

**Фармакокинетика аллергена и мономерного аллергоида для  
оромукозальной иммунотерапии.  
Исследования на добровольцах - аллергиках.**

M. Bagnasco, G. Passalacqua, G. Villa, C. Augeri, G. Flamigni, E. Borini, P. Falagiani, G. Mistrello, G.W. Canonica, G. Mariani.

Аллергия и клиническая иммунология, Аллергия и респираторные заболевания, Служба ядерной медицины, Управление медицины внутренних болезней г. Генуя и Лофарма С.п.А., Милан, Италия.

**Краткое содержание**

**Предпосылки и цели.** В настоящее время имеется немного данных о фармакокинетике аллергенов при локальной иммунотерапии. В связи с этим мы изучали фармакокинетику коммерческой аллерговакцины, выпускаемой в таблетках для подъязычного применения (Лайс, Лофарма С.п.А.) на добровольцах-аллергиках.

**Методы.** Растворимые таблетки, которые назначались аллергикам, содержали радиоактивно меченный  $^{123}\text{I}$  карбамилированный мономерный аллергоид, полученный из мажорного аллергена *Parietaria judaica* (Par j 1), и характеризующийся сохранением оригинальных молекулярных размеров, или природный аллерген. На протяжении исследования проводились сцинтиграфия и измерения радиоактивности плазмы в различные интервалы времени.

**Результаты.** Не было выявлено никакой разницы в локальной фармакокинетике аллергена и аллергоида: часть метки сохранялась в ротовой полости не менее 2 часов после проглатывания. Не наблюдалось прямой абсорбции через слизистую оболочку рта, так как радиоактивность плазмы возросла только после проглатывания слюны и достигла пика через 2 часа. Вместе с тем, пик радиоактивности плазмы был значительно выше при применении аллергоидов, чем природных аллергенов. Наконец, некоторое количество неповрежденных ферментами аллергоидов (не аллергенов) неизменно обнаруживалось на пике кровяной плазмы.

**Заключение.** Результаты показали, что локальная кинетика аллергоида и аллергена схожи; вместе с тем пик плазмы при применении аллергоида был выше, чем при лечении аллергеном. Следовательно, можно сделать вывод о том, что химическая модификация аллергена привела к изменению его фармакокинетики, сделав его менее восприимчивым к разрушающему действию ферментов.

**Предисловие**

Локальная (не инъекционная) аллергенная иммунотерапия (далее - АИТ) является предметом серьезного научного интереса, особенно в странах Европы. Общей целью неинъекционной АИТ является уменьшение рисков неблагоприятных последствий, вероятных при подкожном введении препарата, а также обеспечение пациентов более удобным и приемлемым способом приема препаратов АИТ. В литературе имеются свидетельства действенности назальной и сублингвальной/с проглатыванием АИТ: Всемирная организация здравоохранения и Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии совместно с Европейском обществом педиатрических аллергологов и клинических иммунологов указывают на эти виды АИТ, как на возможную альтернативу инъекционной ИТ для взрослых.

При сублингвальной/с проглатыванием АИТ пациенту предписывается держать аллерген (приготовленный в каплях либо в растворимых таблетках) под языком в течение 1-2 минут, после чего слюну следует проглотить. Считается, что данный способ приема наиболее эффективен для снижения уровня аллергических симптомов, а также сокращения потребности в использовании дополнительных лекарств. Более того, такой прием способствует уменьшению числа местных аллергических воспалительных реакций. Для того чтобы исследовать механизм действия аллергена и оптимизировать график его приема, особенно локальным путем, необходимо изучение его фармакокинетики. Вместе с тем, на данную тему имеется лишь небольшое число данных (в основном, полученных на животных моделях), которые часто не содержат окончательных результатов.

