

УДК 615.218.3

И. И. Романовская, Т. И. Давиденко  
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра фармацевтической химии

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ АЛЛЕРГЕНОВ НА ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ

Рассмотрено включение аллергенов белка куриного яйца и домашней пыли в растворы гидрофильных полимеров и гранулы поливинилкапролактама, получены включенные в пленки поливинилового спирта аллергены с высоким связыванием белка и фенола (до 98,2% и 80,9%, соответственно). Показана перспективность использования полимерных пленок с включенным аллергеном для специфической иммунотерапии аллергического ринита.

**Ключевые слова:** иммобилизация, аллергены, полимерные носители.

Увеличение частоты аллергических заболеваний вызывает необходимость не только расширения номенклатуры лечебных и диагностических форм аллергенов, но и разработку их новых форм и способов введения, поскольку применяемые на практике водно-солевые растворы аллергенов нестабильны и требуют постановки больными большого числа инъекций.

К настоящему времени для стабилизации и пролонгирования неинфекционных аллергенов, имеющих по последним данным гликопротеидную природу, рассмотрены различные методы иммобилизации, включая сорбцию на гидроксиде алюминия и фосфате кальция [1,2], кусочках сахара-рафинада [2], 1-тирозине [3], ковалентное связывание с полимерными носителями (полиэтиленгликолем, поливиниловым спиртом, поливинилпирролидоном), обработанными глутаровым альдегидом и хлористым циануром [1, 4, 5].

Поскольку в ряде случаев не удалось достичь существенной стабилизации препаратов, а применяемые методы зачастую достаточно сложны и дорогостоящи, целью настоящей работы явилось изучение иммобилизации пищевых и пылевых аллергенов включением в растворы, пленки, гранулы синтетических полимеров.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали представленные Винницким МП “Иммунолог” коммерческие препараты пищевого аллергена — аллергена белка куриного яйца (АБКЯ) и бытового аллергена — аллергена домашней пыли (АДП) в жидкой форме, стандартизованные по белковому азоту (PNU /см<sup>3</sup>) с добавлением ~ 0,4% фенола в качестве стабилизатора.

Содержание белка в препаратах аллергенов определяли по методу Брадфорда [6]. К пробам аллергенов в объеме 1 см<sup>3</sup> прибавляли 4 см<sup>3</sup> основного реактива, взбалтывали и через 10 мин фотометрировали при 595 нм. Основной реактив готовили следующим образом: 50 мг Кумасси G-250 растворяли в 62,5 см<sup>3</sup> этано-

ла, вводили 125 см<sup>3</sup> Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> и разбавляли дистиллированной водой до 1 дм<sup>3</sup>. Для построения калибровочной кривой в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Фенол определяли согласно [7], для чего к пробе (1 см<sup>3</sup>), содержащей 1,69—28 мг фенола, прибавляли 1 см<sup>3</sup> раствора NH<sub>4</sub>OH и 0,3 см<sup>3</sup> 0,2%-ного раствора 4-аминоантипирина, перемешивали и непосредственно перед фотометрированием прибавляли 1 см<sup>3</sup> 0,2%-ного раствора красной кровяной соли K<sub>3</sub>[Fe CN<sub>6</sub>], перемешивали и фотометрировали при 510 нм.

Иммобилизацию АБКЯ и АДП осуществляли включением в 10%-ные растворы гидрофильных полимеров: поливинилового спирта (ПВС), полиэтиленоксида-400 (ПЭО-400), полиэтиленгликолей с молекулярными массами 13000-15000, 40000, (ПЭГ- 13000-15000, ПЭГ-40000), поливинилпирролидона (ПВП).

На основе 10% и 20% ПВС согласно разработанной методике получили пленки с включенными аллергенами.

При включении аллергенов в поливинилкапролактамы к 1 см<sup>3</sup> аллергена медленно по каплям при встряхивании прибавляли 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора ПВК при температуре 40°С, затем 10 мин инкубировали, отфильтровывали и быстро промывали образовавшиеся гранулы раствором 0,01 М Na-фосфатного буфера, рН 7,2. Связывание белка и фенола определяли по разности его содержания в исходном препарате и надосадочной жидкости (НОЖ) после включения его в ПВК.

### Результаты и их обсуждение

Применение гидрофильных полимеров: поливинилового спирта, полиэтиленоксида, полиэтиленгликолей, поливинилпирролидона для иммобилизации аллергенов обусловлено их стабилизирующим эффектом [8], низкой токсичностью, невысокой стоимостью.

При включении АБКЯ в растворы полимеров отмечено высокое связывание белка практически во всех исследуемых полимерах (81,7% — 100%), в растворе ПЭГ оно составило 50,1% от исходного (табл. 1).

