

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 034176

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.14

(21) Номер заявки
201690766

(22) Дата подачи заявки
2013.10.16

(51) Int. Cl. A61K 38/17 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) РАСТВОРИМЫЙ Fc-ГАММА РЕЦЕПТОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ
БУЛЛЕЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(43) 2016.07.29

(86) PCT/EP2013/071599

(87) WO 2015/055240 2015.04.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗУППРЕМОЛЬ ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Людвиг Ральф, Сондерман Петер, Тер
Мер Доминик (DE)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) RALF J. LUDWIG: "Clinical
Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment
of Epidermolysis Bullosa Acquisita", ISRN
DERMATOLOGY, vol. 89, no. 5, 1 January 2013
(2013-01-01), pages 915-25, XP055112906, ISSN:
2090-4592, DOI: 10.1016/j.jaad.2006.05.057, cited in
the application, page 16, column 2, paragraph 2

EP-A1-1006183

EP-A1-2161031

US-B2-7655229

US-A1-2009053218

(57) Изобретение, в целом, относится к области биотехнологии и медицины. Оно предлагает средство, фармацевтическую композицию и набор для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний (AMDB). Более конкретно, изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для лечения AMDB, а также фармацевтической композиции и набора, содержащих указанный рецептор. Оно дополнительно предусматривает способ лечения AMDB.

034176 B1

034176

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к области биотехнологии и медицины. Оно предлагает средство, фармацевтическую композицию и набор для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний (AMDB). Более конкретно, настоящее изобретение относится к применению растворимых Fc-гамма рецепторов для лечения AMDB, а также к фармацевтической композиции и набору, содержащим данный рецептор. Оно дополнительно предусматривает способ лечения AMDB.

Предпосылки создания изобретения

Кожа, часто называемая наиболее крупным органом организма человека, служит в качестве водонепроницаемого, теплоизолирующего покрова, защищающего организм от экстремальных значений температуры, повреждающего солнечного света, вредных химических веществ и патогенов. Она помогает регулировать температуру тела и испарение, а также служит огромным сенсором, заполненным нервами, для восприятия и передачи внешних стимулов. Кожа состоит из двух главных слоев. Наружный представляет собой эпидермис, который состоит в основном из высокоорганизованных кератиноцитов. Сложные межклеточные контакты (десмосомы) соединяют между собой кератиноциты, которые секретируют кератины и липиды, образующие внеклеточный матрикс, обеспечивающий механическую прочность кожи. Эпидермис связан с более глубоким слоем кожи, известным как дерма, который состоит из соединительной ткани и придает коже прочность на разрыв и эластичность благодаря внеклеточному матриксу, состоящему из фибрилл коллагена, микрофибрилл и эластичных волокон, окруженных протеогликанами. Эпидермис и дерма разделены тонким слоем, называемым базальной мембраной. Дермо-эпидермальное соединение (DEJ) представляет собой участок кожи, который соединяет эпидермальный и дермальный слои кожи.

Аутоиммунные буллезные заболевания (AMDB) представляют собой группу нарушений со стороны кожи, которые главным образом поражают кожу и слизистые оболочки. При AMDB иммунная система хозяина разрушает молекулы межклеточной адгезии или компоненты базальной мембраны в поверхностных слоях кожи и слизистых оболочек, что обычно приводит к образованию пузырей. Поскольку неповрежденная кожа является жизненно необходимой для защиты организма от обезвоживания и инфекций, AMDB часто связывают с высоким уровнем смертности, и они могут являться опасными для жизни.

AMDB можно разделить на четыре основные группы. Интраэпидермальные пузырчатки ("группа пузырчатки") характеризуются потерей межклеточных соединений, таких как десмосомы, накоплением иммуномедиаторов в межклеточных контактах кератиноцитов и образованием интраэпидермальных пузырчаток, вызванных в результате нарушения адгезии между клетками. Обычные интраэпидермальные аутоиммунные пузырчатки включают обыкновенную пузырчатку (PV) и листовидную пузырчатку (PF). Остальные заболевания характеризуются образованием субэпидермальных пузырей, вызванных нарушением адгезии между клетками и матриксом, а также накоплением аутоиммунных антител в месте дермо-эпидермального соединения (DEJ). "Пемфигоидная группа" включает буллезный пемфигоид (BP), пемфигоид слизистых оболочек (MMP), гестационный пемфигоид, пемфигоид слизистых оболочек и линейный IgA-зависимый дерматоз. Иногда считается, что пемфигоидный плоский лишай представляет собой редкий вариант BP. Две другие группы включают приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA) и герпетиформный дерматит (Mihai and Sitaru, 2007). Буллезная системная красная волчанка (BSLE) представляет собой генерализованную субэпидермальную пузырчатку, встречающуюся у пациентов с системной красной волчанкой.