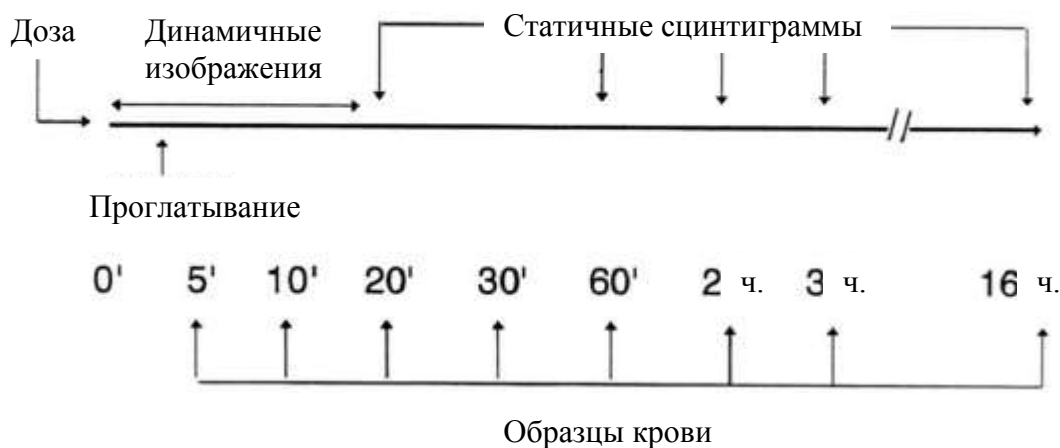
В недавних исследованиях с использованием меченого мажорного аллергена (Par J 1) *Parietaria judaica* на здоровых добровольцах, мы выяснили, что прямая абсорбция аллергена через внутренние слизистые оболочки рта отсутствует, в то время как составляющие фракции белков остаются во рту до 24 ч. после введения. Несомненно, именно проглоченные фракции аллергена являются причиной большей части радиоактивности, обнаруженной в крови. Впрочем, исследование проводилось на здоровых добровольцах и в условиях эксперимента, которые существенно отличаются от применения вакцины в клинических условиях. По этой причине мы приняли решение о проведении исследования кинетики коммерческого препарата, модифицированной аллерговакцины, на добровольцах – аллергиках. Мономерный карбамилированный алергоид, полученный путем модификации мажорного аллергена *Parietaria judaica* (Par j 1), был помечен радиоактивным йодом –  $^{123}\text{I}$  и введен в состав коммерческих растворимых таблеток. Местная и системная кинетика алергоида изучалась на добровольцах – аллергиках, с помощью сцинтиграфической визуализации и посредством измерения радиоактивности плазмы, при сравнении с кинетикой природного аллергена.

## Материалы и методы.

### Описание исследования.

Настоящее исследование изучает абсорбцию и поведение  $^{123}\text{I}$ -меченого Par j 1 аллергена или алергоида ( $^{123}\text{I}$ - Par j 1), назначаемых в составе растворимых таблеток добровольцам: восьми – аллергикам и одному здоровому. Кинетика меченых алергенов в ротовой полости во время и после растворения таблетки изучалась методом сцинтиграфической визуализации в динамическом режиме. Абсорбция препаратов изучалась путем измерения радиоактивности плазмы в разные промежутки времени. Кроме того, были получены гель-хроматограммы пика радиоактивности плазмы. Эксперименты проводились в период с июля по декабрь, для исключения сезонных симптомов. Схема исследования представлена на рис. 1.

Рис. 1. Схема исследования



### *Пациенты.*

В исследовании принимали участие девять добровольцев (пять мужчин и четыре женщины) в возрасте от 25 до 43 лет. До начала исследования были измерены стандартные лабораторные параметры (включая свободные гормоны щитовидной железы и уровень тиреотропина в плазме), которые оказались у всех испытуемых в пределах нормы. Восемь субъектов страдали от сезонного риноконъюнктивита, вызываемого исключительно пылью *Parietaria*, что подтверждено прик-тестами (класс ++ или выше) и RAST (класс > 1). На момент начала исследования у всех участников никаких симптомов не было, они не принимали лекарства и никогда ранее не получали препараты АИТ. Девятый доброволец не являлся атопиком.

Накопление щитовидной железой свободного радиоактивного йода было сведено к минимуму путем употребления насыщенного раствора йодида калия (20 капель дважды в день, в течение 3 дней, предшествовавших исследованию) и перхлората калия (200 мг, две капсулы в день исследования). Все добровольцы были проинформированы и подписали согласие на исследование, протокол которого был одобрен Комитетом по этике при кафедре терапии университета Генуи.

### <sup>123</sup>I-меченный алергоид и аллерген.

Par j 1 аллерген получен путем обработки сырого экстракта *Parietaria judaica* 90% раствором (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; затем осуществлен диализ супернатанта против 5 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> и элюирован методом противофазной жидкостной хроматографии высокого давления (колонка C18, 13×300 мм, Deltapack, Waters Italia, Милан, Италия) в ацетонитрил/трифтороуксусной кислотой (0,1 %) со скоростью 6 мл/мин. Фракции, содержащие Par j 1 аллерген, были идентифицированы с помощью специфических антител, затем объединены, лиофилизированы и повторно разделены хроматографией, для получения одного пика с молекулярным весом 12,5 кДа (SDS-PAGE анализ). Аллергены хранились в стерильном 0,15 М фосфатно-солевом буферном растворе при концентрации около 0,8 мг/мл. Соответствующие мономерные алергоиды, представляющие собой активное начало в коммерческих таблетках, были получены путем реакции аллергена с цианатом калия в щелочной среде, в результате которой происходит избирательное карбамилрование ε-аминогрупп остатков лизина (14). Они хранились в виде лиофилизованного порошка. В отличие от полимерных алергоидов (полученных обработкой формальдегидом или глутаровым альдегидом), карбамиллированные алергоиды сохраняют размеры природной молекулы; что делает их подходящими для мукозального введения (11).

