



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80870** (13) **C2**
(51) **МПК (2006)**
A61K 38/22
A61P 31/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АБО ЗАПОБІГАННЯ ІНФЕКЦІЇ, ЯКА ВИКЛИКАЄТЬСЯ ГРИБАМИ РОДУ ASPERGILLUS ЗА ДОПОМОГОЮ ТИМОЗИНУ АЛЬФА 1

1

2

(21) а200509921

(22) 29.03.2004

(24) 12.11.2007

(86) PCT/US2004/009550, 29.03.2004

(31) 60/457,911

(32) 28.03.2003

(33) US

(72) РАЗІ ГУІДО, ГАРАЧІ ЕНРІКО, БІСТОНІ
ФРАНЧЕСКО, РОМАНІ ЛУІДЖІНА, ДІ ФРАНЧЕСКО
ПАОЛО

(73) САЙКЛОН ФАРМАСЮТИКАЛС, ІНК.

(56) ROMANI L. ET AL: 'Thymosin 1 activates
dendritic cells for antifungal Th1 resistance through
Toll-like receptor signaling' BLOOD vol. 103, no. 11,
01 June 2004, pages 4232 - 4239
US 6001799 A, 14.12.1999

(57) 1. Спосіб лікування або запобігання інфекції,
яка викликається грибом роду *Aspergillus*, у
ссавця, який полягає в тому, що ссавцю вводять
фармацевтичну композицію, яка містить кількість
тимозину альфа 1 (TA1), що має ефективну
протигрибкову дію.

2. Спосіб за п. 1, у якому TA1 вводять у дозі,
достатній для активації дендритних клітин для
продукування цитокінів, які стимулюють Th1-
клітини.

3. Спосіб за п. 1, у якому TA1 вводять у дозі, що
становить від 200 до 400 мкг/кг ваги тіла/день.

4. Спосіб за п. 1, у якому ссавець являє собою
хазяїна з ослабленим імунітетом.

5. Спосіб за п. 4, у якому ссавець являє собою
людину.

6. Спосіб за п. 5, у якому людина є реципієнтом
трансплантата кісткового мозку.

7. Спосіб за п. 5, у якому TA1 вводять для
активації дендритних клітин для продукування
цитокінів, які стимулюють Th1-клітини.

8. Спосіб за п. 5, у якому TA1 вводять у дозі, що
становить від 200 до 400 мкг/кг ваги тіла/день.

9. Спосіб за п. 1, який додатково полягає в тому,
що пацієнту вводять принаймні один додатковий
протигрибковий агент.

10. Спосіб за п. 9, у якому додатковий
протигрибковий агент являє собою амфотерицин
В.

11. Спосіб за п. 10, у якому амфотерицин В
вводять у дозі 4000 мкг/кг ваги тіла/день.

12. Спосіб за п. 1, у якому інфекція, яка
викликається грибами роду *Aspergillus*, являє
собою інвазивний аспергільоз.

Дана заявка претендує на пріоритет
попередньої [заявки 60/457911, поданої 28
березня 2003 р.].

Даний винахід стосується лікування грибних
інфекцій. Зокрема даний винахід стосується
лікування й запобігання інфекцій, які викликаються
грибами р. *Aspergillus*, таких як інвазивний
аспергільоз, зв'язаний із трансплантаціями
кісткового мозку.

Передумови створення винаходу

Інвазивний аспергільоз (ІА), який
характеризується інвазією гіфів, руйнуванням
легеневої тканини й дисемінацією в інші органи, є
основною причиною як нозокоміальної
(внутрішньолікарняної) пневмонії, так і смерті при
алогенній трансплантації кісткового мозку (ТКМ),

причому встановлено, що коефіцієнт інфекційного
зараження становить 5-10%, а коефіцієнт зв'язаної
з ним смертності становить 90-100%. Раніше
найбільш важливим фактором ризику для
виникнення ІА була нейтропенія, при цьому на
мишиній моделі алогенної ТКМ було встановлено,
що відновлення мієлоїдних попередників може
служити захистом від ІА. Однак сучасні
дослідження епідеміології ІА в реципієнтів,
підданих ТКМ, свідчать про зниження кількості
випадків інфекції, зв'язаної з нейтропенією, і про
збільшення кількості випадків інфекції з
"запізнілим початком", що супроводжуються
реакцією «трансплантат проти хазяїна».