Разрушение структурных элементов в коже, приводящее к формированию типичных пузырей при AMDB, объясняли, главным образом, наличием аутореактивных антител. Кроме того, считалось, что система комплемента и аутореактивные Т-клетки вовлечены в патогенез AMDB (Liu and Rubinstein (2008)). Большую часть AMDB ассоциируют с тканевыми антителами и циркулирующими аутореактивными антителами класса IgG, которые, как правило, взаимодействуют посредством своих Fc-областей с факторами врожденной иммунной системы, такими как система комплемента и клетки воспаления, и запускают последующие сигнальные каскады, что в итоге приводит к разрушению тканей (Sitaru et al., 2007). Fc-гамма рецепторы (FcγR) при AMDB играют ключевую роль в опосредовании эффекторных функций аутореактивных антител класса IgG.

FcγR относятся к семейству Fc-рецепторов (FcR), которые являются крайне важными для защиты организма человека от инфекций. В целом, необходимо выделить активацию FcγR и ингибирование FcγR. Среди трех главных FcγR у людей, FcγRI способны связываться с мономерным IgG, в то время как FcγRII и FcγRIII связываются с поливалентными иммунными комплексами (IC), состоящими из антител и антигенов (Takai (2002)). Эффекторные функции, инициированные FcγR, включают, в зависимости от типа экспрессируемого FcR и связанных белков, эндоцитоз с последующей нейтрализацией патогенов и презентацией антигена, антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), секрецию медиаторов или регуляцию выработки антител (Fridman et al. (1992), van de Winkel and Capel (1993)).

Одним примером непрогнозированной эффективности терапии является ритуксимаб. Антитело распознает антиген CD20, который экспрессируется исключительно на В-клетках. После связывания с мишенью ритуксимаб опосредует цитоллиз В-клеток при помощи иммунной системы. Ритуксимаб разрабатывали для лечения В-клеточной лимфомы, но с тех пор его также использовали для лечения аутоим-

мунных заболеваний с участием В-клеток, известных в качестве продуцентов патогенных аутоиммунных антител. Врач, хорошо ориентирующийся в лечении аутоиммунных заболеваний, определенно бы посчитал ассоциированные с ITP, SLE или ANCA васкулиты такими, которые поддаются лечению с помощью ритуксимаба в связи с значительными уровнями аутоиммунных антител при данных заболеваниях. Однако эффективность лечения SLE, которая характеризуется высокими уровнями аутоиммунных антител, не была продемонстрирована в двух клинических исследованиях (Coca and Sanz (2009)). Подобным образом, при ассоциированном с ANCA васкулите только две трети пациентов в достаточной степени реагируют на лечение ритуксимабом (Stone (2010)), в том время как при ITP не реагируют 60% (Patel (2010)). С другой стороны, ритуксимаб способен демонстрировать эффективность при множественном склерозе (Hauser (2008)) и диабете I типа (Pescowitz (2009)), при этом оба заболевания не превосходят по значительным уровням антител.

К настоящему моменту традиционное лечение AMDB обычно включает иммунодепрессанты и противовоспалительные средства, часто в больших дозах, а также лечение повреждений кожи. К сожалению, множество лекарственных средств, используемых для лечения данного заболевания, имеют серьезные побочные эффекты, и пациентов необходимо подвергать тщательному мониторингу на наличие инфекции, нарушений функций почек и легких, нарушений электролитного баланса, гипертензии, диабета, анемии и кровотечения в желудочно-кишечном тракте (Mutasim (2007)).

Таким образом, техническую проблему, лежащую в основе настоящего изобретения, можно рассматривать с точки зрения предоставления альтернативных средств и способа лечения AMDB.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения, к немалому их удивлению выявили, что растворимый Fc-гамма рецептор (sFcγR) уменьшил степень тяжести заболевания и уровень циркулирующих аутореактивных антител в мышиных моделях AMDB *in vivo*. Кроме того, sFcγR значительно уменьшил высвобождение ROS, индуцируемое IgG, из нейтрофилов и замедлил разделение дермы и эпидермиса - которое, как считают, играет решающую роль в образовании обычной пузырчатки - при проведении пересадок кожи, обработанной аутоиммунными антителами. Таким образом, исходя из результатов, предоставленных авторами настоящего изобретения, которые показаны в прилагающихся примерах и проиллюстрированы при помощи чертежей, sFcγR сохраняют значительный потенциал в качестве средства для лечения множества аутоиммунных буллезных заболеваний.

