity), международная единица — IU (International Unit), единица белкового азота — PNU (Protein Nitrogen Unit) и другие.

Выпускаемые в настоящее время диагностические и лечебные аллергены производства АО «НПО «Микроген» стандартизуют по содержанию единиц белкового азота (PNU).

Согласно последним дополнениям к ОФС.1.7.1.0001.15 «Аллергены» Государственной фармакопеи РФ XIII издания (ГФ РФ XIII) [4] серии пыльцевых экстрактов должны быть охарактеризованы относительно стандартного образца (СО). СО представляет собой одну из серий аллергенного экстракта или готового препарата аллергена. В мировой практике для стандартизации аллергенов каждый производитель разрабатывает собственные референс-препараты (In-House Reference Standards), которые также представляют собой охарактеризованные стандартные производственные серии, аттестованные по результатам контроля на сенсибилизированных пациентах и применяемые для сравнительной оценки качества других серий посредством комбинации иммунохимических методов.

Для обеспечения постоянства аллергенной активности выпускаемых лекарственных препаратов пыльцевых аллергенов определяющим является сопоставление выпускаемой серии препарата с СО, охарактеризованным в том числе по белковому и аллергенному составу. Согласно требованиям ГФ РФ XIII серия СО должна быть аттестована по следующим показателям: содержанию общего белка, белковому профилю, аллергенным компонентам, специфической активности. Аналогичные требования к стандартизации аллергенов выдвигают и зарубежные фармакопеи. По показателю «Белковый профиль» СО должен быть охарактеризован одним из следующих методов — электрофорезом в ПААГ с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE электрофорез), иммуноэлектрофорезом, капиллярным электрофорезом, хроматографией, масс-спектрометрией. Также СО должен быть охарактеризован по показателю «Подлинность». Выявление специфических аллергенных компонентов осуществляется методами вестерн-блота или иммуноферментного анализа с использованием специфических IgE-содержащих сывороток крови от лиц, сенсибилизированных к исследуемому аллергену.

Цель работы — характеристика кандидата в стандартные образцы (СО) аллергена из пыльцы тимopheевки луговой по белковому профилю и специфическим аллергенным компонентам (с помощью вестерн-блота).

## Материалы и методы

### Материалы

1. Кандидат в СО: Аллерген из пыльцы тимopheевки луговой для диагностики и лечения (ПУ № ЛС-000881) в концентрации 8200 PNU/мл. Согласно требованиям нормативной документации показатель белкового азота для готовой лекарственной формы (ГЛФ) должен лежать в диапазоне  $10000 \pm 2500$  PNU/мл. Соответствующие аллергенные пыльцевые экстракты (полуфабрикаты) в концентрации 25400 PNU/мл (№ 1) и 16200 PNU/мл (№ 2), изготовленные по действующему промышленному регламенту. Производитель: АО «НПО «Микроген» (г. Ставрополь, НПО «Аллерген»).

2. Образцы аллергена из пыльцы тимopheевки луговой от разных дат выпуска и годов сбора пыльцы в виде ГЛФ в концентрациях 9900 PNU/мл (2011 г.), 11400 PNU/мл (2011 г.) и 9700 PNU/мл (2012–2013 гг.). Аллергенные пыльцевые экстракты (полуфабрикаты) в концентрациях 25000 PNU/мл (2012 г.) и 29000 PNU/мл (2013 г.).

3. Международный стандарт аллергена из пыльцы тимopheевки луговой, WHO International Standard Timothy Pollen Extract (Национальный институт биологической стандартизации и контроля (NIBSC)) code: 82/520, с активностью 100000 IU (международных единиц) на ампулу. Стандарт восстанавливали в 1 мл воды до концентрации 100000 IU/мл. Для последующего анализа использовали концентрацию 10000 IU/мл.

4. Стандарт для эксклюзионной хроматографии Gel Filtration Standard (BioRad Labs, США, #151-1901).

5. Бычий сывороточный альбумин (БСА), фракция V (AppliChem, Германия, A6588,0100).

