



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **108360**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 00846**

(22) Дата подання заявки: **02.02.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.07.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Кордюм Виталій Арнольдович (UA),
Рибалко Світлана Леонтіївна (UA),
Галкін Олександр Юрійович (UA)**

(73) Власник(и):

**ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "УНІВЕРСАЛЬНЕ
АГЕНТСТВО "ПРО-ФАРМА",
вул. Перемоги, 9, оф. 20, м. Київ, 03170
(UA)**

(74) Представник:

Пікалов Сергій Юрійович, реєстр. №344

(54) РЕКОМБІНАНТНИЙ ІНТЕРЛЕЙКІН-7 ЛЮДИНИ (rIL-7)

(57) Реферат:

Рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (rIL-7), що має антибактеріальну активність та призначений для лікування інфекційних захворювань, викликаних *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*.

UA 108360 U

Корисна модель належить до медицини і хіміко-фармацевтичної промисловості, зокрема до створення, виробництва і застосування лікарських засобів для лікування інфекцій, викликаних патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами, зокрема для лікування ранових інфекцій, як засобів, що впливають на стан імунної системи макроорганізму.

За останні 50 років накреслюється чітка тенденція до значного збільшення питомої ваги інфекційних хвороб, викликаних штамами синегнійної палички та золотистого стафілокока, зокрема на тлі інших відомих збудників гнійно-септичних ускладнень в опікових та хірургічних клініках та відділеннях лікарень. Це обумовлено, в першу чергу, внутрішньо лікарняним інфікуванням цими мікроорганізмами, оскільки частота їх виділення зростає пропорційно тривалості знаходження хворого в стаціонарі. Як правило, синегнійна та стафілококова інфекції розвивається у хворих зі зниженою природною резистентністю (при опіках, онкологічних захворюваннях, при використанні імунодепресантів тощо). Збудники цих інфекцій характеризуються резистентністю до багатьох антимікробних препаратів, що використовуються у клініках, що обумовлює високу смертність від розвинутого сепсису. Резистентність *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* до дезінфікуючих агентів перешкоджають їх елімінації з об'єктів внутрішнього середовища клінік. Все це безумовно свідчить про актуальність проблеми пошуку шляхів, що спрямовані на боротьбу з синегнійною та стафілококовою інфекціями.

Не є винятком і Україна, де ці захворювання набули ще більшої актуальності у зв'язку веденням бойових дій на території країни. Це збільшення чисельності контингентів хворих, що піддаються різним хірургічним втручанням та маніпуляціям; розробка та впровадження нових інвазійних методів діагностики та лікування; нераціональна антибіотикотерапія; недостатнє дотримання правил асептики і антисептики. Всі ці причини можуть бути застосовані для пояснення збільшення внутрішньолікарняних інфекцій, викликаних патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами.

Але при синегнійній та стафілококовій інфекціях на першому місці знаходяться фактори, що впливають на стан імунної системи макроорганізму. Більшість дослідників визначають *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus* як умовні патогени, здатні проявляти свої інвазивні і токсигенні властивості при екстремальних ситуаціях. Частота гнійно-запальних ускладнень синегнійної та стафілококової етіології може бути спровокована й тим, що ці збудники в умовах стаціонару вельми невибагливі до поживних речовин, тривало зберігаються у довкіллі, високо стійкі до антибіотиків і антисептиків та продукують велику кількість різноманітних позаклітинних токсичних субстанцій, що здатні пригнічувати природну резистентність макроорганізму. Цими субстанціями (факторами патогенності) можуть бути: поверхневі компоненти клітин (полісахарид слизу, мукоїдний полісахарид, О-антиген ЛПС, ліпід А), які є токсичними для нейтрофілів та мають ендотоксिनотипні властивості. Полісахарид слизу *Pseudomonas aeruginosa* має антифагоцитарний ефект та пригнічує місцевий легеневи імунітет - здатність до виведення синегнійної палички легенями. До факторів патогенності також належать позаклітинні продукти: протеази, екзотоксин А, фосфоліпаза С-лецитиназа, які пригнічують комплементзалежні механізми захисту та токсичні для макрофагів.

Від часу відкриття пеніциліну і активного його застосування проти стафілококів, бактерія мутувала і наразі більшість штамів стійкі до цього антибіотика, завдяки наявності у золотистого стафілокока пеніцилінази - ферменту, що розщеплює молекулу пеніциліну. Для боротьби з бактерією широко застосовують метицилін - хімічно модифікований пеніцилін, який пеніциліназа не руйнує. Але вже зустрічаються штами стійкі і до метициліну, тому штами золотистого стафілокока поділяють на метицилін-чутливі та метицилін-стійкі (MRSA), також виділяють ще стійкіші штами: ванкоміцин-резистентний (VRSA) і глікопептид-резистентний (GISA). Серед пацієнтів, вражених метицилін-стійкими штамами, смертність становить 31 %.