Ввиду крайне сложных и выраженных явлений, вовлеченных в возникновение и прогрессирование AMDB, и частично нестабильных выявленных эффектов, о которых сообщалось в различных исследованиях в отношении лечения аутоиммунных заболеваний с помощью sFc терапевтический потенциал лечения AMDB с помощью sFcγR невозможно было четко прогнозировать, и он не был спрогнозирован. В действительности, хотя лечение с помощью sFcγR являлось целесообразным для лечения ITP, SLE, MS, что было показано в доклинических и клинических исследованиях, на основании этого нельзя сделать заключение о том, что лечение других аутоиммунных заболеваний также было бы эффективным. Скорее, каждое аутоиммунное заболевание обладает своими собственными отличительными свойствами и каждое является отличающимся, таким образом они являются несопоставимыми, и нельзя сделать заключение о том, что успешное лечение одного аутоиммунного заболевания, включающего накопление в тканях иммунных комплексов (IC), может также способствовать лечению другого аутоиммунного заболевания, также включающего накопление IC. На самом деле включение не означает, что различные IC являются единственными причинными факторами аутоиммунного заболевания, поскольку существует множество других факторов, и, таким образом, до сих пор еще не было обнаружено ни одного общего причинного фактора аутоиммунного заболевания, в которое вовлечены разные IC. По сути, единой общей предпосылкой у аутоиммунных заболеваний, таких как заболевания, в которые вовлечены разные IC, является то, что иммунная система реагирует против структур собственного организма. Системное лечение, предполагаемое для ингибирования активации комплексов IC, заключается в блокировке Fc-рецепторов иммунных клеток посредством антитела, как предложено в EC1870422. Однако не ожидали, что связывание различных sFcγR с Fc-областью аутоиммунных антител, вовлеченных в разные IC, в результате приведет к благоприятному эффекту в лечении AMDB. Не вдаваясь в теорию, считается, что sFcγR конкурируют с мембранными FcγR разных IC. В результате конкуренции активация иммунного ответа посредством системы мембранных FcγR снижается. Не предполагали, что данный предложенный механизм действия является настолько эффективным, как было выявлено *in vitro* и в мышинной модели. Следовательно, полной неожиданностью явилось то, что sFcγR принимают участие в лечении AMDB.

Соответственно в первом аспекте настоящее изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора человека для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11. Указанным субъектом предпочтительно является млекопитающее, такое как человек, собака, лошадь, кошка, овца, крупный рогатый скот, корова, кролик, крыса или мышь, причем предпочтительным является человек. Рассматривается возможность применения растворимого Fc-гамма рецептора в лечении заболеваний, выбранных из группы, включающей буллезный пемфигоид (BP) и приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA). Несмотря на то что авторы настоящего изобретения в теории предполагали о применении растворимого FcR1B

человека в лечении пемфигоидных заболеваний (Clinical Presentation, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Epidermolysis Bullosa Acquisita, Ralf J. Ludwig, ISRN Dermatology Volume 2013), было неожиданным обнаружить, что низкие концентрации растворимого FcRIIB человека уменьшали тяжесть симптомов заболевания *in vivo*. Влияние низких концентраций растворимого FcRIIB человека является неожиданным, поскольку специалист в данной области предположил бы, что необходимо применить, по меньшей мере, эквимольное количество растворимого FcRIIB человека для того, чтобы он был способен блокировать связывание патогенных иммунных комплексов через Fc-участок IgG различных IC, что было бы необходимо для остановки формирования пузырей, стимулируемого аутоиммунными антителами при пемфигоидных заболеваниях. Второй аспект, который отделяет пемфигоидные заболевания от заболеваний, где применяли растворимый FcR, представляет собой изоляцию патогенной реакции, которая строго локализована в тканях кожи. Также до настоящего изобретения не было спрогнозировано или известно, что растворимый FcR был способен вызывать какой-либо эффект в определенном слое кожи. Таким образом, специалист в данной области мог сделать предположение о применении растворимого FcR в лечении аутоиммунных пемфигоидных заболеваний, однако благоприятный эффект низких концентраций растворимого FcR в отношении течения заболевания является неожиданным. До сих пор растворимый FcRIIB человека успешно применяли в лечении аутоиммунных заболеваний, в которых присутствуют иммунные комплексы, при этом они встречаются в крови, но не в таком компартменте, как кожа. Следовательно, специалист в данной области не мог ожидать неожиданных результатов и успеха, полученных авторами настоящего изобретения. Третий аспект, проводящий различие между настоящим изобретением и обзорной статьей Ludwig в ISRN Dermatology Volume 2013, представляет собой тот факт, что в обзоре не все ясно в отношении роли FcRIIB в этиологии пемфигоидных заболеваний. В частности, данный обзор ссылается на публикацию Yu et al. (J. Inv. Dermatol. 2010, Vol. 130, No. 12, 2841-2844), в которой сообщают, что FcRIIA и FcRIIB играют важную роль в разрушении ткани при пемфигоидных заболеваниях у человека. Данный обзор также ссылается на публикацию Kasperkiewicz et al. (J. Pathol. (2012), Vol. 228, No. 1, 8-19), в которой отмечена важная роль FcRIV в разрушении ткани при пемфигоидных заболеваниях у человека. В целом, в данном обзоре упоминается не менее трех FcR, которые играют роль в течение пемфигоидного заболевания, при этом не ожидали, что применение растворимого FcRIIB имеет практическую значимость в лечении пемфигоидных заболеваний, поскольку растворимый вариант какого-либо из других трех FcR, как указано в обзоре, мог бы стать перспективным средством для борьбы с пемфигоидными заболеваниями.