6. Сыворотка крови к аллергену из пыльцы тимфеевки луговой (положительная). Специфическая активность: содержит аллергенспецифические IgE-антитела к аллергену тимфеевки луговой; уровень IgE-антител — 3-й класс.

### Методы

**Электрофорез в ПААГ и вестерн-блот.** Испытания кандидата в СО проводили по показателям: «Белковый профиль» (электрофорез в ПААГ, ВЭЖХ) и «Подлинность» (вестерн-блот). Электрофорез проводили в 15 % ПААГ с додецилсульфатом натрия (SDS) в восстанавливающих условиях (в присутствии дитиотреитола) с использованием системы для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Labs, США, #165-8004). Приготовление 15 % ПААГ, электрофорез, окрашивание ПААГ Coomassie R-250 (Serva, Германия, #1752501) осуществляли в соответствии с ОФС.1.2.1.0023.15 [5]. Определение подлинности в присутствии аллергенспецифических сывороток выполняли методом вестерн-блота в соответствии с ОФС.1.7.2.0022.15 [6]. Образцы концентрировали с помощью микроконцентраторов Amicon Ultra-0.5 (Merck, Германия, #UFC5010BK).

**Эксклюзионная ВЭЖХ.** Хроматографический анализ кандидата в СО, аллергенных пыльцевых экстрактов, серий ГЛФ и стандарта ВОЗ тимфеевки луговой проводили при соблюдении фармакопейных требований методом эксклюзионной ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования [7, 8].

Анализ проводили на колонке Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция) с применением хроматографической системы Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Германия). Детекцию осуществляли на флуориметрическом детекторе в режиме длин волн возбуждения/испускания  $E_x = 280 / E_m = 345$  нм. Элюирование выполняли 10-мМ фосфатным буферным раствором (рН 6,8), содержащим 0,4-М натрия хлорида и 0,02 % твин 20, модифицированным ацетонитрилом (соотношение 4:1), со скоростью 0,5 мл/мин. Объем инъекций составлял 50 мкл.

Образцы аллергенных препаратов использовали без предварительной пробоподготовки. Приготовление стандарта для эксклюзионной хроматографии проводили в соответствии с рекомендациями производителя, затем разводили в 100 раз в подвижной фазе. Раствор БСА с концентрацией 1 мг/мл готовили по навеске, разводили в подвижной фазе до концентрации 0,025 мг/мл. Международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеевки луговой (NIBSC code: 82/520) разводили до 10000 IU/мл подвижной фазой.

### Результаты и обсуждение

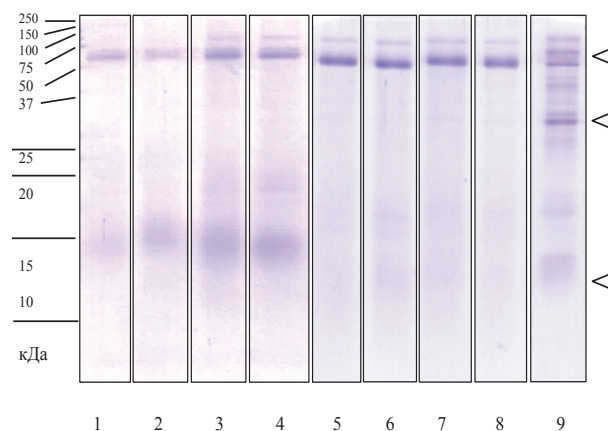
Белковый и аллергенный состав препаратов пыльцевого экстракта может существенно отличаться у разных производителей лечебных аллергенов [9]. Состав экстракта определяется прежде всего видом растения. Однако известно, что на содержание компонентов также оказывают влияние дополнительные факторы: климатические и погодные условия, влажность среды, условия хранения, стадия созревания пыльцы на момент экстракции, а также технология производства. Поэтому перед изготовителями аллергенных препаратов из пыльцы растений стоит задача по получению экстрактов оптимального состава с максимально полным и стандартным набором основных аллергенных компонентов.