Таблица 1

Включение аллергена белка куриного яйца в растворы гидрофильных полимеров\*

Полимер, 10%-ный раствор	Содержание белка		Содержание фенола	
	Мкг/см <sup>3</sup> , M ± m	% от исходного	Мг/см <sup>3</sup> , M ± m	% от исходного
ПВС	45,70 ± 2,71	81,7	2,92 ± 0,05	97,6
ПЭО	51,10 ± 3,00	91,4	2,87 ± 0,01	95,0
ПЭГ 13000-15000	55,38 ± 0,92	100,0	2,86 ± 0,15	94,7
ПЭГ 40000	28,00 ± 1,33	50,1	2,80 ± 0,13	92,7
ПВП	48,03 ± 2,45	85,9	2,88 ± 0,11	95,4

\* Исходное содержание белка составляло 55,90 ± 3,35 мкг/см<sup>3</sup>,  
Исходное содержание фенола составляло 3,02 ± 0,10 мг/см<sup>3</sup>,  
P < 0,001

Содержание фенола в препаратах аллергена в полимерах практически не отличалось от исходного (92,7% — 96,7%).

Через полгода содержание белка в растворе ПЭО составило 77,8%, ПЭГ (13000-15000)- 80,3%, ПВП — 62,5%, ПВС — 59,1%, ПЭГ (40000) — 15,1% от максимального, соответственно, содержание фенола в препаратах на протяжении 3-х месячного хранения практически не отличалось от исходного (табл. 2).

Включение АБКЯ и АДП в пленки 10%-ного и 20%-ного растворов ПВС привело к высокому связыванию как белка (95,6%, 68,5% и 98,2%, 70,6%, соответственно), так и фенола: соответственно 81,5%, 52,1% и 56,3%, 50,8% (таблица 3).

Через полгода хранения в обоих препаратах аллергенов отметили снижение содержание белка и фенола на ~10% и ~15%, соответственно.

При включении АБКЯ, в гранулы ПВК связывание как белка, так и фенола было достаточно высоким, составляя в обоих случаях ~88% (табл.4).

Таблица 4

Включение АБКЯ в гранулы ПВК

№ п/п	Содержание белка, мкг/см <sup>3</sup>			Содержание фенола, мг/см <sup>3</sup>		
	Исходное	В НОЖ после включения	% связывания	Исходное	В НОЖ после включения	% связывания
1.	487,2	57,2	88,2	3,43	0,42	87,5
2.	487,2	68,4	85,9	3,43	0,35	86,9
3.	487,2	65,6	86,6	3,43	0,40	88,3

Определение белка в самом препарате не удалось даже при 18-часовой инкубации его в буфере. Для растворения гранул добавляли 0,2 М раствор NaOH, однако после добавления реактива Брадфорда образовывались хлопья голубого, быстро темнеющего осадка, затрудняющего определение белка.

Учитывая преимущества пленки с включенным аллергеном при эндоназальном способе введения: возможность регулирования концентрации вводимого аллергена, пролонгированность действия, стабильность, в Одесском и Винницком медицинских университетах осуществлена их проверка на добровольцах-больных аллергическим ринитом.

При изучении времени выхода АДП из полимерной пленки нами показано его максимальное высвобождение через 30 мин.

При проведении эндоназальной провокационной аллергической пробы у больных круглогодичным аллергическим ринитом с использованием пленки поливинилового спирта с включенным аллергеном домашней пыли, клинические проявления аллергического ринита появлялись к 5—15 мин, достигая максимального проявления к 20-30 мин.

На 40 больных изучена эффективность специфической иммунотерапии аллергического ринита эндоназальным введением пленок с включенным аллергеном [9]. Показано, что терапия пленочными формами аллергенов привела к исчезновению симптомов аллергического ринита у 29 больных, выраженность основных симптомов уменьшилась у 8-ми пациентов, у 3-х пациентов отметили незначительное улучшение состояния.

Таблица 2

## Сохранение белка и фенола в АБКЯ, включенном в растворы гидрофильных полимеров

Полимер	БЕЛОК				ФЕНОЛ			
	0 сут, мкг/см <sup>3</sup> *	1 мес, % от исходного	3 мес, % от исходного	6 мес, % от исходного	0 сут, мг/см <sup>3</sup> *	1 мес, % от исходного	3 мес, % от исходного	6 мес, % от исходного
ПВС	45,7 ± 2,7	95,7	76,0	59,1	2,92 ± 0,05	100,7	99,4	95,2
ПЭО-400	51,1 ± 3,0	100,0	100,0	77,8	2,87 ± 0,01	100,0	100,0	93,4
ПЭГ-13000-15000	55,4 ± 0,9	100,0	88,4	80,3	2,86 ± 0,15	98,3	97,5	92,8
ПЭГ-40000	28,0 ± 1,3	43,4	30,0	15,1	2,80 ± 0,13	97,1	96,9	96,2
ПВП	48,0 ± 2,5	100,0	95,4	62,5	2,88 ± 0,09	98,5	98,0	93,1

