

Использование масс-спектрометрии в стандартизации препаратов аллергенов

В. В. Смирнов, А. А. Игнатов, В. Н. Кузина, С. П. Дементьев, Г. В. Раменская

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

Поступила 30.06.2016. Принята к публикации 18.08.2016.

В данной статье рассмотрены вопросы стандартизации диагностических и лечебных аллергенных экстрактов, используемых при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ) в России и за рубежом. Рассмотрены методы оценки качества готовых иммунобиологических препаратов (аллергенов) согласно нормативной документации с помощью биологических, иммунохимических и современных физико-химических методов анализа (методы *in vitro* и *in vivo* диагностики). Представлены основные стратегии стандартизации аллергенных препаратов (определение суммарной аллергенной активности, биологической активности, содержания главных аллергенов). Представлены две системы стандартизации аллергенов (аллергенные единицы и биологические единицы). Рассмотрены возможности применения метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) как наиболее перспективного для стандартизации аллергенных экстрактов. Рассмотрены достоинства и недостатки данного метода в применении к стандартизации аллергенов. В качестве примера приводится методика хроматографического анализа полного экстракта пыльцы березы повислой, которая была разработана сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, а также использование масс-спектрометрии в анализе пчелиного яда и пищевых аллергенов.

Ключевые слова: аллерген-специфическая иммунотерапия; аллергенные экстракты; стандартизация; ВЭЖХ; масс-спектрометрия.

Библиографическое описание: Смирнов ВВ, Игнатов АА, Кузина ВН, Дементьев СП, Раменская ГВ. Использование масс-спектрометрии в стандартизации препаратов аллергенов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (3): 166–171.

В настоящее время в мире наблюдается рост заболеваемости аллергическими болезнями. В Российской Федерации аллергические заболевания встречаются более чем у 30 % населения. Наиболее часто они отмечаются у детей [1]. К основным аллергическим заболеваниям относятся бронхиальная астма, аллергический ринит, аллергический конъюнктивит, атопический дерматит, крапивница, пищевая, лекарственная, инсектная аллергия. Причиной развития аллергических болезней является воздействие аллергенов на sensibilized организм. Аллергены представляют собой высокомолекулярные (белки) или низкомолекулярные (гаптены) соединения, которые при попадании в организм больного, чувствительного к данному аллергену, вызывают сенсибилизацию, т.е. образование специфических антител IgE, с последующим развитием аллергических реакций. Аллергены классифицируются на следующие группы: бытовые, пыльцевые, пищевые, инсектные, лекарственные аллергены, аллергены эпидермиса животных, споры плесневых грибов [2].

Для диагностики аллергических заболеваний проводится сбор аллергологического анамнеза, физикальное обследование пациента и аллергические тесты, например, кожные пробы или определение *in vitro* аллерген-специфических IgE антител [3].

Наиболее эффективным методом лечения аллергических риноконъюнктивитов является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) [4]. Этот метод лечения, предложенный Леонардом Нуном и Джоном Фриманом в 1911 г. для лечения поллиноза [5], заключается в назначении пациенту нарастающих доз того аллергена, к которо-

му у него выявлена повышенная чувствительность. Метод АСИТ позволяет достичь долгосрочного улучшения состояния пациентов после завершения курса лечения. Метод оказывает профилактическое действие на прогрессирование аллергических болезней и развитие осложнений. Так, АСИТ предотвращает развитие бронхиальной астмы у пациентов с аллергическими ринитами [2, 5].

Аллергены применяются в виде водно-солевых экстрактов либо модифицированных на разных носителях препаратов [6]. Аллергенные препараты для диагностических и терапевтических целей получают в основном экстракцией соответствующих аллергенов из природных источников с помощью различных растворителей. Далее полученные экстракты подвергают очистке. Таким образом, производственный процесс включает в себя следующие стадии: измельчение, экстракция, очистка, диализ, стерилизация, проба на токсичность [1].