Аллерген (около 30 мкг) и алергоид (около 120 мкг) были радиоактивно мечены иодом (15), с использованием 185-300 МБк (5-8 мКи) свободного от носителя <sup>123</sup>I (Nycomed-Amersham-Sorin Radiopharmaceuticals, Saluggria, Верчелли, Италия) со специфической активностью 7 400 ТБк/мкМ или 200 Ки/мкМ. Не вступивший в реакцию <sup>123</sup>I (20-50%) был удален гель-фильтрацией на колонках PD-10 с Sephadex G-25 м (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Радиоактивно меченные белки имели конечную специфическую радиоактивность 0,9 – 1,5 МБк/мкг (25-40 мКи/мкг). Предварительные эксперименты, выполненные с помощью меченного <sup>125</sup>I показали замечательную стабильность к деиодированию радиоактивно меченных белков в течение нескольких дней и в физиологическом растворе и в сыворотке. <sup>123</sup>I был выбран из-за физических свойств (γ-эмиссия 159 кэВ, период полураспада 13,2 ч.). Меченные алергены (или алергоиды) в объеме 50 мкл (соответствующих 50-100 мКи) был постепенно абсорбирован в таблетки с помощью микропипетки. Каждая таблетка имела одинаковый состав с коммерческими таблетками для иммунотерапии (ЛАЙС, Лофарма С.п.А., Милан, Италия): лактоза, диоксид кремния и стеарат магния. Твердость таблеток колеблется от 5

до 7 кг (как определено дюрометром), соответственно время рассасывания составляет 1-2 мин.

#### *Процедура приема препарата.*

Каждый субъект получал таблетки содержащие радиоактивно меченные белки как при обычном курсе иммунотерапии. Таблетки следовало рассасывать во рту, после чего слюну следовало проглотить. Каждый пациент получил приблизительно 1-2 мкг Par j 1 аллергена/аллергоида за один прием, одна радиоактивная доза приблизительно составила 1,8-3,7 МБк (50-100 мкКи). Таблетки принимались спустя 60 минут после добавления радиоактивной метки. Сцинтиграфическая визуализация выполнялась в динамическом режиме во время рассасывания таблеток и в течение 20 минут после приема. Затем, пациенту было разрешено двигаться, глотать и полоскать рот.

#### *Сцинтиграфическая визуализация*

Для сбора сцинтиграфических изображений использовалась гамма камера с большим углом обзора (SP6, Elscint, Хайфа, Израиль). В начале была создана серия динамических сцинтиграфических изображений, состоящая из последовательных снимков, с частотой 1 снимок в 10 с: в момент приема  $^{123}\text{I}$ - Par j 1, во время рассасывания таблеток и в течение 20 мин. В ходе таких динамических сцинтиграфических съемок голова субъекта находилась близко к коллиматору гамма-камеры. После первичных динамических снимков были сделаны статичные сцинтиграфические снимки головы, плеч и живота через 20 мин., 1, 2, 3, 18-24 ч. после получения меченных препаратов (по 3 повтора в каждом случае).

#### *Отбор проб крови и определение меченых частиц.*

В ходе исследования у каждого пациента были взяты образцы гепаринизированной венозной крови по 5 мл. Плазма отделялась с помощью центрифугирования, затем для измерения радиоактивности в ячейки гамма счетчика отбиралась аликвота по 1 мл. Кроме того, с помощью гель фильтрации был выполнен анализ радиоактивных частиц циркулирующих в плазме (образцы получены через 1 ч. и 2 ч. после приема препарата), для чего использовались колонки PD-10 (Sephadex G-25) как описывалось выше (13).