Вивчення захворюваності синегнійною інфекцією у різних контингентів хворих показує, що є певна кореляція між частотою виникнення ускладнень цієї етіології та станом імунної системи даної групи хворих. В першу чергу до цієї групи хворих належать хворі з глибокими опіками. Ризик виникнення інфекційних ускладнень, спровокованих *Pseudomonas aeruginosa*, набагато вище у хворих, страждаючих онкологічними захворюваннями, особливо лейкозами; реципієнтів різних органів, що отримують високі дози імунодепресантів; у хворих, що знаходяться на штучній вентиляції легень. У таких хворих може страждати один або декілька факторів, які визначають резистентність макроорганізму до синегнійної інфекції.

Фактори захисту від інфекцій, спричинених *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*, можна умовно розділити на дві групи у відповідності з основними факторами вірулентності: антимікробний імунітет (фактори макроорганізму, що впливають на ріст бактерій

та забезпечують нормальний фагоцитоз) та антитоксичний імунітет (фактори, що нейтралізують токсичні властивості деяких продуктів метаболізму).

Місцевий імунітет. Місцеві неспецифічні механізми захисту включають фізичний бар'єр епітеліальних поверхонь тіла. Шкіра також забезпечує механічний бар'єр для збудників і також має кислий рН, обумовлений секрецією довголанцюгових жирних кислот. Крім цього на шкірі зустрічається резидентна мікрофлора, що успішно конкурує з транзитною мікрофлорою, до якої належить *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*. Але колонізація шкіри культурами синегнійної палички та золотистого стафілококу при опіках, ранах, хірургічних та інструментальних втручаннях відіграє важливу роль в патогенезі даних інфекцій.

Відомий патент на винахід, суть в якому полягає в тому, що лікування бактеріальних інфекцій включає введення в організм хворого антибактеріальних препаратів і кровозамінників, яких попередньо опромінюють рентгенівським випромінюванням у дозі 0,2-400 Гр, а їх трансфузію здійснюють безпосередньо після введення антибактеріальних препаратів одноразово (Патент RU № 2009664, заявка № 5041561/14 від 03.06.1992., опубл. 30.03.1994. МПК А61N5/10, А61K31/74, А61K37/02.)

До недоліків зазначеного винаходу слід віднести те, що під впливом радіаційного впливу в крові з'являються різні активні сполуки, такі як вільні радикали, продукти димеризації і перегрупування, окислені речовини і перекисні сполуки. Продукти радіолізу, у свою чергу, можуть розщеплювати антибіотики на біологічно активні метаболіти або посилювати антимікробну активність вихідного препарату, але не виключено крім алергічних ускладнень можливий патологічний вплив антибіотиків на слизові оболонки шлунково-кишкового тракту, кровотворний апарат, так як та частина антибіотиків, що надходить в кровотік, зворотно зв'язується з рецепторами молекул альбуміну, а також поглинається еритроцитами, а цей процес не вивчений досконально.

Відомий препарат для лікування вірусних, хламідійних і бактеріальних інфекцій, виготовлений на основі інтерферону і який використовується для лікування інфекцій, що протікають на тлі імунодефіциту. Суть цього препарату полягає в тому, що він являє собою єдину лікарську форму з суміші інтерферону та речовини, що має антиоксидантні властивості. Як таку речовину використовують альфа-токоферолу ацетат. Препарат містить інгредієнти в такій кількості: інтерферон 500000 МО, альфа-токоферолу ацетат 0,01-0,2 г. Препарат може бути виконаний у вигляді ректальної капсули або свічки і вводиться ректально. Створення єдиної лікарської форми значно спрощує процес лікування при збереженні високої противірусної і антиінфекційної активності препарату. (Патент RU № 2057544 (13) СІ, заявка № 5036367/14 від 02.11.1992., опубл. 04.10.1996, МПК А61K38/21.)

До недоліків препарату слід віднести те, що зберігається все ж випадання бар'єрної функції печінки, а також не вдається остаточно уникнути порушення ліпідного обміну внаслідок інтенсифікації перекисного окислення ліпідів.

Відомий препарат для скорочення термінів очищення ран від гнійно-некротичних мас і прискорення репаративних процесів за рахунок розширення спектра протимікробної дії лікарського препарату і ліквідації тканинної ішемії в патологічному вогнищі є препарат "Іодметроксід", що складається з кристалічного йоду, метронідазолу, диметилсульфоксиду (ДМСО) і гліцерину в наступних співвідношеннях на 100,0 мл розчину: кристалічний йод 300,0-800,0 мг, метронідазол 250,0-500,0 мг, диметилсульфоксид 30,0-40,0 мл, гліцерин до 100,0 мл. Основними бактерицидними інгредієнтами у пропонованій лікарській суміші є кристалічний йод і метронідазол. ДМСО використовують як розчинник, сприяючий проникненню інгредієнтів суміші вглиб тканин. Гліцерин є стабілізатором і розріджувачем лікарської суміші. Виходячи з вищевикладеного, пропонується комплексна лікарська суміш для лікування гнійних ран різної етіології, відмітними ознаками якої є комбінований антибактеріальний ефект відносно аеробі-анаеробних асоціацій мікроорганізмів без загального та місцевого токсичної дії на органи і тканини, глибокий механізм дії. (Патент RU № 2080864, заявка № 93050760/14 від 09.11.1993, опубл. 10.06.1997. МПК А61K33/18, А61K31/41, А61K31/10.)