Эффективность аллерген-специфической иммунотерапии во многом зависит от качества используемых аллергенных препаратов. Аллергенные экстракты представляют собой лекарственные препараты, которые могут использоваться для диагностики, профилактики и лечения аллергии. Поэтому качество препаратов аллергенов является ключевым вопросом как диагностики, так и лечения аллергических заболеваний. Таким образом, стандартизация аллергенных экстрактов имеет первостепенное значение для улучшения их качества и предоставления врачам надежного метода диагностики и лечения аллергических болезней [7].

Общая всемирная стратегия стандартизации аллергенов включает в себя определение:

- суммарной аллергенной активности;
- биологической активности;
- содержания главных аллергенов в единице массы препарата [8].

Суммарную аллергенную активность устанавливают путем соотношения кожной реакции на аллерген при проведении прик-теста к аналогичной кожной реакции, которая вызывается гистамином у больных, сенсибилизированных к данному аллергену [9]. Основным методом стандартизации аллергенных экстрактов является определение биологической активности препарата посредством способности связывания комплекса антиген–анти-тело [10].

В мире используются две системы стандартизации аллергенов:

- Allergy Units (AU), аллергенные единицы — применяются в США, оценивается степень выраженности кожной реакции пациента *in vivo*: измеряется суммарный диаметр эритемы в ответ на внутрикожное титрование аллергеном;
- Biological Units (BU), биологические единицы — используются в Европе, измеряется доза аллергена в биоэквивалентных единицах, рассчитываемых по степени выраженности кожной реакции при прик-тестировании. 1000 BU/мл эквивалентны кожной реакции пациента на раствор гистамина концентрации 10 мг/мл [8]. Единицы Allergy Units и Biological Units используются для измерения суммарной аллергенной активности.

Для определения биологической активности могут быть использованы как *in vitro*-, так и *in vivo*-методы. К методам *in vitro* относятся вестерн-иммуоблоттинг, IgE-иммуноблоттинг, изоэлектрофокусирование, перекрестный радиоиммуноэлектрофорез, иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA — Enzyme-linked immunosorbent assay) [11], электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE — sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis), радиоаллергосорбентный тест (РАСТ) и др. Методами *in vivo* являются различные кожные пробы (капельные, прик-тесты, аппликационные, скарификационные, внутрикожные и др. [1, 8, 10].

В США стандартизацией и контролем качества препаратов аллергенов занимается Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарств (Food and Drug Administration, FDA) [12]. В Европе проверку соответствия качества аллергенных экстрактов требованиям Европейской фармакопеи [13] осуществляет Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA), а также несколько регулирующих организаций, придерживающихся единых правил в соответствии с рекомендациями ВОЗ. В Российской Федерации контролем качества аллергенных препаратов занимается ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России разработал общую фармакопейную статью «Аллергены», в которой представлены основные требования, предъявляемые к аллергенным препаратам. Данная ОФС включена в Государственную фармакопею России XIII издания (электронная версия) [14]. Стандартизация выпускаемых отечественными производителями аллергенных препаратов производится

еще старым методом — по содержанию в препарате единиц белкового азота (Protein nitrogen units, PNU) [15]. Для этого в известном объеме аллергенного экстракта определяют общее содержание белка, осаждаемого фосфорновольфрамовой кислотой. Недостатком данного метода является то, что при этом не учитывается, какая часть приходится на главный аллерген и имеет аллергенную активность, а какая присутствует в виде неспецифических аллергенов либо в неактивном состоянии [1]. Однако отметим, что в последние годы на отечественном фармацевтическом рынке стали появляться препараты, стандартизованные в индексах реактивности (ИР/мл). Данная система стандартизации используется французской компанией «Stallergenes» при производстве препаратов «Фосталь — Аллерген пыльцы березы», «Оралейр» (смесь аллергенов пыльцы луговых трав) и др. [16–18].

Основной проблемой в стандартизации препаратов аллергенов является отсутствие единых протоколов стандартизации, которые могли бы быть использованы всеми производителями аллергенов. До настоящего времени каждый производитель использовал свои единицы и свои внутренние стандарты (In House Reference Standards, IHRS) для выражения специфической активности и концентрации аллергенов:

- биологические единицы — Biological Units (BU);
- аллергенные единицы — Allergy Units (AU);
- биологические аллергенные единицы — Biological Allergenic Units (BAU);
- единицы активности АСИТ — Specific treatment units (STU);
- индекс реактивности — Index of reactivity (IR-Europe);
- единицы активности радиоаллергосорбентного теста — Allergy Units by RAST (AUR-Europe);
- единицы эквивалента гистамина НЕР и др.[15].