Ранее были описаны главные аллергены тимфеевки луговой, к которым относятся белки: Phl p 1 (>90 %) и Phl p 5 (85 %) (27–35 кДа) [10], Phl p 2 (60 %) и Phl p 3 (70 %) (11–14 кДа) [11, 12], Phl p 4 (75 %) и Phl p 13 (56 %) (50–60 кДа) [11, 12]. Помимо главных аллергенов, специфические IgE антитела могут взаимодействовать с второстепенными аллергенами: Phl p 6 (12–13 кДа), Phl p 7 (8–10 кДа), Phl p 11 (16–20 кДа) и Phl p 12 (12–15 кДа) [13, 14].

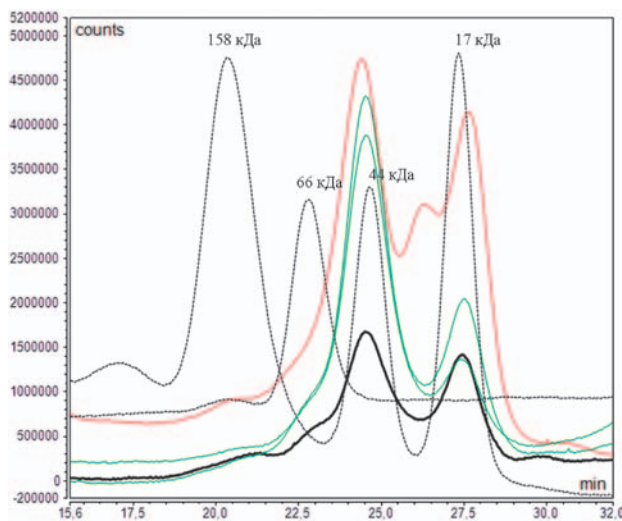
Также в 1985 г. был аттестован первичный международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеевки луговой (WHO International Standard Timothy Pollen Extract, NIBSC code: 82/520) по биологической активности [2]. Каждой ампуле стандарта было присвоено 100000 IU (международных единиц).

В настоящей работе проанализирован кандидат в СО аллергена из пыльцы тимфеевки луговой по показателям «Белковый профиль» методами гель-электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ и «Подлинность» методом вестерн-блота.

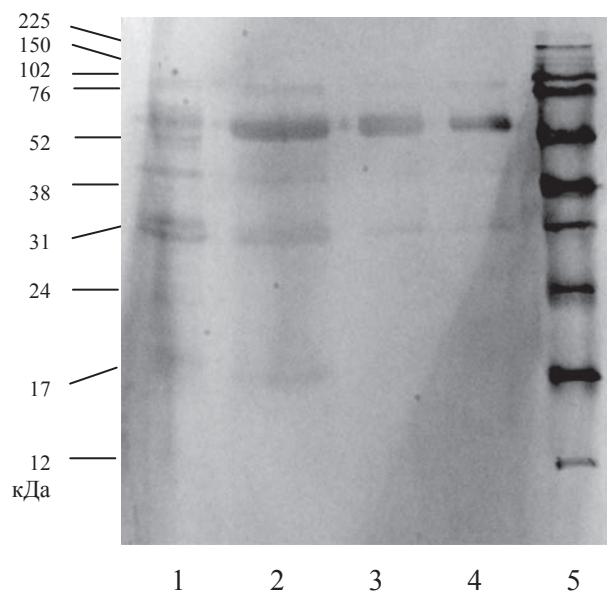
На первом этапе были получены белковые профили кандидата в СО, образцов ГЛФ и аллергенных пыльцевых экстрактов (полуфабрикатов) тимфеевки луговой (рис. 1) от разных дат выпуска. Установлено, что относительные молекулярные массы подавляющего большинства белков пыльцы тимфеевки, в том числе белков-аллергенов, лежат в диапазоне 10–100 кДа. Анализ электрофоретических профилей экстрактов тимфеевки луговой производства АО «НПО «Микроген» выявил наличие полос белков с ожидаемыми для главных и второстепенных аллергенных компонентов молекулярными массами в области 50–60 кДа (группы 4 и 13), 27–35 кДа (группы 1 и 5) и менее 14 кДа (группы 2 и 3) (обозначены стрелками на рис. 1). В ходе работы также установлено, что белковые профили исследованных образцов тимфеевки луговой идентичны и не зависят от года заготовки сырья и даты выпуска препаратов. Более концентрированные образцы аллергенных пыльцевых экстрактов имели более выраженный профиль, так как увеличение концентрации повышает чувствительность метода гель-электрофореза в ПААГ. Наиболее представленными оказались фракции белков с молекулярными массами 50–60 и менее 14 кДа, которые также были выявлены при сравнении