До недоліків препарату слід віднести те, що ефективність препарату все ж при багатьох бактеріальних захворюваннях недостатня, особливо при важких бактеріальних інфекціях. Також негативною стороною антибактеріальної терапії є те, що вона сприяє подальшому формуванню полірезистентних штамів ентеробактерій, розвитку дисбактеріозу, може надати токсичну і сенсibilізуючий вплив на організм. Відомий спосіб отримання препарату для профілактики і лікування синьогнійної інфекції шляхом відбору вірулентної культури Ї збудника синьогнійної інфекції, посіву її на живильне середовище і інкубування з подальшою дезінтеграцією мікробних клітин, концентрування отриманої суспензії, виділенням і очищенням цільового продукту, з метою підвищення ефективності препарату і спрощення способу відбирають декілька

вірулентних штамів синьогнійної палички, різних за серотипом і виділяють протеази і нуклеази, висівають їх на живильне середовище, що містить в дистильованій воді $2,0 \pm 0,1$ ваг. % пептону, $1,0 \pm 0,1$ ваг. % глюкози (Патент RU № 688195, МПК А61К39/02.)

До недоліків препарату слід віднести те, що його застосування занадто ускладнене.

5 Взятий за найближчий аналог препарат, що являє собою ранозагоювальне покриття, що містить стафілопротейно-синьогнійну вакцину (СПСА-вакцина) і основу, що виконана у вигляді пластини, а як основу містить колаген, що розсмоктується, при наступному співвідношенні компонентів, мас. %: СПСА-вакцина - 30-50, колаген - 50-70 (Патент RU № 2180241, дата подачі 18.04.2000., опубл. 10.03.2002).

10 До недоліків зазначеного препарату слід віднести те, що якісний та кількісний склад компонентів не забезпечує достатньо високий рівень та широкий спектр специфічної активності до інфекцій та не зменшує наявності побічних ефектів і протипоказань, а саме рецидивів захворювання якоюсь з інфекцій. Недоліком цього препарату, заснованого на вакцинації та пасивній імунізації, що зазвичай досягається шляхом введення пацієнтові моноклонального антитіла, специфічного щодо імуногена, продукованого патогенним організмом, представляється лише ефективним в лікуванні пацієнтів з ослабленим імунітетом, які не здатні відповісти на вакцинацію, і пацієнтів, які потребують екстреної терапії, які не можуть чекати, поки вакцинація дасть ефект.

20 У зв'язку з цим великий науково-практичний інтерес представляє сполука rIL-7, фармацевтична композиція, в якій як активний інгредієнт вибрано rIL-7, лікарський засіб, на основі запропонованої композиції, що заявляється, і який спонукає імунну систему стати на захист організму.

25 Треба відзначити, що в процесі розвитку мікробної інфекції імунна система пускає в хід різні адаптивні механізми. Одним і, можливо, найбільш важливим з таких механізмів є продукування антитіл. Антитіла, здатні зв'язувати антигени, інфікуються агентом, продукуються і зв'язуються з мікроорганізмами за допомогою активації комплементу, рекрутингу макрофага і за допомогою прямої взаємодії з самим мікробом, створюючи можливість знищення мікробів. Терапевтична ефективність антитіл, здатних зв'язуватися з даним антигеном, різна, і це фактично означає, що продукція антитіл дозріває в процесі розвитку інфекції і стає максимально специфічною в тих випадках, коли пацієнт успішно бореться з інфекцією. Під час інфекційного захворювання антитіла, здатні зв'язуватися з патогенним організмом, відбираються в процесі змін в популяції В-клітин, що призводить до ключових антитіл, що продукуються у великих кількостях. Механізми зазначених змін включають в себе клональне зростання, перемикання ізотипів і соматичну мутацію варіабельних областей імуноглобуліну. В-клітини, відповідальні за вироблення антитіл, які здатні зв'язувати патогенний організм, розмножуються, викликаючи таким чином зрушення в репертуарі В-клітин і змінюючи співвідношення В-клітин.

30 В основу корисної моделі поставлено задачу визначити активність сполуки rIL7, для подальшої розробки фармацевтичної композиції, що буде містити rIL7, для подальшого створення лікарського засобу, більш ефективного при лікуванні бактеріальних інфекцій, що дозволять знизити летальність і скоротити терміни лікування за рахунок препарату, здатного регулювати гомеостаз імунної системи, завдяки його здатності підтримувати баланс між процесами апоптозу і проліферації тимоцитів, наївних Т-лімфоцитів і клітин пам'яті і тим самим, забезпечувати постійність чисельності і функціональної активності цих популяцій.

45 Поставлена задача вирішується тим, що встановлено, що рекомбінантний інтерлейкін-7 людини rIL7 має антибактеріальну активність та його можна застосовувати при лікуванні ранової інфекції, викликаной *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*.

50 Інтерлейкін-7 людини (IL7) - лімфопоетичний фактор росту належить до коротколанцюгових цитокінів 1-го типу родини гематопоетину, займає особливе положення серед інших цитокінів внаслідок його унікальної функції в гематопоезі, який не дублюється іншими факторами. Відсутність функціонального IL-7 може бути однією з причин важкого комбінованого імунодефіциту.