Это делает практически невозможным проведение сравнения качества продукции различных производителей.

При финансовой поддержке Европейского союза был разработан проект «CREATE» («Development of Certified Reference Materials for Allergenic Products and Validation of Methods for their Quantification» — Сертифицированные эталоны (референсы) аллергенов для оценки качества продукции). Целью проекта являлась стандартизация аллергенов как фармакопейных препаратов и внесение в фармакопейные статьи унифицированных методик, которые могли бы быть использованы всеми компаниями-производителями. В ходе работы над проектом CREATE был создан ряд стандартных препаратов на основе рекомбинантных аллергенов березы повислой (Bet v 1), тимофеевки луговой (Phl p 1, Phl p 5a, Phl p 5b), оливы европейской (Ole e 1) и др. Аллерген пыльцы березы Bet v 1 и аллерген пыльцы тимофеевки Phl p 5b, произведенные по правилам GMP, прошли проверку в лабораториях и были включены в Европейскую фармакопею [19–21].

В настоящее время наиболее перспективным направлением в стандартизации аллергенных экстрактов стало определение не биологической или аллергенной активности, а определение содержания главных аллергенов. К главным, или мажорным, аллергенам относятся те аллергены, которые вызывают иммунологический ответ более чем у половины пациентов и связывают более половины

IgE-антител у пациентов, сенсibilизированных к данному аллергену [22, 23]. Так как единицы биологической активности трудно сопоставимы у различных производителей, наиболее целесообразным является выражение активности препаратов в концентрациях главных (мажорных) аллергенов [24, 25].

Для определения содержания главных аллергенов возможно применение метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ЖХ-МС) — Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) [26]. К достоинствам масс-спектрометрии относятся: высокая чувствительность, высокая селективность, быстрота разработки методики, возможность работы с многокомпонентными смесями, информативность. Метод позволяет получить информацию о молекулярной массе и структуре исследуемых веществ. Метод одновременно является универсальным (молекулярная масса есть у всех веществ) и селективным (молекулярная масса различается у разных веществ).

Метод масс-спектрометрии основан на измерении отношения массы к заряду исследуемых веществ. Суть метода заключается в ионизации молекул с последующим разделением и регистрацией образующихся молекулярных ионов (M^+ и M^-), а также заряженных частиц и протонированных/депротонированных молекул. Использование данного метода открывает новые возможности в стандартизации аллергенных препаратов. Так, с применением масс-спектрометрии возможно проводить определение нескольких аллергенных компонентов одновременно (например, аллергенов и их изоформ), что оказывается особенно полезным при работе со сложными по составу препаратами, которые содержат большое количество IgE-связывающих белков. Кроме того, этим методом можно различить изоформы аллергенов, что трудно достигается иммунологическими методами. Масс-спектрометрия (МС) также может быть использована для стандартизации модифицированных аллергенов — алергоидов, поскольку определение главных аллергенов в данных препаратах невозможно из-за их химической модификации альдегидами [7, 25].

С введением таких методов ионизации, как электрораспылительная ионизация (ESI — Electrospray Ionization) и лазерная десорбция в матрице (MALDI — Matrix-assisted Laser Desorption Ionization) стало возможным анализировать крупные молекулы аллергенных белков. Крупные молекулы аллергенных белков разделяются в масс-спектрометрах за достаточно короткий промежуток времени. Такие достоинства масс-спектрометрии, как быстрота проведения анализа, очень высокая чувствительность и разрешение по массе, обуславливают столь широкое ее распространение в анализе биомолекул [27].