**Рис. 1.** Электрофорез коммерческих серий и аллергенных экстрактов тимфеевки луговой различных годов сбора пыльцы. Окрашивание Coomassie R-250. Готовые лекарственные формы: 1 — 2011 г., 2 — 2011 г., 3 — 2012/2013 гг.; 4 — 2013 г. (кандидат в стандартные образцы); промежуточные аллергенные экстракты: 5 — 2013 г. (кандидат в стандартные образцы № 1); 6 — 2013 г. (кандидат в стандартные образцы № 2); 7 — 2012 г.; 8 — 2013 г.; 9 — международный стандарт аллергена из пыльцы тимфеевки луговой (NIBSC code: 82/520) (октябрь 1980-х гг.).



**Рис. 2.** Хроматографические профили кандидата в стандартные образцы аллергенного пыльцевого экстракта тимopheевки луговой (черная хроматограмма) и его промежуточных аллергенных экстрактов (зеленые хроматограммы) на фоне международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520) (красная хроматограмма). Стандарты относительной молекулярной массы для эксклюзионной хроматографии обозначены пунктирной линией.



**Рис. 3.** Выявление специфических аллергенных компонентов аллергенного пыльцевого экстракта тимopheевки луговой с антителами из сыворотки крови пациентов. 1 — Международный стандарт аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520); 2 — кандидат в стандартные образцы (5-кратный); 3 — соответствующий аллергенный экстракт кандидата в стандартные образцы; 4 — кандидат в стандартные образцы; 5 — маркер.

с белковым профилем международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520).

Помимо электрофореза в ПААГ, белковые профили кандидата в СО, образцов ГЛФ и аллергенных пыльцевых экстрактов (полуфабрикатов) тимopheевки луговой были получены методом эксклюзионной ВЭЖХ. Диапазон относительных молекулярных масс основных детектируемых фракций был оценен относительно стандарта для эксклюзионной хроматографии,

содержащего, в том числе смесь белков в интересующем нас диапазоне относительных молекулярных масс 17–158 кДа, и образца БСА с относительной молекулярной массой 66 кДа (рис. 2, пунктирные линии). Для всех изученных образцов тимopheевки были выявлены две группы основных пиков, соответствующих белковым фракциям в диапазоне относительных молекулярных масс около 50 и 15 кДа, что полностью соответствует данным электрофореза в ПААГ. Сравнение хроматографических профилей кандидата в СО (рис. 2, черная линия) и аллергенных пыльцевых экстрактов, в том числе послуживших сырьем для его приготовления (рис. 2, зеленые линии), а также образцов ГЛФ от других дат выпуска (данные не приведены) показало идентичность содержащихся в образцах белковых фракций. Отсутствие на хроматограмме кандидата в СО фракции 27–35 кДа, детектируемой, однако, для международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520) (рис. 2, красная линия), связано, по-видимому, с ее низкой концентрацией; при этом ее присутствие в аллергене тимopheевки производства АО «НПО «Микроген» было доказано методом вестерн-блота (рис. 3).