55 У вілочковій залозі IL-7 приймає активну участь в регуляції декількох процесів. По-перше, IL-7 потрібний для проліферації і дозрівання в тимусі ранішніх клітин-попередників Т-лімфоцитів. В регуляції цього процесу IL-7 діє разом із ствольним клітинним фактором. По-друге, присутність IL-7 необхідна для виживання дозріваючих клітин-попередників Т-лімфоцитів. Цей ефект обумовлений здатністю IL-7 блокувати їх програмовану клітинну загибель (апоптоз) завдяки підсилення експресії білків-інгібіторів апоптозу (наприклад Bcl-2, Mcl-1 і зниження рівня про-апоптогенних білків. По третє, IL-7 запускає в тимусі процес реаранжировки генів антиген-розпізнаючого рецептора Т-клітин (TCR). По-четверте, IL-7 сприяє дозріванню CD8 Т-

лімфоцитів шляхом пригнічення транскрипції молекули CD4 в клітинах-попередниках, тобто в "подвійних позитивних" тимоцитах.

Покинувши вілочкову залозу, Т-лімфоцити як і раніше знаходяться під контролем цього цитокіну. По-перше, IL-7 є незамінним фактором виживання "наївних" Т-лімфоцитів. Це підтверджують результати досліджень, проведених як *in vitro*, так і *in vivo* [4]. Крім цього, IL-7 є одним із цитокінів, що підтримують гомеостаз антиген-специфічних CD4 і CD8-клітин пам'яті, регулюючи в них процеси апоптозу, а також рівень їх фонової проліферації і, тим самим, підтримуючи сталість численності цих популяцій. По-друге, IL-7 здатний виступати як кофактор при антигенній (особливо субпороговій) стимуляції Т-лімфоцитів, забезпечуючи, тим самим, їх проліферацію, синтез і секрецію ними цитокінів. Цей ефект може бути частково обумовлений здатністю IL-7 підвищувати експресію рецептора до IL-2 на поверхні Т-лімфоцитів, що, в свою чергу, підвищує сприйнятливості клітин до активаційних сигналів. Сполучання першого і другого вищеназваних ефектів IL-7 підтверджує значимість даного цитокіну для формування пулів клітин-пам'яті при антигенній стимуляції *in vivo*. Це підтверджують результати досліджень, які встановили значне зниження кількості клітин пам'яті після антигенної стимуляції, проведеної на фоні низьких концентрацій IL-7. По третє, незважаючи на те, що IL-7 не є ключовим цитокіном в регуляції балансу між Т-хелперами 1 і 2 типів (Th1/Th2), його здатність підвищувати синтез інтерферону (IFN) і IL-2, а також підсилювати IL-12 індуквану проліферацію та диференціювання Т-лімфоцитів, що супроводжується секрецією IFN, безумовно, здатна спрямувати диференціювання Т-хелперів в бік Th1 ланцюга. По четверте, IL-7 здатний підсилити функціональну активність цитотоксичних Т-лімфоцитів, природних кілерів (NK) і NKT-клітин, а також CD4-CD8 клітин. Одним із можливих механізмів підсилення цитотоксичного потенціалу лімфоцитів в результаті впливу на них IL-7 є підсилення експресії перфोरину та інших пороформуючих білків, а також синтезу IFN. IL-7 також здатний індукувати утворення лімфокін-активованих кілерів (ЛАК) із NK-клітин, і підсилювати аналогічний ефект, що викликає IL-2.

Крім цього, IL-7 обумовлює антигеннезалежне розмноження Т-лімфоцитів поза тимусу: IL-7, синтезуючий ентероцитами, сприяє дозріванню Т-лімфоцитів в слизовій оболонці кишечника.

Таким чином, можна говорити про те, що IL-7 здатний регулювати гомеостаз імунної системи завдяки його здатності підтримувати баланс між процесами апоптозу і проліферації тимоцитів, наївних Т-лімфоцитів і клітин пам'яті і тим самим, забезпечувати постійність чисельності і функціональної активності цих популяцій. Це підтверджують дані про існування зворотної залежності між кількістю лімфоцитів (в першу чергу, CD4 лімфоцитів) і рівнем IL-7 в периферичній крові у осіб з різною патологією, незважаючи на різний ґенез зниження рівня CD4 лімфоцитів. Вперше подібна закономірність була виявлена у осіб, що перенесли трансплантацію кісткового мозку і пройшли курси хіміотерапії. В подальшому була виявлена зворотна залежність між рівнем IL-7 в сироватці і ступенем зниження кількості CD4 лімфоцитів у онкологічних хворих, що одержували курси хіміотерапії, а також у пацієнтів з ідіопатичною лімфопенією.

Технічний результат, який отримують при здійсненні корисної моделі, полягає у досягненні високого рівня та широкого спектру здатності rIL-7 до модуляції Т- і В-клітинної відповіді і Т-клітинного гомеостазу, взаємодії з мембранними структурами клітин, регуляцію каскаду внутрішньоклітинних ферментів, що забезпечують захисні механізми клітин, а також вплив на апоптоз клітин, можливо припустити, що препарати rIL-7 не лише мають властивість впливати на формування специфічного імунітету та імунодефіцитного стану, а й інгібувати репродукцію вірусів як *in vitro*, так і *in vivo*.