На кафедре фармацевтической и токсикологической химии Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова проводятся исследования по стандартизации экстрактов аллергенов методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ЖХ-МС). В ходе данных исследований были определены оптимальные параметры, по которым проводится стандартизация аллергенного экстракта пыльцы березы по содержанию главного аллергена — белка Bet v 1. Была разработана и валидирована методика стандартизации этого аллергенного экстракта

по содержанию аллергенного белка Bet v 1 с использованием метода ЖХ-МС. Разработанная методика может быть использована для стандартизации экстрактов пыльцы березы, предназначенных для проведения АСИТ [25]. Согласно данной методике, определение проводят на жидкостном хроматографе с tandemным масс-селективным детектором. На стадии пробоподготовки точную навеску (10 мг) препарата помещают в мерную колбу на 100 мл, растворяют в воде деионизированной и доводят объем до метки. Затем 2 мл полученного раствора пропускают через фильтр (размер пор — 0,4 мкм). Фильтрат помещают во флакон для хроматографирования. Условия хроматографирования: колонка Agilent XDB C18, 4,6×150 мм; 5,0 мкм; подвижная фаза — смесь 0,1 % раствора муравьиной кислоты в воде с ацетонитрилом в соотношении 55:45; система водоподготовки «Millipore», Milli Q Advantage A10 (Франция). Температура колонки 30 °С. Скорость потока 0,3 мл/мин. Объем вводимой пробы — 10 мкл. Характеристическое отношение массы к заряду m/z составило 876,1 [28].

Методом масс-спектрометрии также возможно проведение идентификации и определения содержания аллергенов пчелиного яда. Для анализа образцов пчелиного яда была разработана методика с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF-MS — matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). Согласно данной методике, были параллельно использованы две стандартные матричные системы: 1) раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (10 мг/мл) в ацетонитриле и 0,1 % трифторуксусной кислоты (1:1); 2) раствор синаповой кислоты (20 мг/мл) в той же системе растворителей. Образцы для анализа были приготовлены путем растворения 5 мг вещества в 1 мл дважды дистиллированной воды. Полученные растворы были перемешаны путем обработки ультразвуком в течение 10 мин и затем профильтрованы. После этого был добавлен внутренний стандарт — глюкагоноподобный пептид — 1-(7–36) до финальной концентрации 0,2 мг/мл. Растворы пчелиного яда были смешаны с матричными растворами в соотношении 1:10. Для анализа используется 1 мл полученного раствора. Были получены масс-спектры в диапазоне значений m/z от 750 до 15000. С помощью MALDI-TOF анализа удалось получить полуквантитативные данные по различным компонентам в выбранных образцах пчелиного яда. Кроме того, данным методом был обнаружен новый пептид в составе пчелиного яда [29].

Была также разработана быстрая, устойчивая, чувствительная и специфическая методика ВЭЖХ/МС/МС, которая позволяет осуществить одновременное обнаружение четырех главных пищевых аллергенов земляного ореха, молока, пшеницы и яйца. Была использована колонка C18 75×150 мм для обращено-фазовой хроматографии (LC Packings). Подвижной фазой служила смесь воды и ацетонитрила. Скорость потока — 300 мл/мин. Как вода, так и ацетонитрил содержали муравьиную и трифторуксусную кислоты. При проведении анализов была использована ионизация электрораспылением. Чувствительность данного метода эквивалентна чувствительности других доступных в настоящее время методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР), однако он дает лучшие значения коэффициен-

та вариации, чем ИФА. Достоинством ВЭЖХ/МС/МС является также его способность одновременного обнаружения нескольких аллергенов в отличие от ИФА, который требует различных условий для каждого индивидуального аллергена. При использовании данного метода ниже вероятность получения ложноположительных результатов, чем у других методов [30].

Таким образом, использование метода жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием становится наиболее приоритетным направлением в стандартизации аллергенных препаратов. Метод ВЭЖХ в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС/МС) позволяет проводить количественное определение мажорных аллергенных белков непосредственно в препарате и получает все большее распространение при проведении стандартизации аллергенов.

