



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94023** (13) **C2**
(51) **МПК** (2011.01)

A61K 35/56 (2011.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12Q 1/02 (2011.01)

C12Q 1/68 (2011.01)

G01N 33/50 (2011.01)

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ПАРАЗИТИЧНИХ БІОЛОГІЧНИХ АГЕНТІВ ДЛЯ БОРІТЬБИ З ЗАХВОРЮВАННЯМИ

1

2

(21) а200606738

(22) 22.10.2004

(24) 11.04.2011

(86) PCT/US2004/035164, 22.10.2004

(31) 10/715,659

(32) 17.11.2003

(33) US

(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.

(72) ВЕЙНСТОК ДЖОЕЛ В., US, ЕЛЛИОТТ ДЕВІД Е., US

(73) ЮНІВЕРСИТІ ОФ АЙОВА РІСЬОРЧ ФАУН-ДЕЙШН, US

(56) WO 99/33479 A 08.07.1999

SCHUBERT L.A. ET AL.: 'Scurfin (FOXP3) Acts as a Repressor of Transcription and Regulates T cell Activation' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY vol. 276, no. 40, October 2001, pages 37672 - 37679

(57) 1. Спосіб скринінгу препарату паразитичних гельмінтів, що змінює активність регуляторних Т-клітин, при цьому вказаний спосіб включає етапи:

(а) одержання препарату паразитичних гельмінтів;

(b) приведення вказаного препарату паразитичних гельмінтів у контакт з мішенню; та

(с) визначення рівня вказаного внутрішнього маркера для активності регуляторних Т-клітин у вказаній мішені після вказаного контакту, де вказаний внутрішній маркер являє собою Scurfin, Smad7, Gata3 або Tbet (Tbx21),

де зміна вказаного рівня вказаного внутрішнього маркера після вказаного контакту є показовою для вказаного препарату паразитичних гельмінтів, який змінює активність регуляторних Т-клітин.

2. Спосіб згідно з п. 1, в якому вказаний рівень вказаного транскрипційного фактора вимірюється на своєму білковому рівні або на рівні мРНК.

3. Спосіб скринінгу препарату паразитичних гельмінтів, що змінює активність регуляторних Т-клітин, при цьому вказаний спосіб включає етапи:

(а) одержання препарату паразитичних гельмінтів;

(b) приведення вказаного препарату паразитичних гельмінтів у контакт з мішенню; та

(с) визначення рівня маркера клітинної поверхні для регуляторних Т-клітин у вказаній мішені після вказаного контакту, де вказаний маркер поверхні клітин вибирають із групи, яка складається з: CD4, CD45RB^{lo}, CD45Rc, антигену 4, асоційованого з цитолітичними Т-лімфоцитами (CTLA-4), Oх40, 4-1BB, CD25, CD103, CD62L, $\alpha\beta$ інтегрину, пептиду, асоційованого з латентним станом (LAP), або білка, спорідненого з родиною рецептора TNF, що індукується глюкокортикоїдом (GITR), хемокинового рецептора CCR5, Tl-ST2,

де зміна вказаного рівня вказаного маркера клітинної поверхні після вказаного контакту є показовою для вказаного препарату паразитичних гельмінтів, який змінює активність регуляторних Т-клітин.

4. Спосіб згідно з пунктом 3, в якому вказаний рівень вказаного маркера поверхні клітин вимірюється на його білковому рівні або на рівні мРНК.

5. Спосіб лікування тварин, що мають захворювання, пов'язані з Th1 або Th2, шляхом введення препарату паразитичних гельмінтів, що змінює активність регуляторних Т-клітин, вказаній тварині.

6. Спосіб для моніторингу лікувальної ефективності препарату паразитичних гельмінтів для аутоімунного або алергічного захворювання у тварини, який включає:

(а) введення композиції, яка включає препарат паразитичних гельмінтів або його фракцію, вказаній тварині; та

(b) визначення рівня активності регуляторних Т-клітин у вказаній тварині після вказаного введення, в якому вказана активність регуляторних Т-клітин вимірюється шляхом визначення рівня маркера регуляторних Т-клітин, де вказаний маркер регуляторних Т-клітин являє собою внутрішній маркер, вибраний із групи, яка складається з Scurfin, Smad7, Gata3 або Tbet (Tbx21),

де підвищення вказаного рівня вказаної активності регуляторних Т-клітин після вказаного введення є

(13) **C2**

(11) **94023**

(19) **UA**

показовим для лікувальної ефективності вказаного препарату паразитичних гельмінтів.

7. Спосіб для моніторингу лікувальної ефективності препарату паразитичних гельмінтів для аутоімунного або алергічного захворювання у тварини, який включає:

(а) введення композиції, яка включає препарат паразитичних гельмінтів або його фракцію, вказаній тварині; та

(б) визначення рівня активності регуляторних Т-клітин у вказаній тварині після вказаного введення, в якому вказана активність регуляторних Т-клітин вимірюється шляхом визначення рівня маркера регуляторних Т-клітин, де вказаний регуляторний Т-маркер являє собою маркер поверхні клітин, вибраний із групи, яка складається з: CD4, CD45RB^{lo}, CD45RC, антигену 4, асоційованого з цитолітичними лімфоцитами (CTLA-4), Oх40, 4-1BB, CD25, CD103, CD62L, $\alpha\beta$ інтегрину, пептиду, асоційованого з латентним станом (LAP), або білка, спорідненого з родиною рецептора TNF, що індукується глюкокортикоїдом (GITR), хемокінового рецептора CCR5, TI-ST2,

де підвищення вказаного рівня вказаної активності регуляторних Т-клітин після вказаного введення є показовим для лікувальної ефективності вказаного препарату паразитичних гельмінтів.

8. Спосіб для моніторингу лікувальної ефективності препарату паразитичних гельмінтів для аутоімунного або алергічного захворювання у тварини, який включає:

(а) введення композиції, яка включає препарат паразитичних гельмінтів або його фракцію, вказаній тварині; та

(б) визначення рівня активності регуляторних Т-клітин у вказаній тварині після вказаного введення, в якому вказана активність регуляторних Т-клітин вимірюється шляхом визначення рівня маркера регуляторних Т-клітин, де вказаний маркер регуляторних Т-клітин являє собою маркер, що секретується, вибраний із групи, яка складається з IL4, IL13, IL-5, IL-10 або TGF β , PgE2, де підвищення вказаного рівня вказаної активності регуляторних Т-клітин після вказаного введення є показовим для лікувальної ефективності вказаного препарату паразитичних гельмінтів.

Даний винахід стосується композицій паразитів та їх використання при запобіганні та/або лікуванні стану або хворобливого стану, що виникає внаслідок зміненої імунної відповіді.

Паразити представляють собою живі організми, які населяють хазяйський організм, або іншим чином на деяких етапах своїх життєвих циклів забезпечують своє живлення за рахунок хазяїна. Паразити, які населяють кишечник, мають комплекс взаємодії з імунною системою слизової оболонки. Вони повинні встановити мирний взаємозв'язок з хазяйськими механізмами захисту слизової оболонки для свого виживання.

Порушення регуляції імунної системи, що веде до аномальної Th1 або Th2 відповіді, може бути спричинене деякими захворюваннями людини. Деякі захворювання, які виникають в результаті домінуючих Th1 відповідей, включають запальне захворювання кишечника (IBD), ревматоїдний артрит, саркоїдоз, розсіяний склероз, інсулінозалежний цукровий діабет. Пов'язані з Th2 захворювання включають алергічні захворювання та рак.

Нещодавно було продемонстровано, що піддання впливу паразитів знижує тяжкість експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) (Sewell та ін., 2003, *International Immunology*, 15: 59-69). Експериментальний аутоімунний енцефаломієліт (EAE) представляє собою тваринну модель для множинного склерозу (MS), що характеризується хронічною запальною демієлінізацією центральної нервової системи (ЦНС). Sewell повідомив, що у мишей, яких імунізували яйцями *Schistosoma mansoni*, тяжкість EAE знижується, як було виявлено за допомогою знижених клінічних показників та клітинних інфільтратів ЦНС.

Хвороба Крона виникає внаслідок порушення регуляції запалення слизової оболонки Т-

хелперного (Th)1-типу. Хвороба Крона рідко виникає в тропічних країнах, але превалює у розвинутих країнах з м'яким кліматом, в яких частота виникнення цього захворювання підвищилася після 1940 року. На противагу до цього, піддання впливу гельмінтних паразитів є звичайним у тропічних країнах, але є рідким у розвинутих країнах. Elliott та ін. (2003, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 284: G385-G391) продемонстрував, що гельмінти можуть послаблювати (атенувати) надлишкове запалення Th1 типу. Для перевірки цієї гіпотези мишей піддавали дії яєць *Schistosoma mansoni*, а потім проводили ректальну стимуляцію за допомогою тринітробензолсульфонові кислоти (TNBS) для індукції коліту. Піддання дії яєць шистосом атенувало TNBS коліт та захищало мишей від летального запалення. Піддання дії яєць шистосом знижувало рівень гамма-IFN та підвищувало продукцію IL-4 клітин анти-CD3-стимульованої селезінки та мезентеріальних клітин лімфовузлів у мишей, яких оброблювали TNBS. Піддання дії яєць шистосомом знижувало рівень гамма-IFN ободової кишки, але підвищувало рівень експресії мРНК IL-10 у мишей, яких оброблювали TNBS. Для атенування коліту була необхідна інтактна сигнальна трандукція та активатор транскрипції 6. Автори показали, що піддання дії гельмінтів може знизити запалення ободової кишки у мишей.

de Jong та інші (2002, *J. Immunol.*, 168:1704-1709) продемонстрував, що білковий екстракт, одержаний з гельмінту *Schistosoma mansoni*, індуктував утворення DC2, який промотує розвиток клітин Th2 за допомогою підвищеної експресії OX40 ліганду. Крім того, токсин, виділений з екстрацелюлярної бактерії *Vibrio cholerae*, також індуктував розвиток DC2, проте за допомогою шляху, неза-

лежного від ОХ40 ліганду, тобто шляхом ще невідомого механізму. На противагу до цього, токсин з інтрацелюлярної бактерії *Bordetella pertussis* індукував розвиток DC1 з підвищеною продукцією IL-12, що покращувало розвиток Th1 клітин. Полі(І:С) (дцРНК (дволанцюгова РНК, що імітує вірусну) індукувала розвиток дуже потужного DC1, що індукується Th1, без підвищення продукції IL-12.

Заявка на патент США № 2003/0103938 А1 розкриває фармацевтичну композицію, яка складається з IL-4 та SDF-1 α , або IL-2 та SDF-1 α , для запобігання або лікування захворювань, пов'язаних з Th1 клітинами або Th2 клітинами у людини або тварини шляхом модуляції співвідношення Th1/Th2.

Doetze та ін. (2000, *International Immunology*, 12: 623-630) досліджував Т-клітинну проліферативну гіпореактивність стосовно Ов антигену (OvAg) за допомогою периферичних мононуклеарних клітин крові (PBMC), одержаних від індивідумів з хронічними гельмінтними інфекціями, а саме з генералізованим онхоцеркозом (GEO), у порівнянні з PBMC, одержаними від путативно імунних індивідумів (PI). У цьому дослідженні вивчалися механізми, які опосередковують таку клітинну гіпореактивність у GEO: низька проліферативна відповідь на PBMC, одержані від GEO індивідумів, асоціювалася з відсутністю продукції IL-4 та значно більш низькою продукцією IL-5 у порівнянні з такими для PI індивідумів, що свідчило проти загального зсуву до T(h)2 відповіді, що є причиною гіпореактивності. На противагу до цього, IL-10 та трансформуючий ростовий фактор (TGF)-бета, два цитокіни, асоційовані з T(h)3 відповіддю, виявилися такими, що опосередковують гіпореактивність: PBMC, одержані від індивідумів з GEO, продукували набагато більше IL-10, а Т-клітинна проліферативна гіпореактивність у цій групі могла бути змінена шляхом додання анти-IL-10 та анти-TGF-бета антитіл. Автори показали, що гіпореактивність була специфічною для OvAg та не спостерігалася при стимуляції за допомогою родинних нематодних антигенів, що свідчило про опосередковану Т-клітинами Ов-специфічну знижувальну регуляцію. Ов-специфічні Т клітини можуть бути клоновані з GEO PBMC, які мають унікальний цитокіновий профіль (відсутність IL-2, але високий рівень IL-10 та/або продукції TGF-бета), подібний до підмножини Т клітин, відомих як такі, що інгібують постійне запалення (T(h)3 та T(r)1), що свідчить про те, що цей тип клітин, які не були виявлені до цих пір при інфекційних захворюваннях, можуть бути втягнені в Ов-специфічну гіпореактивність.

Th3 клітини представляють собою підмножину регуляторних Т клітин, які були спочатку одержані та ідентифіковані у мишей, які були орально толеризовані до MBR, такі клітини пригнічували індукцію експериментального аутоімунного енцефаломієліту (EAE) за допомогою залежного від TGF- β механізму (Chen та ін., 1994, *Science*, 265: 1237-1240). Нещодавні дослідження дали можливість запропонувати, що регуляторні Т клітини можуть бути індуковані проти бактеріальних, вірусних та паразитичних антигенів *in vivo* та можуть запобіга-

ти аутоімунним захворюванням, імунопатологією, індукованою інфекцією, або подовжувати персистентності патогену шляхом супресії протективних Th1 відповідей (див., наприклад, McGuirk та Mills, 2002, *Trends in Immunology*, 23: 450-455; Tung та ін., 2001, *Immunological Reviews*, 182: 135-148; та Maloy та Powrie, 2001, *Nature Immunology*, 2: 816-822).

Регуляторні Т клітини в загальному вигляді описуються як лімфоцити, які супресують імунні відповіді, тобто, такі, що опосередковані антитілом, та опосередковані клітинами (див., наприклад, для огляду, McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells uprovoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002; 23 (9): 450-5; Field, A. C, L. Caccavelli, M. F. Bloch, та B. Bellon. 2003. Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity. *Journal of Immunology*. 170: 2508-2515; von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar; 3 (3): 223-32; Francois Bach J. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar; 3 (3): 189-98; Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec; 14 (6): 771-8; McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol*. 2002 Sep; 23 (9): 450-5; Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2001 Aug; 182: 135-48; Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2001 Dec; 13 (6): 644-9; Yssel H, Lecart S, Pene J. Regulatory T cells and allergic asthma. *Microbes Infect*. 2001 Sep; 3 (11): 899-904). Ці регуляторні Т клітини (Тг клітини) експресують трансмембранний білок (який називається CD25), що представляє собою альфа ланцюг рецептора для інтерлейкіну-2 (IL-2). Подібно до інших Т клітин, вони також експресують $\alpha\beta$ (альфа-бета) Т клітинний рецептор для антигену (TCR), що може активуватися тільки тоді, якщо він зв'язується з класом II МНС пептидних молекул, або у випадку CD8 регуляторних клітин - з класом I МНС, для яких він є специфічним. Проте після активації вони починають секретувати великі кількості інтерлейкіну-10 (IL-10), а також часто деяку кількість трансформуючого ростового фактора-бета (TGF- β). Обидва ці лімфокіни є потужними імуносупресантами, які інгібують допомогу Th1 для опосередкованого клітинами імунітету та запалення, при цьому Th2 сприяє продукції антитіл та, ймовірно, дії CD8⁺ цитотоксичних Т лімфоцитів (CTL). Деякі інші регуляторні Т клітини відрізняються від Тг клітин. Наприклад, Tr1 клітини мають схожість з Тг клітинами стосовно деяких параметрів, незважаючи на те, що вони не експресують великих кількостей CD25 на своїй поверхні. Вони вимагають IL-10 для свого утворення і тільки тоді, коли вони є зрілими, експресують його у великій кількості. Основний лімфокін Th3 клітин представляє собою TGF- β .

Залишається невідомим, чи грають регуляторні Т клітини певну роль у запобіганні або лікуванні захворювань, пов'язаних з Th1 або Th2, при використанні препаратів паразитичних гельмінтів.

Даний винахід базується на відкритті того факту, що препарат паразитів може змінювати активність регуляторних Т клітин при лікуванні захворювання, пов'язаного з Th1 або Th2.

В одному втіленні даний винахід забезпечує спосіб скринінгу препаратів паразитичних гельмінтів, які змінюють активність регуляторних Т клітин, способу, що включає етапи: (а) одержання препарату паразитичного гельмінту; (b) приведення препарату паразитичного гельмінту в контакт з мішенню; та; (c) визначення рівня внутрішнього маркера для активності регуляторних Т клітин у мішені після контакту, де зміна рівня внутрішнього маркера після контакту є показовою для препарату паразитичного гельмінту, який змінює активність регуляторних Т клітин.

В іншому втіленні даний винахід забезпечує спосіб скринінгу препарату паразитичних гельмінтів, який змінює активність регуляторних Т клітин, при цьому спосіб включає етапи: (а) одержання препарату паразитичного гельмінту; (b) приведення препарату паразитичного гельмінту в контакт з мішенню та (c) визначення рівня внутрішнього маркера для активності регуляторних Т клітин у мішені після контакту, де зміна рівня внутрішнього маркера після контакту є показовою для препарату паразитичного гельмінту, який змінює активність регуляторних Т клітин.

В іншому втіленні даний винахід забезпечує спосіб лікування тварини з захворюваннями, пов'язаними з Th1 або Th2, шляхом введення препарату паразитичних гельмінтів, який змінює активність регуляторних Т клітин у цієї тварини.

В іншому втіленні даний винахід забезпечує спосіб для моніторингу лікувальної ефективності препарату паразитичних гельмінтів щодо аутоімунного або алергічного захворювання у тварини, який включає: (а) введення композиції, яка включає препарат паразитичних гельмінтів або його фракцію тварині; та (b) визначення рівня активності регуляторних Т клітин у тварини після введення, де підвищення рівня активності регуляторних Т клітин після введення є показовим для лікувальної ефективності препарату паразитичних гельмінтів.

Бажано, коли захворювання, яке піддають лікуванню, представляє собою таке, що вибрано з групи, яка включає: запальне захворювання кишечника, ревматоїдний артрит, вовчак, підлітковий інсулінозалежний цукровий діабет (типу 1), саркоїдоз, множинний склероз, астму та алергічний риніт.

Маркер регуляторних Т клітин може представляти собою внутрішній маркер, маркер клітинної поверхні або маркер, який секретується.

Бажано, коли внутрішній маркер представляє собою Scurfin, Smad7, Gata3, Tbet (Tbx21).

Також є бажаним, коли маркер клітинної поверхні є вибраним з групи, яка складається з: CD4, CD45RB^{lo}, CD45Rc, антигену 4, асоційованого з цитотоксичними лімфоцитами (CTLA-4), CD25, CD103, CD62L, $\alpha\beta$ інтегрину, пептиду, асоційова-

ного з латентним станом (LAP), білка, спорідненого з родиною рецептора TNF, що індукується глюкортикоїдом (GITR), експериментального алергічного енцефаліту (EAE), хемокінового рецептора CCR5, TI-ST2.

Також є бажаним, коли маркер, який секретується, представляє собою IL-5, IL-10 або TGF β .

Фігура 1. Фігура описує концентрації IFN γ , IL-4 та IL-5, виміряні у супернатантах селезінки мишей, інфікованих *M. avium*, *S. mansoni* або обома організмами згідно з одним втіленням винаходу. Спленоцити (4×10^5 /комірка) культивували *in vitro* протягом 48 годин при 37°C в 200 мкл середовища у присутності чи за відсутності оптимальних концентрацій PPD або SEA. Секрецію цитокіну кількісно оцінювали за допомогою ELISA.

Фігура 2. Фігура описує концентрації IPN γ та IL-4 у супернатантах клітин гранульоми у мишей, інфікованих *M. avium*, *S. mansoni* або обома організмами згідно з одним втіленням винаходу. Клітини гранульоми (4×10^5 /комірка) культивували *in vitro* протягом 48 годин при 37°C в 200 мкл середовища у присутності чи за відсутності оптимальних концентрацій PPD або SEA. Секрецію цитокіну кількісно оцінювали за допомогою ELISA.

Фігура 3. Фігура описує сироваткові рівні IgG1, IgE та IgG2a, які вимірювали у мишей, інфікованих *M. avium*, *S. mansoni* або обома організмами (одночасно) згідно з одним втіленням винаходу. Концентрації імуноглобуліну визначали за допомогою ELISA.

Фігура 4. Фігура показує, що лікування за допомогою IL-4 може вилікувати мишей від хронічної інфекції *H. polygyrus* згідно з одним втіленням винаходу. Миші одержували три ін'єкції комплексу IL-4, починаючи від 12 дня перед забиттям. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для багатократних вимірювань.

Фігура 5: Дані представляють середнє значення показника запалення \pm стандартне відхилення, які одержані з трьох експериментів аналізу > 4 миші дикого типу (WT)/ група згідно з одним втіленням винаходу.

Фігура 6: Згідно з одним втіленням винаходу WT миші без IBD були колонізовані за допомогою *H. polygyrus*. Контролі одержували симулятивне інфікування при годуванні через зонд. LPMC ізолювали від T1 та культивували протягом 48 годин *in vitro* зі стимуляцією або без стимуляції анти-CD3/анти-CD28. Кількість IFN γ в супернатантах вимірювали за допомогою ELISA. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 7: Згідно з одним втіленням винаходу WT мишей піддавали обробці, як представлено на Фіг. 2. Ізольовані LPMC культивували протягом 48 годин *in vitro* з CpG оліго для поліпшення продукції IL12. IL12 вимірювали за допомогою ELISA. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 8: Згідно з одним втіленням винаходу WT мишей без IBD колонізували за допомогою *H. polygyrus*. Контролі одержували симулятивне інфі-

кування при годуванні через зонд. LPMC ізолювали та культивували на 2 тижні більше, ніж представлено на Фігурі 2. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 9: Згідно з одним втіленням винаходу WT мишей без IBD колонізували за допомогою *H. polygyrus*. LPMC ізолювали та культивували протягом 48 годин *in vitro* з анти-CD3/анти-CD28 +/- α IL10R моноклональним антитілом. IFN γ в супернатантах вимірювали за допомогою ELISA. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка трьох незалежних експериментів.

Фігура 10: Згідно з одним втіленням винаходу WT мишей без IBD колонізували за допомогою *H. polygyrus*. Контролі одержували симулятивне інфікування при годуванні через зонд. LPMC ізолювали та культивували на 2 тижні більше, ніж представлено на Фігурі 2. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 11: Згідно з одним втіленням винаходу WT мишей без IBD колонізували за допомогою *H. polygyrus*. Контролі одержували симулятивне інфікування при годуванні через зонд. LPMC ізолювали та культивували на 2 тижні більше, ніж представлено на Фігурі 2. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 12: Згідно з одним втіленням винаходу WT мишей без IBD колонізували за допомогою *H. polygyrus*. Контролі одержували симулятивне інфікування при годуванні через зонд. LPMC ізолювали з TI та культивували протягом 48 годин *in vitro* зі стимуляцією або без стимуляції LPS. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 9 визначень з трьох незалежних експериментів.

Фігура 13: Згідно з одним втіленням винаходу T клітини ізолювали з диспергованих кишкових LPMC при використанні магнітних кульок. Фракції, збагачені T клітинами (T клітини) та виснажені по T-клітинах фракції (не T клітини) культивували протягом 48 годин *in vitro* з анти-CD3/анти-CD28 стимуляцією або без неї перед визначенням IFN γ у супернатантах. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 14: Згідно з одним втіленням винаходу WT неінфіковані миші одержували 2×10^7 MLN клітин від мишей, колонізованих за допомогою *H. polygyrus*. Через один тиждень LPMC ізолювали від цих реципієнтів та культивували протягом 48 годин з анти-CD3/анти-CD28 стимуляцією або без неї перед визначенням IFN γ у супернатантах. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 6 визначень з двох незалежних експериментів.