\* M ± m, P &lt; 0,001

Таблица 3

## Включение аллергенов в пленки поливинилового спирта

Аллерген	[ПВС] %	Содержание белка				Содержание фенола			
		Исходное мкг/г* носителя	В иммобилизованном препарате			Исходное мкг/г* носителя	В иммобилизованном препарате		
			мкг/г* носителя	% от исходн.	Через 6 мес., % от исходн.		мкг/г* носителя	% от исходн.	Через 6 мес., % от исходн.
АБКЯ	10	1618 ± 36	1546 ± 100	95,6	75,7	10,3 ± 0,1	8,4 ± 0,3	81,6	65,1
	20	1135 ± 88	776 ± 20	68,5	57,1	6,7 ± 0,1	3,5 ± 0,2	52,1	40,3
АДП	10	1609 ± 75	1580 ± 69	98,2	78,0	10,3 ± 0,2	5,9 ± 0,1	56,3	38,7
	20	1020 ± 95	720 ± 59	70,6	60,3	6,6 ± 0,3	3,4 ± 0,1	50,8	35,4

P &lt; 0,001

Таким образом, рассмотрено включение аллергенов белка куриного яйца и домашней пыли в растворы гидрофильных полимеров, в гранулы поливинилкапролактама, получены включенные в пленки поливинилового спирта АБКЯ и АДП с высоким связыванием белка и фенола, показана перспективность эндо-назального введения пленок с включенным аллергеном для специфической иммунотерапии аллергического ринита.

## Литература

1. Фрадкин В. А. Диагностические и лечебные аллергены. — М: Медицина, 1990. — 260 с.
2. Передкова Е. В., Медуницын Н. В., Порошина Ю. А. и др. Пероральный метод специфической иммунотерапии // Иммунология. — 1986. — № 6. — С. 49-51.
3. Blainey A. D., Phillips M. J., Olivier S. et al. Hypersensitisation with a tyrosine adsorbed extract of *Dermatophagoides pteronissimus* in adults with perennial rhinitis // *Allergy*. — 1984. — V.39, № 7. — P. 521-528.
4. Гуцин И. С., Войтенко В. Г., Свиридов Б. Д. и др. Полифункциональная молекула: конъюгат синтетического полииона – иммуностимулятора с аллергеном и ингибитором аллергической активации тучных клеток // Иммунология. — 1988. — № 6. — С. 53-57.
5. Хаитов Р. М., Федосеева В. Н., Некрасов А. В. и др. О сниженных анафилактических свойствах аллергена, конъюгированного с синтетическим полимером // Иммунология. — 1996. — № 6. — С. 40-42.
6. Якубке Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Наука, 1985. — С. 335-356.
7. Коренман И. М. Фотометрический анализ — методы определения органических соединений. — М.: Наука, 1983. — 358 с.
8. Давиденко Т. И., Романовская И. И., Чуманова М. А. и др. Литическая активность иммобилизованной стерилазы (литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*) // Хим. — фарм. журн. — 2001. — Т.35, №10. — с.14-17.
9. Заболотний Д. І., Пухлик Б. М., Нестерчук В. І. Стан та перспективи розробки та впровадження нових препаратів для специфічної діагностики і лікування алергічних захворювань // Тези доповідей II Національного з'їзду фармакологів України. — Дніпропетровськ, 2001. — с. 88-89.

Романовська І. І., Давиденко Т. І.

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,  
кафедра фармацевтичної хімії

### ІММОБІЛІЗАЦІЯ АЛЕРГЕНІВ НА ПОЛІМЕРНИХ НОСІЯХ

#### Резюме

Розглянуто включення алергенів білка курячого яйця та домашнього пилу у розчини гідрофільних полімерів та гранули полівінілкапролактаму; отримані включені у плівки полівінілового спирту алергени з високим зв'язуванням білка та фенолу: до 98,2% та 80,0%, відповідно.

Показана перспективність використання плівок із включеним алергеном для специфічної імунотерапії алергічного риніту.

**Ключові слова:** іммобілізація, алергени, полімерні носії.

**Romanovskaya I. I., Davidenko T. I.**

**IMMOBILIZATION OF THE ALLERGENS ON THE POLYMER CARRIERS.**

**Summary**

The entrapment of eggs-white and domestic dust-allergenes in solutions of hydrophilic polymers and also in granules of polyvinyl caprolactame was studied; there were obtained polyvinyl-alcohol films with a high level of protein yeild: up to 98,2% and 80,9%, respectively.

The prospect films, containing the entrapped allergenes application, for the specific immunotherapy of the allergic rinite is shown.

**Key words:** immobilization, allergen, polymer carrier