Литература

- Боков ДО, Смирнов ВВ, Демина НБ. Производство и стандартизация пыльцевых аллергенных экстрактов. Available from: <http://pharmjournal.ru/articles/stati/>.
- Баранов АА, Хаитов РМ, ред. Аллергология и иммунология. М.: М-Студио; 2008.
- Ferrer M. Molecular diagnosis in Allergy: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; **19**(1): 19–24.
- Маслова ЛВ. Поллиноз: методы контроля заболевания. *Рецензент* 2013; (3): 118–27.
- Jacobsen L, Wahn U, Bilo MB. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorized by level of benefit — the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. Available from: <http://www.ctajournal.com/content/2/1/8>.
- Гуцин ИС. Аллерген-специфическая иммунотерапия (гипосенсибилизация). *Лечащий врач* 2001; (3): 10–27.
- Fernández-Caldas E, Zakzuk J, Lockey FR. Allergen Standardization and Characterization. Available from: <http://files.sld.cu/allergenos/files/2011/08/allergenvaccines2009opt1.pdf>.
- Хаитов РМ, Ильина НИ. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. М.: Гэотар-Медиа; 2009.
- Боков ДО, Смирнов ВВ. Стандартизация полного экстракта пыльцы березы, используемого при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). В кн.: SCIENCE4HEALTH — 2013. Клинические и теоретические аспекты современной медицины: материалы V Международной научной конференции (29 октября — 2 ноября 2013 г.). М.: РУДН; 2013. С. 156–7.
- Воробьева ОВ. Современное состояние проблемы стандартизации аллергенов при аллерген-специфической иммунотерапии. *Российский аллергологический журнал* 2011; (4): 76–77.
- Невская ЛВ, Радунская СФ, Лавренчик ЕИ, Мовсесянц АА, Капитанова ВК, Короткова МЮ. Применение иммуноанализа для решения актуальных проблем стандартизации препаратов аллергенов. *Биопрепараты* 2015; (3): 17–20.
- Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (21 680.1). «Allergenic Products». Vol. 7. P. 133–6.
- European pharmacopoeia. 7th ed. suppl. 7.0. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. 2010. № 1. 1207 p.
- Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 2. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoei.
- Боков ДО, Смирнов ВВ. К вопросу стандартизации аллергенных экстрактов: пути дальнейшего развития. *Сеченовский вестник* 2013; (4): 39–46.
- Stallergenes SA. Stallergenes group. Available from: <http://www.stallergenes.com/en/stallergenes-group/our-products.html>.
- Видадь. Лекарственные препараты в России: Справочник. М.: АстраФармСервис; 2013.
- Frati F, Scurati S, Puccinelli P, David M, Hilaire C, Capece M, et al. Development of a sublingual allergy vaccine for grass pollinosis. *Drug Des Devel Ther*. 2010; (4): 99–105.
- van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; **63**: 310–26.
- Filep S, Tsay A, Vailes L, Gadermaier G, Ferreira F, Matsui E, et al. A multi-allergen standard for the calibration of immunoassays: CREATE principles applied to eight purified allergens. *Allergy* 2012; **67** (2): 235–41.
- Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, Cromwell O, Bryan D, Becker WM, et al. The European Union CREATE Project: A model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; **122** (5): 882–9.
- Астафьева НГ. и др. Место аллерген-специфической иммунотерапии в лечении атопии. *Consilium medicum* 2013; (3): 55–61.
- Breiteneder H, Chapman MD. Allergen Nomenclature. Available from: http://www.allergen.org/pubs/10_BRP_69_Breiteneder_MDC_Allergen_Nomenclature_2014.pdf.
- Игнатов АА, Раменская ГВ, Смирнов ВВ. Современные тенденции в стандартизации препаратов аллергенов. *Фармакокинетика и фармакодинамика* 2015; (1): 16–20.
- Боков ДО, Смирнов ВВ. Разработка подходов к стандартизации и методов контроля качества аллергенных экстрактов, применяемых при проведении аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). Available from: <http://www.scienceforum.ru/2014/pdf/3011.pdf>.
- LC/MS Information. Technology Reviews. Available from: http://www.lcms.com/lcms_information/refer_books.html.
- Ласкин Дж, Лифшиц Х. Принципы масс-спектрометрии в приложении к биомолекулам. М.: Техносфера; 2012.
- Боков ДО, Смирнов ВВ. Совершенствование методов стандартизации экстрактов лечебных аллергенов: от PNU до LC-М. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2013; (4): 31–41.
- Matysiak J, et al. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; (54): 273–8.
- Lock S, et al. The Detection of Allergens in Bread and Pasta by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Available from: http://static.ow.ly/docs/The_%20Detection_%20of_%20Allergens_%20in_%20Bread_%20and_%20Pasta_39TI.pdf.