(13) **C2**

(11) **80870**

(19) **UA**

Таким чином, у даній галузі існує необхідність у розробці способів лікування інфекції, яка викликається грибами р. *Aspergillus*.

У даному винаході запропонований спосіб лікування або запобігання інфекції, яка викликається грибами р. *Aspergillus* у ссавців, який полягає в тому, що ссавцеві вводять фармацевтичну композицію, яка містить кількість тимозину альфа 1 (ТА1), що має ефективну протигрибкову дію.

У клінічних й експериментальних дослідженнях встановлено, що для контролю ІА важлива реактивність Th1-клітин. Дендритні клітини (ДК) зумовлюють примування Th1-клітинами грибами *in vivo* й *in vitro*. Є дані про те, що на здатність легеневих ДК викликати відповідні Т-клітинні відповіді на грибіні антигени можуть впливати локальні імунорегуляторні каскади, у тому числі передача сигналу через Толл-подібні рецептори (ТПР). ДК можуть являти собою перспективні мішені для впливу при розробці імунотерапії й вакцин, і це змінює основний напрямок фармацевтичних розробок в бік «ад'юванту». Переважним є ад'ювант, який має, як здатність стимулювати відповідний тип відповіді, найбільш придатний для боротьби з інфекцією, так й ефективність в умовах імуносупресії.

Тимозин альфа 1 (ТА1) являє собою тимусний пептид, який зустрічається в природних умовах. ТА1 у формі синтетичного пептиду, що складається з 28 амінокислот, застосовують в усьому світі в клінічних умовах для лікування деяких вірусних інфекцій або як єдиний терапевтичний засіб, або в сполученні з інтерфероном альфа. ТА1 знаходить застосування також при лікуванні імунodefіцитних станів, злоякісних захворювань і ВІЛ/СНІДу. Механізм дії синтетичного поліпептиду ТА1 у цей час не повністю вивчений, однак існує думка, що він зв'язаний із властивими поліпептиду імунomodulatory активностями, спрямованими в основному на посилення функції Т-клітин. Внаслідок його імунomodulatory дії на клітини природної імунної системи, включаючи здатність активувати активовані мітогеном протеїнкінази (МАРК) і експресію генів на макрофагах, автори винаходу розглядали ТА1 як ад'ювант, який має здатність активувати ДК для примування Th1-клітин відносно грибів р. *Aspergillus*. У даному винаході запропонований спосіб лікування інфекцій, що викликаються грибами р. *Aspergillus*, який полягає в тому, що ТА1 шляхом передачі сигналу через ТПР може активувати ДК для протигрибкового примування Th1.

У даному винаході запропонований спосіб лікування ссавця, інфікованого грибами р. *Aspergillus*, який полягає в тому, що такому ссавцеві вводять кількість тимозину альфа 1 (ТА1), що має ефективну протигрибкову дію. У переважному варіанті здійснення винаходу ТА1 має ефективність у відношенні інвазивного аспергілозу (ІА). Ефективна доза ТА1 є достатньою для активації дендритних клітин для продукування стимулюючих Th1-клітини цитокінів.

Переважна доза для лікування грибової інфекції становить від 200 до 400мкг/кг ваги тіла на день. У переважному варіанті здійснення винаходу ссавець являє собою хазяїна з ослабленим імунітетом, насамперед людину. Спосіб застосовний, насамперед, для лікування пацієнтів з ослабленим імунітетом, насамперед пацієнтів, які є реципієнтами трансплантатів кісткового мозку.

У даному винаході запропонований також спосіб запобігання інфекції, яка викликається грибами р. *Aspergillus*, у ссавця, який полягає в тому, що такому ссавцеві вводять кількість ТА1, що має ефективну протигрибкову дію. Винахід переважно застосовують для запобігання ІА в хазяїна з ослабленим імунітетом. У переважному варіанті здійснення винаходу спосіб запобігає таким інфекціям в пацієнтів з ослабленим імунітетом, насамперед у пацієнтів, які є реципієнтами трансплантатів кісткового мозку. Ефективна доза ТА1 є достатньою для активації дендритних клітин для продукування стимулюючих Th1-клітини цитокінів. Переважна доза для запобігання грибової інфекції становить від 200 до 400мкг/кг ваги тіла в день.