Фігура 15: Згідно з одним втіленням винаходу GFP WT мишей колонізували за допомогою *H. polygyrus*. Через два тижні MLN клітини, одержані від цих GFP мишей, яких піддавали колонізації, перенесли у нормальних C57BL/6 мишей за допомогою інтраперитонеального введення. Через 7 днів власну пластину слизової оболонки диспергу-

вали та перевіряли на клітини GFP + T під флуоресцентним мікроскопом. А) GFP + LP T клітини. В) Те саме поле під світловим мікроскопом.

Фігура 16: Згідно з одним втіленням винаходу IL10 $^{-/-}$ тварини одержували корм, що містить піроксикам, починаючи з п'ятитижневого віку. Через 2 тижні лікування припиняли введення піроксикаму та коліти оцінювали через 2 тижні. Підібрані за віком IL10 $^{-/-}$ контролі не одержували піроксикаму.

(Контроль). Коліти підраховували у гістологічних зрізах за допомогою сліпого зчитування при використанні шкали від 0 до 4. А) Товста кишка контролю IL10 $^{-/-}$ мишей. В) Товста кишка підібраних за віком мишей IL10 $^{-/-}$ після обробки піроксикамом. С) Інфільтрація власної пластинки слизової оболонки товстої кишки CD4 $^{+}$ T клітинами після обробки піроксикамом (H&E 10X, IHC 20X). Графічні дані представляють собою середні значення, одержані з 5 окремих експериментів, кожний з яких включав 5-6 мишей/група.

Фігура 17: Згідно з одним втіленням винаходу фотознімки А, В та С показують типове запалення товстої кишки у мишей, оброблених піроксикамом, які не одержували *H. polygyrus*. Фотознімки D, E та F показують поліпшення коліту через 2 тижні після одержання *H. polygyrus* (усі H&E, 4X). Коліти підраховували згідно зі шкалою 0 - 4. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 11 тварин, яких вивчали у двох окремих експериментах.

Фігура 18: Згідно з одним втіленням винаходу миші IL10 $^{-/-}$ з колітами одержували *H. polygyrus* або симулятивну інфекцію, як описано для Фіг. 12. Через 2 тижні LPMC ізолювали та культивували протягом 48 годин *in vitro* з анти-CD3/анти-CD28 стимуляцією (IPN γ) або з CpG оліго (IL12) або без неї. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 8-9 визначень з трьох незалежних експериментів.

Фігура 19: Згідно з одним втіленням винаходу мишей IL10 $^{-/-}$ з колітами піддавали обробці так, як представлено на Фіг. 13. Дані представляють собою середнє значення \pm стандартна похибка для 9 визначень з трьох незалежних експериментів.

Фігура 20: Згідно з одним втіленням винаходу А) MLN клітини, ізольовані від мишей IL10 $^{-/-}$ через 2 тижні після одержання *H. polygyrus* або симулятивної інфекції (контроль) з кормом, переносили (20×10^6) шляхом інтраперитонеальної інфекції у мишей, яких піддавали обробці піроксикамом. Через два тижні після переносу коліти оцінювали так, як представлено на Фіг. 12. В) MLN T клітини, ізольовані з контрольних та колонізованих мишей, переносили (5×10^6) у мишей з колітами. Дані представляють собою середні значення \pm стандартна похибка для 9 мишей/група у двох незалежних експериментах.

Фігура 21: Згідно з одним втіленням винаходу мРНК екстрагували з MLN клітин, ізольованих з IL10 $^{-/-}$ мишей через 2 тижні після симулятивної інфекції або інфекції *H. polygyrus*, яку вводили через зонд, через 2 тижні після симулятивної обробки або обробки піроксикамом. ПЛР у реальному часі для Foxp3 нормалізували до HPRT мРНК (Способи). Примітка: Більш висока експресія вима-

гає менше ПЛР циклів для досягнення порогового значення. Дані представляють собою середні значення \pm стандартна похибка з трьох незалежних експериментів, у кожному з яких використовували 4 миші/група.

Фігура 22: Згідно з одним втіленням винаходу мРНК екстрагували з MLN клітин IL10-/- мишей через 2 тижні після симулятивної інфекції або інфекції *H. polydorus*, яку вводили з через зонд. Нижчий рівень експресії вимагає більше циклів ПЛР циклів для досягнення порогового значення. Дані представляють собою середні значення \pm стандартна похибка з трьох незалежних експериментів, у кожному з яких використовували 4 миші/група.

Фігура 23. Схематична діаграма процедури для одержання антигену згідно з одним втіленням винаходу.

Винахід охоплює спосіб скринінгу паразитичного препарату, який змінює активність регуляторних Т клітин.

Як використовується в даній заявці, термін «препарат паразитичних гельмінтів» включає, але не обмежується, будь-який препарат, що містить цілого паразита, екстракт паразита, жіночу зародкову клітину паразита, екстракт жіночої зародкової клітини паразита, яйце паразита, екстракт яйця паразита, личинку паразита, екстракт личинки паразита, церкарію паразита та екстракт церкарії паразита. «Паразитичний препарат» може також бути ізольованим білком, полінуклеотидом, вуглеводом або ліпідом, який має походження від паразиту та його екстракту.

Як використовується в даній заявці, термін «вільний від специфічного патогена» застосовується до тварин, вирощених для використання у даному винаході, коли тварини є відомими як такі, що є вільними від специфічного патогенного мікроорганізму, який може викликати захворювання у цільової тварини або людини. Способи вирощування тварин, які не мають патогену, є відомими в галузі техніки, наприклад, див. посилання, Brown та ін., A Bibliography on the Culture and Maintenance Specific Pathogen-Free Organisms, що є доступною на сайті http://www.ctsa.org/upload/publication/CTS_A_116631681202959092495.pdf (введено в дану заявку як посилання). Brown та ін. забезпечує посилання для вирощування різних сільськогосподарських тварин та лабораторних тварин у SPF навколишньому середовищі, а також процедури та вимоги стосовно проектування споруд та утримання. Див. також M. Michael Swindle (J. Invest. Surg., 9: 267-271, 1996, що введено в дану заявку як посилання) для SPF процедури та списків декількох потенціальних вірусних та бактеріальних патогенів людини, які потребують уваги.

Як використовується в даній заявці, термін «регуляторні Т клітини» відноситься до популяції клітин лімфоцитів, які секретують, принаймні, у два рази більше (наприклад, у 3 рази більше, у 4 рази більше, у 5 рази більше, у 6 разів більше, у 8 разів більше, у 10 разів більше або ще більше) IL-10 та/або TGF β у порівнянні з Т-клітинами, які не піддавали впливу. Визначення IL-10 або TGF β секреції є відомим в галузі техніки. Наприклад, це може бути визначено шляхом культивування клі-

тин *in vitro* протягом 24 або 48 годин зі стимулятором або без стимулятора Т клітин, подібного анти-CD3, та подальшого аналізу культуральних супернатантів для цих цитокінів при використанні специфічного для цитокінів ELISA. У доповнення до цього, регуляторні Т клітини згідно з даним винаходом також характеризуються високим рівнем FoxP3 транскрипту у порівнянні з іншими типами Т клітин (наприклад, Т клітинами, які не піддавали обробці). «Високий рівень FoxP3 транскрипту» відноситься до, принаймні, чотирьохкратного підвищення рівня у порівнянні з іншими типами Т клітин. FoxP3 визначається при використанні ПЛР у реальному часі або за допомогою кількісної ПЛР (наприклад, при використанні ПЛР праймерів CCCAGGAAAGACAGCAACCTT, TTCTCACAACCAGGCCACTTG (SEQ ID NO. 1), та міченого зонду 6FAM-ATCCTACCCACTGCTGGCAAATGGAGTC-TAMRA (SEQ ID NO. 2), як описано у Hori, S., T. Nomura, та S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 299: 1057-1061). Значення нормалізують до HPRT експресії, що представляє собою облігатний ген. Альтернативно, FoxP3 білковий продукт, Scurfm, може бути визначений за допомогою аналізу Вестерн-блоттингу, як відомо з рівня техніки, наприклад, при використанні козячого анти-FoxP3 (FoxP3) поліклонального антитіла (каталожний номер ab2481, Novus Biologicals, Littleton, CO). Необов'язково регуляторні Т клітини можуть продукувати набагато менше IFN γ у порівнянні з іншими Т клітинами (наприклад, Т-клітинами, які не піддавали обробці), тобто, принаймні, у 3 рази менше, у 4 рази менше, у 5 разів менше, у 6 разів менше, у 8 разів менше, у 10 разів менше або ще менше. Також необов'язково регуляторні Т клітини також можуть бути визначені при використанні внутрішньоцитоплазматичного проточного аналізу для визначення Т клітин, які експресують IL10 та/або TGF β , але мало або зовсім не експресують IFN γ . Додаткові необов'язкові маркери, як описано в даній заявці нижче, можуть також використовуватися для визначення регуляторних Т клітин або активності регуляторних Т-клітини.

Як використовується в даній заявці, термін «Т клітини, які не піддавали обробці» відноситься до Т клітин, які утворилися за допомогою продукції імунної системи свіжих клітин у кістковому мозку. Т клітини, які не піддавали обробці, відповідають на нові патогени, що містять антигени, з якими імунна система ще не зустрічалася до цього. Т клітини, які не піддавали обробці, можуть бути ідентифіковані згідно з методами, які є відомими з рівня техніки (для огляду див., наприклад, Tough та ін., 1999, Immunol Rev. 170: 39-47; Itano та ін., 2003, Nat Immunol. 4 (8): 733-9; Berard та ін., 2002, Immunology. 106 (2): 127-38).

Як використовується в даній заявці, термін «паразитичний препарат, який змінює активність регуляторних Т клітин» відноситься до паразитичного препарату, який змінює активність регуляторної Т клітини в мішені, принаймні, на 40%, наприклад, 50%, 80%, 100%, у 2 рази, у 4 рази, у 6 разів, у 8 разів, у 10 разів або більше при контакті з мі-

шенню у порівнянні з активністю регуляторних Т клітин у мішені при відсутності контакту з паразитичним препаратом. Активність регуляторних Т клітин може бути виміряна шляхом моніторингу рівня внутрішнього маркера регуляторних Т клітин (наприклад, транскрипційного фактора, такого, як FoxP3 мРНК або його білкового продукту Scurin, Smad7, Gata3 або Tbet (Tbx21)), або поверхневого маркера регуляторних Т клітин (наприклад, CD4, CD45RB^{lo}, CD45Rc, антиген 4, асоційований з цитотоксичними Т лімфоцитами (CTLA-4), Oх40, 4-1BB, CD25, CD 103, CD62L, $\alpha\beta$ інтегрин, пептид, асоційований з латентним станом (LAP), білок, споріднений з родиною рецептора TNF, що індукується глюкокортикоїдом (GITR), експериментального алергічного енцефаліту (EAE), хемокинового рецептора CCR5, T1-ST2) або маркера, що секретується (наприклад, IL4, IL13, IL-5, IL-10, TGF β). Підвищена активність регуляторних Т клітин може бути представлена підвищенням (наприклад, FoxP3, Oх40, 4-1BB, CD4, CTLA-4, CD25, CD103, CD62L, $\alpha\beta$ інтегрин, LAP, GITR, EAE, CCR5, T1-ST2, IL-10, TGF β) або зниженням (наприклад, D45Rc) рівня маркера регуляторних Т клітин, на, принаймні, 40%, наприклад, 50%, 80%, 100%, у 2 рази, у 4 рази, у 6 разів, у 8 разів, у 10 разів або більше, як вимірюється згідно зі способами, відомими з рівня техніки та так, як описано в даній заявці.

Бажано, коли паразитичний препарат, який змінює активність регуляторних Т клітин змінює рівень двох або більше маркерів, як описано в даній заявці вище.

Як використовується в даній заявці, термін «рівень маркера регуляторних Т клітин» відноситься до кількості специфічного маркера регуляторних Т клітин у мішені, наприклад, виміряного у мікрограмах або у молярних кількостях. Типово, маркер регуляторних Т клітин представляє собою білок, кількість якого може бути виміряна за допомогою будь-якого зі способів, що відомі з рівня техніки для кількісного визначення білка, наприклад, за допомогою ELISA, Вестерн-блоттингу, імунопреципітації, радіоімуноаналізу або FACS аналізу (що описані, наприклад, в Innis та ін. (1990) Academic Press, Inc.; Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2-е вид., Sambrook, та ін. (1989); та Current Protocols in Molecular Biology (1997, Ausubel та ін., John Wiley & Sons, Inc.). Рівень білкового маркера може також бути виміряний на півні його мРНК згідно зі способами, які є відомими з рівня техніки, наприклад, за допомогою нозерн-блоттингу, кількісної RT-ПЛР, мікроматричного аналізу (наприклад, як описано в Innis та ін., (1990) Academic Press, Inc.; Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2-е вид., Sambrook, та ін. (1989); та Current Protocols in Molecular Biology (1997, Ausubel та ін., John Wiley & Sons, Inc.).

Як використовується в даній заявці, термін «мішень» відноситься до *in vitro* системи (наприклад, культивованої тканини або клітин, транскрипційного/трансляційного екстракту) або до *in vivo* системи (наприклад, тварини).

Бажано, коли мішень представляє собою *in vivo* систему, яка містить тваринну клітину, вклю-

чаючи людську клітину. Більш бажано, коли мішень представляє собою тварину. Навіть більш бажано, коли мішень представляє собою ссавця. Ще більш бажано, коли мішень представляє собою людину.

Винахід також охоплює спосіб запобігання захворюванню, яке спричинене зміненою імунною відповіддю у тварини, який включає введення препарату паразитичних гельмінтів у кількості, яка є достатньою для запобігання або лікування захворювання у тварини.

Як використовується в даній заявці, термін «захворюванню, яке спричинене зміненою імунною відповіддю у тварини» відноситься до захворювання, яке розвивається у тварини (наприклад, людини) завдяки відмінності в її імунній відповіді у порівнянні з твариною, яка не має захворювання. Наприклад, хвора тварина може мати аномальну (наприклад, надлишкову або недостатню) імунну відповідь на антиген (наприклад, власний або не власний антиген) у порівнянні з відповіддю на той самий антиген у нормальної не хворої тварини. Термін «захворювання, спричинене зміненою імунною відповіддю» згідно з даним винаходом включає, але не обмежене, пов'язане з Th1 захворювання або захворювання, пов'язане з Th2, як описано в даній заявці.

Як використовується в даній заявці, термін «пов'язане з Th1 захворювання» відноситься до захворювання, при якому забезпечення, пов'язане з Th1 клітинами, викликає або опосередковує хворобливий процес, або при якому Th1 клітини втягнені у лікування або полегшення симптомів захворювання, яке може бути представлене підвищеною або зниженою активністю Th1. Під «підвищеною» розуміють, що хвора тварина має збільшення (наприклад, принаймні у 2 рази, та можливо, у 5 разів, у 6 разів, у 8 разів, у 10 разів або більше) своєї Th1 активності у порівнянні з іншою твариною, яка не має захворювання. Підвищена Th1 активність може бути виміряна за допомогою збільшення рівня секретованих цитокінів (наприклад, IL-2, IFN- γ , TNF α , IgG2a, IL-12, IL-18, IL-23) або зниження рівня секретованих цитокінів (наприклад, IL-4, IL-13) згідно зі способами, які відомі з рівня техніки. Під «зниженим» розуміють, що хвора тварина має зниження (наприклад, принаймні, на 50%, або у 2 рази, та можливо, у 5 разів, у 6 разів, у 8 разів, у 10 разів, або нижче) своєї Th1 активності у порівнянні з іншою твариною, яка не має захворювання. Знижена Th1 активність може бути виміряна за допомогою зниження рівня секретованих цитокінів (наприклад, IFN- γ , TNF α , IgG2a) або підвищення рівня секретованих цитокінів (наприклад, IL-4, IL-13) згідно зі способами, які відомі з рівня техніки, та так, як описано в даній заявці та патентних заявках США з реєстраційними номерами 09/209,732 та 09/362,598, посилання на які введено в дану заявку у своїй цілісності.

Як використовується в даній заявці, «знижений» використовується з терміном «зменшений», замінюючи один на одний, а термін «підвищений» використовується з терміном «збільшений», замінюючи один на одний.

Як використовується в даній заявці, термін «захворювання, пов'язане з Th2» відноситься до захворювань, при яких забезпечення, пов'язане з Th2 клітинами, викликає або опосередковує хворобливий процес, або при якому Th1 клітини втягнені у лікування або полегшення симптомів захворювання, яке може бути представлене підвищеною або зниженою активністю Th2. Під «підвищеною» розуміють, що хвора тварина має збільшення (наприклад, принаймні у 2 рази, та можливо, у 5 разів, у 6 разів, у 8 разів, у 10 разів або більше) своєї Th2 активності у порівнянні з іншою твариною, яка не має захворювання. Підвищена Th2 активність може бути виміряна за допомогою збільшення рівня секретованих цитокінів та антитіл (наприклад, IL-4, IL-5, IgE та IgG1) згідно зі способами, які відомі з рівня техніки. Під «зниженим» розуміють, що хвора тварина має зниження (наприклад, принаймні, на 50%, або у 2 рази, та можливо, у 5 разів, у 6 разів, у 8 разів, у 10 разів або нижче) своєї Th2 активності у порівнянні з іншою твариною, яка не має захворювання. Знижена Th2 активність може бути виміряна за допомогою зниження рівня секретованих цитокінів та антитіл (наприклад, IL-4, IL-5, IgE та IgG1) згідно зі способами, які відомі з рівня техніки, та так, як описано в даній заявці та в патентних заявках США з реєстраційними номерами 09/209,732 та 09/362,598, посилання на які введено в дану заявку у своїй цілісності.

Як використовується в даній заявці, термін «ефективність лікування» відноситься до результативності лікування захворювання при використанні паразитичного препарату. «Ефективність лікування» звичайно вимірюється за допомогою клінічної відповіді на специфічне захворювання, для лікування якого тварину піддавали або піддають лікуванню за допомогою такого паразитичного препарату.

Корисні гельмінтні паразити включають, але не обмежені, дві групи. Перша група представляє собою гельмінтних паразитів, які в природі колонізують людей, а друга група представляє собою гельмінтних паразитів, які колонізують тварин, але можуть забезпечувати захист для людей.

У першій групі гельмінтні паразити є детально розробленими багатоклітинними глистами зі складними життєвими циклами та розвитком.

Нематоди (несегментовані кільчасті черви) та платигельмінти (плоскі глисти) представляють собою дві групи гельмінтів, які колонізують кишечник людини. У відповідності до даного винаходу будь-який з ряду гельмінтних паразитів, що у природі колонізують людей або тварин, буде забезпечувати заплановані результати.

Нематоди, які часто населяють травний тракт людини представляють собою *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (рострик), *Trichuris trichiura* (власоглав), *Ancylostoma duodenale* та *Necator americanus* (анкілостоми), та *Strongyloides stercoralis*. *Trichinella spiralis* заражає тонкий кишечник.

Платигельмінти включають трематод та цестод. Найбільш загальні дорослі трематоди, які населяють тонкий кишечник людини, представляють

собою види *Fasciolopsis*, *Echinostoma* та *Heterophyes*. Такі, що живуть у системі жовчного міхура, включають *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felis* та *Fasciola hepatica*. *Schistosoma* перебуває у венозній системі, але деякі види хронічно уражують кишечник при проходженні яєць через стінку кишечника. Дорослі цестоди, які в загальному випадку інфікують людей, представляють собою види *Diphyllobothrium* (риб'ячий стрічковий черв'як), *Taenia saginata* (бичачий солітер), *Taenia solium* (свинячий солітер) та *Hymenolepis nana* (карликовий солітер).

Інші гельмінти, які представляють інтерес, включають філяріозних паразитів та легеневих сисунів. Ці паразити не мають кишечної фази, але стимулюють сильну відповідь Th2-типу.

Друга загальна група гельмінтних паразитів, що можуть використовуватися у даному винаході, включає гельмінтів, які колонізують тварин, але можуть забезпечувати захист людей проти захворювань, опосередкованих імунітетом. Такі паразити включають *Trichuris muris* (мишачий солітер), *Trichinella spiralis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyms* та *Hymenolepis nana*, які усі є кишковими гельмінтами, що інфікують мишей. Крім того, *Angiostrongylus* представляє собою гельмінта пацюків. *Trichuris suis* та *Ascaris suum* є гельмінтами свиней, що можуть інфікувати людей. *Trichuris vulpis*, види *Toxocara*, *Gnathostoma* та *Ancylostoma* є гельмінтами собак або котів, що також можуть інфікувати людей.

Anisakis та *Pseudoterranova* представляють собою нематоди морських ссавців, які можуть передаватися людям. Пташині шистосоми можуть тимчасово інфікувати людей. Такі шистосоми включають *S. douthitti*, *Trichobilharzia ocellata*, *T. stagnicola*, *T. physellae* та *Gigantobilharzia huronensis*.

Гельмінтний препарат може бути вибраним з групи, яка складається з гельмінтів, які в природі колонізують людей, та гельмінтів, які колонізують тварин, але можуть захищати людей або тварин від захворювання, спричиненого зміненою імунною відповіддю.

У деяких втіленнях даного винаходу гельмінтний паразит представляє собою нематоду та може бути вибраний з групи, що включає *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* та *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* та *Trichinella spiralis*.

В інших втіленнях винаходу гельмінтний паразит представляє собою плоский гельмінт (платигельмінт) та може бути вибраний з групи, яка складається з трематод та цестод, таких, як види *Fasciolopsis*, *Echinostoma* та *Heterophyes*, *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felis*, *Fasciola hepatica*, види *Schistosoma*, види *Diphyllobothrium*, *Taenia saginata*, *Taenia solium* та *Hymenolepis nana*.

В інших втіленнях гельмінтний паразит є вибраним з групи, яка складається з філяріозних паразитів та легеневих сисунів.

У бажаних втіленнях гельмінтні паразити є вибраними з групи, яка складається з *Trichuris muris*,

Trichinella spiralis, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Hymenolepis nanan*, видів *Angiostrongylus*, *Trichuris suis*, *Ascaris suum*, *Trichuris vulpis*, видів *Toxocara*, видів *Gnathostoma*, видів *Ancylostoma*, видів *Anisakis* та видів *Pseudoterranova*.

Є бажаним, щоб тварини для одержання паразитів та препарату були вирощені у специфічному навколишньому середовищі, вільному від патогенів (SPF) (наприклад, вільному від специфічних патогенів людини).

Захворювання, які піддаються лікуванню згідно з винаходом

Приклади захворювань, які піддаються лікуванню згідно з винаходом, включають, але не обмежені, захворювання, пов'язані з Th1, та захворювання, пов'язані з Th2, у тому числі види раку, що пов'язані з Th1 або Th2.

Захворювання, пов'язані з Th1

Захворювання, пов'язані з Th1, включають наступні групи захворювань: інфекційні захворювання, аутоімунні захворювання, захворювання гіперчутливості відстроченого типу та рак.

Група інфекційних захворювань включає захворювання, спричинені паразитами та вірусами, такими, як ВІЛ.

Група аутоімунних захворювань включає енцефаломієлопатичні, демієлінізуючі та інші аутоімунні захворювання.

Приклади енцефаломієлопатичних захворювань включають, але не обмежені, множинний склероз (MS); розсіяний склероз; вогнищевий склероз; острівковий склероз; прогресуючу рухому атаксію (сухотка спинного мозку); гострий та хронічний експериментальний алергічний (або аутоімунний) енцефаломієліт (EAE), що представляє собою тваринну модель MS; гострий первинний ідіопатичний поліневрит; експериментальний алергічний неврит (тваринна модель гострого первинного ідіопатичного поліневрити); гострий розсіяний енцефаломієліт; міалгічний енцефаломієліт (доброякісний та епідемічний); вірусний енцефаломієліт; грануломатозний енцефаломієліт; тощо. Сюди також включаються захворювання тварин, такі як, але без обмеження, собача чума; кошачья чума; конячий енцефаломієліт (східний, венесуельський та західний); пташиний енцефаломієліт; свинячий енцефаломієліт; бичачий енцефаломієліт; мишачий енцефаломієліт; тощо.