Fc-гамма рецепторы встречаются в разных изоформах. В соответствии с настоящим изобретением растворимый Fc-гамма рецептор может представлять собой Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIB, Fc-гамма RIIIA или Fc-гамма RIIB. Однако в одном предпочтительном варианте осуществления растворимый Fc-гамма рецептор представляет собой Fc-гамма RIIB.

Растворимый Fc-гамма рецептор является растворимым Fc-гамма рецептором человеческого происхождения. Он может содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11. Вышеупомянутые аминокислотные последовательности кодируются нуклеотидными последовательностями, показанными в SEQ ID NO: 2 и 12 соответственно. Данные нуклеотидные последовательности предпочтительно можно применять для выработки как синтетическим путем, так и с помощью системы вектор и клетка-хозяин, как описано в данном документе, какого-либо из sFcγR, раскрытых в данном документе, в частности имеющих аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 11 соответственно.

Последовательности, относящиеся к настоящей заявке, показаны ниже.

SEQ ID NO: 1 (SM101)

MAPPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH
TQPSYRFGAN NNDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWLV LQTPHLEFQE
GETIVLRCHS WKDKPLVKVT FFQNGKSKKF SRSDPNFSIP QANHSHSGDY
HCTGNIGYTL YSSKPVTITV QAPSSSP

В аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, остаток М (метионина) в положении 1 (то есть в начале аминокислотной последовательности) может отсутствовать. Этот вариант аминокислотной последовательности раскрыт в данном документе под SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 2 (SM101, κДНК)

1 ATGGCACC GC CGAAAGCAGT TCTGAACTG GAACCGCAGT GGATTAACGT TCTGCAGGAA
61 GATAGCGTTA CCCTGACCTG TCGTGGCACC CATAGCCCGG AAAGCGATAG CATTCACTGG
121 TTTCACAACG GCAATCTGAT TCCGACCCAT ACCCAGCCGA GCTATCGTTT TAAAGCGAAC
181 AACAACGATA GCGGCGAATA TACCTGTCAG ACCGGTCAGA CCAGCCTGAG CGATCCGGTT
241 CATCTGACCG TTCTGAGCGA ATGGCTGGTT CTGCAGACCC CGCATCTGGA ATTTCAAGAA
301 GGCGAAACCA TTGTTCTGCG TTGCCACAGC TGGAAAGATA AACCGCTGGT TAAAGTTACC
361 TTCTTCCAGA ACGGCAAAAG CAAAAAATC AGCCGTAGCG ATCCGAATTT TAGCATTCCG
421 CAGGCGAATC ATAGCCATAG CGGCGATTAT CATTGTACCG GCAACATTGG STATACCCTG
481 TATAGCAGCA AACCGGTGAC CATTACCGTT CAGGCGCCGA GCAGCAGCCC GTAA

SEQ ID NO: 3 (FcγRIIB человека)

MGTPAAPPKA VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
FKANNNDSGE YTCQTGQTSLS SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIVL RCHSWKDKPL
VKVTFFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHS SHGDYHCTGNI GYTLYSSKPV TITVQAPSSS
P

SEQ ID NO: 4 (FcγRIIB человека, κДНК)

1 atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaac tcgagcccca gtggatcaac
61 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tggcggggga ctacagccc tgagagcgac
121 tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccacc acacgcagcc cagctacagg
181 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc
241 agcgaccctg tgcattgac tgtctttct gagtggctgg tgcctcagac cctcacctg
301 gaggctccagg agggagaaac catctgtctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg
361 gtcaaggcca cattctcca gaatgaaaa tccaaagaaat ttcccgttc ggalcccaac
421 ttctccatcc cacaagaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaacata
481 ggctacacgc tgtactcacc caagcctgtg accatcactg tccaaagctc cagctcttca
541 ccg

SEQ ID NO: 5 (FcγRIIA человека)

MGTPAAPPKA VLKLEPPWIN VLQEDSVTLT CQGARSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
FKANNNDSGE YTCQTGQTSLS SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIML RCHSWKDKPL
VKVTFFQNGK SQKFSLDPT FSIPQANHS SHGDYHCTGNI GYTLFSSKPV TITVQVPSMG
SSSP