Не вдаючись у яку-небудь конкретну теорію можна вважати, що даний винахід заснований на відкритті нової імунорегуляторної активності ТА1, яка дозволяє лікувати або запобігати інфекцію, що викликається грибами р. *Aspergillus*. Очевидно, ТА1 підсилює вироблення стимулюючих Th1 цитокінів IL-12 p70, IL-10 й IFN-альфа різними типами ДК за допомогою залежного від MyD88 шляху.

У трансфектованих ТПР клітинах ТА1, очевидно, безпосередньо активує сигнали, що прокуються TLR9, але не TLR2, останній активується у відповідь на відповідні ліганди. Таким чином, ТА1, очевидно, активує продуковані TLR сигнали або безпосередньо, або непрямым способом. Наявні дані дозволяють припустити, що ТА1 може використовувати залежний від TLR2 каскад для вироблення IL-12 p70 на мієлоїдних дендритних клітинах (МДК) і залежний від TLR9 каскад для вироблення IFN-альфа й IL-10 на плазмацитоїдних дендритних клітинах (ПДК).

Оскільки вироблення IL-10 дендритними клітинами (ДК) може являти собою компонент імунологічної пам'яті, що забезпечує захист від грибків, то баланс вироблення IL-12fL-10 на ДК й/або інших піднаборах ДК може зумовлювати дуже більшу роль ад'ювантності ТА1 при аспергілозі.

На мишиній моделі ТКМ обробка ТА1 після зараження грибами р. *Aspergillus* приводила до збільшення кількості CD4⁺ і CO8⁺-клітин, а також до збільшення загальної кількості нейтрофілів. Після обробки ТА1 кількість Th1-клітин (які продукують IFN-гамма) збільшувалася, у той час як кількість Th2-клітин (які продукують IL-4) знижувалася.

Важливо відзначити, що лікування мишей із ТКМ, інфікованих грибами р. *Aspergillus*, за допомогою ТА1 приводило до залежного від дози зменшення росту грибів у легенях, а при

використанні більш високих доз виявлялося можливим досягати повного вилікування інфекції. ТА1 мав також здатність підвищувати терапевтичну ефективність амфотерицину В.

Впливи ТА1 на ДК узгоджуються з його антиапоптозною активністю. Оскільки ДК відіграють основну роль у забезпеченні балансу між імунопатологією, імунітетом й аутоімунітетом, і в тимусі має місце передача сигналу до ПДК через TLR9, то здатність ТА1 здійснювати модуляцію функції ДК є ендogenousним регулятором природної й адаптивної імунних систем, які діють за допомогою використання ТПР. Це забезпечує раціональну основу для терапевтичного призначення ТА1 при деяких вірусних інфекціях, для яких вважається, що ПДК, які продукують IFN-альфа, відіграють основну роль. Для вироблення IFN-альфа в цих ПДК необхідним є присутність TLR9. Крім того, очевидно, ПДК беруть участь в імунних відповідях після трансплантації гематопоетичних клітин, що може пояснити серед іншого причину сприятливого впливу ТА1 на відновлення імунітету в свавців, підданих ТКМ.

ТПР, очевидно, активують природну імунну систему, не тільки допомагаючи адаптивній імунній системі, але й забезпечуючи безпосередню антимікробну ефекторну активність. Оскільки ТА1, очевидно, активують ДК для примування Th1 відносно грибів р. *Aspergillus* і також протигрибковий статус ефекторних нейтрофілів, то це є додатковим доказом сприятливої дії ТА1 при лікуванні грибкових інфекцій.

Гриб р. *Aspergillus* має унікальну природу, яка полягає в тому, що він являє собою сапрофітний гриб, який колонізує хазяїв з ослабленим імунітетом. У даному винаході запропонований цілеспрямований вплив на клітини й шляхи опосередкованого клітинними імунітету, що дозволяє підвищувати стійкість до грибів р. *Aspergillus*, при якому ТА1 є ад'ювантом, який програмує відповідну реактивність Th1 відносно гриба за допомогою використання ТПР-шляху.

Нижче винахід більш докладно проілюстрований на прикладі, який не обмежує його обсяг.

Приклад 1

Тварини

Самок мишей ліній BALB/c й C57BL6 віком 8-10 тижнів одержували від фірми Charles River. Мишей лінії NOD/SCID одержували від фірми The Jackson. З лінії C57BL6 виводили шляхом попарного схрещування гомозиготних мишей з дефіцитом TLR2, TLR9 й MyD88, а з лінії BALB/c виводили гомозиготних мишей з дефіцитом IFN-гамма й IL-4, яких утримували у вільних від конкретного патогену умовах.