Приклади демієлінізуючих захворювань включають, але не обмежені, множинний склероз (MS), розсіяний склероз (DS), гострий розсіяний енцефаломієліт, прогресивну багатофокальну лейкоенцефалопатію (PML) та підгострий склеротичний паненцефаліт (SSPE).

Приклади інших аутоімунних захворювань включають множинний склероз (MS), поліартритну нодозну астму, гіперчутливий пульмоніт, інтерстиціальне захворювання легень, саркоїдоз, ідіопатичний легеневи фіброз, інтерстиціальне захворювання легень, асоційоване з хворобою Крона або виразковим колітом, або захворюванням Уїлла, інтерстиціальне захворювання легень, асоційоване з грануломатозом Вегенера або гіперчутливим васкулітом,

синдрому васкуліту, пурпуру Хеноча-Шонлейнса, синдром Гудпасчура, грануломатоз Вегенера,

ниркові захворювання, такі, як опосередкована антитілами гломерулопатія, така, як при гострому гломерулонефриті, нефрит, асоційований з системним еритематозним вовчаком (SLE), нефрит, асоційований з іншими системними захворюваннями, такими, як грануломатоз Вегенера та синдром Гудпасчура, та змішане захворювання сполучних тканин, хронічний інтерстиціальний нефрит, хронічний гломерулонефрит,

шлунково-кишкові захворювання (наприклад, IBD), такі, як хвороба Крона, виразковий коліт, глютеніова ентеропатія, захворювання Уїлла, колагенозний коліт, еозинофільний коліт, лімфоцитарний коліт,

гепатобіліарні захворювання, такі, як аутоімунний гепатит, гепатит, індукований алкоголем, періпортальний фіброз, первинний біліарний цироз, склеротизуючий холангіт,

шкірні захворювання, такі, як псоріаз, атопічний дерматит, екзема, алергічне захворювання шкіри, прогресивний системний склероз (склеродерма), лускатий дерматит, звичайна пупирчатка,

захворювання суглобів, такі, як ревматоїдний артрит (RA), анкілозуючий спондиліт, артрит, асоційований з псоріазом або запальним захворюванням кишечника.

скелетно-м'язові захворювання, такі, як астенічний бульбарний параліч (MG), поліміозит,

ендокринні захворювання, такі, як інсулінозалежний цукровий діабет (IDDM), аутоімунний тиреоїдит (Хашимото), тиреотоксикоз, гіпертироїдизм (хвороба Граве),

захворювання гематопоетичної системи, такі, як аутоімунна анемія, аутоімунна тромбоцитопенія, аутоімунна апластична анемія,

серцево-судинні захворювання, такі, як кардіоміопатія, васкуліт, серцево-судинне захворювання, асоційоване з системними захворюваннями, такими, як системний еритематозний вовчак, нодозний поліартрит, ревматоїдний артрит, склеродерма, саркоїдоз,

Визначною характеристикою аутоімунних захворювань є їх спадкова кластеризація та асоціація з експресією певних генів, зокрема, генів класу I та класу II основного комплексу гістосумісності (MHC). Наприклад, велика частина пацієнтів з MS мають HLA-DR2 гаплотип (Beall S S, Concannon P, Charmley P, та ін., J. Neuroimmunol., том 21, стор. 59-66, 1989). Оскільки не усі суб'єкти з чутливим генотипом розвивають аутоімунне захворювання, виявляється, що фактори навколишнього середовища також відіграють основну роль. Наприклад, MS, як виявляється, є найбільш звичайним явищем у суб'єктів, які живуть у районах з м'яким кліматом (Kurtzke J F, IN: Multiple Sclerosis, Hallpike J F, Adams C W M, Tourtelotte W W, ред., Williams та Wilkins, Baltimore, Md., 1983, стор. 49-95). До цих пір вважається, що фактор навколишнього середовища для аутоімунних захворювань може представляти собою інфекційний агент, такий, як вірус. Етіологія деяких захворювань людини та тварин може бути приписана вірусній інфекції. Наприклад,

мишачий енцефаліт Тейлера представляє собою демієлінізуюче захворювання з клінічними та патологічними симптомами, подібними до таких ЕАЕ. Незважаючи на те, що антитіла є втягненими у деякі ефекторні відповіді при аутоімунних захворюваннях, запуск у більшості випадків починається з активації CD4 Т клітин, які є необхідними для дозрівання В клітин та клонального розмноження.

Група гіперчутливості відстроченого типу включає контактну гіперчутливість до речовин з низькою молекулярною вагою.

А. Запальні захворювання кишечника (CD та UC):

Епідеміологічні дані передбачають генетичну чутливість до розвитку хвороби Крона (CD) та виразкового коліту (UC). Частота виникнення CD у промислових країнах підвищилася з 1950-их років до середини 1980-их, та зараз ця величина складає від 1 до 8 на 100000 осіб на рік. Це дає змогу запропонувати, що невідомі зміни у нашому оточенні впливають на частоту виникнення CD.

Оскільки причина виникнення IBD залишається невизначеною, то це передбачає що вона виникає внаслідок порушення регуляції імунної системи слизової оболонки кишечника. Запальні клітини у слизовій оболонці у нормі захищають нас від вмісту кишечника. Таке ефективне хронічне запалення вузько контролюється для обмеження пошкодження тканини. IBD може виникати з причини неприйнятно інтенсивних імунних відповідей на фактори вмісту кишечника. CD, як виявляється, представляє собою сильне запалення Th1-типу, яке викликає утворення IFN- γ та TNF α . Природа UC не так добре визначена.

Виразковий коліт (UC) та хвороба Крона (CD) представляють собою розлади, що мають комплексне походження, яке спричинене взаємодією погано визначених факторів впливу навколишнього середовища та, принаймні, у деяких випадках спричинене успадкуванням генів чутливості. Підтвердженням генетичної схильності до IBD, що часто приводиться, є те, що частота виникнення IBD є вищою за ту, яку можна очікувати у членів родини пацієнтів, які мають цей стан, а також високим ступенем поширення цього захворювання у єврейських популяціях західних країн (Roth MP, Petersen GM, McElree C та ін. *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology* 1989; 97 (4): 900-4). Поки що IBD набагато менше поширене у єврейській популяції Ізраїлю (Fireman Z, Grossman A, Lilos P та ін. *Epidemiology of Crohn's disease in the Jewish population of central Israel, 1970-1980*. *Am J Gastro* 1989; 84 (3): 255-8) з подібним етнічним походженням (Grossman A, Fireman Z, Lilos P та ін. *Epidemiology of ulcerative colitis in the Jewish population of central Israel 1970-1980*. *Hepato-Gastroenterology* 1989; 36 (4): 193-7). Дослідження Твіна забезпечують підтвердження генетичної схильності, принаймні, для CD (Halfvarson J, Bodin L, Tysk C та ін. *Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics*. *Gastroenterology* 2003; 124 (7): 1767-73.). Генетичний дефект у CARD15/NOD2, внутрішньоклітинно-

му білку, що сприймає бактеріальний продукт мурамідипептид (Inohara M, Ogura Y, Fontalba A та ін. *Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease*. *J Biol Chem* 2003; Girardin SE, Boneca IG, Viala J та ін. *Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection*. *J Biol Chem* 2003), робить деяких людей більш чутливими до CD. Різноманітні інші генетичні зміни пропонуються як IBD фактори ризику. Поки що генетична схильність не пояснює швидкого росту частоти виникнення захворювання.

Існує декілька тваринних моделей хронічного кишкового запалення, наприклад, як вказано Elliott та ін. (Elliott та ін., 1998, *Inflammatory Bowel Disease and Celiac Disease*. In: *The Autoimmune Diseases*, третє вид., N.R. Rose та I.R. MacKay, ред. Academic Press, San Diego, CA). Важливим доказом є нещодавнє відкриття, яку полягає у тому, що деякі миші з генетично створеними делеціями можуть розвивати хронічне запалення кишечника, подібне до IBD, див. Elson та ін., 1995, *Gastroenterology* 109: 1344. Такі включають мутантних мишей, які несуть націлені делеції для IL-2, IL-10, MHC класу II або TCR генів серед інших. Використовуючи деякі моделі, Berg та ін., 1996, *J. of Clin. Investigation* 98:1010, Ludviksson та ін., 1997, *J. of Immunol.* 158: 104, та Mombaerts та ін., 1993, *Cell* 75: 274, показали, що порушена імунна система сама по собі може опосередковувати пошкодження кишечника. Запалення слизової оболонки деяких з цих моделей індукує утворення великих кількостей IFN- γ та TNF- α , що дає змогу запропонувати, що надлишок продукції цитокінів Th1 типу є загальним механізмом, що лежить в основі патогенезу захворювання. Крім того, блокування Th1 схеми запобігає запаленню. CD представляє собою Th1 відповідь. Таким чином, ці моделі можуть мати безпосередні наслідки, які стосуються імунopatології цього процесу захворювання людини.

В. Ревматоїдний артрит (RA):

RA представляє собою хронічне захворювання, яке характеризується персистентним запальним синовітом, що звичайно втягує периферичні суглоби при симетричному поширенні. Це запалення може приводити до руйнування кісток, пошкодження хрящів та деструкції суглобів. Ревматоїдний артрит є хворобою, що уражує приблизно 1% населення. Схильність до цього захворювання збільшується з віком, при цьому жінки піддаються цьому захворюванню частіше, ніж чоловіки. Поширення RA представляє собою імунологічно опосередковану подію, що приводиться у дію за допомогою CD4+ Th1 клітин.

С. Інсулінозалежний ювенільний цукровий діабет (DM) (тип 1):

Тип 1 DM представляє собою захворювання, яке звичайно починається в ранньому дорослому віці, і має причиною нездатність продукувати інсулін у відповідь на підвищення рівня цукру у крові. Такий персистентний високий рівень цукру у крові та нездатність до власного метаболізму глюкози викликає метаболічні порушення, які з часом приводять до пошкодження очей, нирок, серця та ін-

ших органів. Приймаючи інсулін парентерально, можна частково контролювати ці метаболічні проблеми. DM типу 1 виникає внаслідок аутоімунної атаки на бета клітини підшлункової залози, які є джерелом інсуліну. Активовані макрофаги та цитотоксичні Т клітини оточують та руйнують бета клітини підшлункової залози. Генетична схильність та, в меншій мірі, певні умови навколишнього середовища запускають процес захворювання.

D. Еритематозний вовчак (LE):

LE представляє собою системне аутоімунне захворювання, що найбільш часто зустрічається у жінок в дорослому ранньому - середньому віці. Пошкодження тканини спричинене антитілами та гіперреактивними регуляторними Т клітинами. Аномальна імунна відповідь приводить до безперервної продукції патогенних антитіл та імунних комплексів. Це веде до пошкодження м'язово-скелетної, шкірної, гематологічної, ниркової та інших систем. Аномальна імунна відповідь, ймовірно, залежить від взаємодії між множини спадкових факторів та факторів навколишнього середовища.

E. Саркоїдоз:

Саркоїдоз представляє собою хронічне грануломатозне захворювання легенів та інших органів невідомої причини. Більшість пацієнтів має вік від 20 до 40. Найбільш частий симптом представляє собою коротке дихання. Захворювання виникає внаслідок гіперболізованої клітинної імунної відповіді Th1 типу, ймовірно, на обмежену кількість антигенів. Саркоїдоз є поширеним у всьому світі та уражує усі раси. Проте існують значні відмінності у схильності до саркоїдозу серед певних етнічних та расових груп. Наприклад, захворювання є рідким у Польщі, Південно-східній Азії та Індії.

G. Множинний склероз (MS):

MS представляє собою хронічний рецидивуючий, багатовогнищевий запальний розлад центральної нервової системи, що веде до вогнищевих демієлінізацій та рубцювання мозку. Він представляє собою досить часте захворювання, на яке страждають 350,000 американців та яке починається в ранньому - середньому дорослому віці. MS представляє собою аутоімунне захворювання, яке опосередковане, принаймні, частково Th1 клітинами. Пошкодження MS мають схожість з тими, які індукуються відстроченою гіперчутливою відповіддю, яка втягує активовані Т клітини та макрофаги. Це захворювання є характерним для помірного клімату, при цьому схильність до цього підвищується з віддаленням від екватору.

Захворювання, пов'язані з Th2

Захворювання, пов'язані з Th2, включають наступні групи захворювань:

алергічні захворювання та рак.

Добре відомо, що генетично схильні індивідууми стають чутливими (алергічними) до антигенів, які походять з багаточисленних джерел навколишнього середовища, дії яких піддаються ці індивідууми. Алергічна реакція виникає тоді, коли попередньо сенсibilізований індивідуум повторно піддається впливу того самого або гомологічного алергену. Алергічні відповіді коливаються у межах від сінної лихоманки, ринокон'юнктивіту, риніту та

астми до системного анафілактичного шоку та смерті у відповідь, наприклад, на ужалювання бджолами або шершнями або укуси комах. Реакція є негайною та може бути спричинена різноманітністю алергенів, таких, як сполуки, які мають походження від трави, дерев, бур'янів, комах, кліщів (які містяться у домашньому пилі), їжі, лікарських засобів, хімічних речовин та парфумів.

Група алергічних захворювань включає сінну лихоманку, ринокон'юнктивіт, риніт та астму.

Найбільш поширені алергени, до яких виникають алергічні реакції, включають інгалаційні алергени, які походять, наприклад, від дерев, трав, грибів, кліщів, домашнього пилу, кліщів, поширених у місцях зберігання продуктів, тарганів, шерсті тварин, пир'їв птахів та лупи. Важливі алергени пилку дерев, трав та бур'янів є такими, що мають походження від таксономічних порядків Fagales, Oleales та Pinales включаючи, наприклад, березу (*Betula*), вільху (*Alnus*), ліщину (*Corylus*), граб (*Carpinus*) та оливу (*Olea*), порядків Poales, включаючи, наприклад, трави родів *Lolium*, *Phleum*, *Poa*, *Cynodon*, *Dactylis* та *Secale*, порядків Asterales та Urticales, включаючи, наприклад, трави родів *Ambrosia* та *Artemisia*. Важливі інгалаційні алергени серед грибів представляють собою, наприклад, такі, що походять від родів *Alternaria* та *Cladosporium*. Інші важливі інгалаційні антигени є такими, що мають походження від кліщів домашнього пилу родів *Dermatophagoides*, кліщів, які поширені у місцях зберігання, роду *Lepidoglyphus destructor*, таких, що походять від тарганів, та таких, що походять від ссавців, таких, як коти, собаки, коні, корови, та птахів. Крім того, часто спостерігаються алергічні реакції на ужалювання або укуси комах, таких, як ті, що належать до таксономічного ряду Hymenoptera, включаючи бджіл, шершнів та мурашок. Специфічні алергенні компоненти є добре відомими спеціалісту у даній галузі техніки та включають, наприклад, *Bet v 1* (*B. verrucosa*, береза), *Aln g 1* (*Alnus glutinosa*, вільха), *Cor a 1* (*Corylus avelana*, ліщина) та *Car b 1* (*Carpinus betulus*, граб) порядку Fagales. Інші представляють собою *Cry j 1* (Pinales), *Amb a 1* та *2*, *Art v 1* (Asterales), *Par j 1* (Urticales), *Ole e 1* (Oleales), *Ave e 1*, *Cyn d 1*, *Dac g 1*, *Fes p 1*, *Hol 1*, *Lol p 1* та *5*, *Pas n 1*, *Phi p 1* та *5*, *Poa p 1*, *2* та *5*, *Sec c 1* та *5*, та *Sor h 1* (пилки різноманітних трав), *Alt a 1* та *Cha h 1* (гриби), *Der f 1* та *2*, *Der p 1* та *2* (кліщі домашнього пилу *D. farinae* та *D. pteronyssinus*, відповідно), *Lep d 1*, *Bla g 1* та *2*, *Per a 1* (таргани, *Blattella germanica* та *Periplaneta americana*, відповідно), *Fel d 1* (коти), *Can f 1* (собаки), *Equ c 1,2* та *3* (коні), *Apis m 1* та *2* (медоносна бджола), *Ves g 1*, *2* та *5*, *Pol a 1*, *2* та *5* (усі шершні) та *Sol i 1*, *2*, *3* та *4* (вогняний мураха), які є найбільш загальними.

A. Астма

У багатьох людей астма виникає як алергічна реакція на речовини, які звичайно вдихаються з повітрям, такі, як лупа тварин, пилко або кліщі пилу або продукти життєдіяльності тарганів. Різнорманітність усіх названих речовин, алергенів відноситься до таких, що викликають алергічну реакцію. Деякі люди мають генетичну схильність до реакції

на певні антигени. У 1988 році за оцінками 17 мільйонів американців страждали на астму, що складає 6,4% населення. Діти нараховують 4,8 мільйонів американців з астмою. Доступні експериментальні та клінічні дані, одержані як на тваринних моделях, так і за допомогою клінічних досліджень стосовно патології астми людини, свідчать про те, що Th2 клітини втягнені у патологію цих захворювань.

Види раку, пов'язані з Th1- та Th2-

В загальному випадку ракові клітини можуть викликати імунну відповідь на антигени, які специфічно експресуються раковою клітиною. Оскільки Th1 та Th2 імунні відповіді можуть викликати сильні запальні відповіді, що веде до цитотоксичного знищення тканини, модуляція Th1 або Th2 імунних відповідей може використовуватися для лікування раку.

Види раку, які можуть піддаватися лікуванню за допомогою композиції згідно з даним винаходом, можуть бути гістогенетично класифіковані як злоякісні епітеліальні пухлини, включаючи карциноми та аденокарциноми, та як злоякісні пухлини не епітеліального походження, включаючи ліпосаркоми, фібросаркоми, хондросаркоми, остеосаркоми лейоміосаркоми, рабдоміосаркоми, гліоми, нейробластоми, медулобластоми, злоякісні меланоми, злоякісні менінгіоми, різні види лейкозів, різноманітні мієлопроліферативні розлади, різноманітні лімфоми (лімфома Ходжкіна та неходжкінська лімфома), гемангіосаркому, саркому Капоші, лімфангіосаркому, злоякісну тератому, дисгерміному, семіному та хоріокарциному. Карциноми та аденокарциноми є найбільш численними (нараховують приблизно 90% смертей від раку) і, таким чином, представляють собою захворювання, що представляють інтерес для лікування/запобігання згідно з даним винаходом. Найбільш важливі карциноми та аденокарциноми є такими повітряних шляхів (зокрема, бронхіального походження), молочної залози, прямої кишки та шлунка. Проте карциноми та аденокарциноми передміхурової залози, яєчника, лімфоїдної тканини та кісткового мозку, матки, стравоходу, сечового міхура та нирки також викликають велику кількість смертей і тому також викликають інтерес.

Група ракових захворювань додатково включає ретикулоз Сезарі, шкірну Т-клітинну лімфому, печінкову карциному та легеневий рак.

Регуляторні Т клітини у захворюваннях, які пов'язані з Th1 або Th2

Регуляторні Т клітин можуть індукувати периферичну толерантність та обмежувати реактивність слизової оболонки (McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells upvoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 2002; 23 (9): 450-5). В різноманітних тваринних моделях було продемонстровано декілька фенотипів регуляторних Т клітин. Регуляторні Т клітин експресують різноманітні маркери та були продемонстровані як такі, що втягнені у різноманітні захворювання (див, наприклад, Field, A. C, L. Caccavelli, M. F. Bloch, та B. Bellon. 2003. Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity. *Journal of*

Immunology. 170: 2508-2515; von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar; 3 (3): 223-32; Francois Bach J. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*. 2003 Mar; 3 (3): 189-98; Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2002 Dec; 14 (6): 771-8; McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells upvoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol*. 2002 Sep; 23 (9): 450-5; Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2001 Aug; 182: 135-48; Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2001 Dec; 13 (6): 644-9; Yssel H, Lecart S, Pene J. Regulatory T cells and allergic asthma. *Microbes Infect*. 2001 Sep; 3 (11): 899-904). У деяких системах вони відрізняються диференціальною експресією поверхневих молекул, подібних CD25 (Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T-cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology*. 2: 389-400), CD45RB (Annacker, O. та F. Powrie. 2002. Homeostasis of intestinal immune regulation. *Microbes & Infection*. 4: 567-574), та CTLA-4 (Read, S., V. Malmstrom та F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med*. 192: 295-302). Ця модель експресії білка поверхні клітин передбачає, що вони можуть бути у примованому ефекторному стані або у примованому стані пам'яті. Ці регуляторні клітини можуть опосередковувати деякі зі своїх впливів за допомогою продукції IL10 та TGFβ. Описуються анергічні регуляторні Т клітини a(T_h1), які продукують високі рівні IL10 та TGFβ. Інші клітини, які називаються Th3, пригнічують індукцію експериментального аутоімунного енцефаломієліту, головним чином, через продукцію TGFβ. Ще інші не залежать від розчинного IL10 або TGFβ, але замість цього експресують на своїй поверхні пептид, асоційований з латентністю, який представляє собою аміно-термінальний домен пептидного попередника TGFβ (Oida T, Zhang X, Goto M та ін. CD4+CD25-T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RB high-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 170 (5): 2516-22). Внутрішньоклітинні маркери були продемонстровані для регуляторних Т клітин (Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF, Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cells activation. *J Biol Chem*. 2001 Oct 5; 276 (40): 37672-9). Усі наведені статті приведені як посилання.

Rag мишей, який реконструювали за допомогою CD4+, CD45^{high} Т клітин, можуть розвивати тяжкий коліт, якому можна запобігти за допомогою сумісного переносу CD4+, CD45^{low} Т клітин (Annacker O, Powrie F. Homeostasis of intestinal immune regulation. *Microbes & Infection* 2002; 4 (5): 567-74). TGF/3 та IL10 є необхідними для захисту,

що дає змогу передбачити роль цих цитокінів у регуляторному процесі.

Препарати паразитичних гельмінтів згідно з винаходом

Гельмінти представляють собою паразитичних тварин (глистів), які в залежності від видів живуть місцях, подібних просвіту кишечника, у крові або мускулатурі хазяїна. Ці організми колонізують більше 1/3 населення усього світу. Колонізація гельмінтами є найбільш звичайною у дітей, які живуть у теплом кліматі та в антисанітарних умовах. Інфекційні форми цих організмів поширюються через контакт з зараженим ґрунтом, їжею або водою. До 1940-их років багато дітей та дорослих у Сполучених Штатах мали гельмінтів. Наявність глистів є найбільш загальною у сільських районах Півдня та у бідних популяціях в великих містах (Elliott DE, Urban JF, Jr., Argo CK та ін. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? FASEB J 2000; 14 (12): 1848-55). У Сполучених Штатах та у Європі колонізація гельмінтами постійно знижується. Їх знаходять у нових іммігрантів з менш розвинутих країн (Salas SD, Heifetz R, Barrett-Connor E. Intestinal parasites in Central American immigrants in the United States. Arch Intern Med 1990; 150 (7): 1514-6) та в економічно бідних популяціях, які живуть у малозабезпечених районах Сполучених Штатів, подібним деяким індіанським резерваціям (Healy GR, Gleason NN, Bokart R та ін. Prevalence of ascariasis and ame bias is in Cherokee Indian school children. Public Health Rep 1969; 84 (10): 907-14). Поширення гельмінтів є найвищим у країнах з теплим кліматом та у скупчених популяціях, при антисанітарних умовах життя та забруднених продуктах харчування. Запальне захворювання кишечника (IBD), ревматоїдний артрит та аутоімунні захворювання є рідкими в цих районах.

Нематоди, які часто населяють шлунково-кишковий тракт людини, представляють собою *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis* (гострик), *Trichuris trichiura* (власоглав), *Ancylostoma duodenale* та *Necator americanus* (анкілостоми), та *Strongyloides stercoralis*. *Trichinella spiralis* інфікує тонкий кишечник в незначній мірі.

Плоскі гельмінти включають трематод та цестод. Найбільш поширеними трематодами дорослих, що населяють кишечник людини, є види *Fasciolopsis*, *Echinostoma* та *Heterophyes*. Такі, які живуть у жовчній системі, включають *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* та *felineus*, та *Fasciola hepatica*. *Schistosoma* перебуває у венозній системі, але деякі види хронічно уражують кишечник при проходженні яєць через стінку кишечника. Дорослі цестоди, які в загальному випадку інфікують людей, представляють собою види *Diphyllobothrium* (рибний стрічковий черв'як), *Taenia saginata* (бичачий солітер), *Taenia solium* (свинячий солітер) та *Hymenolepis* папа (карликовий солітер).