## Par j 1 аллергоид

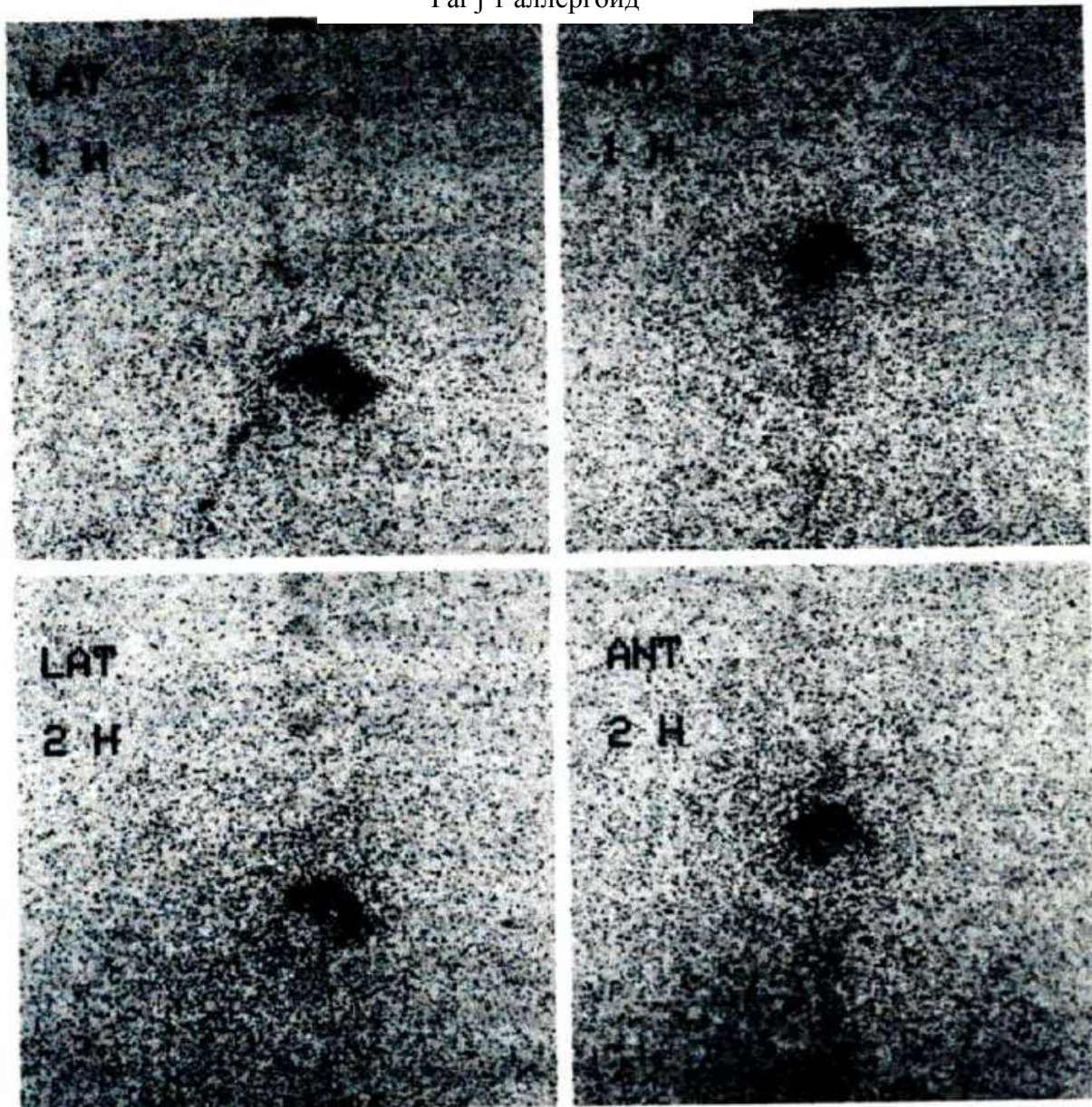


Рис. 2 Статичные сцинтиграфические изображения головы, полученные через 1 час (вверху) и через 2 часа (внизу) после приема таблеток, содержащих радиоактивные аллергоиды. Снимки сбоку (слева) и спереди (справа) показывают наличие радиоактивности по рту даже после проглатывания.

### Результаты

По результатам исследования было проведено сравнение специфической активности обоих Par J 1 аллергена и аллергоида. Хроматографические профили радиоактивно меченных аллергена и аллергоида были схожи и сопоставимы с результатами наших предыдущих исследований. Никаких неблагоприятных последствий после получения радиоактивно меченных белков у пациентов не отмечалось. У трех участников эксперимента, которые прошли позднее сцинтиграфирование, наблюдалась минимальная сцинтиграфическая визуализация щитовидной железы, несмотря на терапевтическое блокирование железы.

#### *Сцинтиграфическая визуализация.*

Динамическое изображение, полученное в период ранней фазы (несколько минут в течение рассасывания таблетки), показало, что никаких изменений радиоактивности

содержимого ротовой полости не произошло. После того, как таблетка рассосалась, и пациент начинал глотание, постепенная визуализация глотки и пищевода проводилась так же, как и при любом пероральном приеме радиоактивных пилюль. После проглатывания происходило быстрое распространение метки в желудочно-кишечном тракте. Измеримое количество радиоактивных алергоидов (около 2 % от дозы) сохранялось во рту до 2 часов. Накопление метки к 3 часу почти у всех участников было незначительно, более поздняя сцинтиграфия радиоактивных алергоидов совсем не выявила. Никакой разницы в местной кинетике алергена и алергоида не было обнаружено, как не было никакой разницы в кинетике препаратов у алергиков и здоровых пациентов.