Методом вестерн-блота проведен анализ подлинности аллергена из пыльцы тимopheевки луговой. Предварительно был отобран образец сыворотки крови от лица, сенсibilизированного к пыльце тимopheевки луговой, и содержащий соответствующие антитела. Для повышения чувствительности метода вестерн-блота образец кандидата в СО был сконцентрирован в пять раз с помощью микроконцентраторов. Затем были исследованы кандидат в СО из пыльцы тимopheевки луговой (в исходной и пятикратной концентрациях) в сравнении с соответствующим аллергенным экстрактом (в исходной концентрации) и международным стандартом аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520; 10000 IU/мл), получены профили их аллергенных специфических компонентов (рис. 3). Обнаружены специфические аллергенные компоненты в двух основных областях: 27–35 кДа, соответствующей главным белкам-аллергенам Phl p 1 и Phl p 5; и 50–60 кДа, соответствующей главным белкам-аллергенам групп 4 и 13. Также выявлены полосы преципитации менее 20 кДа, предположительно соответствующие минорным аллергенным компонентам. Полученные профили специфических аллергенных компонентов показали высокую степень сходства международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520) и образцов производства АО «НПО «Микроген».

### Выводы

Охарактеризован белковый профиль кандидата в СО аллергена из пыльцы тимopheевки луговой методами гель-электрофореза в ПААГ и ВЭЖХ. Подтверждена идентичность белковых профилей исследованных образцов аллергена из пыльцы тимopheевки луговой разных дат выпуска. Выявлено наличие специфических аллергенных компонентов в кандидате в СО и в соответствующем полуфабрикате, а также сходство аллергенного профиля с образцом международного стандарта аллергена из пыльцы тимopheевки луговой (NIBSC code: 82/520). Целесообразно использование более концентрированных образцов аллергена для успешной идентификации белковых и аллергенных компонентов в составе.

### Информация об отсутствии конфликта интересов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

**Conflict of interests.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## Литература / References

1. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, et al. Allergenic Pollen and Pollen Allergy in Europe. *Allergy* 2007;62(9):976–90. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x
2. Gjesing B, Jäger L, Marsh DG, Löwenstein H. The International Collaborative Study Establishing the First International Standard for Timothy (*Phleum pratense*) Grass Pollen Allergenic Extract. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;75(2):258–67.
3. Невская ЛВ, Радунская СФ, Лавренчик ЕИ, Мовсесянц АА, Капитанова ВК, Короткова МЮ. Применение иммуноанализа для решения актуальных проблем стандартизации препаратов аллергенов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2015;(3):17–20. [Nevskaya LV, Radunskaya SF, Lavrenchik EI, Movsesyants AA, Kapitanova VK, Korotkova MYu. Immunoassay for the Purpose of Solving Current Issues Associated with Standardization of Allergen Preparations. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2015;(3):17–20 (in Russ.)] DOI: 10.30895/2221-996X-2015-3-17-20
4. Общая фармакопейная статья 1.7.1.0001.15 Аллергены. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.7.1.0001.15 Allergens. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
5. Общая фармакопейная статья 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.2.1.0023.15 SDS-PAGE. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
6. Общая фармакопейная статья 1.7.2.0022.15 Определение подлинности и чистоты иммунобиологических лекарственных препаратов методом вестерн-блот. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 2, М.; 2015. [General Monograph 1.7.2.0022.15 Characterization and Purity Determination of Biotherapeutics by Immunoblotting. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 2. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
7. Общая фармакопейная статья 1.2.1.2.0001.15 Хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.2.1.2.0001.15 Chromatography. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
8. Общая фармакопейная статья 1.2.1.2.0005.15 Высокоэффективная жидкостная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1, М.; 2015. [General Monograph 1.2.1.2.0005.15 High-Performance Liquid Chromatography. *The State Pharmacopoeia of Russian Federation* 13th ed. V. 1. Moscow; 2015 (in Russ.)] Available from: <http://www.femb.ru/feml>
9. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R. Heterogeneity of Commercial Timothy Grass Pollen Extracts. *Clin Exp Allergy* 2008;38(8):1400–8. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2008.03031.x
10. Matthiesen F, Löwenstein H. Group V Allergens in Grass Pollens. I. Purification and Characterization of the Group V Allergen from *Phleum pratense* Pollen, Phl p V. *Clin Exp Allergy* 1991;21(3):297–307.
11. Suck R, Petersen A, Hagen S, Cromwell O, Becker WM, Fiebig H. Complementary DNA Cloning and Expression of a Newly Recognized High Molecular Mass Allergen Phl p 13 from Timothy Grass Pollen (*Phleum pratense*). *Clin Exp Allergy* 2000;30(3):324–32.
12. Suck R, Hagen S, Cromwell O, Fiebig H. The High Molecular Mass Allergen Fraction of Timothy Grass Pollen (*Phleum pratense*) between 50–60 kDa is Comprised of Two Major Allergens: Phl p 4 and Phl p 13. *Clin Exp Allergy.* 2000;30(10):1395–402.
13. Sekerkova A, Polackova M, Striz I. Detection of Phl p 1, Phl p 5, Phl p 7 and Phl p 12 Specific IgE Antibodies in the Sera of Children and Adult Patients Allergic to *Phleum* Pollen. *Allergol Int.* 2012;61(2):339–46. DOI: 10.2332/allergolint.11-0A-0372
14. Valenta R, Duchene M, Ebner C, Valent P, Sillaber C, Deviller P, et al. Profilins Constitute a Novel Family of Functional Plant Pan-allergens. *J Exp Med.* 1992;175(2):377–85.