Хазяїн одержує різні види гельмінтів шляхом контакту з ґрунтом, продуктами харчування або водою, які заражені інфекційними формами паразиту. Діти найбільш часто одержують гельмінтні інфекції з причини їх тісного контакту з ґрунтом та

недостатнього дотримання гігієнічних правил. Гельмінти стимулюють кишкову Th2 відповідь, яка може спричинити вигнання або обмеження амплітуди інфекції. Більшість дітей, які живуть у промислово не розвинутих країнах, мають цих паразитів. Багато видів гельмінтів живуть роками жити у травному тракті, жовчній системі або мезентеріальних венах, відкладаючи тисячі яєць кожного дня. Таким чином, починаючи з дитинства ці глисти та/або їх яйця вивільняють молекули, які контактують з поверхнею слизової оболонки кишечника роками, стимулюючи запалення Th2-типу.

А. Вакцини життєздатних організмів:

Життєздатні організми паразитичних гельмінтів можуть забезпечувати найбільш глибоку адаптацію слизової оболонки кишечника, завдяки їх відносній довгостроковості у порівнянні з компонентами вакцин. Життєздатні організми можуть вводитися або у формах яєць, личинок, церкарії або інкапсульованої личинки в залежності від гельмінту. Можуть використовуватися гельмінти, які можуть колонізувати людей та лабораторних тварин.

Лабораторна тварина може потребувати проведення маніпуляцій для того, що забезпечити високу доступність для гельмінтів. Таке проведення маніпуляцій може включати лікування за допомогою агентів, що можуть бути імуносупресивними, подібно до глюкокортикоїдів або азатіотропіну; агентів, що протидіють Th2 ефектам, які подібні до антигістамінів, антицитокінів або рекомбінантних цитокінів; агентів, які впливають на моторику кишечника, подібних антихолінергічним речовинам або опіатам. Корм тварин буде змінюватися для зниження вмісту грубих волокон. Тварина може бути пацюком, свинею, хом'яком, птахом або іншою лабораторною твариною.

Лабораторні тварини вирощуються у навколишньому оточенні, що є вільним від специфічних патогенів (SPF) (наприклад, специфічних для людини патогенів) згідно зі способами, відомими з рівня техніки. Вони можуть піддаватися аналізу для впевненості у відсутності бактеріальних, мікобактеріальних та вірусних патогенів людини. Способи для вирощування тварин у SPF навоколишньому середовищі та перевага, яка забезпечується за допомогою цих способів, описані в галузі техніки, наприклад, M. Michael Swindle (J. Invest. Surg., 9: 267-271, 1996, що введено в дану заявку як посилання). Swindle також приводить список деяких потенціальних вірусних та бактеріальних патогенів людини, що потребують уваги. Згідно з цим паразитичні препарати, які одержані від тварин, вирощених у навколишньому оточенні, що є вільним від специфічних патогенів людини, не будуть мати цих патогенів людини, і таким чином відрізняються від паразитичних препаратів, одержаних від тварин, вирощених у будь-якому SPF навоколишньому середовищі.

Яйця: Деяких кишкових гельмінтів набувають шляхом споживання життєздатних яєць. Гельмінти вирощуються в SPF лабораторних тваринах, наприклад, SPF свинях. Для збору яєць тварини одержують спеціальний корм з низьким вмістом грубих волокон. Тваринам вводять перорально послаблюючий засіб для індукції дефекації. Екск-

ременти збирають та ферментативно перетравлюють для збору яєць. Яйця ізолюють зі зріджених екскрементів шляхом флотації у градієнті концентрації, відбирають за допомогою фільтрації, Візер-фільтрації або центрифужного відстоювання. Способи зберігання яєць варіюють в залежності від гельмінту, який використовується. Яйця гельмінтів, які є стійкими до зневоднення, висушують, змішують з інертним матеріалом, вводять в кишкову капсулу та заморожують. Яйця гельмінтів, які є чутливими до зневоднення, зберігають за допомогою заморожування у рідкому середовищі або шляхом додання кріопротектора та заморожування у рідкому азоті. Життєздатні яйця промивають, змішують з охолодженою, вільною від лактози напіврідкою речовиною або іншими носіями для доставки. Яйця, які зберігаються з кріопротером на основі гліцерину, можуть не потребувати промивання. Яйця, одержані з кожної серії, піддають аналізу на швидкість вилуплювання з яєць для визначення ефективного дозування. Яйця, одержані з кожної серії, піддають аналізу на відсутність бактеріальних та вірусних патогенів

Личинки: Деякі гельмінти (тобто анкілостоми) потребують стадії визрівання у ґрунті перед тим, як вони зможуть колонізувати людей. Яйця, одержані від цих агентів, будуть інкубуватися при оптимальних умовах до ембріональної зрілості або такі яйця вирощуватися до вилуплювання та забезпечують личинкові форми. Пацієнти можуть інокулюватися за допомогою підшкірної ін'єкції або перорального споживання життєздатних личинок.

Церкарії: Деякі гельмінти мають складні життєві цикли, що втягують використання проміжного хазяїна. Проміжний хазяїн поширює форму, яка здатна колонізувати людей. Церкарії представляють собою форму для трематодних гельмінтів (тобто сисунів), яка поширюється проміжними хазяйськими організмами, подібними равликам. Церкарії ізолюють з колонізованих равликів, яких вирощували в умовах SPF. Церкарії промивають. Їх зберігають шляхом додання кріопротектора та заморожування у рідкому азоті. Розморожені або свіжі церкарії промивають та вводять шляхом підшкірної ін'єкції для інокуляції пацієнта. Зразки з кожної партії аналізують на відсутність патогенів та для визначення ефективної дози.

Інкапсульовані личинки: Деякі гельмінти (наприклад, солітери) утворюють інкапсульовану личинку або цистицерку у проміжних хазяйських організмах. Вони представляють собою форму личинки в оболонці, що ініціює колонізацію людини. Інкапсульовані личинки виділяються з проміжних хазяйських організмів, наприклад, худоби, риб або рослин, вирощених в SPF умовах. Цисти промивають у вільному від залишкової тканини хазяїна вигляді. Цисти можуть зберігатися шляхом додання кріопротектора та заморожування у рідкому азоті. Цисти розморожують або використовують свіжими, промивають, змішують з охолодженою напіврідкою речовиною, вільною від лактози, або іншим носієм для доставки та згодовують індивідуумам. Зразки з кожної партії аналізують на відсутність патогенів та для визначення ефективної дози.

В. Вакцини на основі нежиттєздатного компоненту

Нежиттєздатні компоненти гельмінтних паразитів забезпечують достатню Th2 адаптацію імунною відповіді для запобігання патології, опосередкованої Th1. Нежиттєздатні компоненти одержують з яєць, личинок або дорослих глистів.

Нежиттєздатні інтактні яйця шистосом забезпечують сильну Th2 відповідь. Яйця ізолюють з печінок лабораторних тварин (наприклад, хом'яків), вирощених в SPF умовах. Яйця ізолюють за допомогою способу, який представляє собою модифікацію того, що спочатку був описаний Coker та Lichtenberg, 1956, *Proceedings of the Soc. For Exp. Biol. & Med.* 92: 780. Модифікації полягають у тому, що використовують фосфатно-буферний сольовий розчин з глюкозою замість 1,7% фізіологічного розчину, для проведення етапів промивання та інкубації, а також зменшення часу аутолітичного перетравлювання. Такі зміни поліпшують ізоляцію життєздатних яєць. Спосіб полягає у наступному.

Інфікували золотих хом'яків за допомогою 1000 - 1500 церкарій. Проводили визрівання інфекції (6-7 тижнів). Видаляли печінки з тварин та поміщали їх у 600 мОсм стерильний фосфатно-буферний розчин, який містить 5% глюкози, 100 од./мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину. Печінки піддавали аутоперетравлюванню протягом 24 годин при кімнатній температурі. Здійснювали віброгомогенізацію печінок при низькій швидкості протягом 3 хвилин у охолоджену пристрої для змішування Waring. Інкубували гомогенат з колагеназою (2 мг/мл) та трипсином (2 мг/мл) при 32°C протягом однієї години. Фільтрували гомогенат через сито з розміром пор 50 та 80-100 меш для видалення грудок тканин та дебрису. Вилучали яйця з фільтрату за допомогою пропускання через сито 325 меш. Яйця не проходили через сито. Відбирали яйця з сита та поміщали у поліпропіленову центрифужну пробірку на 50 мл. Промивали яйця за допомогою низько швидкісного (400 x g) центрифугування у стерильному фосфатно-буферному розчині з 4% глюкози. Яйця повинні бути вільними від будь-якого колагенового дебрису. Підраховували аліквоти яєць у камері Седвіка на 1 мл для визначення загальної кількості яєць.

Ізольовані яйця суспендували у фізіологічному розчині та заморожували у рідкому азоті без кріопротектора. Це вбиває яйця. Розморожені яйця вводили підшкірно, внутрішньом'язово або внутрішньовенно або у сайти Th1 запалення для індукції сильних Th2 відповідей. Також можна використовувати яйця від інших гельмінтів.

Компонентні вакцини можуть також використовуватися так, як використовуються білки, ліпіди або вуглеводи, ізольовані з яєць паразитів. Приклад представляє собою розчинні антигени яєць шистосом (SEA). Спосіб для одержання антигену яєць шистосом був раніше описаний Borog та Warren, 1970, *J. of Experimental Med.* 132: 488 та коротко описується так, як приведено нижче.

Промиті яйця ресуспендували у концентрації 50000 яєць/мл у забуференому фосфатом фізіологічному розчині. Цю суміш переносили до скля-

ного гомогенізатора тканин. Яйця гомогенізували на льоду. Для того, щоб впевнитися, що усі оболонки та мірацидії були зруйновані, аліквоту (5 мл) видаляли для перевірки під мікроскопом. Перенесли гомогенат в ультрацентрифужні пробірки. Центрифугували при 100,000 x g протягом 2 годин при 4°C. Відновлювали водну фракцію (SEA) та визначали вміст білка. Зберігали SEA у вигляді невеликих аліквот при -70°C. Цей спосіб може вимагати модифікації для ізоляції продуктів яєць паразитів, що сильно посилюють Th2 адаптацію, тобто для досягнення оптимально ефективної концентрації (100 мкг SEA або 10,000 яєць/тварина). Яйця або розчинні компоненти яєць використовують для ініціації Th2 відповідей або для підвищення Th2 відповідей, які попередньо були ініційовані за допомогою колонізації життєздатними гельмінтами. Яйця або компоненти яєць піддавали аналізу для підтвердження відсутності патогенів та ендотоксинів.

Компонентні вакцини можуть також бути одержані з личинок та дорослих глистів гельмінтних паразитів. Личинки або глисти ізолюють з лабораторних тварин, вирощених у SPF умовах. Вакцини, які використовують нежиттєздатні інтактні організми або білки, ліпіди або вуглеводи, ізолювані з гельмінту, одержують та використовують за допомогою способу, подібного до того, який раніше був описаний для яєць гельмінтів.

Даний винахід також охоплює вакцини, які містять субфракції гельмінтних паразитів, а також вакцини, які містять ізолювані білки, полінуклеотиди, вуглеводи, ліпіди, тощо, що мають походження від гельмінтних паразитів згідно з відомими способами рівня техніки, наприклад, як описано Williams та ін., 1994, Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of a cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. J. Infect. Dis. 170: 946; Xu-Amano та ін., 1993, Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. J. Exp. Med. 178:1309; Ausiello та ін., 2000, Cell mediated immunity and antibody responses to Bordetella pertussis antigens in children with a history of pertussis infection and in recipients of an acellular pertussis vaccine. J. infect. Dis., 181: 1989.

Наприклад, фракції або субфракції можуть бути одержані згідно зі способом, описаним у Thaumaturgo та ін. (2001, Preliminary Analysis of Sml4 in Distinct Fractions of *Schistosoma mansoni* Adult Worm Extract, Mem. Inst. Oswaldo Cruz том 96 додат. том. 96, Дод.: 79-83, що введено в дану заяву як посилання у своїй цілісності). У цьому способі паразити *S. mansoni* були одержані за допомогою ретроградної перфузії при використанні гепаринизованого сольового розчину (0,85% розчин NaCl), через 45 днів після інфекції (Pellegrino & Siqueira 1956, Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. Rev Bras Mai D Trop 8: 589-597), їх використовували для одержання різних екстрактів.

Приготування екстракту з дорослих глистів (SE). Паразитів промивали у PBS. Живих глистів потім залишали при кімнатній температурі (від 28°C до 30°C) у свіжому PBS (фосфатно-буферний сольовий розчин) протягом 2-3 годин та заморожували при -20°C. Після відтаювання PBS суспензії глистів (1 г глистів/10 мл PBS) фільтрували через дротяне сито та центрифугували при 10,000 g протягом 1 години при 4°C (Tendler & Scapin 1981, *Schistosoma mansoni* antigenic extracts obtained by different extraction procedures. Mem List Oswaldo Cruz 76: 103-109; Tendler та ін. 1982, Immunogene and protective activity of an extract of *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz 77: 275-283). Білковий вміст SE оцінювали згідно з методом Лоурі (Lowry та ін. 1951), та одержаний розчин, який мав концентрацію білка 1 мг/мл зберігали при -20°C. Екстракти самок та самців готували у відповідності до тієї самої методики, використовуючи паразитів, яких розділяли негайно після перфузії.

Приготування «фракції» швидкого вивільнення екстрактів дорослих глистів (SEi) - SEi препарат відповідає початковому етапу SE: після перфузії, як описано для SE, живих глистів інкубують протягом 2-3 годин при кімнатній температурі (від 28°C до 30°C) в PBS. Потім дорослих глистів фільтрують з інкубаційного розчину (SEi) через дротяне сито.

Приготування SE2. Дорослих глистів, які залишилися після початкового етапу приготування SE, повторно заморожували (-20°C) в PBS протягом одного тижня (1 г глистів/10 мл PBS). Після відтаювання PBS суспензії фільтрували через дротяне сито та центрифугували при 10,000 g протягом 1 години при 4°C.

Паразитичні антигени також можуть бути екстраговані так, як описано на Фігурі 1 Thaumaturgo та ін. (вище) (відтворено як Фігура 23). Альтернативно, паразитичні антигени можуть бути приготовлені так, як описано у Deelder та ін. (1980, Applicability of different antigen preparations in the enzyme-linked immunosorbent assay for schistosomiasis mansoni Am. J. Trop. Med. Hyg. 29: 401-410). Наприклад, антигени можуть бути одержані зі SWAP, що приготовлений як розчинні супернатанти рідкі речовини з гомогенатів на основі фосфатно-буферного сольованого розчину відповідних стадій життєвого циклу (Goes та ін. 1989, Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol 11: 695-711). SWAP піддавали фракціонуванню за допомогою аніонообмінної хроматографії на FPLC (рідинна експрес-хроматографія білків), як було описано раніше (Hirsch & Goes 1996, Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro. Parasitology 112: 529-535). Коротко, білки елюювали за допомогою 20 мМ Трис-HCl, pH 9,6 при використанні багатоетапного підвищення градієнту аж до 1 М NaCl, що переривалося інтервалами підтримання градієнту при 0, 100, 280, 450, 600 та 750 мМ. Фракції, що витікали, піддавали концентрації шляхом ліофілізації. Сконцентрова-

ний матеріал піддавали діалізу проти 0,15 М фосфатно-буферного розчину (PBS), pH 7,4, стерилізували шляхом фільтрації та зберігали при -70°C. Вміст білка вимірювали у відповідності з мікроаналізом Бредфорда (Bradford 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254, що введено як посилання у своїй цілісності). Аналіз шести фракцій, розділених за допомогою 10% SDS-ПАГЕ (додецилсульфат натрію-електрофорез у поліакриламідному гелі) в умовах відновлення (Laemmli 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, що введено як посилання у своїй цілісності), показав багаточисленні білкові смуги, фракція III містила білки з високою молекулярною масою (97 та 160 кДа), середньою молекулярною масою (52 та 56 кДа) та низькою молекулярною масою (28 та 36 кДа). Цю фракцію називали PIII та використовували у різних імунологічних аналізах.

Ліпіди також можуть бути одержані так, як описано у рівні техніки, наприклад, у van der Kleij та ін. (1999, Recognition of Schistosoma Glycolipids by Immunoglobulin E: Possible Role in Immunity Infection та Immunity, 67: 5946-5950, що введено як посилання у своїй цілісності).

В одному втіленні ліпіди дорослих глистів *S. mansoni* (12 г [волога вага]) та яйця (1,6 г [волога вага]) піддавали екстракції за допомогою способу, описаного Bligh та Dyer (1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917). Органічну фазу висушували за допомогою роторного випаровування, розчиняли у 10 мл хлороформу та вносили у колонку з TEAE-целюлозою як аніонним обмінником (Serva, Heidelberg, Germany), що була перетворена у гідроксильну форму. Ліпіди елюювали так, як описано Rouser та ін. (1969. Diethylaminoethyl and triethylaminoethyl cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glycolipids, and pigments. *Methods Enzymol.* 14: 272-317). Згідно з цим прописом фракції містили наступні ліпіди: фракція 1, холестерин, гліцериди та інші нейтральні ліпіди; фракція 2, цереброзиди, гліцеринові дигліцериди, фосфатидилхолін та сфінгомієлін; фракція 3, церамідполігексозиди; фракція 4, неорганічні речовини; фракція 5, фосфатидилетаноламін та вільні жирні кислоти; фракція 6, фосфатидилсерин; фракція 7, відсутня (етап промивання); та фракція 8, фосфатидна кислота, кардіоліпін, фосфатидилгліцерин, фосфатидилінозитол та інші кислі ліпіди. Присутність гліколіпідів у фракціях 2 та 3 підтверджували за допомогою забарвлювання орцінолом ліпідних фракцій на HPTLC планшетах (1956. Quantitative estimation of cerebroside in nervous tissue. *J. Neurochem.* 1: 42-53).

С. Підтримання організмів гельмінтів:

Цикл розвитку гельмінтів здійснюють за допомогою проміжних та лабораторних тварин, вирощених у SPF умовах. Зразки популяцій гельмінтів піддавали аналізу для підтвердження фенотипічної стабільності, такої, як швидкості колонізації, плодовитості та чутливості для протигельмінтних препаратів.

Дозування, введення та фармацевтичні композиції

Індивідууми, які потребують лікування, одержують інфекційну форму паразиту (яйце, церкарія або личинка) перорально або парентерально в залежності від природного життєвого циклу вибраного паразиту. Альтернативно, розчинні екстракти глистів або яєць можуть прийматися перорально або парентерально для індукції TH2 відповідей.

Стосовно кишкових та печінкових гельмінтів та шистосом, то вони починають продукцію яєць, які виявляються в екскрементах приблизно через 30-60 днів після інкубації. Кількісна оцінка яєць в екскрементах продемонстрована як достатня для визначення адекватності та інтенсивності інфекції. Аліквоти екскрементів піддавали обробці за допомогою цукрової флотації для визначення загальної кількості яєць у кожному зразку. Флотація у розчині сахарози представляє собою спосіб, який часто використовується для ізоляції яєць з екскрементів для точного підрахунку, як показано Koontz та Weinstock, 1996, *Gastroenterology Clinics of N, America*, 25: 435.

Паразитичні гельмінтні сполуки згідно з винаходом можуть бути рецептовані для введення будь-яким прийнятним шляхом, таким чином, винахід включає в межах свого об'єму фармацевтичні композиції, які включають сполуку гельмінтних паразитів згідно з винаходом, адаптовану для використання у людей. Такі композиції можуть бути представлені для використання традиційним способом за допомогою необхідних фармацевтичних носіїв та наповнювачів.

Сполука паразитичних гельмінтів згідно з винаходом може бути рецептована для ін'єкції та, таким чином, для вакцинного застосування, та може бути представлена у вигляді одиної дози в ампулах, або у вигляді багатодозових контейнерів, при необхідності, з доданням консерванту. Композиції можуть також мати таку форму як суспензії, розчини або емульсії у масляних або водних носіях, та можуть містити додаткові рецептурні агенти, такі, як суспендувальні, стабілізуючі та/або диспергувальні агенти. Альтернативно, гельмінтний паразит може бути у формі порошку або може бути відновлений за допомогою прийнятного носія, наприклад, стерильної, вільної від пірогенів води, перед застосуванням.

Якщо це є бажаним, то така порошкова композиція може містити прийнятну нетоксичну основу для того, щоб бути впевненим, що порошок відновлюється за допомогою води, pH одержаної водної композиції є фізіологічно прийнятним.

Сполуки гельмінтних паразитів можуть бути також рецептовані як супозиторії, наприклад, такі, що містять традиційні основи для супозиторію, такі, як масло какао або інші гліцериди.

Сполуки гельмінтних паразитів можуть також бути рецептовані для перорального дозування з традиційними наповнювачами, носіями та екіпіентами. Кількість паразиту, що вводиться індивідууму, який цього потребує, представляє собою кількість, достатню для запобігання або лікування аутоімунного захворювання. Ця кількість може варіювати в залежності від захворювання, яке під-

дають лікуванню або якому запобігають, та гельмінтного паразиту, від того, чи вводиться паразит в інтактній формі, або як яйця, личинки, екстракт або церкарії.

Типово, коли паразити вводяться для усіх аутоімунних захворювань, які обговорюються в даній заявці, то ця кількість коливається від приблизно 50 до приблизно 50000. Зокрема, ця кількість може коливатися в межах від приблизно 500 до приблизно 5000. Коли використовуються яйця, то приблизно може використовуватися від приблизно 500 до приблизно 5000 для лікування аутоімунних захворювань, розкритих в даній заявці. Коли вводяться екстракти, то використовується від приблизно 100 мкг до приблизно 10000 мкг для лікування аутоімунних захворювань. Коли вводяться личинки та церкарії, то дозування може коливатися в межах від приблизно 500 до приблизно 5000 у кожному випадку.

З метою запобігання або вакцинного застосування кількості паразитів можуть складати від 500 до 5000.

Дозування паразитичного препарату можна піддавати моніторингу шляхом вимірювання Th1, Th2 або регуляторних клітинних відповідей. Альтернативно, дозування можна піддавати моніторингу шляхом оцінювання патології або симптомів певного захворювання, які є відомим в галузі техніки або описані в даній заявці.

А. Визначення Th1 та Th2 відповідей

Для того, щоб продемонструвати ефективність даного винаходу можна розрізнити Th1 та Th2 відповіді. Metawali та ін., 1996, J. of Immunol. 157: 4546 показав, що у мишей можливо розрізнити Th1 відповідь від Th2 відповіді шляхом гістологічного аналізу та за допомогою аналізу профілів цитокіну та імуноглобуліну. Крім того, Sandor та ін., 1990, J. of Exp. Med. 171: 2171 показали, що експресія на поверхні клітин Fcγ3 та молекул класу II MHC піддається розрізненню. У цьому процесі тонкий кишечник та товстий кишечник досліджуються гістологічно для визначення ступеня запалення слизової оболонки, еозинофілі та мастоцитозу. Останні типи клітин є показовими для Th2 відповіді. Мезентеріальні лімфатичні вузли (MLN) та селезінка можуть бути дисоційовані до суспензії, яка включає одиничні клітини для культури in vitro у мікротитрувальних планшетах. Клітини (1-2 x 10⁶/комірка) у повному RPMI середовищі культивують до 72 годин у присутності чи за відсутності антигену глистів або анти-CD3, а потім супернатанти досліджують на цитокіни та імуноглобуліни. IFN-γ, TNFα та IgG2a характеризують Th1 відповідь, у той час, як IL-4, IL-5, IgE та IgG1 є типовими для Th2 реакції. Крім того, сироватка може бути оцінена на концентрації цитокіну та імуноглобуліну. Крім того, дисперговані запальні лейкоцити досліджують шляхом проточної цитометрії на експресію Fcγ3 на макрофагах (Th1) та експресії MHC класу II на В клітинах (Th2). Контролі включають сироватку, клітини MLN та селезінки від прийнятим чином підібраних за віком мишей з одного приплоду, що не мають паразитів.