Зараження мікроорганізмами й обробки

Для зараження грибом р. *A. fumigatus* мишам протягом 3 послідовних днів вводили шляхом інтраназальної ін'єкції суспензію, яка містить 2×10^7 конідій/20мкл фізіологічного розчину. Для кількісної оцінки росту гриба в легенях застосовували аналіз хітину. Вміст хітину виражали в мікрограмах глюкозаміну на орган. Як

негативний контроль використовували вміст глюкозаміну в легенях неінфікованих мишей, що становив від 0,80 до 2,25мкг глюкозаміну/орган. Для гістологічного аналізу-легені вирізали й відразу ж фіксували у формаліні. Зрізи (товщиною 3-4 мікрони) тканин, занурених у парафін, фарбували методом Шифа з використанням перйодної кислоти. Тимозин альфа 1 (ТА1) і скремблер-поліпептид (модифікований поліпептид) являли собою очищені стерильні ліофілізовані ацетильовані поліпептиди з рівнями ендотоксину менше 0,03 пкг/мл за даними стандартного лімulus-аналізу лізату. Вони мали наступні послідовності: Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-OH (тимозин альфа 1) і Ac-A1a-Lys-Ser-Asp-Val-Lys-Ala-Glu-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Asp-Thr-Thr-Glu-Leu-Asp-Glu-Lys-Val-Glu-Val-Lys-Ala-Asn-Glu-OH (sthmo3hh альфа 1). Їх ліофілізовані порошки відновлювали в стерильній воді.

Обробки проводили в такий спосіб: підданим ТКМ мишам (ТКМ-мишам) вводили щодня, починаючи із дня здійснення інфузії КМ, одночасно із зараженням, ТА1 у різних дозах, інтраперитонеально, тимозин альфа 1, 400мкг/кг, інтраперитонеально, або людський рекомбінантний G-CSF (гранулоцитарний колонієстимулювальний фактор), 250мкг/кг, внутрішньовенно, і продовжували вводити ще протягом 3 днів. Амфотерицин В вводили щодня протягом 3 днів одночасно із зараженням, у дозі 4000мкг/кг, інтраперитонеально. Ця доза призначалася для лікування ІА в оброблених циклофосфамідом мишей. Циклофосфамід, 150мг/кг, інтраперитонеально, вводили за день до здійснення зараження. Обробленим циклофосфамідом мишам протягом 5 послідовних днів, починаючи від дня зараження, вводили інтраперитонеально 400мкг/кг ТА1.

Виснаження нейтрофілів одержували шляхом внутрішньовенного введення 1мг нейтралізуючого Gr-1 антитіла RB6-8C5 за день до й через день після здійснення зараження. Обробка істотно знижувала кількість нейтрофілів у легені, але не знижувала кількість ДК ($5-6 \times 10^5$ CD11c⁺, ГКГ класу II⁺, P480⁺-клітин до й після обробки). Контрольним мишам вводили еквівалентну кількість очищеного щурячого IgG2b. FACS-аналіз (аналіз із використанням клітинного сортеру із збудженням флуоресценції) клітин легені через день після обробки циклофосфамідом дозволив виявити виражену й довгострокову (аж до 5 днів) лейкопенію. Обробка не впливала на відсоток F480⁺-клітин (приблизно 20%) і відсоток CD11c⁺, ГКГ класу II⁺, F480⁺-фДК (<3%).

Ліганди ТПР

Зимозан одержували з *Saccharomyces cerevisiae*, ліпотеїхоєву кислоту (ЛТК) одержували з *Staphylococcus aureus* і ліпополісахарид (ЛПС) зі штамму Re 595 *Salmonella minnesota*. CpG-олігонуклеотиди 1826 й 2006 являли собою перевірені імуностимуляторні послідовності.

Виведення ТКМ-мишей

Мишей лінії C57BL/6 обробляли летальною дозою 9 Гр й їм вводили шляхом інфузії донорські клітини, які характеризуються виснаженням Т-клітин, отримані від мишей лінії BALB/c. У більше ніж 95% мишей, що вижили, був виявлений стабільний гематопоетичний химеризм донорського типу, що підтверджувалося експресією антигену ГКГ класу I донорського тину на клітинах селезінки.