Наводимо конкретні приклади здійснення корисної моделі.

Приклад 1. Вивчення впливу rIL-7 при інфекції, викликаній резистентним штамом *Pseudomonas aeruginosa*.

Для дослідження використовували препарат rIL-7 у концентрації 30 мкг/мл; 20 мкг/мл. Модель: миші білі неінбредні (безпородні) вагою 14-18 г. Збудник модельованої інфекції: *Pseudomonas aeruginosa* належить до групи неферментуючих бактерій (НФБ). Як правило, ця група включає хемоорганотрофні грамнегативні мікроорганізми, які належать до різних родин та родів, що об'єднані за відсутністю здатності здійснювати процеси бродиння (розщеплення вуглеводів в анаеробних умовах). При цьому частина НФБ характеризується повною інертністю, друга - здатністю до окислення глюкози. Для диференціації НФБ від інших грамнегативних бактерій використовується мінімальний набір тестів, ґрунтований на вивченні метаболізму глюкози, здатності до росту на селективних диференціально-діагностичних середовищах, визначенні цитохромоксидази, нітратредуктази і рухливості.

Pseudomonas aeruginosa належить до роду *Pseudomonas*, родини *Pseudomonadaceae*. Морфологія. Представники роду *Pseudomonas* прямі або зігнуті, але не спіральні, палички 0,5-

1,0 × 1,5-5,0 мкм. Грамнегативні. Рухливі за рахунок одного або декількох полярних джгутиків. Спор не утворюють, окремі штами *Pseudomonas aeruginosa* оточені слизовим шаром, що нагадує капсулу у *Klebsiella* spp. *Pseudomonas aeruginosa* - це грамнегативні палички розміром 1-3 мкм в довжину та 0,5-1 мкм завширшки. У мазку з чистої культури палички можуть

розташовуватися поодинокі, парами або утворювати короткі ланцюжки. Культуральні властивості. Строгі аероби. Метаболізм чисто дихального типу з використанням кисню як кінцевого акцептора електронів. Не ростуть у кислому середовищі (рН 4,5). Добре ростуть на звичайних середовищах: агар Мак-Конкі, Ендо, простий поживний агар. Багато штамів продукує пігменти (жовті, зелені), що полегшує їх диференціацію.

Характерною біологічною ознакою виду *Pseudomonas aeruginosa*, що значно спрощує ідентифікацію приблизно 70-80 % штамів, є унікальна здатність цього мікроорганізму синтезувати водорозчинний феназіновий пігмент - піоціанін, що забарвлює поживне середовище або пов'язки хворих у синє-зелений колір. Крім цього, переважна більшість культур утворює пігмент флюоресцеїн або піовердин. При культивуванні на поживних середовищах *Pseudomonas aeruginosa* синтезує триметиламін, який надає культурам своєрідний характерний запах, який нагадує запах жасмину, полуничного мила або карамелі.

Характеристика збудника інфекції. Штам *Pseudomonas aeruginosa* з типовими характерними для виду властивостями: рухливий, має пігменти піоціанін, флюоресцеїн, синтезує триметиламін, оксидазо- та каталазопозитивний, дає гемоліз на кров'яному агарі, росте при +42 °С, не росте при +5 °С, відновлює нітрати до нітритів, має позитивну аргініндегідролазу, негативні лізин та орнітин декарбоксилази; утворює кислоту з глюкози. На середовищах Ендо, МПА колонії цього штаму *Pseudomonas aeruginosa* складчасті, нагадують "квітки маргаритки".

Відрізняється резистентністю до наступних антибіотиків: ципрофлоксацину, цефтазидіму, амікацину, цефепіму, меропенему. Чутливий до колістину.

Штам резистентний до дії багатьох дезінфектантів: септаміну, санідезу, максисану, дисмозону, саніфекту, солізму, ентактиву, дезекону та інших.

Поживні середовища: ГРМ-агар, середовище Мюллер-Хінтона, агар Ендо.

Моделювання ранової інфекції у мишей. До експерименту залучено 10 мишей. Шерсть на заживку тварин вистригли, нанесли рану 1-1,5 см лезом безпечної бритви.

Культуру *Pseudomonas aeruginosa* вирощували протягом 24 годин на м'ясо-пептонному агарі в термостаті при температурі +37±1 °С. З 24-годинної культури зробили бактеріальний інокулят, каламутність якого відповідала 10 одиницям за стандартним зразком каламутності (ОСЗ 42-28-85-01 П), що орієнтовно відповідає наступній концентрації бактеріальних клітин в 1 мл: 0,08·10⁹ кл./мл.

Кожній миші було внесено в рану по 0,1 мл бактеріальної суспензії.

Результати досліджень. Було зафіксовано наступні клінічні прояви розвитку синегнійної інфекції: гіперемія тканин навколо рани, біль в ділянці рани, обмежений набряк, достатнє розходження країв рани, гнійні виділення з розрізу.