Подібний аналіз може розрізнити Th1 відповідь та Th2 відповідь. Можна перевіряти запалені

тканини, ізолювати лейкоцити з ділянок запалення, а також клітини периферичної крові. Лейкоцити культивують in vitro або окремо або у присутності паразитичного антигену або мітогенів для стимуляції вивільнення цитокінів. IgG2 замінює IgG2a.

В. Визначення активності регуляторних Т клітин

Способи ізоляції регуляторних Т клітин з in vitro культури або тварин є відомими в галузі техніки, наприклад, як описано у McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells upvoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol 2002; 23 (9): 450-5; Field, A. C, L. Caccavelli, M. F. Bloch, та B. Bellon. 2003. Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity. Journal of Immunology. 170: 2508-2515; von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3): 223-32; Francois Bach J. Regulatory T cells under scrutiny. Nat Rev Immunol. 2003 Mar; 3(3): 189-98; Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy. Curr Opin Immunol. 2002 Dec; 14(6): 771-8; McGuirk P, Mills KH. Pathogen-specific regulatory T cells upvoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. Trends Immunol. 2002 Sep; 23(9): 450-5; Tung KS, Agersborg SS, Alard P, Garza KM, Lou YH. Regulatory T-cell, endogenous antigen and neonatal environment in the prevention and induction of autoimmune disease. Immunol Rev. 2001 Aug; 182: 135-48; Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. Curr Opin Immunol. 2001 Dec; 13(6): 644-9; Yssel H, Lecart S, Pene J. Regulatory T cells and allergic asthma. Microbes Infect. 2001 Sep; 3(11): 899-904; Shevach, E. M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nature Reviews Immunology. 2: 389-400; Annacker, O. та F. Powrie. 2002. Homeostasis of intestinal immune regulation. Microbes & Infection. 4: 567-574; Read, S., V. Malmstrom, та F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J. Exp. Med. 192: 295-302.

Відповідь або активність регуляторних Т клітин можуть бути виміряні за допомогою внутрішнього маркера, маркера клітинної поверхні або секретованого маркера, як описано в даній заявці.

Корисні внутрішні маркери для регуляторних Т клітин включають, але не обмежені, транскрипційні фактори, такі, як Scurfin, Smad7, Gata3, Tbet (Tbx21).

Корисні поверхневі маркери для регуляторних Т клітин включають, але не обмежені, CD4, CD45RB^{lo}, CD45Rc, цитоплітичний антиген 4, асоційований з Т лімфоцитами (CTLA-4), CD25, CD103, Oх40, 4-1BB, CD62L, αβ інтергін, пептид, асоційований з латентністю (LAP), або родину споріднених білків рецептора TNF, що індукується глюкортикоїдом (GITR), хемокінний рецептор CCR5, TI-ST2.

Корисні маркери, що секретуються, для регуляторних Т клітин включають, але не обмежені, IL-5, IL-10 та TGFβ.

С. Необмежувальні приклади способів для *in-vitro* вимірювання кількості маркерів

Визначення цитокінів за допомогою проточної цитометрії: Спленоцити, MLN або кишкові запальні клітини в RPMI повному середовищі поміщали в планшети для тканинних культур на 24 комірки в концентрації 2×10^5 клітини/комірка. Клітини інкубували протягом 4-6 годин у присутності чи за відсутності анти-CD3 або прийнятного антигену з брефелдіном А у концентрації 10 мкг/мл. Брефелдін запобігає екзоцитозу білків та сприяє акумуляції цитокіну у клітині. Для визначення цитоплазматичного цитокіну клітини піддавали фіксації у 2% параформальдегіді при кімнатній температурі протягом 5 хвилин, після чого проводили забарвлення поверхні для розрізнення підтипів клітин. Клітини промивали та ресуспендували в 50 мкл PBS 0,2% сапоніну та 1 мкг анти-цитокінового антитіла та інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. Далі клітини промивали двічі у сапоніні та ресуспендували у PBS/FCS. Специфічність забарвлення цитокінового антитіла підтверджували за допомогою попереднього блокування клітин при використанні надлишку неко-н'югованого антитіла того самого ізо типу та цитокінової специфічності або за допомогою інкубації клітин у присутності рекомбінантного цитокіну. Фікоеритрин (PE)-мічені нерелевантні контролю антитіла також включалися для оцінки фонового забарвлення. Клітини аналізували при використанні проточної цитометрії.

ELISA: Вимірювали концентрації цитокіну та антитіла за допомогою ELISA у клітинних супернатантах, одержаних з клітин, які культивували у мікротитрувальних планшетах та піддавали обробці так, як описано вище. Багато з цих аналізів вже є робочими в нашій лабораторії. Цитокіни оцінювали при використанні двох моноклональних антитіл (mAb) у твердо фазному імуноферментному аналізі з флуоресцентним підсиленням. Анти-цитокінові моноклональні антитіла очищали за допомогою амонійної преципітації з супернатантів антитіл, секретованих гібридомними клонами. Мікротитрувальні планшети покривали 50 мкл 1 мкг/мл антитіла для покриття у PBS, що містить Твін 20 (PBS-T), та інкубували при 4°C протягом ночі. Потім комірки блокували за допомогою додавання 150 мкл 10% FCS в PBS з інкубацією при 37°C протягом 30 хвилин. Стандарти включали рекомбінантний цитокін або супернатанти, які містять цитокін, що були одержані з клітин селезінки, які активовані мітогеном або антигеном, що були одержані від мишей, інфікованих шистосомами. Зразки та стандартні розведення здійснювали в RPMI, що містить 10% FCS (повне RPMI) в окремому мікротитрувальному планшеті на 96 комірок з плоским дном, потім 50 мкл об'єму переносили до планшетів ELISA, які були промиті три рази у PBS-T. Зразки інкубували у планшетах для аналізу протягом 1 години при 37°C. Прийнятні моноклональні антитіла кон'югували з біотином. Після трьохкратного промивання в PBS-T у кожному комірці додавали 50 мкл антитіло-біотинового кон'югату при концентрації 0,5 мкг/мл в 1% BSA/PBS-T. Планшети інкубували при кімнатній температурі

протягом 1 години, після чого тричі промивали у PBS-T. Додавали кон'югати стрептавідин-пероксидаза хрому (75 мкг) у концентрації 1 мкг/мл в 1% BSA/PBS-T та інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Планшети промивали десять разів у свіжому PBS-T та додавали 100 мкл субстрату (2,2'-азино(3-етилбензотіазолінсульфонова кислота) при концентрації 1 мкг/мл у 44 mM Na₂HPO₄, 28 mM лимонної кислоти та 0,003% H₂O₂. Забарвлений продукт піддавали вимірюванню при довжині хвилі 405 нм з контролем при довжині хвилі 490 нм, використовуючи мультисканувальний пристрій для зчитування мікропланшетів.

Імуноглобуліни кількісно оцінювали, використовуючи анти-ізотипічні специфічні ELISA. Афінно очищені козячі анти-IgM, -IgG1, -IgG2a, -IgG2b, -IgG3, -IgA та -IgE використовували для захвату антитіл та абсорбували до гнучких полівінілових мікротитрувальних чашок при концентрації 10 мкг/мл. Після додання культуральних супернатантів, інкубації та промивання використовували прийнятний ізо тип козячого анти-імуноглобуліну, кон'югованого з лужною фосфатазою, для визначення загальної кількості мишачого імуноглобуліну, який зв'язався з чашками. Одержували стандартні криві, використовуючи очищений імуноглобулін. Для вимірювання антитіла, специфічного для паразитичного антигену, розчинний антиген піддавали біотинілюванню та використовували для визначення зв'язаного мишачого імуноглобуліну. Планшети аналізували на пристрої для зчитування ELISA при довжині хвилі 410 нм та визначали концентрації загального імуноглобуліну, використовуючи стандартну криву та програмне забезпечення для аналізу найбільшої відповідності. Концентрації антиген-специфічного антитіла порівнювали відповідно зі зчитування оптичної густини, оскільки розчинний паразитичний антиген не є визначеним антигеном, що дозволяє проводити точну кількісну оцінку.

ELISPOT аналізи: ELISPOT аналізи проводили для підрахунку лімфоцитів, які секретують або поліклональні антитіла, або цитокіни. Мікротитрувальні планшети на 96 комірок на основі нітроцелюлози покривали протягом ночі при 4°C за допомогою 1 мкг/мл або анти-імуноглобулінових або анти-цитокінових антитіл в PBS-T. Потім планшети блокували за допомогою PBS, що містить 10% FCS та інтенсивно промивали PBS-T.

Серійні розведення клітинної суспензії одиничних клітин, починаючи з 5×10^4 клітин/комірка, інкубували на планшеті протягом 5 годин при 37°C у вологій атмосфері з 5% CO₂. Планшети промивали за допомогою PBS-T та покривали за допомогою біотинильованих анти-імуноглобулінових або анти-цитокінових антитіл протягом ночі при температурі 4°C. Потім планшети промивали та обробляли за допомогою кон'югату стрептавідин-глюкозаоксидаза протягом 2 годин та знову промивали.

Антитіло або цитокін, секретовані одиничними клітинами, візуалізували за допомогою субстрату. Колориметричну реакцію зупиняли через 30 хвилин шляхом промивання та плями пронумеро-
 1

вали при 30 X збільшенні. Розведення клітин, які продукують 10-50 плям/комірка, використовували для підрахунку загальної кількості секретуючих клітин на зразок. Контролі включали комірки, вкриті прийнятним козячим антитілом або неприйнятним антигеном, або такі, що не піддавали покриттю.

Модифікація аналізу при використанні розчинного антигену для покриття комірок дозволяє також здійснювати кількісну оцінку паразитичного антиген-специфічного імуноглобуліну, який секретується В-клітинами. Коротко, наприклад, планшети покривають за допомогою антигену зрілого *T. muris* при концентрації 0.25 мкг/комірка або прийнятним нерелевантним контрольним антигеном. Клітини додають до комірок після промивання. Після прийнятої інкубації планшети знову промивають та обробляють так, як описано вище.

D. Оцінка патології захворювання

Підтвердження наявності аутоімунного захворювання та його лікування або послаблення симптомів є необхідним для визначення необхідності лікування, а також для спостереження за розвитком процесу лікування. Наступні процедури використовують для вимірювання клінічних параметрів зазначених захворювань.

1. Запальні захворювання кишечника

Оцінка запалення: У мишей клінічне підтвердження захворювання включає втрату ваги, діарею, ректальний пролапс та гістологічне підтвердження кишкового запалення. Таким чином, поліпшення цих параметрів буде свідчити про полегшення захворювання.

Для градації кишкового запалення у тваринних моделей видаляють тканини, піддають обробці при використанні методики Swiss-roll, поміщають їх у парафін згідно зі стандартними способами. Зрізи забарвлюють за допомогою гематоксиліну та еозину. Ступінь запалення товстого кишечника класифікують на кілька рівнів напівкількісно від 0 до 4 за допомогою сліпого способу, що здійснюється одним патологом при використанні стандартизованої методики: 0 = немає запалення; 1 = низький рівень запалення; 2 = середній ступінь запалення з потовщенням стінки; та 4 = трансмуральна інфільтрація та втрата келихоподібних клітин з потовщенням стінки.

Для підрахунку кількості мастоцитів готують зразки кишкової тканини, одержані від індивідуальних мишей за допомогою методики Swiss-roll, піддають їх фіксації у фіксаторі Карноя, поміщають у парафін та піддають обробці для забарвлення за допомогою алціанового синього та сафраніну. При дослідженні мастоцитів піддають скануванню п'ятидесяти суміжних полів даного зрізу з власної пластини слизової оболонки та м'язових шарів. Мастоцити ідентифікують за їх відмінним внутрішньоклітинним гранулярним забарвленням при використанні алціанового синього. Усі зразки оцінюють за допомогою сліпого способу.

Активність захворювання у людей піддають моніторингу при використанні клінічних лабораторних та гістологічних критеріїв. Існує декілька добре встановлених індексів активності IBD захворювання, що дають змогу стежити за клінічними

параметрами, подібними частоті діареї та абдомінальному болю. Один особливо корисний індекс для оцінки хвороби Крона представляє собою індекс активності хвороби Крона або CDAI (Best та ін., 1976, *Gastroenterology* 70: 439). CDAI включає 8 змінних, пов'язаних з активністю захворювання, він використовувався у найбільш сучасних дослідженнях застосування терапевтичних агентів при хворобі Крона. Він включає кількість рідких або дуже м'яких екскрементів, тяжкість абдомінального болю або появу спазмів, загальний стан здоров'я, наявність екстракишкових проявів захворювання, наявність або відсутність абдомінальної маси, застосування антидіарейних лікарських засобів, гематокрит та вагу тіла. Складене значення коливається у межах від 0 до приблизно 600. Значення нижче 150 свідчить про ремісію, а значення вище 450 свідчить про тяжке захворювання.

Проаналізований, прийнятий та специфічний для даного захворювання список питань стосовно якості життя може використовуватися перед або після лікування для оцінки терапевтичного прогресу. Збірка питань Ірвіна для запального захворювання кишечника представляє собою 32 питання (Irvine та ін., 1996, *The Short Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a quality of life instrument for community physicians managing inflammatory bowel disease*. CCRPT Investigators. *Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial*. *Am J Gastroenterol*. 1996 91(8): 1571-8). Така збірка оцінює якість життя стосовно функції кишечника (наприклад, рідкі екскременти та абдомінальний біль), системні симптоми (втомлюваність, та змінена модель сну), соціальні функції (відвідування роботи та необхідність відмінити соціальну активність) та емоційний стан (злість, депресія або дратівливість). Це значення коливається в межах від 32 до 224, при цьому вищі значення свідчать про кращу якість життя. Пацієнти, які перебувають на стадії одужання, звичайно мають значення, вищі за 170.

Для оцінки можна також проводити ендоскопічну, рентгенівську та гістологічну оцінку активності кишкового захворювання. Рівні С-реактивного білка та швидкість осідання клітин крові можуть також піддаватися моніторингу як системні індикатори запалення.

2. Ревматоїдний артрит

Оцінка запалення:

Мишей з колаген-індукованим артритом піддавали аналізу кожного дня та їх кінцівки оцінювали наступним чином: 0, нормальна; 1, еритема та слабе напухання, які обмежені гомілково-ступеневим суглобом або пальцями; 2, еритема та середнє опухання поширюється від гомілково-ступеневого суглобу до середнього відділу стопи; 3, еритема та значне опухання поширюється від лоджки до метатарзального суглобу; та 4, анкілозуюча деформація з опуханням суглоба. Ці чотири параметри можуть корелювати з гістологічними змінами в артритних суглобах. Успіх лікування приводить до зниження значення артриту з поліпшенням гістології. Anthony DD. Haqqi TM. *Collagen-induced arthritis in mice: an animal model to study the pathogenesis of rheumatoid arthritis*.

Clinical & Experimental Rheumatology. 17(2): 240-4, 1999.

Для пристан-індукованого артриту суглоби можна вимірювати за допомогою мікрометра для визначення напухання. У людей RA підраховується шляхом вимірювання напухання суглобів, еритми, обмеження рухливості та болі. Крім того, синовіальна рідина може бути проаналізована на концентрації цитокіну та запального білка, а також на склад та функцію лейкоцитів згідно зі способами, відомими в галузі техніки. Синовіальні біопсії забезпечують тканину для гістологічного аналізу згідно зі способами, відомими в галузі техніки. Felson DT.

Anderson JJ. Boers M. Bombardier C Furst D. Goldsmith C Katz LM. Lightfoot R Jr. Paulus H. Strand V. та ін. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. Arthritis & Rheumatism. 38(6): 727-35, 1995
Schiff M. A rationale for the use of summary measurements for the assessment of the effects of rheumatoid arthritis therapies. Clinical Therapeutics. 25 (3): 993-1001, 2003

3. Вовчак

Оцінка запалення:

Нормальний розвиток та функція імунної системи значною мірою залежать від видалення небажаних клітин за допомогою процесу, який називається апоптозом. Взаємодія клітина-клітина за допомогою специфічних молекул, які знаходяться на поверхні клітин, а також їх рецепторів, часто запускають цей процес. Одна така система називається FAS та FAS лігандом. Миші, які є дефектними за FAS (LPR/-) або FAS лігандом (GLD/-) розвивають системне захворювання, схоже на вовчак. Reilly CM. Gilkeson GS. Use of genetic knockouts to modulate disease expression in a murine model of lupus, MRL/lpr mice Immunologic Research. 25(2): 143-53, 2002.

Колонії LPR або GLD мишей вирощують в мікроізольованих будиночках в умовах навколишнього середовища, вільних від специфічного патогену. Такі миші можуть розвивати аутоімунітет спонтанно, але напевно після штучної індукції. Для індукції захворювання мишей у віці 8 тижнів піддають ін'єкції за допомогою агенту, подібного пристану. Протягом двох місяців миші мають аутоімунне захворювання. В галузі техніки відомо багато клінічних, гістологічних та імунологічних критеріїв, корисних для оцінки індукції захворювання та полегшення як у мишей, так і у людей. Satoh M. Richards HB. Shaheen VM. Yoshida H. Shaw M. Nairn JO. Wooley PH. Reeves WH. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. Clinical & Experimental Immunology. 121(2): 399-405, 2000

4. Ювенільний інсулінозалежний цукровий діабет (тип I)

Оцінка запалення:

NOD миші розвивають тип 1 цукрового діабету, подібний до людського, завдяки аутоімунному руйнуванню β клітин підшлункової залози. Клінічне, біохімічне, імунологічне та гістологічне дослідження згідно зі способами, відомим з рівня техніки дозволяє проводити оцінку індукції

захворювання та полегшення у мишей. Див., наприклад. Adorini L. Gregori S. Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. Trends in Molecular Medicine. 8(1): 31-8, 2002

5. Саркоїдоз

Оцінка запалення:

У моделі легеневого запалення шляхом емболізації за допомогою гранул антигени (тобто, Th1 або Th2) зливали з гранулами Сефарози, які емболізували в легені шляхом ін'єкції в їх хвостові вени. Тварин звичайно попередньо сенсibilізували за допомогою злитого антигену. Імунна система хазяїна розвиває інтенсивну імунну відповідь до гранул, що викликають алергічну реакцію. Такі вогнищеві запальні відповіді, які можуть тривати кілька тижнів, можуть бути перевірені на розмір. Вони також можуть бути ізольовані від тканин та вивчатися на склад клітин та продукцію цитокіну. Крім того, прикореневі лімфовузли та селезінки є легко доступними для експериментів. Див., наприклад, Kunkel SL. Lukacs NW. Strieter RM. Chensue SW. Animal models of granulomatous inflammation. Seminars in Respiratory Infections. 13 (3): 221-8, 1998

Саркоїдоз представляє собою захворювання людини, що звичайно втягує легені. Визначення саркоїдозу та ступеня захворювання може бути зроблене згідно зі способами, відомими з рівня техніки. Аналізи на легеневу функцію можуть оцінювати еластичність та функцію легенів. Крім того, бронхіальні змиви дають запальні клітини, які були інфільтровані у бронхіальне дерево під час запального процесу. Такі клітини можуть вивчатися на склад та функції. Легеневі інфільтрати та прикоренева лімфоаденопатія є характерними для саркоїдозу. Таким чином, періодична рентгенографія грудної клітки або СТ сканування може допомогти оцінити активність захворювання згідно зі способами, відомими з рівня техніки. Серологічні аналізи, такі, як вимірювання активності ангіотензинперетворюючого ферменту згідно з відомими з рівня техніки способами, можуть використовуватися для класифікації ступеня та активності захворювання. Див., наприклад, Hunninghake GW. Costabel U. Ando M. Baughman R. Cordier JP. du Bois R. Eklund A. Kitaichi M. Lynch J. Rizzato G. Rose C Selroos O. Semenzato G. Sharma OP. ATS/ERS/WASOG statement on sarcoidosis. American Thoracic Society/European Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. Sarcoidosis Vasculitis & Diffuse Lung Diseases. 16 (2): 149-73, 1999.

6. Розсіяний склероз

Оцінка запалення:

Експериментальний аутоімунний енцефаломієліт індукується у чутливих мишей шляхом повторюваної ін'єкції прийнятих сенсibilізуючих мієлінових антигенів. Мишей оцінюють клінічно згідно з наступними критеріями: 0, відсутність захворювання; 1, атонія хвоста; 2, слабкість задніх кінцівок; 3, параліч задніх кінцівок; 4, параліч задніх кінцівок та параліч або слабкість передніх кінцівок; 5, агонія. Для гістологічного аналізу видаляють спинний мозок та головний мозок та фіксують їх у

формаліні. Зрізи, які поміщаються у парафін, забарвлюють та вивчають під світловим мікроскопом. Дисперговані спленоцити та клітини з інших ділянок можуть вивчатися *in vitro* так, як описано вище. Такі параметри можуть допомогти визначити послаблення симптомів або полегшення, див. наприклад, Sewell, Diane, Zing Qing, Emily Reinke, David Elliott, Joel Weinstock, Matyas Sandor, та Zsuzsa Fabry. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *International Immunol.* 15: 59-69, 2003.

У людей активність захворювання MS визначається шляхом моніторингу розвитку та ремісії неврологічних ознак та симптомів. Вимірювання, що найбільш часто використовується для оцінки результатів, називається розширеною шкалою стану непрацездатності (інвалідності). Склад білків спинномозкової рідини та склад клітин, які аналізуються згідно зі способами, відомими з рівня техніки, можуть також використовуватися для моніторингу активності захворювання. Крім того, серійні MRI дослідження показують нові ураження мозку, які виявляються за допомогою гадолінію. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S,

Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis *Ann Neurol* 50(1): 121-7. 2001. Poser CM, Pary DW, Scheinberg L, та ін. "New Diagnostic Criteria For Multiple Sclerosis: Guidelines For Research Protocols" *Ann Neurol* 1983; 13: 227-231. Статистичні способи: Деякі дані для одного зразка аналізуються за допомогою критерію Ст'юдента для того, щоб визначити, чи середні значення значним чином відрізняються від 0. Парний критерій Ст'юдента використовується для аналізу відмінностей між групами середніх значень. Аналіз відхилення та критерій Дуннетта використовують для аналізу множинних порівняльних даних.

Тваринні моделі, що є корисними згідно з винаходом

Наведена нижче Таблиця 1 ілюструє необмежувальні приклади тваринних моделей, які є корисними згідно з даним винаходом. Додаткові необмежувальні приклади можуть бути знайдені у рівні техніки, наприклад, так, як описано в *Current Protocols in Immunology* (2001, Eds. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, published by John Wiley & Sons).

Таблиця 1

Захворювання, яке піддають лікуванню	Деякі тваринні моделі
1. Запальні захворювання кишечника	TNBS colitis (Neurath та ін., 1995, <i>J. of Exp. Med.</i> 182: 1281)
	IL-2 mutant mice (Ludviksson та ін., 1997, <i>J. of Immunol.</i> 158: 104)
	IL-10 mutant mice (Berg та ін., 1996, <i>J. of Clin. Investigation</i> 98: 1010)
	TCR transgenic mice (Mombaerts та ін., 1993, <i>Cell</i> 75: 274)
	CD45+ T cells transferred into SCID mice (Powrie та ін., 1994, <i>Immunity</i> 1: 553)
2. Ревматоїдний артрит	Murine pristane-induced arthritis (Stasluk та ін., 1997, <i>Immunol.</i> 90:81)
	Murine collagen-induced arthritis (Horsfall та ін., 1997, <i>J. of Immunol.</i> 159: 5687)
3. Інсулінозалежний діабет (тип 1)	NOD mouse (Cameron та ін., 1997, <i>J. of Immunol.</i> 159: 4686)
4. Вовчак	(NZW×NZB) F ₁ models (Santiago та ін., 1997, <i>J. of Exp. Med.</i> 185:65)
	GRD, LPR mouse (FAS mutation) (Bhandoola та ін., 1994, <i>Int. Rev. of Immunol.</i> 11: 231)
5. Саркоїдоз	Murine Berylliosis (Pfeifer та ін., 1994, <i>Int. Archives of Allergy & Immunol.</i> 104: 332)
	M. avium mouse (Chen та ін., 1994, <i>Science</i> 265:1237)
6. Множинний склероз	Experimental allergic encephalomyelitis in mice Owens T. Sriram S. 1995. <i>Neurol Clin.</i> 13(1): 51-73. Review. Degaonkar та ін., 2002, <i>J Magn Reson Imaging.</i> 16(2): 153-9. Duckers та ін., 1996, <i>Neuroscience</i> 1(2): 507-21.