Виділення й культивування дендритних клітин. Мієлоїдні ДК (МДК) крові лінії CD11c⁺ одержували (виводили!!) з моноклеарних клітин лінії CD14⁺ шляхом магнітного сортування клітин і культивування протягом 5 днів у середовищі Дульбекко, модифікованому за способом Ісков, що містить 10% фетальної телячої сироватки, 50мкМ 2-меркаптоетанол, піруват натрію (імМ), 2мМ L-глутамін, HEPES (ЮмМ) і 50мкг/мл гентаміцину в присутності 50нг/мл рекомбінантного людського GM-CSF (колонієстимулювальний фактор гранулоцитів і макрофагів) і 200од/мл рекомбінантного людського IL-4. Для одержання зрілих ДК незрілі МДК культивували протягом 24 год із 1000 нг/мл злитого протеїну: тримерний ліганд людського CD40-лейцинова «застібка». Плазмацитоїдні ДК (ПДК) лінії CD123⁺ виділяли за допомогою набору для виділення BDCA-4. Чистота CD123⁺-клітин становила >96%.

Для одержання зрілих ПДК незрілі ДК культивували із тримерним лігандом людського CD40 відповідно до описаного вище методу в присутності 10нг/мл IL-3. FACS-аналіз дозволив встановити, що ПДК являли собою CD123^{bright}, CD4⁺, CD45RA⁺ й CD11c⁻ на відміну від МДК, що представляють собою CD1a⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, CD4⁺, CD14^{low} й CD8⁻. Рівень експресії головного комплексу гістосумісності людини (ЧГКГ) класу II, CD80 й CD86 був високим як у незрілих, так й у зрілих ДК. ДК лінії CD11c⁺ легень миші (від 5 до 7% позитивних у відношенні CD8alpha і від 30 до 35% позитивних у відношенні Gr-1) виділяли за допомогою магнітного сортування клітин.

Для дослідження фагоцитозу ДК піддавали попередній обробці 100нг/мл TA1 протягом 60хв і потім інкубували протягом ще 60хв при 37°C з конідіями *Aspergillus*. Розраховували відсоток інтерналізації й робили фотознімки. Для оцінки функціонального дозрівання й визначення цитокінів очищені ДК ресуспендували в середовищі Ісков (що не містить сироватку, але з додаванням поліміксину В для запобігання неспецифічної активації компонентами сироватки й ендотоксинами) і вводили шляхом впорскування 100нг/мл TA1 протягом 24год або індивідуально, або в сполученні з лігандами ТПР або неопсонованими конідіями *Aspergillus*.

Фенотипічний аналіз

Фенотип клітинної поверхні оцінювали, піддаючи зразки взаємодії з кон'югованими з ФІТЦ (флуоресцеїн-ізотіоціанат) або ФЕ (фосфатидилетаноламін) щурячими антимишиними антитілами. Як контроль використовували антитіла, які відповідають неспорідненому людському ізотипу.

Протирибкова ефекторна активність

При оцінці фагоцитозу бронхоальвеолярні макрофаги й периферичні нейтрофіли піддавали попередній обробці 100нг/мл ТАІ протягом 60хв й інкубували при 37°C з неопсонованими конідіями *Aspergillus* протягом 60хв. Крім того, оцінювали конідіоцидну активність шляхом визначення кількості колонієутворюючих одиниць й як міру конідіоцидної активності приймали відсоток інгібування колонієутворюючих одиниць (середнє значення \pm С.К.В.).

Аналіз із використанням трансфектованих клітин лінії HEK293

Людські ембріональні клітини нирки лінії HEK293 дикого типу або

стабільно трансфектовані людськими TLR2, TLR9 й TLR4/CD1427 культивували в модифікованому за Способом Дульбекко середовищі Ігла з низьким вмістом глюкози, доповненим 10% фетальної телячої сироватки (ФТС), HEPES (10нМ), L-глутаміном (2мкг/мл) і гентаміцином (50мкг/мл). Крім того, середовище для трансфектантів доповнювали пуроміцином (100мкг/мл). Для експериментів з стимуляції клітини культивували протягом ночі при щільності $3-5 \times 10^5$ клітин/лунку в 12-лункових планшетах для культур тканин. Клітини промивали й стимулювали 100нг/мл ТА1 або індивідуально, або разом з лігандами ТПР, за 5 год до здійснення оцінки вироблення IL-8 у супернатантах.