SEQ ID NO: 6 (FcγRIIA человека, κДНК)

1 atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaac ttgagccccc gtggatcaac
61 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tggcggggg ctgcagccc tgagagcgac
121 tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccacc acacgcagcc cagctacagg
181 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc
241 agcgaccctg tgcattgac tgtctttcc gaatggctgg tgcctcagac cctcacctg
301 gaggctccagg agggagaaac catcatgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg
361 gtcaaggcca cattctcca gaatgaaaa tccaaagaaat ttcccattt ggalccccc
421 ttctccatcc cacaagaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaacata
481 ggctacacgc tgttctcacc caagcctgtg accatcactg tccaaagctc cagctgggc
541 agctcttacc caat

SEQ ID NO: 7 (FcγRIIA человека)

MDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCCQA YSPEDNSTQWF HNESLISSQA SSYFIDAATV
DDSGEYRCQ TNLSTLSDPV QLEVHIGWLL LQAPRWVFKEE DPHLRCHSW KNTALHKVTV
LQNGKGRKY FHHNSDFYIP KATLKDSGSY FCRGLVGSKNV SSETVNITIT QGLSVSTISS
F

SEQ ID NO: 8 (FcγRIIA человека, κДНК)

1 atggatcccaa aggtctggtg gticctggag cctcaatggt acaggggtgt cgagaaggac
61 agtctgactc tgaagtgcga gggagcctac tcccctgagg acaattccac acagtggitt
121 cacaatgaga gcctcatctc aagccaggcc tcgagctact tcattgacgc tggccagtt
181 gacgacagtg gagagtagag gtgccagaca aaccttcca cctcagtaga cccgtgtcag
241 ctagaagtcc atatcggctg gctgttctc caggccctc ggtgggtgtt caaggaggaa
301 gaccctatcc acctgaggtg tcacagctgg aagaacactg ctctgcataa ggtcacatat
361 ttacagaatg gcaaaaggcag gaagtatttt catcataatt ctgacttcta cattccaaa
421 gccacactca aagacagcgg ctctacttc tgcagggggc ttgtgggag taaaatgtg
481 tcttcagaga ctgtgaacat caccatcact caaggtttgt cagtgtcaac catctcatca
541 ttc

SEQ ID NO: 9 (FcγRIIB человека)

MDLPKAVVFL POWYSVLEKD SVTLKCCQAY SPEDNSTQWF HNENLISSQA SSYFIDAATV
NDSGEYRCQT NLSTLSDPVQ LEVHIGWLL QAPRWVFKEE DPHLRCHSW KNTALHKVTV
LQNGKDRKYF HHNSDFHIPK ATLKDSGSYF CRGLVGSKNV SSETVNITIT QGLAVSTISS
F

SEQ ID NO: 10 (FcγRIIB человека, κДНК)

1 atggatctcc caaaggctgt ggtgttctg gagcctcaat ggtacagct gcttgagaag
61 gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagccc tactccctg aggacaattc cacacagtgg
121 ttacacaatg agaacctcat ctaagccag gcctcagct acttcattga cgtgccaca
181 gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccgggtg
241 cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctgggtgggt gtccaaggag
301 gaagacccta ttacctgag gtgtcacagc tggagaaca ctgctctgca taaggtcaca
361 tatttacaga atggcaaga cagggaagtat ttatcataa attctgactt ccacattcca
421 aaagccacac tcaagatag cggctctctac ttctgcaggg ggcttgttgg gaggtaaaaa
481 gtgtctcag agactgtgaa catcaccatc actcaaggtt tggcagtgtc aacctatca
541 tcatte

SEQ ID NO: 11 (отличающийся SM101)

APPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH
TQPSYRFKAN NDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWLV LQTPHLEFQE
GETIVLRCHS WKDKPLVKVT FFQNGKSKKF SRSDPNFSIP QANHS SHSGDY
HCTGNIGYTL YSSKPVITV QAPSSS

В аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, остаток М (метионина) в положении 1 (то есть в начале аминокислотной последовательности) может отсутствовать. Этот вариант аминокислотной последовательности раскрыт в данном документе под SEQ ID NO: 11 и представляет собой предпочтительную аминокислотную последовательность по настоящему изобретению.