Приклади

Винахід ілюструється наступними прикладами, які не обмежують його, та в яких використовуються приведені матеріали та способи. Повне розкриття кожного з літературних посилань, що приво-

диться в даній заявці, введено в дану заявку тільки як посилання.

Приклад 1. Загальні способи:

Тварини: Колонії 129/SVIL-10/- мутантних мишей та прийнятні контрольні тварини вирощуються згідно зі стандартними способами у спеціальних

клітках у приміщеннях, де підтримується навколишнє середовище, що не має патогену.

Підтримання паразиту, тваринна інфекція, одержання яєць шистосом: Підтримання *T. muris* та спосіб, який використовується для інфікування, є такими, як описано Else та Wakelin, 1990, *Parasitology*, том. 100, частина 3: 479.

Яйця шистосом збирають з печінок хом'яків, інфікованих шистосомами, та зберігають так, як описано Elliott, 1996, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*. 9: 255. П'ять інфікованих хом'яків дають приблизно 2×10^6 яєць.

Одержання яєць *T. suis*: Наступний процес використовували при одержанні та зборі яєць *T. suis*. Дорослих глистів *T. suis* ізолювали з товстого кишечника свиней через 7-8 тижнів після піддання свиней експериментальній інюкуляції яйцями *T. suis*. Яйця з зародком одержували шляхом культивування дорослих глистів в умовах *in vitro*, а потім виділені яйця відокремлювали від культурального середовища шляхом центрифугування, поміщали у 0,2% розчин дихромату калію при 22°C на 5-6 тижнів з барботуванням для одержання інфекційних личинок першого покоління. Яйця промивали двічі у стерильній воді при центрифугуванні при 1200 x g протягом 10 хвилин, підраховували та повторно суспендували у бажаній кількості фізіологічного розчину на основі підрахованої дози 2500. Ці яйця зберігали для використання у суб'єктів. Яйця є стабільними протягом, принаймні, одного року при зберіганні у холодильнику. Для гарантії інфективності ми спостерігали за появою яєць в екскрементах пацієнтів після колонізації. Кількість яєць в екскрементах є пропорційною інтенсивності зараження. Крім того, час від часу ми інфікували свиней за допомогою яєць, які зберігаються, для гарантування постійної інфективності.

Інфекція *M. avium*: Мишей інфікували шляхом введення 10^6 колонієутворюючих одиниць (CFU) *Mycobacterium avium* (ATCC 25291) інтраперитонеально. На 60 день після інфікування деякі миші також одержували 35 церкарій *S. mansoni* для індукції інфекції.

Інфекція шистосомами та ізоляція яєць: У деяких експериментах використовували мишей (18-20 г), інфікованих протягом 8-9 тижнів за допомогою *S. mansoni*. Мишей інфікували підшкірно за допомогою 40 церкарій пуерто-ріканського штаму.

Ізоляція гранульоми та диспергування: Гранульоми утворюються у мишей, інфікованих шистосомами внаслідок природного відкладання яєць, яке починається на 6-ому тижні після інфекції. *M. avium* також індукує утворення гранульом. Ми вивчали печінкові гранульоми, ізолювані від інфікованих мишей так, як було описано (Elliott, 1996, вище). Гранульоми диспергували для одержання суспензій одиничних клітин. Ізолювані гранульоми перемішували протягом 35 хвилин при 37°C у пристрої для струшування на водній бані у RPMI середовищі, що містить 5 мг/мл колагенази. Гранульоми, що залишилися, відсмоктували та пропускали через шприц на 1 мл для індукції додаткової дисоціації. Одержану клітинну суспензію фільтрували через дрітчасту сітку та тричі промивали. Життєздатність клітин визначали за допомо-

гою еозин-У виключення. Цей пропис приводить до одержання високого виходу життєздатних заpalьних клітин, що зберігають експресію поверхневих молекул.

Диспергування селезінки та MLN: Спленоцити та MLN диспергували шляхом препарування та промивання тканини через корозійно стійке сталеве сито. Забруднення RBC піддавали лізису за допомогою H_2O , та клітини промивали x 3 в RPMI перед використанням.

Індукція TNBS коліту: Коліти індукували шляхом ректальної інсталяції тринітробензолсульфонової кислоти (TNBS) так, як описано Neurath та ін., 1995, *J. Exp. Med.*, 182: 1281. Коротко, BALB/c контрольні миші або миші, яких піддавали інфікуванню паразитом, голодували протягом 30 годин, потім їх анестезували за допомогою метоксифлурану. Катетер розміром 1,2 мм вводили на 4 см у кишечник та вливали 0,1 мл розчину TNBS (5 мг/мл TNBS (Sigma) в 50% етанолі). Тварин тримали за хвіст протягом 3 хвилин для того, щоб впевнитися в однаковому контакті зі слизовою оболонкою кишечника.

Оцінка запалення слизової оболонки: Для класифікації кишкового запалення видаляли тканину у вказані моменти часу, піддавали обробці згідно з методикою Swiss-roll та поміщали у парафін у відповідності до стандартних способів. Зрізи забарвлювали за допомогою гематоксиліну та еозину. Ступінь запалення кишечника класифікували напівкількісно від 0 до 4 за допомогою сліпого способу одним патологом при використанні нашої звичайної стандартизованої методики (19). 0 = відсутність запалення, 1 = низький рівень запалення, 2 = середній рівень запалення, 3 = високий рівень запалення з потовщенням стінки, 4 = трансмуральна інфільтрація, втрата келихоподібних клітин, потовщення стінки.

Ізоляція клітин та збагачення Т-клітинами:

Th1, Th2 та регуляторні Т клітини можуть бути ізолювані згідно зі способами, відомими в галузі техніки, наприклад, так, як описано в *Current Protocols in Immunology* (2001, ред., John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, опубл. John Wiley & Sons)

В одному втіленні суспензії одиничних клітин MLN одержували шляхом обережного препарування за допомогою голки в RPMI 1640 середовищі (GIBCO, Grand Island, NY). Клітини протягом нетривалого періоду часу повторно суспендували у великому об'ємі дистильованої води для лізису RBC. Потім MLN тричі промивали у великому об'ємі RPMI.

Кишкові LPMC ізолювали так, як описано вище. Кишкові тканини інтенсивно промивали за допомогою RPMI, та усі видимі Пейєрові пляшки видаляли ножицями. Кишку розкривали уздовж, розрізали на шматочки 5 мм, а потім інкубували у 0,5 мМ ЕДТА у розчині Хенкса, вільному від кальцію та магнію, протягом 20 хвилин при 37°C при струшуванні для вивільнення інтраепітеліальних лімфоцитів та епітеліальних клітин. Цю процедуру повторювали після ретельного промивання. Потім тканину інкубували протягом 20 хвилин при 37°C в

20 мл RPMI, що містить 10% FCS, 25 мМ HEPES буфера, 2 мМ L-глутаміну, 5×10^5 М β -меркаптоетанолу, 1 мМ пірувату натрію, 100 од./мл пеніциліну, 5 мг/мл гентаміцину та 100 мг/мл стрептомицину (усі GIBCO) та 1 мг/мл колагенази (Sigma #CO130). У кінці процесу інкубації тканину піддавали додатковому механічному руйнуванню при використанні шприцу на 1 мл. Для видалення дебрису препарати LPMC промивали через попередньо зволожену марлю, шар якою містився у воронці з RPMI. Потім LPMC один раз промивали та просіювали через попередньо зволожений 2 см шар колонки, яка містить нейловону вату, упаковану у шприц на 10 мл. Після промивання клітини (до 2×10^6) нашаровували на колонку Percoll з градієнтом 30:70%. Клітини піддавали центрифугуванню при швидкості 2200 x G при кімнатній температурі протягом 20 хвилин. LPMC, зібрані з 30:70 поверхні розділу фаз, промивали та витримували на льоду до використання. Життєздатність клітин складала 90%, як визначали за допомогою способу еозин-Y виключення.

Для експериментів на клітинний перенос MLN Т клітини ізолювали за допомогою негативної селекції при використанні процедури SpinSep збагачення за допомогою покритих антитілами частинок з високою масою так, як описано виробником (#17031, #17032, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Проточну цитометрію використовували після кожного розділення для гарантії прийнятного відновлення та чистоти (>98%) $Thy1^+$ Т-клітин.

Перенос клітин:

MLN клітини ізолювали з IL10^{-/-} мишей, колонізованих за два тижні перед цим за допомогою H. polygus або від підібраних за віком здорових IL10^{-/-} мишей, в яких відсутня така колонізація. Такі нефракціоновані, дисперговані MLN клітини (2×10^7 клітини/миша) або MLN Т клітини (5×10^6 клітини/миша) потім перенесли у IL10^{-/-} мишей з колітом через 2 дні після завершення обробки піроксикамом шляхом інтраперитонеальної ін'єкції. Коліти оцінювали через 14 днів.

Додаткові способи для одержання регуляторних Т клітин

У деяких втіленнях даного винаходу регуляторні Т клітин можуть бути одержані з культивованих клітин або тварин для подальшого аналізу згідно зі способами, відомими з рівня техніки, наприклад, так, як описано у патентних заявках США з реєстраційними номерами 2003/0170648, 2003/0157057, 2003/0133936, 2003/0064067, 2003/0049696, 2002/0182730, 2002/0090724, 2002/0090357, які введені в дану заявку як посилання.

In vivo джерела популяцій клітин, корисні як джерела клітин, включають, але не обмежені, периферичну кров, продукти лейкофореzu крові, продукти аферезу крові, периферичні лімфатичні вузли, лімфоїдну тканину, асоційовану з кишечником, селезінку, тимус, пуповинну кров, мезентеричні лімфатичні вузли, печінку, сайти імунологічних пошкоджень, наприклад, синовіальну рідину, підшлункову залозу, спинно-мозкову рідину, зразки пухлини, тощо. Донор переважно представляє собою людину та може бути зародком, новонаро-

дженим, дитиною, дорослою людиною, а також може бути здоровим, хворим або схильним до захворювання індивідом, що представляє інтерес.

Наприклад, регуляторні Т клітини згідно з даним винаходом можуть бути збагачені на основі експресії маркерів поверхні клітин. В одному втіленні клітини є позитивно відібраними на експресію CD4 та CD25, та можуть бути негативно відібрані на відсутність CD45RA. Необов'язково можуть використовуватися інші маркери для подальшого розділення субпопуляцій регуляторних Т клітин, включаючи CD69, CCR6, CD30, CTLA-4, CD62L, CD45RB та CD45RO. Способи можуть включати додаткові процедури збагачення або очистки або етапи для ізоляції клітин шляхом позитивної селекції на інші специфічні для клітин маркери.

В іншому втіленні регуляторні Т клітини відокремлювали від складної суміші клітин за допомогою способів, які збагачують її на клітини, що мають характеристики $CD4^+CD25^+$ та необов'язково CD45RA. Для ізоляції клітин від тканини можна використовувати прийнятний розчин для диспергування або суспензії. Такий розчин у загальному випадку буде представляти собою збалансований сольовий розчин, наприклад, нормальний фізіологічний розчин, PBS, збалансований сольовий розчин Хенкса, тощо, який прийнятим чином доповнюється бичачою фетальною сироваткою, BSA, нормальною козячою сироваткою або іншими факторами, які існують в природі, у сполученні з прийнятим буфером у низькій концентрації, в загальному випадку від 5-25 мМ. Прийнятні буфери включають HEPES, фосфатні буфери, лактатні буфери та інші.

В іншому втіленні відокремлення популяції регуляторних Т клітин використовує афінне відокремлення для забезпечення суттєво чистої популяції. Способи для афінного відокремлення можуть включати магнітне відокремлення при використанні магнітних частинок, покритих антитілами, афінної хроматографії, цитотоксичних агентів, з'єднаних з моноклональним антитілом або таким, що використовується разом з моноклональним антитілом, наприклад, комплемент та цитотоксини, та «пеннінг» метод з антитілами, прикріпленими до твердого матриксу, наприклад, планшету, або за допомогою інших прийнятих технологій. Способи, які забезпечують точне розділення, включають пристрій для сортування активованих флуоресценцією клітин, що має варіабельні ступені удосконалення, такі, як багаточисленні канали забарвлення, канали визначення за допомогою малого кута та приглушеного світлорозсіювання, канали електричного опору, тощо. Клітини можуть бути відібрані проти мертвих клітин при використанні барвників, асоційованих з мертвими клітинами (йодид пропідію, LDS). Може використовуватися будь-яка технологія, яка не є надлишково шкідливою для життєздатності вибраних клітин.

Афінні реагенти можуть бути специфічними рецепторами або лігандами для молекул поверхні клітин, що зазначені вище. У доповнення до реагентів антитіл, можуть використовуватися також пари пептид-МНС антиген та рецептор Т клітин;

пептидні ліганди та рецептор; молекули ефектора та рецептора, тощо. Антитіла та рецептори Т клітин можуть бути моноклональними або поліклональними та можуть бути одержані за допомогою трансгенних тварин, імунізованих тварин, вбитих В-клітин людини або тварини, клітин, трансфікованих за допомогою ДНК векторів, що кодують антитіло або рецептор Т клітин, тощо. Деталі одержання антитіл та їх прийнятність для використання як специфічних зв'язувальних членів є добре відомими спеціалісту в даній галузі техніки.

Особливий інтерес представляє використання антитіл як афінних реагентів. Традиційно ці антитіла кон'югують з міткою для використання при розділенні. Мітки включають магнітні гранули, які дозволяють здійснювати безпосереднє розділення, біотин, який може бути видалений за допомогою авідину або стрептавідину, зв'язаними з носієм, флуорохромом, що можуть використовуватися разом з сортувальним пристроєм для активованих флуоресценцією клітин, або подібних, для того, щоб дозволити проводити легке відокремлення особливих типів клітин. Флуорохромом, що знайшли своє використання, включають фікобіліпротейн, наприклад, фікоеритрин та алофікоціаніни, флуоресцеїн та техаський червоний. Часто кожне антитіло є міченим різними флуорохромами для того, щоб проводити незалежне сортування на кожний маркер.

В одному втіленні антитіла додають до суспензії клітин та інкубують протягом періоду часу, достатнього для зв'язування поверхневих антигенів життєздатних клітин. Інкубація буде звичайно тривати, принаймні, 5 хвилин та звичайно менше, ніж 30 хвилин. Є бажаним мати достатню концентрацію антитіл у реакційній суміші, так, що ефективність розділення не є обмеженою відсутністю антитіла, тобто, використовуючи насичуючу кількість антитіла. Прийнятна концентрація може також бути визначена шляхом титрування. Середовище, в якому проводять розділення клітин, буде будь-яким середовищем, яке підтримує життєздатність клітин. Бажане середовище представляє собою фосфатно-буферний сольовий розчин, який містить від 0,1 до 0,5% BSA. Різноманітні середовища є комерційно доступними та можуть використовуватися згідно з природою клітин, включаючи модифіковане Дюльбекко середовище Ігла (dMEM), основний сольовий розчин Хенкса (HBSS), фосфатно-буферний сольовий розчин Дюльбекко (dPBS), RPMI, середовище Ісковера, PBS з 5 мМ ЕДТА, тощо, які часто є доповненими бичачою фетальною сироваткою, BSA, HSA, тощо.

За інтенсивністю забарвлювання клітин можна слідкувати за допомогою проточної цитометрії, де лазери визначають кількісні рівні флуорохромом (які є пропорційними кількості зв'язаного з антитілами антигену поверхні клітин). Проточна цитометрія, або FACS, може також використовуватися для розділення клітинної популяції на основі інтенсивності забарвлювання антитілом, а також інших параметрів, таких, як розмір клітин та розсіювання світла. Незважаючи на те, що абсолютні рівні забарвлювання можуть відрізнятися в залежності від конк-

ретного флуорохромом та препарату антитіла, дані можуть бути нормалізовані до контролю.

Мічені клітини потім розділяють відносно експресії CD4 та CD25. Розділені клітини можуть бути зібрані у будь-якому прийнятному середовищі, що підтримує життєздатність клітин та звичайно містить підкладку на дні пробірки для збору клітин. Різноманітні середовища є комерційно доступними та можуть використовуватися згідно з природою клітин, включаючи dMEM, HBSS, dPBS, RPMI, середовище Ісковера, тощо, що часто доповнені бичачою фетальною сироваткою.

Композиції, високо збагачені на активність людських регуляторних Т клітин, можна одержати таким чином. Популяція, яку необхідно одержати, буде міститися у кількості 70% або приблизно 70% або більше від клітинної композиції, та звичайно 90% або приблизно 90% або більше від клітинної композиції, та може бути настільки великою, що містить приблизно 95% або більше клітинної популяції. Збагачена клітинна популяція може використовуватися негайно. Клітини також можна заморожувати, незважаючи на те, що є бажаним заморожувати клітини перед проведенням процедури розділення, або можна заморожувати при температурах рідкого азоту та зберігати протягом тривалих періодів часу, розморожувати та використовувати повторно. Клітини звичайно будуть зберігатися в DMCO та/або FCS у поєднанні із середовищем, глюкозою, тощо. Розморожені клітини можна розмножувати при використанні ростових факторів, антигенної стимуляції, дендритних клітин, тощо, для проліферації та диференціації.

Клітинні культури:

Для аналізу цитокінів, клітини культивували протягом 48 годин у мікротитрувальних планшетах на 96 комірок (Corning, Cambridge, MA) з 200 нл середовища (5×10^5 клітин/комірка) при 37°C. Як культуральне середовище використовували RPMI, що містить 10% FCS, 25 мМ HEPES буфера, 2 мМ L-глутаміну, 5×10^{-5} М β -меркаптоетанолу, 1 мМ пірувату натрію, 100 од./мл пеніциліну, 5 мг/мл гентаміцину та 100 мг/мл стрептомицину (усі від GIBCO). Для більшості експериментів клітини культивують без додання або з доданням анти-CD3 (2C11, ATCC) та анти-CD28 моноклонального антитіла (Pharminogen, San Diego, CA) (кожне у концентрації 1 мкг/мл). Ізольовані Т клітини культивували у комірках, які попередньо були покриті протягом ночі за допомогою анти-CD3 та -CD28 моноклонального антитіла. Для аналізу IL12 клітини культивували з олігонуклеотидом, який має фосфорітований скелет ODN 1826 (TCCATGACGTTCTGACGTT) (SEQ ID NO. 3) який містить два (підкреслено) імуностимуляторні CpG фрагменти (13; 14), що забезпечується Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA), та використовували його у концентрації 0,6 мкг/мл для стимуляції продукції.

ELISA для мишачих цитокінів: ELISA проводили так, як описано у розділі VI, що приведений вище.

Приклад 2. Th2 відповідь на *S. mansoni* виявляє знижувальну модуляцію на існуючу Th1 відпо-

відь на неспоріднений бактеріальний Th1-індукований антиген:

Добре відомо, що Th-клітинні імунні відповіді можуть поляризуватися в Th1 або Th2 моделі. Така поляризація виникає внаслідок того, що $IFN\gamma$ з Th1 клітин інгібує проліферацію Th2 клітин, у той час як IL-4 та IL-10 з Th2 клітин інгібують розвиток Th1 клітин. Наступні експерименти продемонстрували, що шистосоматоз змінює Th1 відповідь у мишей на встановлену мікобактеріальну інфекцію.

Мишей сумісно інфікували за допомогою *M. avium* та *S. mansoni* для оцінки відповіді хазяйського організму на ці чітко відмінні Th1 та Th2 стимули запалення. BALB/cAnN миші розвивали хронічну *M. avium* інфекцію, коли проводили ін'єкцію цього організму (10^6 CFU). Через 60 днів після встановлення мікобактеріальної інфекції, мишей інфікували за допомогою *S. mansoni* (40 церкарій). Через 60 днів мишей забивали. Контрольні групи включали мишей, які одержували або тільки *M. avium* протягом 120 днів, або тільки *S. mansoni* протягом 60 днів. Дисперговані спленоцити або ізольовані клітини гранульоми з цих тварин культивували *in vitro* (4×10^5 клітини/комірка) протягом 48 годин у присутності або за відсутності антигену яєць шистосоми (SEA, сильний Th2 антиген) або очищеної білкової похідної мікобактеріальних антигенів (PPD, сильний антиген, що індукує Th1), які використовували в оптимальній концентрації. Після інкубації супернатанти аналізували на продукцію цитокіну або імуноглобуліну при використанні ELISA. Дані на Фігурах 1-3 представляють собою середні значення \pm стандартна похибка трьох окремих експериментів.

Спленоцити від мишей, інфікованих за допомогою *M. avium*, секретували велику кількість $IFN\gamma$ після стимуляції за допомогою PPD (Th1 антиген). Клітини селезінки від неінфікованих контрольних мишей не продукували $IFN\gamma$. Найбільш важливим є те, що не визначали $IFN\gamma$ у культурах клітин селезінки, одержаних від одночасно інфікованих мишей (тільки *M. avium* проти одночасної інфекції, $P < 0.01$, Фігура 1). Розчинний антиген яєць шистосоми (SEA, Th2 антиген) стимулює тільки вивільнення IL-4 та IL-5 зі спленоцитів тварин, інфікованих *S. mansoni*. Миші, індивідуально інфіковані за допомогою *M. avium*, не продукували IL-4 або IL-5 у відповідь на PPD або SEA. Проте спленоцити, одержані від сумісно інфікованих мишей, секретували деяку кількість IL-4 після стимуляції за допомогою PPD (Фігура 1).

Гранульоми ізолювали з печінок мишей, інфікованих за допомогою *M. avium* або *S. mansoni*, або від тварин, які мали одночасну інфекцію. Одночасно інфіковані тварини розвивали печінкові гранульоми, які містили як яйця шистосоми, так і мікобактерії, що можна було легко побачити при гістологічному дослідженні. Дисперговані клітини гранульоми від цих тварин культивували протягом 48 годин у присутності чи за відсутності SEA або PPD, який використовували в оптимальній концентрації. Гранульоми, одержані від мишей, які були інфіковані тільки *M. avium*, секретували великі кількості $IFN\gamma$ після стимуляції за допомогою PPD. Не визначали $IFN\gamma$ у культурах клітин гранульоми,

які одержані від одночасно інфікованих мишей (*M. avium* проти інших, $P < 0.001$) (Фігура 2). SEA стимулював вивільнення IL-4 з клітин гранульоми мишей, інфікованих *S. mansoni*. SEA не сприяє секреції $IFN\gamma$ за будь-яких обставин. Миші, які були інфіковані тільки за допомогою *M. avium*, не продукували IL-4 у відповідь на PPD. Проте клітини гранульоми, одержані від сумісно інфікованих тварин, секретували деяку кількість IL-4 після стимуляції за допомогою PPD (Фігура 2).

Th1 відповіді сприяють продукції IgG2a, у той час як Th2 реакції поліпшують продукцію IgG1 та IgE. Фігура 3 показує, що миші, інфіковані за допомогою *M. avium*, мають високі рівні IgG2a. Крім того, сумісно інфіковані тварини мали нормальні сироваткові концентрації IgG2a, але підвищені рівні IgG1 та IgE. Ці дані, узяті разом, показують, що Th2 відповідь на гельмінтну інфекцію може мати інгібувати існуючу відповідь хазяїна на організм, який володіє сильною індукцією Th1, подібний *M. avium*.