Аналіз цитокінів і твердофазний імуноферментний спот-аналіз (ELISPOT) Рівні TNF-альфа, IL-10, IL-12 p70, IFN-альфа й IL-8 у супернатантах культур визначали за допомогою набору для ELISA. Межі виявлення (пг/мл) аналізу становили: для TNF-альфа: <3 (людський) і <32 (мишиний), для IL-10: <12 (мишиний) і <5 (людський), для IL-12 p70: <16 (мишиний) і <3 (людський) і для IL-8: <25 (людський). Для людського IFN-альфа межа виявлення становила <3нг/мл. Для підрахунку клітин, які продукують цитокіни, проводили аналіз ELISPOT на очищених CD4⁺-Т-клітинах і ДК із легень.

Аналіз проліферації методом проточної цитометрії

Проліферацію легеневи CD4⁺-Т-лімфоцитів, стимульованих 10мкг/мл конкаваліну А (Con A), або інактивованими нагріванням конідіями в присутності легеневи ДК оцінювали шляхом мічення з використанням CFSE (сукцинімідилового ефіру 5(6)-карбоксифлуоресцеїндіацетату).

ПЛР зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР)

Загальну РНК екстрагували з незрілих ДК, які попередньо обробляли протягом 60хв 100нг/мл ТА1, а потім піддавали впливу неопсонізованих конідій *Aspergillus* протягом 60хв, процедура була вибрана на основі попередніх експериментів. Синтез і ПЛР кДНК проводили з використанням прямого й зворотного праймерів для ПЛР і циклів, застосовуваних для мишиних і людських ТПР й HPRT. Синтезовані ПЛР-продукти розділяли за допомогою електрофорезу на 2%-ному агарозному гелі й візуалізували шляхом фарбування етидйбромідом.

Аналіз активації p38 й NF-κB

p38 й NF- κ B активували на ДК легені шляхом впливу протягом 20хв при 37°C конідіями *Aspergillus ta* або 100 нг/мл ТАІ. Блоти клітинних лізатів інкубували із кролячими поліклональними Ат, які розпізнають або нефосфориловану форму MAPK p38, або двічі фосфориловану форму (Thr-180/Tyr-182) MAPK p38, або з Ат, які мають специфічність до Rel A, що представляє собою зв'язувальну ДНК субодиницю з молекулярною масою 65кДа людського NF- κ B, а потім з кон'югованим з пероксидазою із хрому козячим IgG до антитіла кролика відповідно до інструкцій виробника. Блоти проявляли з використанням набору для виявлення тину Enhanced Chemiluminescence. Смуги візуалізували після експозиції блотів на плівці Kodak RX. Для того, щоб гарантувати однакове завантаження білка в кожній доріжці, вирізали смужки фосфорилованих блотів і мембрани піддавали допоміжному зондуванню з використанням Ат до p38 й NF- κ B.

Тимозин альфа 1 (TA1) активує дендритні клітини (ДК)

У попередніх дослідженнях було встановлено, що мишині ДК можуть здійснювати фагоцитоз грибів р. *Aspergillus in vitro* й у місці інфекції. Встановлено, що TA1 на відміну від модифікованого пептиду активує легеневі ДК відносно фагоцитозу неопсонізованих конідій (більшою мірою, ніж гіфів), експресії костимульованого антигену й вироблення цитокінів. На відміну від цього конідії *Aspergillus* індивідуально не являють собою достатній стимул для індукції активації ДК, однак їх вплив разом з TA1 приводить до значного підвищення експресії антигенів ГКГ класу II, молекул CD86 й CD40 і кількості ДК, які продукують IL-12 p70. Важливо відзначити, що кількість ДК, які продукують IL-12 p70, збільшується також при впливі тільки одного тимозину. TA1 активує також піднабори людських МДК і ПДК. Піднабори як незрілих, так і зрілих ДК, мають здатність до фагоцитозу конідій. TA1 підвищує фагоцитарну активність незрілих ДК, впливає на морфологію ДК (у незрілих МДК можна виявити більшу кількість цитоплазматичних проєкцій) і здійснює підвищувальну регуляцію антигенів ЧКГ класу II і приводить до експресії костимульованих молекул у відповідь на присутність конідій. TA1 приводить до істотного збільшення вивільнення IL-12 p70 незрілими МДК у відповідь на конідії й зимозан і вивільнення IL-10 незрілими ПДК у відповідь на обробку конідіями. РДК можуть продукувати IFN-альфа у відповідь на обробку лігандом CpG TLR9, вироблення якого істотно підсилюється під дією TA1. На відміну від цього модифікований пептид не має здатності здійснювати підвищувальну регуляцію експресії антигенів класу II і костимульованих молекул й індукувати вироблення цитокінів ДК у відповідь на обробку конідіями.