На 2 добу були взяті посіви з ран з метою виділення збудника інфекції та з'ясування його кількості. Посіви було внесено в пробірки з 10 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію. З кожної пробірки було зроблено висів на чашки з м'ясо-пептонним агаром в кількості 0,1 мл з подальшим втиранням в поверхню середовища за допомогою шпателя. Чашки інкубували при температурі +37±1 °С протягом 24 годин. Наступної доби кількість вирослих колоній на агарі підраховували. На 3 добу від початку нанесення рани і зараження кількість мікробних клітин *Pseudomonas aeruginosa* в перерахунку на 1 см² поверхні рани коливалася в діапазоні від 1,0·10² до 1,0·10⁶ мікробних клітин на 1 см² (мк/см²).

На 2 добу було сформовано дві експериментальні групи тварин: дослідну та контрольну, по 5 мишей в кожній. Кожна тварина знаходилася в окремій клітці. Кожній дослідній миші починаючи з 3-ї доби від початку експерименту внутрішньочеревно вводили 5 мкг (0,1 мл) rIL-7. В контрольній групі тварин rIL-7 не вводили.

На 5-ту добу від початку експерименту (на 3 добу від початку введення rIL-7) знову було взято посіви з ран для визначення якісного та кількісного знаходження збудника *Pseudomonas aeruginosa* в матеріалі, відокремленому з рани. Згідно з наказом МОЗ України №236 від 04.04.2012р. "Про організацію контролю та профілактики післяопераційних гнійно-запальних інфекцій, спричинених мікроорганізмами, резистентними до дії антимікробних препаратів" та наказом МОЗ СРСР №535 від 22.04.1985р. "Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений" факт виділення мікроорганізму з рани є свідченням його етіологічного значення в інфекційному гнійно-запальному процесі.

Отримані дані свідчать, що на 5 добу від початку експерименту у мишей дослідної групи, що отримували rIL-7 внутрішньочеревно, кількість мікробних клітин *Pseudomonas aeruginosa* в перерахунку на 1 см² ранової поверхні коливалася від $1,0 \cdot 10^4$ мк/см² (найменше значення) до $5,0 \cdot 10^5$ мк/см² (найбільше значення). У мишей контрольної групи, що не отримували лікування,

кількість мікробних клітин *Pseudomonas aeruginosa* в перерахунку на 1 см² ранової поверхні коливалася від $3,0 \cdot 10^3$ мк/см² (найменше значення) до $1,0 \cdot 10^4$ мк/см² (найбільше значення), що є на один порядок більше в максимальному значенні, ніж у мишей дослідної групи.

Зовнішні прояви ранової інфекції у мишей обох груп на п'яту добу від нанесення рани зараження *Pseudomonas aeruginosa* були такі ж самі, як і на третю добу, але більш яскраво виражені.

На сьому добу від початку досліду у мишей, що отримували лікування rIL-7, відмічено добре виражену тенденцію до загоєння рани (підсихання, утворення кірочок). Було взято посіви на наявність збудника синегнійної інфекції, які показали, що у чотирьох мишей з дослідної групи (ті, що отримували лікування) *Pseudomonas aeruginosa* з поверхні рани повністю зникла і тільки у однієї миші кількість мікробних клітин на 1 см ранової поверхні залишалася ще досить високою $1,0 \cdot 10^4$ мк/см².

У контрольної групи мишей на сьому добу навпаки: тільки у однієї дослідної тварини *Pseudomonas aeruginosa* з рани не виділена, у інших чотирьох мишей кількість мікробних клітин *Pseudomonas aeruginosa* в перерахунку на 1 см² ранової поверхні коливалася від $1,0 \cdot 10^3$ мк/см² до $1,0 \cdot 10^5$ мк/см². Ознаки інфікування рани у контрольних тварин досі присутні: є гіперемія, утворення струпів, хоча тенденція до загоєння теж є.

На 9-ту добу у мишей, що отримували лікування rIL-7, при зовнішньому добре відзначеному загоєнні рани, відбулася повна елімінація збудника *Pseudomonas aeruginosa*, про це свідчать посіви з ран, взяті на 9 добу.

На 9-ту добу у трьох мишей з контрольної групи теж є тенденція до загоювання та повна елімінація збудника. У двох мишей з цієї групи зберігаються ознаки інфікування рани, що підтверджується мікробіологічними посівами, де кількість збудника *Pseudomonas aeruginosa* зберігається на достатньо високому рівні - в кількості $1,0 \cdot 10^5$ клітин на 1 см² поверхні рани.

На 12 добу у дослідної групи мишей відзначається практично повне загоєння рани аж до початку відновлення шерстяного покриву. *Pseudomonas aeruginosa* з ран не виділяється.

У трьох мишей з контрольної групи на 12 добу експерименту збудника в посівах з ран не виділено, відбувається загоєння рани. У двох мишей зберігаються ознаки інфікування рани, але значно приглушені. Збудник *Pseudomonas aeruginosa* на 1 см² поверхні рани виділяється в значно меншій кількості $3,0 \cdot 10^3$; $5,0 \cdot 10^3$ мікробних клітин.

Повна елімінація збудника з поверхні рани у мишей контрольної групи відбулася на 14 добу від початку нанесення рани і інфікування синегнійною інфекцією. Стан повного загоєння ран теж припадає на цей день.