SEQ ID NO: 12 (вариант SM101, κДНК)

1 GCACCGC CGAAAGCAGT TCTGAACTG GAACCGCAGT GGATTAACGT TCTGCAGGAAGAT
 61 AGCGTTA CCTGACCTG TCGTGCCACC CATAGCCCGG AAAGCGATAG CATTCACTGGTTT
 121 CACAACG GCAATCTGAT TCCGACCCAT ACCGAGCCGA GCTATCGTTT TAAAGCGAACAAC
 181 AACGATA GCGGCGAATA TACCTGTGAG ACCGGTCAGA CCAGCCTGAG CGATCCGGTTTCAT
 241 CTGACCG TTCTGAGCGA ATGGCTGGTT CTGCAGACCC CGCATCTGGA ATTTCAAGGAAGGC
 301 GAAACCA TTGTCTGCG TTGCCACAGC TGGAAAGATA AACCGCTGGT TAAAGTTACCTTC
 361 TTCCAGA ACGGCAAAAG CAAAAAATTC AGCCGTAGCG ATCCGAATTT TAGCATTCGCGAG
 421 GCGAATC ATAGCCATAG CGGCGATTAT CATTGTACCG GCAACATTGG CTATACCCGTAT
 481 AGCAGCA AACCGGTGAC CATTACCGTT CAGGCGCCGA GCAGCAGCCC GTAA.

Растворимый Fc-гамма рецептор можно вводить внутривенно или внутривенно.

Дополнительно предполагается, что растворимый Fc-гамма рецептор можно вводить периодически.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество растворимого Fc-гамма рецептора, для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11. Указанная фармацевтическая композиция может дополнительно необязательно содержать противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20 вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий растворимый Fc-гамма рецептор, для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний, причем указанный набор может содержать одно или более из противовоспалительных средств, иммунодепрессантов и/или антитела к CD20 вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11.

В еще одном дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к способу лечения у нуждающегося в этом субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, который предусматривает стадию введения указанному субъекту терапевтически эффективного количества растворимого Fc-гамма рецептора человека, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для получения фармацевтической композиции для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора человека для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - формирование IC индуцировали путем инкубации IgG человека в 96-луночных микропланшетах. После промывания нейтрофилы человека добавляли в присутствии или в отсутствие sCD32. Активацию нейтрофилов анализировали путем измерения выработки ROS. В зависимости от дозировки sCD32 (SM101) ингибировал выработку ROS нейтрофилами, активированными IC. Данные основаны на 5 экспериментах на группу (* $p < 0,05$, ANOVA) и выражены как среднее значение $\pm$ SEM.

Фиг. 2 - криосрезы нормальной кожи человека инкубировали с сывороткой крови от пациентов с буллезным пемфигоидом. Затем добавляли лейкоциты от здоровых доноров крови. Это вызывало разделение дермы и эпидермиса в отсутствие sCD32 (SM101). В присутствии sCD32 (SM101) индуцированное аутоиммунным антителом, зависимое от лейкоцитов разделение дермы и эпидермиса существенно замедлялось. Данные основаны на 21 эксперименте на группу (* $p < 0,05$, ANOVA) и выражены как среднее значение $\pm$ SEM.

Фиг. 3A - экспериментальный ЕВА вызывали у мышей SJL/J путем иммунизации с помощью vWFA2. После того как у отдельных мышей 2% или более площади поверхности их тела имели повреждения кожи, их распределили в группы лечения с помощью sCD32 (SM101) или с помощью PBS. В левой панели неделя 0 указывает на время начала лечения и тяжесть клинического заболевания по отношению ко времени включения в фазу лечения (0 неделя). В сравнении с мышами, которым вводили PBS, лечение с помощью sCD32 (SM101) приводило к значительно более низкой тяжести протекания клинического заболевания. Данные основаны на 13 мышах на группу в целом (* $p < 0,05$, t-тест) и выражены как среднее значение $\pm$ SEM. В момент назначения лечения (0 неделя) средние показатели тяжести заболевания не отличались ($3,4 \pm 0,21\%$ и $3,4 \pm 0,20\%$ при лечении с помощью PBS и sCD32 (SM101) соответственно). Фиг. 3B - показано, что общая степень тяжести заболевания (AUC) была более низкой у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (SM101) ($p = 0,031$, t-тест). Фиг. 3C - репрезентативные клинические изображения после 4 недель с момента назначения лечения у мышей, которых лечили с помощью PBS (левая верхняя панель) и sCD32 (SM101) (правая верхняя панель).

Фиг. 4A - показатель инфильтрации кожи является значительно более низким у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (SM101) ($p < 0,05$, t-тест). Фиг. 3B - репрезентативные гистологические изображения свидетельствуют об уменьшении воспалительных дермальных инфильтратов у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (SM101) (справа) в сравнении с PBS (слева).

Фиг. 5 - антитела к vWFA2 в сыворотке крови, измеренные при помощи ELISA, в конце периода лечения. Мыши, которых лечили с помощью sCD32 (SM101), имели примерно на 20% меньше антиген-специфических аутоиммунных антител в сравнении с контрольными мышами ($p = 0,048$; t-тест).