У сукупності ці дані свідчать про нову раніше невідому імунорегуляторну роль TA1 в активації й функціонуванні ДК.

TA1 активує залежний від MyD88 каскад за допомогою залежного від ТПР сигналу

У присутності конідій *Aspergillus* виникає залежний від ТПР сигнал, який опосередковує функціональні відповіді на гриб. ТАІ викликає сильну активацію експресії TLR2, TLR5 й TLR9 на мишиних ДК, причому TLR2 й TLR9 можуть також активуватися при спільному впливі конідій і ТА1, у той час як експресія TLR5 при цьому інгібується. І в цьому випадку модифікований пептид не має здатності активувати експресію TLR2 й TLR9 ні індивідуально, ні в сполученні з обробкою конідіями.

Здатність ТА1 активувати залежний від ТПР сигнал підтверджується результатами досліджень на клітинах лінії HEK293, трансфектованих TLR2, TLR9 й TLR4/CD14, у яких оцінювали вироблення IL-8 у відповідь на обробку тільки ТАІ або на обробку в сполученні з відповідними ТПР-лігандами. У досліджах на таких клітинах лінії HEK293 ТАІ істотно підвищував вироблення IL-8 клітинами, трансфектованими TLR9, як при його застосуванні індивідуально, так і при застосуванні разом з лігандом TLR9 CpG. При цьому ТАІ не стимулював вироблення IL-8 трансфектованими TLR2 клітинами при його застосуванні індивідуально, але трохи підвищував вироблення IL-8 у цих клітинах у відповідь на стимуляцію зимозаном. Крім того, ТА1 не індукував вироблення IL-8 у клітинах, трансфектованих TLR4/CD14, як при його застосуванні індивідуально, так й у відповідь на обробку лігандом TLR4 ЛПС (ліпополісахаридом). ТАІ також впливав на здатність мишиних ДК продукувати IL-12 p70 й IL-10 у відповідь на вказані ліганди мікробних ТПР. ТА1 не впливав на вироблення цитокінів у відповідь на Po1y(I:C) або ЛПС (TLR4), ТА1 викликав істотне збільшення вироблення IL-12 p70 і знижував вироблення IL-10 p70 після стимуляції зимозаном й LTA (TLR2) і CpG (TLR9). Отже, ТА1, очевидно, має здатність передавати сигнал безпосередньо через TLR9 і підсилювати TLR2-сигнал, стимульований відповідної лігандом.

Активация як NF, так й MAPK p38, являють собою перші події в стимуляції, індукованої ТПР генної експресії, причому в попередніх дослідженнях було встановлено, що ТА1 активує шляхи трансдукції MAPK. Для посилення своєї участі в індукованих ТПР каскадах ТА1 індукує ядерну транслокацію NF- κ B, а також фосфорилювання p38 (обидва процеси не стимулювали ні конідії індивідуально, ні модифікований пептид, ні модифікований пептид плюс конідії). Крім того, інгібітори ядерної транслокації NF- κ (SN50) або MAPK p38 (SB202190) усували вплив ТА1 на ДК.

Фактор мієлоїдного диференціювання 88 (MyD88) являє собою один з адаптерних білків, необхідний для активації NF- κ B й MAPK і вироблення IL-12 p70 після виникнення ТПР-сигналу. Вплив ТА1 і конідій на вироблення IL-12 p70 і вплив ТА1 на вироблення IL-10 у значній мірі усувається в мишей з дефіцитом MyD88. Таким чином, залежний від MyD88 каскад, очевидно, відіграє істотну роль у механізмі дії ТАІ *in vitro*. Для оцінки того, чи відіграє залежний від MyD88 каскад

істотну роль також й у механізмі дії TA1 *in vivo*, здійснювали оцінку місцевого росту грибів після зараження грибами р. *Aspergillus* мишей дикого типу й мишей з дефіцитом TLR2, TLR9 або MyD88. Ріст гриба в мишей з дефіцитом TLR2 й TLR9 був порівнянний з ростом гриба в мишей дикого типу й на нього аналогічно впливала обробка тимозином. Ріст гриба був порівнянний також з ростом гриба в мишей з дефіцитом MyD88, однак у цих мишей на нього не впливала обробка TA1. Таким чином, незважаючи на те, що застосування ТПР певною мірою є зайвим, залежний від MyD88 каскад сигналу, очевидно, є необхідним для прояву активності TA1 як *in vitro*, так й *in vivo*.