Об авторах

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.

Смирнов Валерий Валерьевич. Доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, канд. фарм. наук.

Игнатов Алексей Анатольевич. Аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии.

Кузина Вера Николаевна. Доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, канд. фарм. наук.

Деметьев Сергей Петрович. Доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, канд. фарм. наук.

Раменская Галина Владиславовна. Заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, д-р фарм. наук, профессор.

Адрес для переписки: Раменская Галина Владиславовна; gamenskaia@mail.ru

Mass spectrometry methods for standardization of allergenic preparations

V. V. Smirnov, A. A. Ignatov, V. N. Kuzina, S. P. Dementiev, G. V. Ramenskaya

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The present article highlights the issues of standardization of diagnostic and therapeutic allergen extracts used for allergen-specific immunotherapy (ASIT) in Russia and abroad. Quality evaluation methods for finished immunobiologicals (allergens) in accordance with the regulatory documents and using biological, immunochemical and advanced physical and chemical analytical techniques (in vitro and in vivo diagnosis) have been considered. Basic standardization strategies for allergenic preparations (determination of total allergenic activity, biological activity, the content of major allergens) have been presented. Two systems of allergen standardization (allergen units and biological units) have been introduced. The potential for use of high-performance liquid chromatography combined with mass spectrometry (HPLC-MS) as the most promising method for the standardization of allergen extracts has been considered. The advantages and disadvantages of the mentioned method for the standardization of allergens has been described. The method of chromatographic analysis of the total extract of drooping birch pollen, developed by the experts of the Chair of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of the I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, has been given as an example.

Key words: allergen-specific immunotherapy; allergen extracts; standardization; HPLC; mass spectrometry.

For citation: Smirnov VV, Ignatov AA, Kuzina VN, Dementiev SP, Ramenskaya GV. Mass spectrometry methods for standardization of allergenic preparations. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (3): 166–171.