Фиг. 6A - уровень относительной интенсивности флуоресценции тканевого IgG, измеренный при

помощи ImageJ, в конце периода лечения. У всех мышей наблюдается накопление IgG в месте DEJ при анализе с помощью прямой флуоресценции (ПИФ). Интенсивность флуоресценции не отличалась среди типов лечения. Фиг. 6B - репрезентативные изображения накоплений IgG, полученные с помощью, в конце периода лечения.

Подробное описание

Авторы настоящего изобретения неожиданно установили, что растворимый Fc-гамма RII рецептор (sCD32=SM101), в частности и предпочтительно sCD32, представляющий собой SM101, как описано в данном документе, был способен ингибировать высвобождение активных форм кислорода (ROS) из нейтрофилов, активированных *in vitro* иммунными комплексами (IC) с участием IgG. Кроме того, sCD32 способен замедлить разделение дермы и эпидермиса, выявляемое на криосрезах кожи человека, инкубированных с сывороткой от пациентов с буллезным пемфигоидом в присутствии моноклеарных клеток периферической крови (РВМС). Удивительно, но перспективный терапевтический потенциал sCD32 был доказан на мышинных моделях с приобретенным буллезным эпидермолизом (ЕВА): sCD32 в значительной степени уменьшал тяжесть клинического проявления заболевания, при этом гистологически подтвердили значительное уменьшение инфильтрации лейкоцитами дермы, а также примерно 20% уменьшение циркулирующих антиген-специфических аутоиммунных антител по сравнению с контролем. Эти перспективные результаты указывают на то, растворимые Fc-гамма рецепторы обладают значительным потенциалом для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний.

Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для использования в способе лечения аутоиммунных буллезных заболеваний.

Термин "Fc-гамма рецептор" используется в данном документе взаимозаменяемо с "TcgR", или "Fcγ-рецептор", или "FcγR" и предусматривает как мембранные FcgR, так и растворимые FcgR. Fc-гамма рецепторы относятся к суперсемейству белков-иммуноглобулинов, и их выявили во многих ростках кроветворения. Как указывает их название, Fc-рецепторы распознают Fc (фрагмент, способный кристаллизоваться) часть антител и связываются с ней, т.е. фрагмент, соответствующий двум C-концевым доменам обеих тяжелых цепей антитела, и, как правило, взаимодействуют с эффекторными молекулами и клетками.

FcγR распознают антитела IgG. У человека существует четыре подкласса IgG, названных в порядке их концентрации в сыворотке крови (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, причем IgG1 является наиболее преобладающим типом IgG). У человека существует три класса FcγR: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIIIA (CD16). Кроме того, FcγR встречаются в различных изоформах, т.е. функционально подобные Fc-гамма рецепторы, которые имеют подобную, но не идентичную аминокислотную последовательность. Указанные изоформы включают FcγRIA, B1, B2, C; FcγRIIA1-2, B1-3, C и, кроме того, несколько аллелей (FcγRIIA1-HR, -LR; FcγRIIb-NA1, -NA2) (van de Winkel and Capel, Immunol. Today 1993, 14:215-221). Разные классы и изоформы FcγR могут отличаться в отношении их аффинности к IgG и в особенности к различным подклассам IgG. Как правило, FcγR встречаются в виде трансмембранных белков типа I или растворимых форм, но также существует заякоренная форма FcγRIII (FcγRIIIB).

Настоящее изобретение предлагает наборы и композиции, содержащие растворимые FcγR, и способы лечения AMDB. "Растворимые FcγR" также обозначают как "sFcγR". В целом, растворимые формы какого-либо из класса, изоформу или аллель FcγR можно идентифицировать по стоящей впереди "s", например sCD32, или FcγR относится к растворимому Fc-гамма-рецептору RII. Предпочтительные растворимые Fc-гамма рецепторы для способов, наборов и композиций в соответствии с настоящим изобретением представляют собой Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIIB, Fc-гамма RIIIA или Fc-гамма RIIIB. Однако растворимые FcγRIIB-рецепторы являются особенно предпочтительными, в частности SM101, как описано в данном документе. Таким образом, в более предпочтительном варианте осуществления, если в данном документе указывают sCD32 или sFcγRII, то подразумевают SM101.

Как правило, в отличие от мембранного (т.е. мембранносвязанного) FcγR, растворимый FcγR не содержит трансмембранный участок или внутрицитоплазматический хвост.

Предпочтительно растворимый FcγR по настоящему изобретению имеет человеческое происхождение. Выражение "человеческое происхождение" следует истолковывать в его наиболее широком смысле. В целом, оно означает, что sFcγR (или его участок или фрагмент) имеет сходство с человеческим sFcγR (то есть с белком, обнаруживаемым в человеческом организме) или является подобным ему по аминокислотной последовательности и/или структуре. В целом, растворимые белки и пептиды можно получить путем экстракции из тканей человека или биологических жидкостей, например из плазмы крови, путем применения фракционирования плазмы крови, способа, описанного в предшествующем уровне техники (Burnouf (2007)).