### Об авторах

Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген». Российская Федерация, 115088, Москва, ул. 1-я Дубровская, д. 15

*Цымбаревич Ирина Всеволодовна.* Главный специалист-эксперт по экспериментальным технологиям отдела инновационных проектов Центра разработок и внедрения (R&D)

*Ефимова Ирина Сергеевна.* Начальник отдела инновационных проектов Центра разработок и внедрения (R&D), канд. хим. наук

*Калинин Сергей Павлович.* Директор Центра разработок и внедрения (R&D), канд. техн. наук

*Зубкова Наталия Васильевна.* Заместитель директора Центра разработок и внедрения (R&D) по технологиям, д-р фарм. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». Российская Федерация, 105064, Москва, Малый Казенный пер., д. 5А, стр. 2

*Зубков Александр Владимирович.* Заведующий лабораторией иммунологической диагностики эндокринных заболеваний, канд. мед. наук

*Мазуринa Светлана Александровна.* Ведущий научный сотрудник лаборатории аллергодиагностики, канд. биол. наук

*Михайлова Наталья Александровна.* Заместитель директора института по научной работе, д-р мед. наук, профессор

Поступила 19.02.2018

Принята к публикации 26.04.2018

### Authors

Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines», 15 1st Dubrovskaya St, Moscow 115088, Russian Federation

*Irina V. Tsybmarevich.* Chief Expert in Experimental Technologies of the Department of Innovation Projects of the Centre for R&D Implementation

*Irina S. Efimova.* Head of the Department of Innovation Projects of the Centre for R&D Implementation. Candidate of Chemical Sciences

*Sergey P. Kalinin.* Director of the Centre for R&D Implementation. Candidate of Technical Sciences

*Natalia V. Zubkova.* Deputy Director of the Centre for R&D Implementation. Doctor of Pharmaceutical Sciences

Federal State Budgetary Scientific Institution «Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 5A/2 Maly Kazenny lane, Moscow 105064, Russian Federation

*Alexander V. Zubkov.* Head of the Laboratory of Immunological Diagnosis of Endocrine Disorders. Candidate of Medical Sciences

*Svetlana A. Mazurina.* Leading Researcher of the Laboratory of Allergy Diagnosis. Candidate of Biological Sciences

*Natalya A. Mikhailova.* Deputy Director of the Scientific Research Institute. Doctor of Medical Sciences, Professor

Received 19 February 2018

Accepted 26 April 2018