References

- Bokov DO, Smirnov VV, Demina NB. Production and standardization of allergenic pollen extracts. Available from: <http://pharmjournal.ru/articles/stati/> (in Russian).
- Baranov AA, Haitov RM, eds. *Allergology and Immunology*. Moscow: M-Studio; 2008 (in Russian).
- Ferrer M. Molecular diagnosis in Allergology: application of the microarray technique. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009; 19(1): 19–24.
- Maslova LV. Hay fever: disease control methods. *Retsept* 2013; (3): 118–27 (in Russian).
- Jacobsen L, Wahn U, Bilo MB. Allergen-specific immunotherapy provides immediate, long-term and preventive clinical effects in children and adults: the effects of immunotherapy can be categorized by level of benefit — the centenary of allergen specific subcutaneous immunotherapy. Available from: <http://www.ctajournal.com/content/2/1/8>.
- Gushchin IS. Allergen-specific immunotherapy (desensitization). *Lechaschiy vrach* 2001; (3): 10–27 (in Russian).
- Fernández-Caldas E, Zakzuk J, Lockey FR. Allergen Standardization and Characterization. Available from: <http://files.sld.cu/allergenos/files/2011/08/allergenvaccines2009opt1.pdf>.
- Haitov RM, Ilna NI. *Allergology and Immunology. National guidance*. Moscow: Geotar-Media; 2009 (in Russian).
- Bokov DO, Smirnov VV. Standardization of total extract of birch pollen used during allergen-specific immunotherapy (ASIT). In: *SCIENCE4HEALTH — 2013. Clinical and theoretical aspects of modern medicine: Proceedings of the V International Scientific Conference (29 October — 2 November 2013)*. Moscow: RUDN; 2013. P. 156–7 (in Russian).
- Vorobieva OV. Current status of allergen standardization problems with allergen-specific immunotherapy. *Rossiyskiy allergologicheskii zhurnal* 2011; (4): 76–77 (in Russian).
- Nevskaya LV, Radunskaya SF, Lavrenchik EI, Movsesyants AA, Kapitanova VK, Korotkova MY. Immunoassay for the purpose of solving current issues associated with standardization of allergen preparations. *Biopreparaty* 2015; (3): 17–20 (in Russian).
- Code of Federal Regulations Food and Drug Administration (21 CFR 310.1). «Allergenic Products». Vol. 7. P. 133–6.
- European pharmacopoeia. 7th ed. suppl. 7.0. Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines. 2010. № 1. 1207 p.
- The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 2. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoei (in Russian).
- Bokov DO, Smirnov VV. On the issue of standardization of allergenic extracts: the way of further development. *Sechenovskiy vestnik* 2013; (4): 39–46 (in Russian).
- Stallergenes SA. Stallergenes group. Available from: <http://www.stallergenes.com/en/stallergenes-group/our-products.html>.
- Vidal. *Pharmaceuticals in Russia: A Handbook*. Moscow: AstraFarmServis; 2013 (in Russian).
- Frati F, Scurati S, Puccinelli P, David M, Hilaire C, Capece M, et al. Development of a sublingual allergy vaccine for grass pollinosis. *Drug Des Devel Ther*. 2010; (4): 99–105.
- van Ree R, Chapman MD, Ferreira F, Vieths S, Bryan D, Cromwell O, et al. The CREATE project: development of certified reference materials for allergenic products and validation of methods for their quantification. *Allergy* 2008; 63: 310–26.
- Filep S, Tsay A, Vailes L, Gadermaier G, Ferreira F, Matsui E, et al. A multi-allergen standard for the calibration of immunoassays: CREATE principles applied to eight purified allergens. *Allergy* 2012; 67 (2): 235–41.
- Chapman MD, Ferreira F, Villalba M, Cromwell O, Bryan D, Becker WM, et al. The European Union CREATE Project: A model for international standardization of allergy diagnostics and vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122 (5): 882–9.
- Astafieva NG, et al. Location of allergen-specific immunotherapy in the treatment of atopy. *Consilium medicum* 2013; (3): 55–61 (in Russian).
- Breiteneder H, Chapman MD. Allergen Nomenclature. Available from: http://www.allergen.org/pubs/10_BRP_69_Breiteneder_MDC_Allergen_Nomenclature_2014.pdf.
- Ignatov AA, Ramenskaya GV, Smirnov VV. Current trends in the standardization of allergen preparations. *Farmakokinetika i farmakodinamika* 2015; (1): 16–20 (in Russian).
- Bokov DO, Smirnov VV. Development of approaches to standardization and quality control of allergenic extracts used in the conduct of allergen-specific immunotherapy (ASIT). Available from: <http://www.scienceforum.ru/2014/pdf/3011.pdf> (in Russian).
- LC/MS Information. Technology Reviews. Available from: http://www.lcms.com/lcms_information/refer_books.html.
- Laskin G, Lifshitz H. *Mass Spectrometry Principles in the application to biomolecules*. Moscow: Tehnosfera; 2012 (in Russian).
- Bokov DO, Smirnov VV. Improving methods of standardization of medicinal extracts of allergens from PNU to LC-M. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya* 2013; (4): 31–41 (in Russian).
- Matysiak J, et al. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; (54): 273–8.
- Lock S, et al. The Detection of Allergens in Bread and Pasta by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Available from: http://static.ow.ly/docs/The_20Detection_20of_20Allergens_20in_20Bread_20and_20Pasta_39TI.pdf.

Authors

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Trubetskaya street 8, bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

Smirnov VV. Docent of the Department of pharmaceutical and toxicological chemistry. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Ignatov AA. Post-graduate student of the Department of pharmaceutical and toxicological chemistry.

Kuzina VN. Docent of the Department of pharmaceutical and toxicological chemistry. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Dementiev SP. Docent of the Department of pharmaceutical and toxicological chemistry. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Ramenskaya GV. Head of the Department of pharmaceutical and toxicological chemistry. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.