#### ***Кинетика радиоактивной плазмы.***

Распределение радиоактивности плазмы во времени отражено на рис. 3 а и б. До момента глотания радиоактивность плазмы не обнаруживалась: после проглатывания радиоактивность плазмы медленно возрастала и достигла максимального значения через 2 часа. Алерген в таблетках и в растворе показали сходную кинетику.



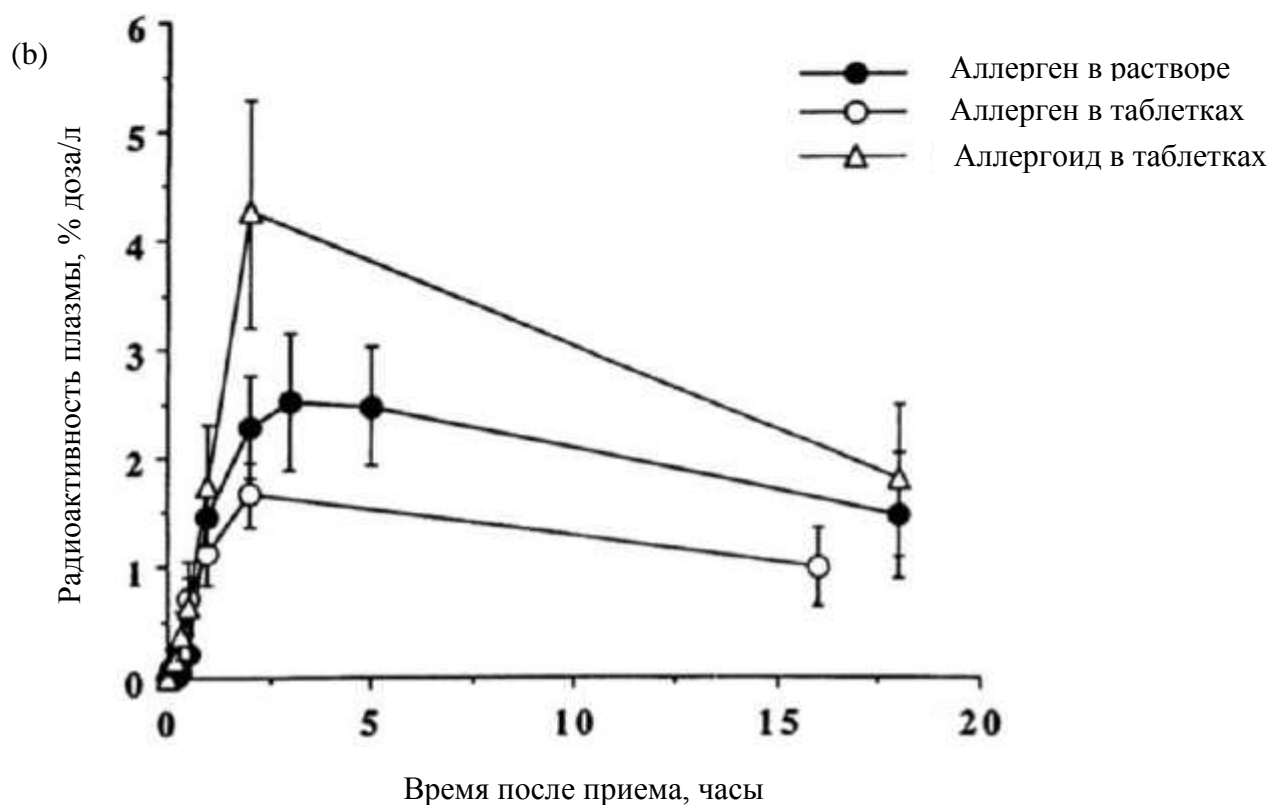
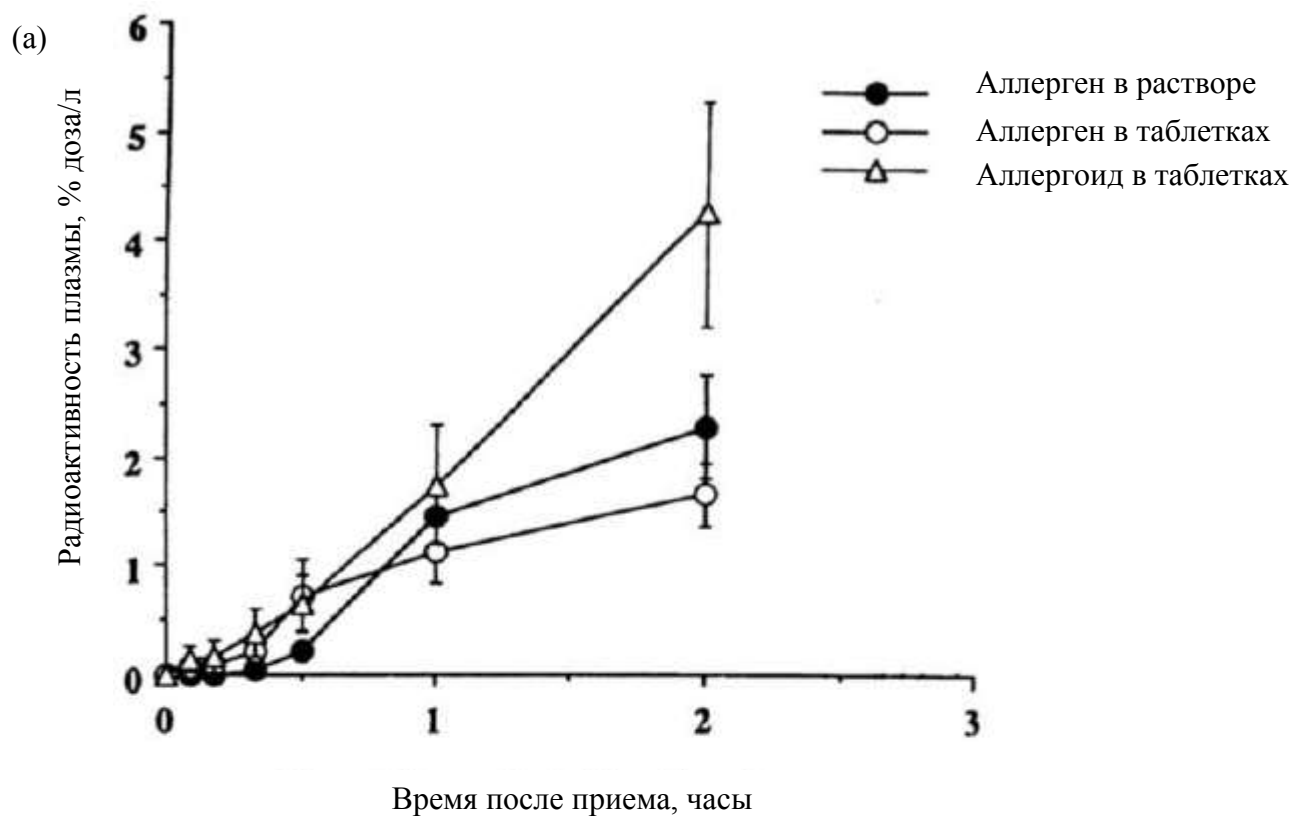