Таким чином, у 80 % дослідних тварин, яким вводили внутрішньочеревно rIL-7, загоєння ран і елімінація збудника гнійно-запальної інфекції *Pseudomonas aeruginosa* відбувається на сьому добу. На 9-ту добу від початку нанесення рани і зараження збудником синегнійної інфекції відбувається загоєння ран і елімінація збудника гнійно-запальної інфекції *Pseudomonas aeruginosa* у 100 % мишей.

У 60 % мишей з контрольної групи, що не отримували лікування rIL-7, загоєння ран і елімінація збудника *Pseudomonas aeruginosa* відбувається на 9 добу. Загоєння ран і елімінація збудника гнійно-запальної інфекції *Pseudomonas aeruginosa* у всіх мишей контрольної групи відбувається на 14 добу.

Тобто у мишей, що отримували лікування rIL-7, загоєння ран і елімінація збудника відбувається на 5 днів раніше, ніж у мишей з контрольної групи.

Приклад 2. Вивчення впливу rIL-7 при інфекції, викликаній резистентним штамом *Staphylococcus aureus*.

Для дослідження використовували препарат rIL-7 у концентрації 30 мкг/мл; 20 мкг/мл. Модель: миші білі неінbredні (безпородні) вагою 14-18 г. Збудник модельованої інфекції: *Staphylococcus aureus* відноситься до роду *Staphylococcus* родини *Micrococcaceae*.

Культуральні властивості. До роду *Staphylococcus* належать факультативні анаероби, які все ж таки активніше ростуть в присутні кисню. Добре ростуть на простих поживних середовищах. Температурний оптимум росту для них +35-40 °C, оптимум pH для них: 7,0-7,5, але можливий ріст при pH від 4,2 до 9,3. Добре вигримують підвищений осмотичний тиск, тому селективними середовищами для них слугують середовища з високим вмістом солі - жовтково-сольовий агар, на якому зазвичай утворюють колонії, оточені веселковим віночком за рахунок утворення ферменту лецитовеліази.

Морфологія. Представники роду *Staphylococcus* - це грампозитивні бактерії, мають форму правильної кулі діаметром 0,5-1,5 мкм, діляться в декількох площинах, утворюючи скупчення у вигляді гронів винограду. Нерухливі. Біохімічно активні: продукують каталазу, утворюють ацетон на середовищі з глюкозою в реакції Фогеса-Проскауера, відновлюють нітрати до нітритів, гідролізують білки, гіпурат, жири, розщеплюють вуглеводи в аеробних умовах до оцтової кислоти і вуглекислого газу. Родовою ознакою є ферментація глюкози в анаеробних умовах з утворенням молочної кислоти.

Характеристика збудника інфекції. Штам *Staphylococcus aureus* каталазопозитивний, дає гемоліз на кров'яному агарі, має жовтий пігмент при рості на жовтково-сольовому агарі, володіє лецитоветілазною активністю. Штам коагулює плазму кролика та має ДНК-азу.

Клінічний штам *Staphylococcus aureus* виділено від хворого хірургічного профілю при спорадичній захворюваності.

Штам відрізняється резистентністю до оксациліну та пеніциліну.

Поживні середовища: ГРМ-агар, середовище Мюллер-Хінтона, жовтково-сольовий агар.

Моделювання ранової інфекції. До експерименту залучено 6 мишей. Шерсть на загривку тварин вистригли, нанесли рану 0,5 см лезом безпечної бритви.

Культуру *Staphylococcus aureus* вирощували протягом 24 годин на м'ясо-пептонному агарі в термостаті при температурі $+37 \pm 1$ °C. З 24-годинної культури зробили бактеріальний інокулят, каламутність якого відповідала 5 одиницям за стандартним зразком каламутності (ОСЗ 42-28-85-01 П), що орієнтовно відповідає наступній концентрації бактеріальних клітин в 1 мл: $0,04 \cdot 10^9$ кл./мл.

Кожній миші було внесено в рану по 0,1 мл бактеріальної суспензії.

Результати досліджень. На третю добу від початку зараження були взяті посіви з ран з метою виділення збудника інфекції та з'ясування його кількості. Матеріал було внесено в пробірки з 10 мл стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію. З кожної пробірки було зроблено висів на чашки з жовтково-сольовим агаром в кількості 0,1 мл з подальшим втиранням в поверхню середовища за допомогою шпателя. Чашки інкубували при температурі $+37 \pm 1$ °C протягом 24 годин. Наступної доби кількість колоній, що вирости на агарі, підраховували. На 3-ю добу від початку нанесення рани і зараження кількість мікробних клітин *Staphylococcus aureus* в перерахунку на 1 см² поверхні рани коливалася в діапазоні від $1,2 \cdot 10^3$ до $1,5 \cdot 10^4$ мк/см².

Клінічні прояви ранової інфекції. У всіх мишей спостерігали невелику гіперемію ділянки рани. У трьох мишей - ознаки запалення в ділянці рани. У двох мишей незначні гнійні виділення. Однак у всіх мишей відзначалася чітка тенденція до загоєння вже на 3 добу.