Приклад 3. Колонізація кишковими гельмінтами або їх яйцями атенує запалення кишечника Th1-типу у мишачій моделі TNBS-індуковано коліту:

Ректальна інсталяція TNBS в 50% етанолі індукувала коліт у мишей, які мали ознаки хвороби Крона. Кишкове запалення характеризується інфільтрацією CD4+ Т клітин з підвищенням експресії мРНК $IFN\gamma$. Т клітини власної пластини слизової оболонки, одержані від мишей, яких обробляли TNBS, секретували у 50 разів більше $IFN\gamma$ та у 5 разів менше IL-4, ніж Т клітини контрольні (Neurath та ін., 1995, вище). Мононуклеарні клітини власної пластини слизової оболонки секретували у 30 більше TNF α , ніж клітини, одержані від контрольних мишей (Neurath та ін., 1997, Eur. J. Immunol. 27: 1743). Важливим є те, що TNBS коліту можна було запобігати або поліпшувати його лікування за допомогою обробки анти-IL-12 (Neurath та ін., 1995, вище), анти-TNF α (Neurath та ін., 1997, вище), або rIL-10 (Duchmann та ін., 1996, Eur. J. Immunol. 26: 934). Індукованому TNBS коліту також можна було запобігати за допомогою попередньої оральної обробки гаптенем (Elson та ін., 1996, J. Immunol. 157: 2174), ймовірно, за рахунок підвищення рівнів IL-4, IL-10 та TGF β відповідей слизової оболонки (Neurath та ін., 1996, J. Exp. Med. 183: 2605).

Модель TNBS коліту при використанні BALB/c мишей є відомою. Ректальне введення TNBS (0,1 мл 5 мг/мл концентрованого розчину) в 50% етанолі викликає коліти у тварин відтворюваним чином. Для кожного з TNBS експериментів, що обговорюються вище, тваринам, які піддавалися впливу паразитів, та контрольним тваринам вводили той самий препарат TNBS у той самий день, за допомогою того самого оператора, який здійснював обробку тварин групи згідно зі «сліпою» процедурою.

А. Шистосомоз інгібує вивільнення $IFN\gamma$ з MLN клітин та клітин селезінки у мишей, оброблених за допомогою TNBS.

Досліджували, чи змінює шистосомна інфекція Th1 відповідь у мишей, модель коліту для яких здійснювали шляхом обробки TNBS. Мишей інфі-

кували за допомогою 35 церкарій *S. mansoni* шляхом підшкірної ін'єкції. Глисти проходили дозрівання та починали відкладати яйця приблизно через 6 тижнів після ініціації інфекції. Через два тижні (на 8 тиждень після інфекції) мишей оброблювали за допомогою TNBS. Здатність MLN клітин та клітин селезінки виробляти $IFN\gamma$ у відповідь на стимуля-

цію Т клітин (анти-CD3) вивчали через декілька днів. Як показано у Таблиці 2, природна шистосомна інфекція сильно інгібує вивільнення $IFN\gamma$ з мезентеріальних клітин лімфатичних вузлів (MLN) та клітин селезінки у мишей, оброблених TNBS.

Таблиця 2

Шистосомоз інгібує продукцію $IFN\gamma$ Т клітинами MLN та клітинами селезінки у мишей, оброблених TNBS

Група	α -CD3 стимульований $IFN\gamma$ (нг/мл)	
	MLN клітини	Клітини селезінки
Неінфіковані миші, які одержували TNBS	$3,2 \pm 0,7$	$44,1 \pm 2,3$
Інфіковані шистосомами миші, які одержували TNBS	$1,9 \pm 0,3^a$	$4,2 \pm 0,4^b$

Середнє значення $IFN\gamma$ (нг/мл) \pm стандартна похибка для трьохкратних визначень, які проводили за допомогою ELISA. а) $p < 0,1$ б) $p < 0,05$. Культури містили 10^6 диспергованих MLN клітин або клітин селезінки/комірка, їх інкубували в 200 мкл середовища протягом 48 годин при 37°C у присутності анти-CD3 (1 мкг/мл) (2C11). Результати є репрезентативними для трьох окремих експериментів.

В. Піддання впливу яєць шистосоми інгібує вивільнення $IFN\gamma$ з клітин MLN та клітин селезінки у мишей, яких обробляли TNBS.

При шистосомозі піддання обробці яйцями паразитів індукує кращу Th2 відповідь, ніж дорослі глисти. Шистосомна інфекція не індукує сильних Th2 відповідей до тих пір, поки глисти не дозріють та не почнуть відкладати яйця (Grzych та ін., 1991. J. Immunol. 146: 1322). Миші, яких піддавали обробці інтактними яйцями шистосом при відсутності природної інфекції, розвивали сильну Th2 відповідь (Oswald та ін., 1994, J. Immunol. 153: 1707). Ці спостереження дають змогу передбачити, що піддання дії яєць шистосом при відсутності природної інфекції може індукувати Th2 відповідь та пригнічувати Th1 відповідь.

Для визначення, чи буде попередня обробка яйцями шистосом інгібувати Th1 відповідь без необхідності інфекції зрілими глистами, мишей ін-

кулювали двічі за допомогою 10^4 яєць шистосом шляхом інтраперитонеальної ін'єкції на 14 та 4 дні перед ректальним введенням TNBS. Ці моменти часу були вибрані для того, щоб змодельовати безперервне відкладання яєць, що виникає при природній інфекції. Миші, яких не піддавали обробці яйцями паразитів, або обробляли за допомогою TNBS, служили як контролю. Попередньо яйця заморожували, вони не були життєздатними на момент ін'єкції. Ще раз здатність клітин MLN та клітин селезінки виробляти $IFN\gamma$ у відповідь на стимуляцію Т клітин (анти-CD3) перевіряли через кілька днів після введення TNBS. Подібно до природної шистосомної інфекції (Таблиця 1), піддання дії яєць, що вводяться інтраперитонеально, інгібувало продукцію $IFN\gamma$ Т клітинами MLN та селезінки в оброблених TNBS мишей, як показано у Таблиці 3.

Таблиця 3

Піддання інфекції яйцями шистосом інгібує продукцію $IFN\gamma$ Т клітинами MLN та клітинами селезінки у мишей, оброблених TNBS

Обробка	α -CD3 стимульований $IFN\gamma$ (нг/мл)	
	MLN клітини	Клітини селезінки
Тільки TNBS	$4,65 \pm 0,02$	$47,1 \pm 3,0$
Інтраперитонеальне введення яєць та TNBS	$2,19 \pm 0,11^a$	$21,8 \pm 3,4^b$

Середнє значення $IFN\gamma$ (нг/мл) \pm стандартна похибка трьохкратних визначень, які проводили за допомогою ELISA. а) $p < 0,1$ б) $p < 0,05$. Культури містили 10^6 диспергованих MLN клітин або клітин селезінки/комірка, їх інкубували в 200 мкл середовища протягом 48 годин при 37°C у присутності анти-CD3 (1 мкг/мл) (2C11). Результати є репрезентативними для трьох окремих експериментів.

С. Обробка яйцями шистосоми захищає мишей від TNBS-індукованого коліту.

Інгібування розвитку Th1 відповіді слизової оболонки може послаблювати (атенувати) TNBS-

індукований коліт. Попередня обробка яйцями шистосоми секрецію Th1 цитокіну Т клітинами MLN та клітинами селезінки. Для визначення, чи буде інтраперитонеальна ін'єкція яєць шистосоми інгі-

бувати TNBS-індукований коліт, яйця вводили шляхом ін'єкції, як описано вище, після чого проводили обробку TNBS. Обробка яйцями значно знижувала кумулятивну смертність у трьох окремих експериментах з 60% (16/27) у контрольній групі до 22% (6/27) у мишей, яких піддавали обробці яйцями. Кишкове запалення підраховували згідно з чотирьохрівневою шкалою, як детально описано вище у розділі Загальні методи. У трьох мишей, що вижили, обробка яйцями атенувала кишкове запалення від $3,1 \pm 0,5$ (середнє значення \pm стандартна похибка) у контрольній групі до $1,3 \pm 0,3$ у мишей, яких піддавали обробці яйцями ($p < 0,05$, Фігура 4). Подальші експерименти показали, що найбільша різниця між групами була очевидною на третій день після обробки TNBS. Інші експерименти, які проводили через 14 днів після введення TNBS, показали, що піддання обробці яйцями забезпечує тривалий захист. Ці дані показують, що яйця шистосом захищають мишей від розвитку смертельного коліту шляхом інгібування Th1 відповідей слизової оболонки.

Р. Кишкові гельмінти індукують Th2 відповіді у хазяїна

Перевіряли, чи можуть гельмінтні паразити, відмінні від *S. mansoni*, модулювати Th1 відповіді хазяїна. Експресія протективного імунітету до кишкових нематод є залежною від CD4 T клітин. Миші усувають глистів або обмежують інфекцію шляхом індукції Th2 відповіді. Видалення глистів не є таким, що виключно залежить від кишкової еозинофілії, ні мастоцитозу слизової оболонки. IL-4 може грати вирішальну роль у видаленні глистів, оскільки обробка за допомогою блокуючих моноклональних антитіл до рецепторів IL-4 або IL-4 сприяє утриманню глистів (Else та ін., 1994, J. Exp. Med., 179: 347). На противагу до цього, обробка IL-4 сприяє очищенню від глистів (Фігура 4).

Т. *muris* живе у товстому кишечнику мишей. Цей організм є спорідненим з *Trichuris trichiura*, паразитом, який населяє близько одного мільярда людей протягом їх життя (Grencis та ін., 1996, Gastroenterology Clinics of North America, 25: 579). Споживання яєць ініціює інфекцію. Яйця вивільняють личинок, які проходять через цекальний епітелій. Потім вони визрівають до дорослих глистів. Паразит не відтворюється у межах, які дозволяють нам контролювати інтенсивність інфекції (Bancroft та ін., 1994, Eur. J. Immunol., 24: 3113).

Т. *muris* використовується для знижувальної модуляції кишкової Th1 чутливості. Інфекція Т. *muris* індукується шляхом орального введення 250 яєць, що містять життєздатні личинки. BALB/c миші можуть нести Т. *muris*, природним чином виганяють глистів протягом 4 тижнів після інфекції. Інфікованих Т. *muris* або симулятивно інфікованих мишей піддавали ректальному введенню TNBS

через 4 тижні після ініціації інфекції. Попередня колонізація за допомогою Т. *muris* знижувала кумулятивну смертність у двох окремих експериментах з 58% (7/12) у симулятивно інфікованій групі до 21% (3/14) у групі, яка піддавалася обробці паразитом. Крім того, миші, попередньо колонізовані за допомогою Т. *muris*, розвивали атенуований TNBS коліт ($0,92 \pm 0,5$, середнє значення \pm стандартна похибка) у порівнянні з симулятивно інфікованими мишами ($3,13 \pm 0,63$, $p < 0,05$). Ці дані показують, що попереднє піддання дії кишкових паразитів (Т. *muris*) захищає мишей від розвитку тяжкого Th1-опосередкованого коліту.

Приклад 4. Пошкодження гена IL-10 не змінює в значній мірі взаємодію хазяїн/паразит

IL-10 представляє собою важливий імунорегуляторний цитокін, який викликає знижувальну модуляцію активації макрофагів та допоміжних функцій клітини (Moore та ін., 1993, Ann. Rev. Immunol., 11: 165). Миші, які мають порушену за допомогою спрямованого пошкодження гена функцію IL-10 (IL-10^{-/-}), розвивають хронічний ентероколіт, який знає впливу з боку кишкової флори (Kuhn та ін., 1993, Cell, 75: 263). Кишкове запалення атенується за допомогою обробки анти-IFN γ антитілом, що свідчить про те, що коліт виникає внаслідок дуже надлишкових Th1 відповідей на вміст кишечника (Berg, та ін., 1996, J. Clin. Invest., 98: 1010). Такі миші служать відмінними моделями для спонтанного коліту, подібного до такого, що спостерігається при хворобі Крона. У цьому прикладі використовували IL-10^{-/-} мишей на фоні 129 та C57B1/6.

А. IL-10^{-/-}-миші можуть розвивати Th2 відповіді на паразитів.

Миші, інфіковані кишковою нематодою *N. brasiliensis*, розвивають запалення Th2-типу на паразита з продукцією IL-4, IL-5 та IL-10. *N. brasiliensis* може колонізувати IL-10^{-/-} мишей та стимулювати прийнятну кишкову Th2 відповідь (Kuhn та ін., 1993, вище). IL-10^{-/-} мишей інфікували за допомогою *S. mansoni* для перевірки, чи можуть вони розвивати Th2 відповідь.

Таблиця 4 показує, що спленцити, одержані від мишей з порушеним геном IL-10, колонізованих протягом 8 тижнів за допомогою *S. mansoni*, секретують великі кількості IL-4 при стимуляції за допомогою антигену яєць шистосом (SEA) або анти-CD3. Гранульоми, які оточують яйця шистосом у цих мишей, звичайно містять високий процент (45-50%) еозинофілів та виробляють IL-4 та IL-5. Таким чином, вони демонструють ефективну Th2 відповідь. Ці дані свідчать про те, що піддання дії гельмінтного паразиту, подібного *S. mansoni*, буде індукувати сильну Th2 відповідь навіть при відсутності IL-10.

Таблиця 4

Шистосомоз індукує Th2 відповідь у мишей, дефектних за IL-10

Клітини селезінки, одержані від мишей, інфікованих шистосомами			
Цитокін	Нестимульовані	SEA-стимульовані	α -CD3-стимульовані
IL-4 (нг/мл)			
Дикого типу	0,07 \pm 0,08	0,21 \pm 0,02	3,94 \pm 0,12
IL-10-/-	0,41 \pm 0,10	2,56 \pm 0,2	5,06 \pm 0,33

Середнє значення IFN γ (нг/мл) \pm стандартна похибка трьохкратних визначень, які проводили за допомогою ELISA. а) $p < 0,1$ б) $p < 0,05$. Культури містили 10^6 диспергованих MLN клітин або клітин селезінки/комірка, їх інкубували в 200 мкл середовища протягом 48 годин при 37°C у присутності анти-CD3 (1 мкг/мл) (2C11). Результати є репрезентативними для трьох окремих експериментів.

В. Гельмінтне Th2-кондиціювання інгібує природний розвиток запалення слизової оболонки у IL-10 -/- мишей

Дефектні за IL-10 миші можуть бути заселені гельмінтними паразитами та розвивати сильну Th2 відповідь. Оскільки IL-10 -/- миші можуть розвивати Th2 відповідь та бути заселені гельмінтними паразитами, вони служать відмінними моделями для вивчення ефекту дії паразиту на спонтанний або вже існуючий коліт. IL-10 представляє собою важливий протизапальний цитокін. Можливо, що порушення цього суттєвого імунорегуляторного кола буде запобігати Th2 кондиціюванню слизової оболонки паразитами. Даний аргумент показує, що інфекція за допомогою *T. muris* перешкоджає спонтанному коліту, що розвивається у IL-10-/- мишей. Тварин (у віці 6 тижнів), які одержували *T. muris* або симулятивну інфекцію, забивали через 6 тижнів. Запалення товстого кишечника в IL-10-/- мишей, інфікованих *T. muris*, або симулятивно інфікованих мишей, підраховували за чотирьохрівневою шкалою, як детально описано у розділі Загальні способи, що представлений вище. Попередня інфекція за допомогою *T. muris* послаблює кишкове запалення від $3,0 \pm 0,3$ (середнє значення \pm стандартна похибка) у симулятивно інфікованій групі до $2,2 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) у мишей IL-10-/-, яких піддавали дії паразиту. Ці дані демонструють, що попереднє піддання дії гельмінтних паразитів послаблює спонтанний коліт у IL-10 дефектних мишей.

Приклад 6. Кишкова колонізація за допомогою *Trichuris suis* виявляє знижувальну модуляцію стосовно активності захворювання у пацієнтів з хворобою Крона:

Пацієнтів з хворобою Крона колонізували за допомогою *Trichuris suis* та оцінювали поліпшення активності захворювання. *T. suis*, свинячий власоглав, є близько спорідненим з *T. trichiura*, людським кишковим гельмінтом, який є поширеним у нерозвинутих країнах. Цей власоглав є потенційним агентом для терапії. Природний паразит людини *Trichuris trichiura* є дуже малим організмом, який населяє товстий кишечник, приєднуючись до слизової оболонки. Звичайна інфекція, як правило, не викликає ніяких симптомів та не спричинює ніяких проблем зі здоров'ям у хазяїна. Такі випадки є типовими для мільйонів людей по всьому світу, але у деяких людей тяжка інфекція викликає

діарею, кровотечу та анемію, обумовлену нестачею заліза. Представляє інтерес, що цикл життя паразиту є таким, що хазяїн не піддається самозараженню. Яйця будуть вимагати твердої фази для визрівання для того, щоб стати інфекційними а потім повинні бути повторно проковтнуті для збільшення паразитичного навантаження на індивідуума. Таким чином, заселення *T. trichiura* не буде збільшуватися у хазяїні, поки хазяїн не проковтне яйця з ґрунту. Агент легко та ефективно піддається лікуванню шляхом введення протягом трьох днів мебендазолу. Людський власоглав може використовуватися для колонізації хазяїна та вважається експериментальним агентом для модифікації імунного процесу при хворобі Крона.

Проте *Trichuris trichiura* створює потенціальну проблему для здоров'я хазяїна. Оскільки людина є тільки природним хазяїном, яйця для експериментально використання повинні збиратися від інших людей, що створює потенціал для трансмісії інших інфекційних захворювань людини експериментальному суб'єкту. Тому використовували близько споріднених паразитів тварин. Свинячий власоглав (*Trichuris suis*) володіє потенціалом для короточасної колонізації хазяїна без спричинення симптомів, захворювання та сумісних інфекційних захворювань або без створення загрози для громадського здоров'я.

Свинячий власоглав є близько спорідненим до видів, які інфікують людей. Два організми входять до однієї й тієї ж родини та є морфологічно подібними, але вони належать до різних видів та можуть розрізнятися морфологічно, за своїм розвитком та клінічно. Яйця свинячого власоглаву є трошки більшими, мають різну форму обертання, швидкість розвитку з яєць до дорослої особини є меншою, ніж така для *Trichuris trichiura* (Beer, 1976, Res. Vet. Sci, 20: 47). Важливим є те, що ми можемо одержати інфекційні яйця паразиту з SPF тварин.

Забезпечення інфекційними яйцями *T. suis* проводять так, як описано вище. Яйця аналізують для того, щоб підтвердити відсутність контамінації за допомогою кишкових паразитів (наприклад, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* та ентеротоксична *E. coli*) та вірусів (наприклад CMV, HSV, VZV, аденовіруси та ентеровіруси).

Двох пацієнтів з розвинutoю, стійкою до фармацевтичного лікування хворобою Крона колонізу-

вали за допомогою *T. suis*. Вони є стійкими до паразиту з незначними симптомами або з відсутніми симптомами, які приписуються цьому організму. Таблиця 5 показує, що після колонізації пацієнтів обидва учасники мали спад у значеннях CDAI,

діареї та індексах запалення. Цей результат свідчить про те, що гельмінти є корисними для модуляції аномальних імунних відповідей, включаючи, але не обмежуючись, хворобу Крона.

Таблиця 5

Пацієнти з хворобою Крона можуть мати користь від колонізації за допомогою *T. suis*.

	Пацієнт Параметр	Базова лінія a	Тиждень 2 b	Тиждень 4 b•
1	CDAI ^c	250,2	269,9	147,4
	Випорожнення кишечнику/тиждень	67	101	49
	ESR ^d	17	11	4
	С-реактивний білок	<0,5	<0,5	<0,5
2	CDAI	341,3	169,6	136,7
	Випорожнення кишечнику/тиждень	77	27	25
	ESR	19	7	ND
	С-реактивний білок	0,9	<0,5	<0,5

а) Стабільні показники при входженні у дослідження, b) Значення на 2 та 4 тижні після ініціації колонізації за допомогою *T. suis*. c) Індекс активності захворювання хвороби Крона, d) Швидкість осідання еритроцитів. NB; не визначали.

Приклад 7. *H. polygyrus* у запобіганні та терапії запального захворювання кишечника:

Для оцінки ролі регуляторних Т клітин при індукованому паразитом захисті проти запального захворювання проводили дослідження.

В експериментах використовували мишачих кишкових гельмінтів *H. polygyrus*. *H. polygyrus* населяє дванадцятипалу кишку хазяїна без спричинення запалення або пошкодження термінально відділу ободової кишки або товстого кишечника. TNBS у спирті індукує коліт, коли вводиться інтра ректально мишам. Фіг. 5 показує, що цей організм захищає мишей від TNBS-індукованого коліту. Колонізація встановлюється шляхом орального проковтування 200 життєздатних личинок. Миші усувають глистів приблизно через 2 тижні після ініціації колонізації. Інфікованих *Я. polygyrus* мишей або симулятивно інфікованих мишей обробляли за допомогою ректального введення 0,1 мл TNBS (5 мг/мл в 50% EtOH) через 4 тижні після початку колонізації. Запалення оцінювали на забарвлених гістологічних зрізах через 3 дні після індукції коліту.

Експерименти проводили для аналізу, чи захищає гельмінтна колонізація мишей від IBD, індукованого TNBS шляхом обмеження кишкової продукції - Th1 цитокінів, подібних IFN γ , TNF α та IL12. Фіг. 6 та 7 показують, що піддання здорових мишей дикого типу, вільних від IBD впливу *Я. polygyrus*, забезпечує той факт, що дистальна слизова оболонка кишечника є менш здатною до продукції IFN γ та IL12.

Регуляторні цитокіни, подібні IL10, TGF β та PGE2, є здатними до обмеження функції Th1 клітин. Було визначено, що *Я. polygyrus* сприяє продукції цих регуляторних цитокінів у межах слизової оболонки кишечника. Фіг. 8 показує, що цей глист ін-

дукує продукцію IL-10 слизовою оболонкою. IL-10 виявляє знижувальну регуляцію на множини прозапальних медіаторів, подібних TNF α , IL6 та IL12. Таким чином, є підстави передбачати, що IL-10, який виробляється у слизовій оболонці кишечника, обмежує Th1 клітинну функцію. Фіг 9 показує, що LPMC, одержані від мишей з *H. polygyrus*, виробляють суттєво більше IFN γ при культивуванні з інгібітором анти-IL10R моноклональних антитіл, що підтримує цей постулат.

Потенційно важливі імунорегуляторні цитокіни, що можуть захищати від захворювання, включають простагландин E2 (PGE2), IL4, IL5, IL13 та TGF β . Фігури 10-12 показують, що гельмінти індукують продукцію проективних цитокінів E2 (PGE2), IL4, IL5, IL13 та TGF β у слизовій оболонці кишечника.

Т клітини є основним джерелом IFN γ у слизовій оболонці кишечника (Фіг. 13). IFN γ є важливим для індукції TNBS коліту.

Кишкові гельмінти індукують регуляторні Т клітини MLN, що мігрують до кишечника для локального контролю імунної реактивності слизової оболонки. Експерименти виявили (Фіг. 14), що LPMC, одержані від нестимульованих та неінфікованих мишей дикого типу, демонструють знижену здатність до продукції IFN γ після переносу Т клітин MLN з мишей, інфікованих глистами.

У деяких експериментах використовували трансгенних мишей з зеленим флуоресцентним білком (GFP) для проведення експериментів з чутливого переносу для визначення, чи поступають піднабори регуляторних Т клітин MLN у власну пластину слизової оболонки кишечника для подальшої продукції цитокінів. Як видно з Фігури 15, путативні регуляторні Т клітини MLN, одержані з GFP+ мишей, які несуть *H. polygyrus*, поступають у

слизову оболонку кишечника здорових реципієнтів дикого типу.

Цей експеримент показав як гельмінти забезпечують захист від захворювання. Було виявлено у клінічних дослідженнях, що колонізація гельмінтами полегшує активний IBD. Було також досліджено, як колонізація *H. polygyrus* усуває існуючий коліт у мишей.