Рис. 3. Радиоактивность плазмы (% доза/л) в различное время после приема аллергена и аллергоида в таблетках с 0 до 3-х часов (а) и с 0 до 18 часов (б). Кинетика аллергена, принимаемого в составе водного раствора (статистические данные [13]), нанесены для сравнения.

С другой стороны, образцы радиоактивной плазмы различались у аллергена и аллергоида: в случае последнего, максимально достигаемое значение было выше ( $P < 0,05$ , тест Манна-Уитни). Гель-фильтрация (через Sepandex G-25) образцов плазмы,

полученных спустя 2 часа с момента приема препарата, дала основной пик в области низкой молекулярной массы (состоящий в основном из свободного йода), как показано на рис. 4.

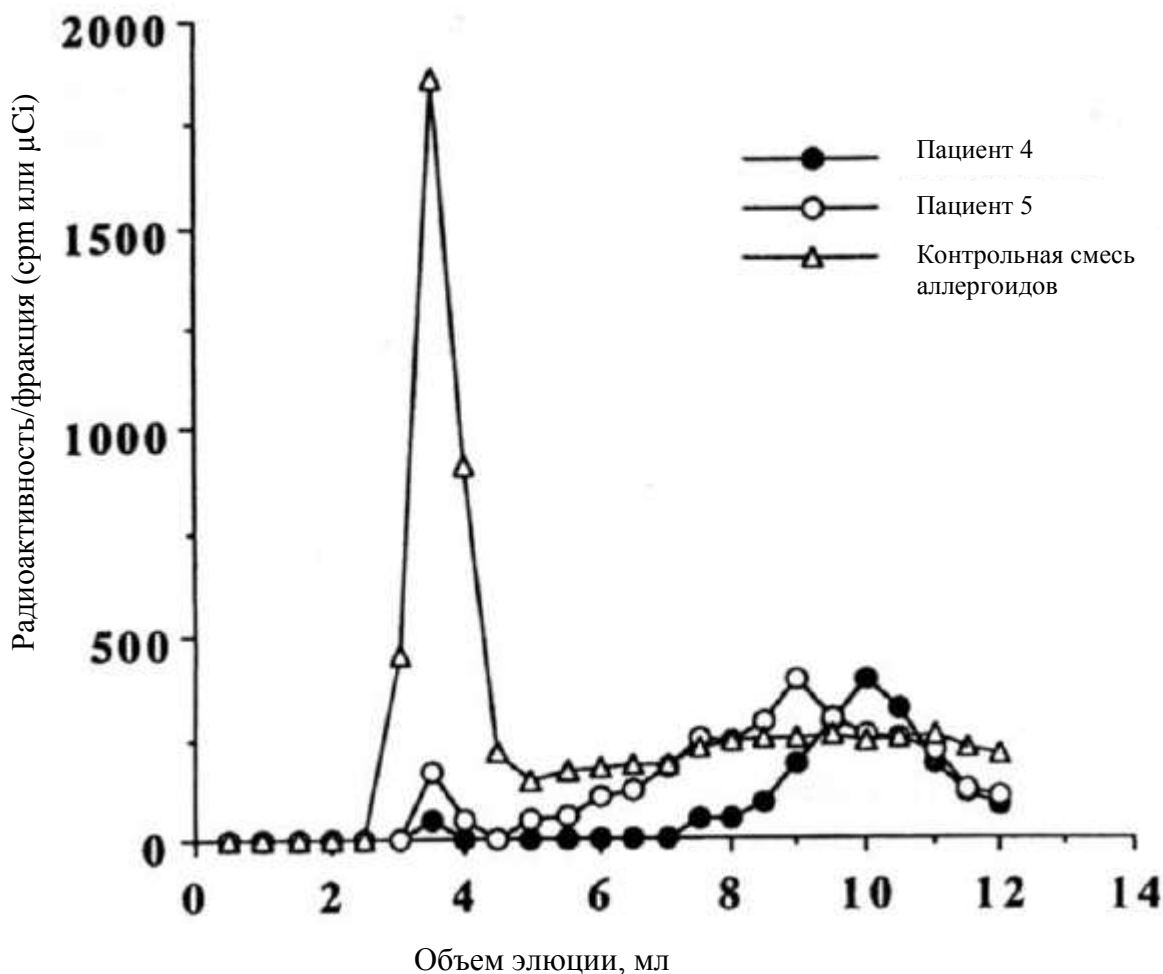


Рис.4. Гель-хроматограммы образцов плазмы, полученные спустя 2 часа после приема радиоактивно меченных алергоидов от 2-х пациентов. Для сравнения нанесен хроматографический профиль радиоактивно меченной смеси алергоидов до хроматографической очистки. На хроматограммах пациентов обнаруживается пик по молекулярной массе, соответствующий интактному алергоиду.

У образцов пациентов, получавших алергоиды, неизменно наблюдался небольшой пик плазмы, соответствующий молекулярной массе природного белка.

### Обсуждение.

В предыдущем исследовании, мы разработали экспериментальный подход для того, чтобы исследовать кинетику данных меченых алергенов и получить предварительные данные, касающиеся здорового человека. В том исследовании радиоактивно меченый алерген принимался в составе водного раствора, при этом его держали под языком, не глотая, около 20-30 мин. Эти экспериментальные условия отличаются от современного клинического применения. Поэтому мы оценивали кинетику коммерческой вакцины (ЛАЙС Лофарма С.п.А., мономерный алергоид) воспроизводя условия ее назначения алергикам при проведении регулярных курсов АИТ. Радиоактивно-меченный алергоид и алерген (для контроля) были включены в состав растворимых во рту таблеток, которые принимались участниками эксперимента в соответствии с инструкциями производителя.



Из-за размеров таблетки (10 x 3 мм), в нее мог быть включен только небольшой объем меченного препарата, что подразумевает малые дозы  $^{123}\text{I}$  и низкий уровень радиоактивности. Однако, и при таких обстоятельствах, наблюдалось хорошее качество скинтиграфических изображений и четко различимый уровень радиоактивности плазмы.

Эксперименты показали схожесть специфической активности меченных аллергенов и алергоидов, а также схожесть профилей радиоактивности при гелефильтрации: в самом деле, молекулярная масса двух белков сопоставима (12 кДа) и химическая модификация аллергена (превращающая его в алергоид), как и ожидалось, не повлияла на действенность облучения. Следует отметить, что кинетика алергоида существенно отличалась от аллергена, поскольку достигнутый им пик плазмы был выше.