TA1 захищає ТКМ-мишей від ІА

Обробка TA1, на відміну від обробки модифікованим пептидом, очевидно, дозволяє лікувати ТКМ-мишей з ІА, про що свідчить підвищення виживаності й відповідне зменшення росту гриба в легенях. Критерієм захисної дії є залежний від дози повний захист (виживаність протягом >60 днів), що досягається в мишей, оброблених 200 й 400мкг/кг TA1, і він перевершує захисну дію амфотерицину В. Крім того, ТАІ підвищує терапевтичну ефективність амфотерицину В, про що свідчить підвищення виживаності й зменшення росту гриба в мишей, оброблених обома агентами. Крім того, TA1 зменшує також легенеvu патологію. На зрізах легені інфікованих мишей ^видно наявність численних гіфів *Aspergillus*, які інфільтруються в паренхіму легені, що супроводжується вираженими ознаками пошкодження бронхіальної стінки й некрозом і недостатнім рекрутментом запальних клітин. На відміну від цього вказані особливості не спостерігаються в мишей, оброблених TA1, легені яких характеризуються інфільтраціями запальних клітин, які загоюються, при цьому відсутні ріст гриба й руйнування бронхіальної стінки. Таким чином, TA1 може мати терапевтичну ефективність у відношенні ІА й може сприятливо діяти в сполученні із протигрибковими лікарськими засобами, у відношенні яких відомо, що вони мають знижену активність при ТКМ.

TA1 прискорює відновлення мієлоїдів й Th1-клітин в мишей з ІА

Після обробки TA1 істотно збільшується абсолютна кількість лімфоцитів і нейтрофілів у кровотоці. Важливо відзначити, що рівні нейтрофілів у крові не дозволяють передбачити наявність чутливості до аспергільозу. Однак за даними цитофлуориметричного аналізу кількість CD4⁺ і CD8⁺-клітин і нейтрофілів у легенях істотно зросло після обробки ТКМ-мишей ТАІ. Вказані легеневі CD4⁺-Т-лімфоцити мають функціональну активність, яка проявляється в антигенспецифічній проліферації й виробництві IFN-гамма. Концентрація Th1-клітин-продуцентів (які продукують IFN-гамма) є більш високою, а Th2-клітин-продуцентів (які продукують IL-4) більш низькою у мишей, оброблених TA1. Крім того, з погляду протигрибкової активності ефекторних фагоцитів кондіоцидна активність, як макрофагів, так і нейтрофілів є більш високою в мишей, оброблених TA1. Таким чином, очевидно, TA1 не

лише стимулює дозрівання ДК, але також активує місцеві ефекторні клітини відносно негайного фагоцитозу й знищення гриба.

Відновлення після нейтропенії, наприклад, за допомогою обробки тільки дозою G-CSF, який, як відомо, прискорює відновлення нейтрофілів у мишей, недостатньо для забезпечення ступеня протигрибкової стійкості, порівнянної з тією, яка досягається за допомогою TA1. Аналогічно до цього, незважаючи на значне відновлення нейтрофілів, терапевтична ефективність TA1 у мишей, позбавлених Т-клітин або Th1-клітин, які продукують IFN-гамма, є не настільки високою. Крім того, підвищення терапевтичної ефективності ТАІ досягається в присутності збільшеної кількості Th1-клітин, що має місце в мишей з дефіцитом IL-4. Таким чином, хоча нейтрофіли відіграють істотну роль у забезпеченні протигрибкової стійкості за допомогою лікарської терапії за відсутності адаптивного Th1-залежного імунітету, досягнення стану повного захисту від гриба, яке, очевидно, може бути отримане шляхом обробки TA1, може бути зумовлено скоординованою дією природних ефекторних фагоцитів і захисних Th1-клітин.