IL10^{-/-} миші розвивали хронічний Th1 коліт, що прогресував з віком тварин. Проте, як це справедливо для більшості моделей спонтанного захворювання IBD, IL10^{-/-} миші розвивали коліт в умовах SPF з варіабельною експресією тільки через кілька місяців. IBD модель удосконалювали для того, щоб зробити її більш корисною для експериментів. Було виявлено, що введення мишам IL10^{-/-} у віці 5 тижнів NSAID (піроксикам) протягом 2 тижнів індукує тяжкий Th1 коліт, що неявним чином персистує навіть після того, як припиняють введення лікарського засобу. Запалення є високо передбачуваним від однієї миші до іншої, втягуючи кишечник та Т1 з однорідною тяжкістю (Фіг. 16). Миші дикого типу не розвивали коліту при обробці піроксикамом.

Було виявлено, що колонізація IL10^{-/-} мишей за допомогою *H. polygyrus* усуває існуючий раніше коліт (Фіг. 17). Миші C57BL/6IL10^{-/-} у віці 5 тижнів отримували піроксикам (80 мг/250 г корму). Через 2 тижні введення піроксикаму припиняли. У цей момент часу усі миші мали коліт. Через два дні після того, як припиняли введення піроксикаму, деяких мишей колонізували за допомогою 200 *H. polygyrus*, які вводили за допомогою шлунокового зонду, у той час як інші були симулятивно оброблені. Через два тижні колонізації значення колітів падало з 3,6 ± 0,4 (SE) у контролях до 0,55 ± 0,5 у колонізованих мишей (p=0,001).

Лікування існуючих колітів за допомогою *H. polygyrus* асоціюється зі змінами у продукції цитокіну LPMC.

LPMC, ізольовані з нестимульованих (при відсутності піроксикаму) або колітних симулятивно колонізованих мишей, вивільняли значні кількості IFN γ при стимуляції за допомогою анти-CD3/анти-CD28 (Фіг. 18), та IL12 при стимуляції за допомогою CpG олігонуклеотиду (0,6 мкг # 1826/мл). LPMC, одержані з IL10^{-/-} мишей, яких піддавали обробці піроксикамом та які були колонізовані *H. polygyrus*, виробляли IFN γ у кількості від незначної до такої, що не є здатною до чутливого виявлення за допомогою ELISA (30 пг/мл) та мали знижене вивільнення IL12 (Фіг. 18). LPMC, одержані від нестимульованих або колітних IL10^{-/-} мишей, не виробляли IL4 та виробляли незначну кількість IL13 (Фіг. 19). На противагу до цього, LPMC, одержані від колонізованих за допомогою *H. polygyrus* мишей, виробляли незначну кількість IL4 та великі кількості IL13. Гельмінтна колонізація усувала запалення кишечника, але цитокіновий профіль LPMC не повертався до такого, що характерний для нестимульованих IL10^{-/-} мишей. Крім того, колонізація приводить до нового профілю цитокінів, асоційованого із заживленням коліту.

Колонізація *H. polygyrus* активізує регуляторні механізми в LPMC IL10^{-/-} мишей. Перемішування

LPMC, що продукують IFN γ , одержаних від колітних IL10^{-/-} мишей у співвідношенні 1:1, з LPMC, одержаними з мишей колонізованих *H. polygyrus*, приводить до співкультур з інгібованою продукцією IFN γ .

H. polygyrus населяє дванадцятипалу кишку, але ініціює регуляторні механізми, що усувають коліт та змінюють існуючі раніше цитокінові профілі для LPMC. Було продемонстровано, що колонізація гельмінтами індукує та активує циркуляторні регуляторні клітини у межах Т-клітинного компартменту MLN у мишей, колонізованих *H. polygyrus*. Перенос 20 × 10⁶ MLN клітин або 5 × 10⁶ Т клітин MLN з колонізованих *H. polygyrus* IL10^{-/-} мишей до тварин із встановленим IL10^{-/-} колітом приводить до усунення запалення (Фіг. 20).

Scurfin представляє собою транскрипційний фактор, який кодується геном foxp3, що є важливим для розвитку або активності регуляторних Т-клітин. Кількість Foxp3 транскриптів є підвищеною в MLN мишей, колонізованих *H. polygyrus*, у порівнянні з мишами, вільними від глистів, як було кількісно встановлено за допомогою RT-ПЛР у реальному часі (Фіг. 21). Кожне зниження порогового значення у циклі ПЛР є еквівалентним подвійному вмісту FoxpS, нормалізованому до HPRT мРНК. Колонізація гельмінтами приводить до 3- - 5-кратного підвищення експресії FoxpS в MLN клітинах. FoxpS також підвищується (у три рази) в LPMC IL10^{-/-} мишей, колонізованих за допомогою *H. polygyrus* у порівнянні з контролями, вільними від глистів. Тільки регуляторні Т клітини є відомими як такі, що експресують FoxpS (Hori, S., T. Nomura, та S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cells development by the transcription factor FoxpS. Science. 299: 1057-1061). The increase in FoxpS expression in MLN and LPMC supports the hypothesis that helminths induce regulatory T cells that orchestrate resolution of established colitis.

Інші транскрипти для імунорегуляторних факторів змінюються за допомогою колонізації *H. polygyrus*. Smad7 представляє собою транскрипційний фактор, який блокує передачу сигналів TGF β . Колонізація *H. polygyrus* знижує експресію Smad 7 клітинами MLN у 4,5 рази, як біло визначено за допомогою RT-ПЛР у реальному часі (Фіг. 22). Smad7 транскрипти також є зниженими в LPMC. Зниження Smad7 буде дозволяти клітинам бути більш чутливими до імунорегуляторного TGF β . Крім того, зниження експресії Smad7 показує, що для усунення IL10^{-/-} коліту існують багато численні регуляторні механізми.

Праймери для зонду для Smad7 представляють собою TCCTGCTGTGCAAAGTGTTTC (SEQ ID NO. 4), GAGTAAGGAGGAGGGGAGAGA (SEQ ID NO. 5), та FAM-TTGATCTTCCCGTAAGATTACAGCAACA-TAMRA (SEQ ID NO. 6). Експресія мРНК Foxp3 та Smad7 нормалізується до такої для HPRT. Праймери та зонди для HPRT представляють собою: TGAAGAGCTACTGTAATGATCAGTCAAC (SEQ ID NO. 7), GCAAGCTTGCAACCTTAACCAT (SEQ ID NO. 8), та TET-TGCTTTCCCTGGTTAAGCAGTACAGCCC-TAMRA (SEQ ID NO. 9).

Представлені вище приклади демонструють експерименти, заплановані та проведені авторами даного винаходу для здійснення даного винаходу. Передбачається, що ці приклади включають розкриття способів, які служать як для інформації рівня техніки про здійснення винаходу, так і для демонстрації його корисності. Спеціаліст в даній галузі техніки може оцінити, що способи та втілення, розкриті в даній заявці, представляють собою тільки

такі, що можуть використовуватися у багаточисленних еквівалентних способах та методиках для досягнення того самого результату.

Усі посилання, вказані в даній заявці вище, введені в дану заявку як посилання у тій мірі, в якій вони описують, представляють, забезпечують основу для можливих композицій та/або способів, які можуть бути важливими для практики одного або більше втілень згідно з даним винаходом.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```

<110> University of Iowa
<120> Застосування паразитичних біологічних агентів для запобігання
захворюванню.
<130> 27045/2038
<140> Ще не визначено
<141> 22 жовтня 2004 року

<150> 10/715,659
<151> 17 листопада 2003 року

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 42
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(42)
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 1
cccaggaaag acagcaacct tttctcaca ccaggccact tg
42

<210> 2
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 2
atcctaccca ctgctggcaa atggagtc
28

<210> 3
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 3
tccatgacgt tcctgacgtt
20

```

<210> 4
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 4
 tcctgctgtg caaagtgttc

20

<210> 5
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(20)
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 5
 gagtaaggag gagggggaga

20

<210> 6
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 6
 ttgatcttcc cgtaagattc acagcaaca

29

<210> 7
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

<400> 7
 tgaagagcta ctgtaatgat cagtcaac

28

<210> 8
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

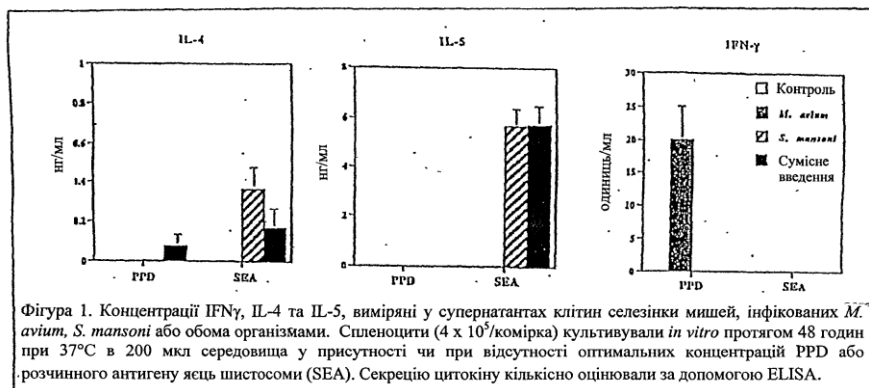
<400> 8
 gcaagcttgc aaccttaacc at

22

<210> 9
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Синтетичний олігонуклеотид
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223> Синтетичний олігонуклеотид

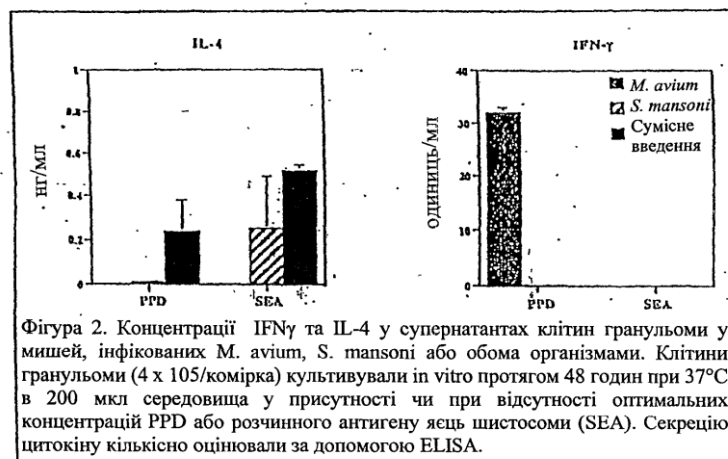
<400> 9
 tgctttccct ggtaagcag tacagccc

28



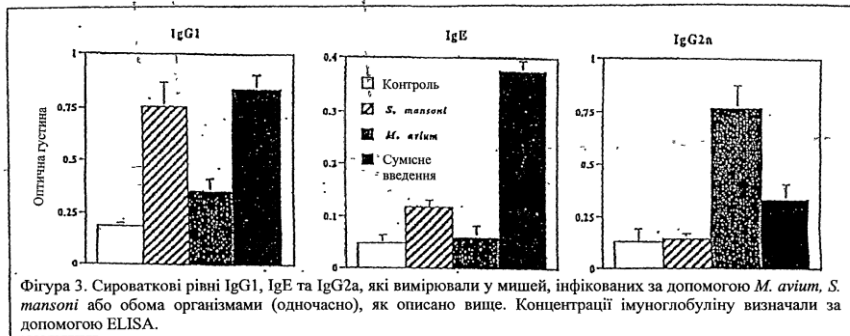
Фігура 1. Концентрації IFN γ , IL-4 та IL-5, виміряні у супернатантах клітин селезінки мишей, інфікованих *M. avium*, *S. mansoni* або обома організмами. Спленцити (4×10^5 /комірка) культивували *in vitro* протягом 48 годин при 37°C в 200 мкл середовища у присутності чи при відсутності оптимальних концентрацій PPD або розчинного антигену яєць шистосом (SEA). Секрецію цитокіну кількісно оцінювали за допомогою ELISA.

Фігура 1

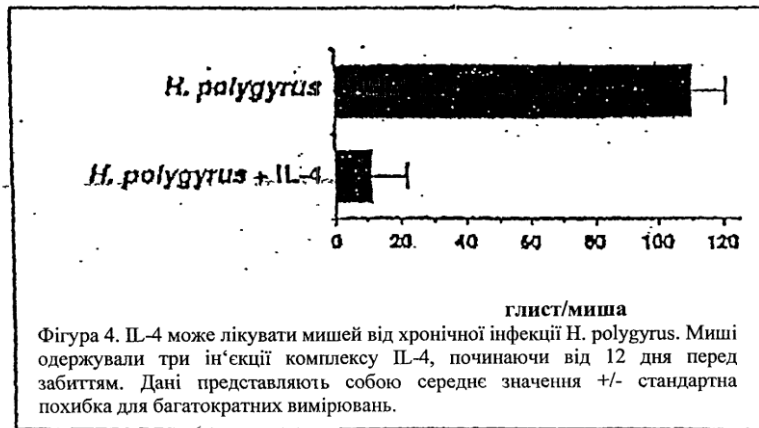


Фігура 2. Концентрації IFN γ та IL-4 у супернатантах клітин гранульоми у мишей, інфікованих *M. avium*, *S. mansoni* або обома організмами. Клітини гранульоми (4×10^5 /комірка) культивували *in vitro* протягом 48 годин при 37°C в 200 мкл середовища у присутності чи при відсутності оптимальних концентрацій PPD або розчинного антигену яєць шистосом (SEA). Секрецію цитокіну кількісно оцінювали за допомогою ELISA.

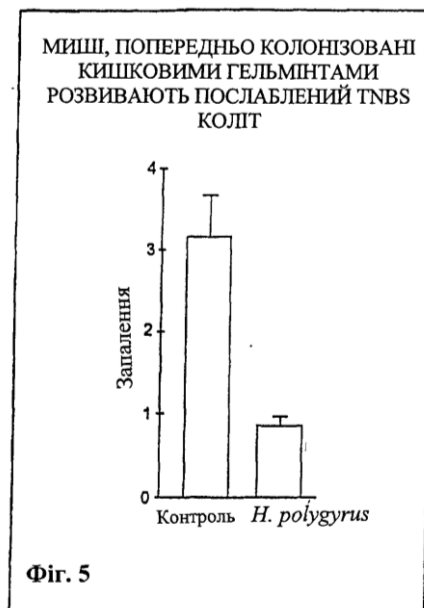
Фігура 2

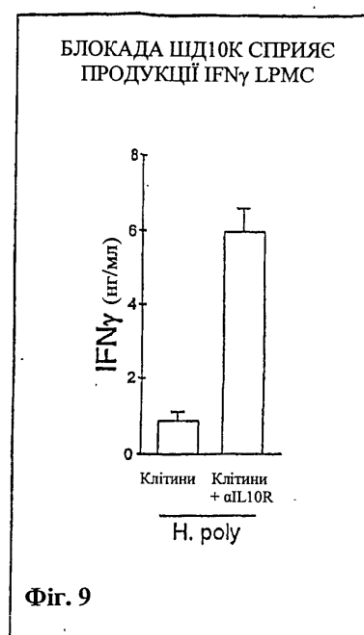
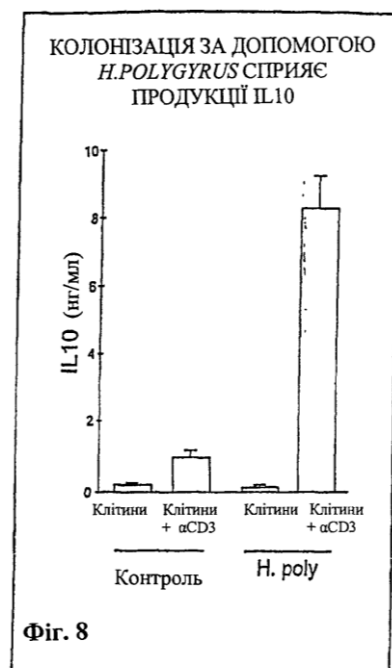
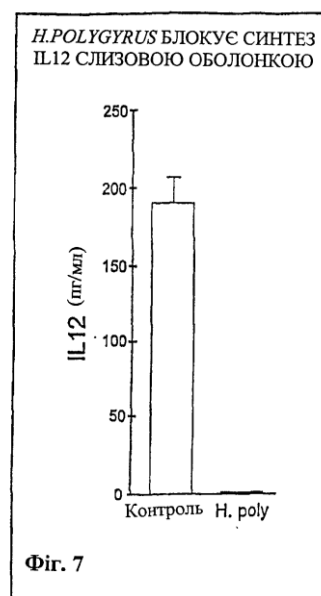
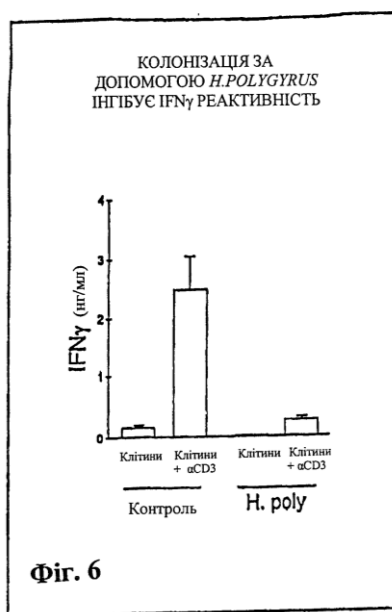


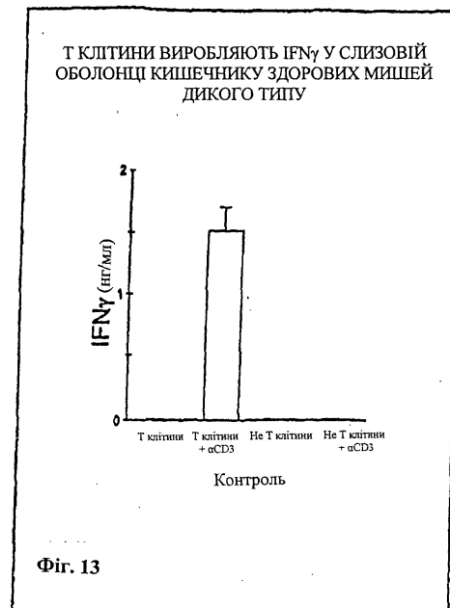
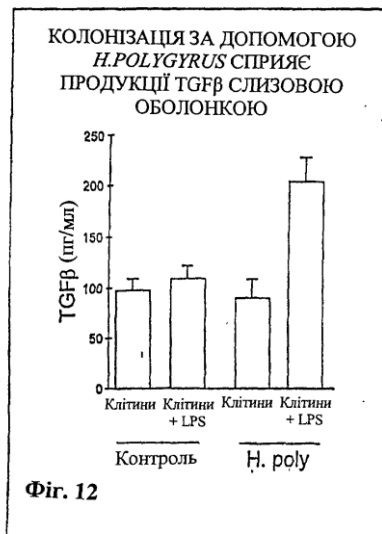
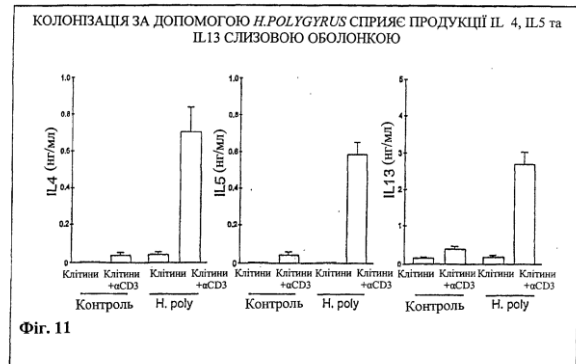
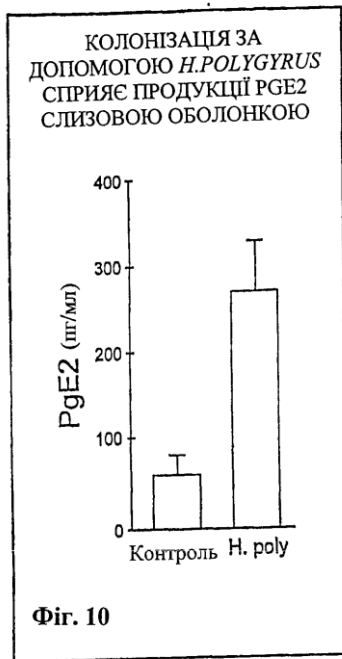
Фігура 3



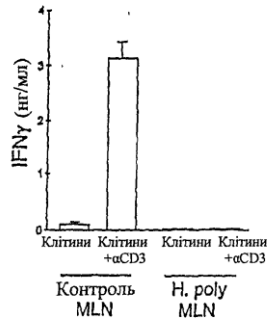
Фігура 4





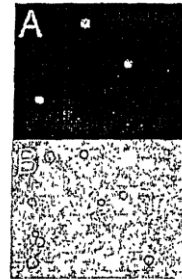


ПЕРЕНОС MLN КЛІТИН З МИШЕЙ,
ЯКІ НЕСУТЬ *H. POLYGYRUS*, ДО
НЕІНФЕКОВАНИХ МИШЕЙ ДИКОГО
ТИПУ ІНГІБУЄ $\text{IFN}\gamma$ РЕАКТИВНІСТЬ
LRMC



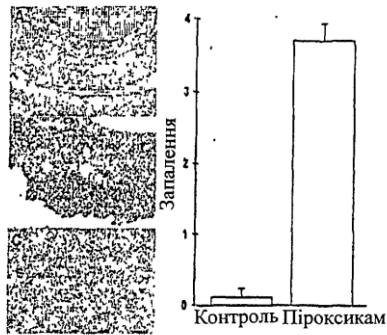
Фиг. 14

MLN КЛІТИНИ З МИШЕЙ, ЯКІ НЕСУТЬ
H. POLYGYRUS, ПОСТУПАЮТЬ ДО СЛИЗОВОЇ
ОБОЛОНКИ КИШЕЧНИКА ПРИ ПЕРЕНОСІ В
РЕЦИПІЄНТІВ ДИКОГО ТИПУ



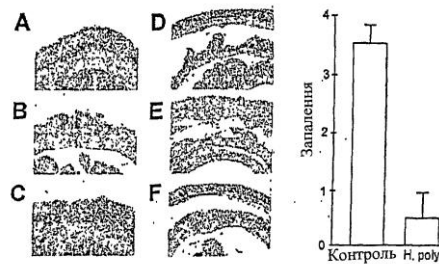
Фиг. 15

КОЛІТИ, ІНДУКОВАНІ ПІРОКСИКАМОМ
У МИШЕЙ IL10-/-



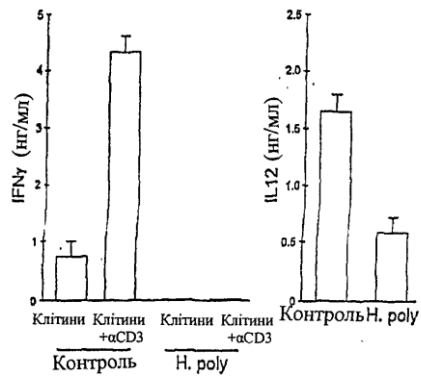
Фиг. 16

H. POLYGYRUS УСУВАЄ ІСНУЮЧІ АКТИВНІ КОЛІТИ,
ІНДУКОВАНІ ПІРОКСИКАМОМ У МИШЕЙ IL10-/-



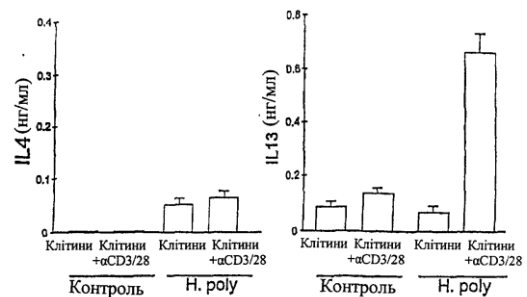
Фиг. 17

H. POLYGYRUS БЛОКУЄ
ПРОДУКЦІЮ $\text{IFN}\gamma$ ТА IL12
LRMC ПРИ IL10-/- КОЛІТАХ



Фиг. 18

H. POLYGYRUS ПОСИЛЮЄ ПРОДУКЦІЮ
IL4 ТА IL13 LRMC ПРИ IL10-/- КОЛІТАХ



Фиг. 19