До тех пор, пока меченные препараты находились во рту, прямой абсорбции радиоактивных алергоидов через слизистую оболочку в кровоток не происходило, радиоактивность плазмы начала проявляться только после проглатывания таблетки. Кроме того, хроматографический пик, соответствующий молекулярной массе алергоида, неизменно наблюдался у 2-х часового образца плазмы, это подтверждает, что часть белка могла быть абсорбирована через желудочно-кишечный тракт с небольшим, или, вообще, без ферментативного разрушения. Данный факт, возможно, играет существенную роль в механизме действия препарата. Повышенную устойчивость к воздействию ферментов желудочно-кишечного тракта можно объяснить высокой абсорбцией алергоидов и их попаданием в кровоток. Это может быть связано с замещением большинства  $-\text{NH}_2$  остатков, которые необходимы для гидролитического действия многих ферментов. Примечательно, что такое изменение не повлияло на способность алергоидов, индуцировать выработку специфических антител, аналогичных антителам против не модифицированных аллергенов.

Персистенция радиоактивно меченых аллергенов и алергоидов наблюдалась в ротовой полости в течение 2 часов, в то время как в предыдущем исследовании, с применением водных растворов аллергенов, персистенция длилась дольше. Вероятно, это связано с тем, что препараты неизменно находились (не проглатывались) во рту в течение большего периода времени. В настоящем исследовании, растворение таблеток происходило приблизительно за 1 - 1,5 мин (затем пациенты проглатывали слюну). Даже короткого контакта антигена со слизистой оболочкой оказалось достаточно, чтобы детерминировать продолжающееся действие вещества во рту в течение нескольких часов. Кроме того, нельзя исключать, что более длительная персистенция некоторой части аллергенов не могла быть обнаружена из-за малой дозы радиоактивности препарата. Во всяком случае, это местное продолжительное действие аллергенов согласовывается с гипотезой о возможности участия мукозального иммунитета в механизме действия локальной АИТ.

По результатам настоящей работы, можно сделать следующие выводы: во-первых, основное направление абсорбции (через ЖКТ) и персистенция во рту схожи для алергоида и природного аллергена, во-вторых, алергоидные вакцины, вероятно, более эффективно усваиваются по сравнению с природными аллергенами.

### **Благодарности**

Данное исследование выполнялось при частичной финансовой поддержке: ARMIA (Ассоциации исследования иммунологических и аллергических заболеваний); Министерства университетов Италии, научных и технологических исследований; Специального фонда прикладных исследований 46/82; Института ценных бумаг Италии С.п.А.; Института здравоохранения. Завершена программа исследований, начатая в 1998 году.

## Список литературы

- 1 Passalacqua G, Canonica GW. Alternative routes for immunotherapy: a review. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1996; 6:81–8.
- 2 World Health Organization. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Allergy* 1998; 53(Suppl. 44):6–30 .
- 3 Malling HJ, Abreu-Nogueira E, Alvarez-Cuesta E. et al. EAACI/ESPACI local immunotherapy position paper. *Allergy* 1998; 53:733–44.
- 4 Tari MG, Mancino M, Monti G. Efficacy of sublingual immunotherapy in patients with rhinitis and asthma due to house dust mite. A double blind study. *Allergol Immunopathol* 1990; 18:277–84.
- 5 Sabbah A, Hassoun S, Le Sellin J. et al. A double blind placebo controlled trial by the sublingual route of immunotherapy with a standardized grass pollen extract. *Allergy* 1994; 49:309–13.
- 6 Troise C, Voltolini S, Canessa A. et al. Sublingual immunotherapy in parietaria pollen induced rhinitis: a double blind study. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995; 5:25–30.
- 7 Feliziani V, Lattuada G, Parmiani S et al. Safety and efficacy of sublingual rush immunotherapy with grass allergenic extract. *Allergol Immunopathol* 1995; 23:173–8.
- 8 Hirsch T, Sahn M, Leupold W. Double blind placebo controlled study of sublingual immunotherapy with house dust mite extract in children. *Pediatr Allergy Immunol* 1997; 8:21–7.
- 9 Passalacqua G, Albano M, Fregonese L et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998; 351:629–32.
- 10 Swarbrick T, Stokes CR, Soothill JF. Absorption of antigens after oral immunisation and the simultaneous induction of specific systemic tolerance. *Gut* 1979; 20:121–5.
- 11 Mistrello G, Roncarolo D, Gentili M et al. Modified par j I allergen from *P. judaica* pollen and its rate of absorption in rats. *Immunol Lett* 1994; 40:31–6.
- 12 Mistrello G, Rapisarda G, Falagiani P. Detection of IgE-binding activity in serum after intranasal treatment of normal rabbits with *P. judaica* extracts. *Allergy* 1991; 46:52–5.
- 13 Bagnasco M, Mariani G, Passalacqua G et al. Absorption and distribution kinetics of the major parietaria judaica allergen administered by noninjectable routes to healthy human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:121–9.
- 14 Mistrello G, Brenna O, Roncarolo D et al. Monomeric chemically modified allergens: immunological and physico-chemical characterization. *Allergy* 1996; 51:8–15.
- 15 Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphnyl-glycouril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 80: 849–57.