Тому після відбору матеріалу для посіву на *Staphylococcus aureus*, провели повторне зараження бактеріальною суспензією *Staphylococcus aureus*, каламутність якої відповідала 10 одиницям за стандартним зразком каламутності (ОСЗ 42-28-85-01 П), що орієнтовно відповідає наступній концентрації бактеріальних клітин в 1 мл: $0,08 \cdot 10^9$ кл./мл. Кожній миші знову було внесено в рану по 0,1 мл бактеріальної суспензії.

На 6-ту добу від початку експерименту знову було взято посіви з ран для визначення якісного та кількісного знаходження збудника *Staphylococcus aureus* в матеріалі, відокремленому з рани. Кількість мікробних клітин *Staphylococcus aureus* в перерахунку на 1 см² ранової поверхні коливалася від $1,8 \cdot 10^3$ мк/см² (найменше значення) до $1,64 \cdot 10^5$ мк/см² (найбільше значення). У тварин дослідної групи спостерігали загоєння рани.

На 10-ту добу спостерігали загоєння рани вже у всіх мишей. Посіви матеріалу з ран показали, що у двох мишей відбулася спонтанна елімінація збудника; у двох мишей *Staphylococcus aureus* виділявся в кількості $1,0-2,0 \cdot 10^2$ мк/см²; ще у двох кількість мікробних клітин *Staphylococcus aureus* в перерахунку на 1 см² ранової поверхні коливалася від $2,0 \cdot 10^3$ мк/см² до $1,5 \cdot 10^4$ мк/см².

На 14 добу у всіх тварин відбулася повна елімінація *Staphylococcus aureus* з поверхні ран. В клінічному відношенні спостерігали повне загоєння ран.

При посівах крові на стерильність *Staphylococcus aureus* виділено не було.

Якісний і кількісний склад лікарського засобу, що заявляється, повністю виконує поставлену корисною моделлю задачу зі створення високоефективного засобу. Введення екзогенного rIL-7 нормальним мишам призводить до значного збільшення преВ та зрілих В-клітин, що разом з активацією Т-клітинної відповіді може бути підставою для використання препарату як ад'ювантної терапії при імунodefіцитних станах і вакцинації.

Таким чином, IL-7 є одним з найважливіших регуляторних цитокінів імунної системи, який конститутивно секретується клітинами кісткового мозку та периферичними лімфоїдними органами. IL-7 є критично необхідним для розвитку та підтримання гомеостазу лімфоїдної тканини. До основних функцій IL-7 належать регуляція активації, росту та виживання клітин

імунної системи. Також було продемонстровано, що він може індукувати синтез моноцитами прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IL-6, IL-8 та TNF-1 α , сприяти виживанню еозинофілів та нейронів гіпокампу, а також бере участь у формуванні остеобластів. В той же час гама-ланцюг рецептора IL-7 є загальним для рецепторів IL-2, IL-4, IL-9, IL-15, IL-21. Має зв'язок із зовнішньоклітинними матрикс-асоційованими глікозаміногліканами, гепаран-сульфатами і фібронектином, які є рецепторами адсорбції для багатьох вірусів.

Враховуючи здатність IL-7 до модуляції T- і B-клітинної відповіді і T-клітинного гомеостазу, взаємодії з мембранними структурами клітин, регуляцію каскаду внутрішньоклітинних ферментів, що забезпечують захисні механізми клітин, а також вплив на апоптоз клітин, можливо припустити, що препарати IL-7 не лише мають властивість впливати на формування специфічного імунітету та імунодефіцитного стану, а й інгібувати репродукцію вірусів як *in vitro*, так і *in vivo*.

Слід зазначити, що препарати IL-7 можуть виготовлятися як лікарські засоби для парантерального, орального, місцевого, зовнішнього застосування та можуть бути виконані у формі ліофілізату для розчину для ін'єкцій, розчині для ін'єкцій, розчинів для місцевого застосування, мазей, капсул.

Для різних лікарських форм застосовують різні методики перерахунку дози діючої речовини, яка використана під час доклінічних досліджень на тваринних моделях, у терапевтичну дозу для використання людиною. Зважаючи на різний спектр коефіцієнтів перерахунку еквівалентних доз людини, а також рекомендації щодо рекомендованих доз IL-7 для лікування арфаних (рідкісних) захворювань, нами пропонується застосування IL-7 як антимікробного агента у дозі від 1 до 100 мкг rIL-7 на 1 кг маси тіла людини.

Препарат rIL-7 виявився ефективним при лікуванні інфекцій, що викликані при лікуванні ранової інфекції, викликані *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*. При застосуванні схеми лікування - введення препарату rIL-7 внутрішньочеревно по 0,1 мл у дозі 5 мкг/мл щодобово упродовж 5 діб тваринам з експериментальною рановою інфекцією, загоєння ран та елімінація збудника відбувається раніше, ніж у тварин контрольної групи.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (rIL-7), що має антибактеріальну активність.
2. Рекомбінантний інтерлейкін-7 людини (rIL-7) за п. 1, який **відрізняється** тим, що призначений для лікування інфекційних захворювань, викликаних *Pseudomonas aeruginosa* та *Staphylococcus aureus*.

Комп'ютерна верстка Д. Шеврун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601