В качестве альтернативы растворимый sFcγR "человеческого происхождения" может быть рекомбинантным sFcγR, получен путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, например, как описано у Sondermann and Jacob (1999). Вкратце, представляющий интерес ген получают из организма и встраивают в вектор, например плазмиду или вирус, который далее используют для переноса гена в клетку-хозяина, экспрессирующую рекомбинантный ген и вырабатывающую рекомбинантный белковый продукт.

Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения прокариотические клетки (например, *E. coli*, *B. subtilis*) или эукариотические клетки, такие как клетки дрожжей (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), клетки насекомых (например, клетки Sf9, Hi5) или клетки млекопитающих (например, COS, CHO, BHK, HEK293, VERO, HeLa, MDCK, Wi38, Swiss 3T3, NIH 3T3, PER C6, SP2/0). Специалист в данной области без труда определит, какую клетку-хозяина выбрать для того, чтобы получить sFcγR, который, например, является подходящим для получения фармацевтической композиции. Например, в некоторых вариантах осуществления может потребоваться негликозилированный sFcγR. Далее специалист в данной области может выбрать прокариотическую клетку-хозяина для экспрессии sFcγR, лишенную ферментного аппарата, требующегося для гликозилирования белка.

Термин дополнительно охватывает sFcγR, которые в сравнении с sFcγR дикого типа модифицировали или изменили по аминокислотной последовательности, и они включают в себя, например, дополнительные сайты гликозилирования и им подобные. Тем не менее, также предусмотрены негликозилированные формы sFcγR, и они являются предпочтительными вариантами осуществления sFcγR.

В предпочтительном варианте осуществления растворимый FcγR по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность или же состоит из нее, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 1 (SM101, рекомбинантный растворимый человеческий FcγRIIB), SEQ ID NO: 3 (FcγRIIB), SEQ ID NO: 5 (FcγRIIA), SEQ ID NO: 7 (FcγRIIA), SEQ ID NO: 9 (FcγRIIB) или SEQ ID NO: 11 (вариант SM101). Настоящее изобретение также охватывает применение растворимых FcγR, которые по меньшей мере на 90%, предпочтительно на 95% идентичны белкам с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 или 9. Для определения идентичности последовательности сравнение осуществляют путем выравнивания последовательностей таким образом, чтобы обеспечить максимальное соответствие аминокислот. В предпочтительном варианте осуществления растворимый человеческий рецептор представляет собой SM101 (SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 11), который представляет собой растворимый рецептор FcγRIIB.

В соответствии с настоящим изобретением FcγR применяют для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний. Термин "аутоиммунные буллезные заболевания", сокращенно AMBD, иногда также относится к "аутоиммунным пузырчаткам", "аутоиммунным буллезным дерматозам" или "аутоиммунным пузырчатым дерматозам", как используется в данном документе, представляющим собой приобретенные хронические заболевания, которые характеризуются пузырчаткой кожи и/или слизистых оболочек и обычно ассоциированы с иммунным ответом на структурные белки, которые поддерживают адгезию типа клетка-клетка и/или клетка-матрикс. В ряде исследований указали на решающую роль FcγR в аутоиммунных заболеваниях. Однако авторы настоящего изобретения первыми выявили потенциал у sFcγR для лечения AMBD, и они смогли показать, что их подход приводил к неожиданным и перспективным эффектам как в схеме с непрямым переносом сывороток пациентов с буллезным пемфигоидом (BP), так и в мышинной модели с приобретенным буллезным эпидермолизом (EBA). Аутоиммунные буллезные заболевания можно классифицировать по четырем основным группам: виды пузырчатки и виды пемфигоида, приобретенный буллезный эпидермолиз и герпетиформный дерматит. Группа пузырчатки предусматривает пузырчатки, обычно характеризующиеся формированием интрадермальных пузырей, потерей кератиноцитами адгезии типа клетка-клетка и накоплением аутоантител в межклеточных контактах кератиноцитов.

Другие заболевания обычно характеризуются субэпидермальной пузырчаткой, вызванной потерей базальными кератиноцитами связи с расположенной ниже базальной мембраной, и эти заболевания ассоциируются с накоплением иммуномедиаторов в месте дермоэпидермального соединения. "Иммуномедиаторы" представляют собой вещества, проявляющие иммунологическую реактивность, такие как антитела или белки системы комплемента. В частности, предусмотрено применение Fc-гамма рецептора для лечения заболевания, выбранного из группы, включающей обыкновенную пузырчатку (PV), листовидную пузырчатку (PF), буллезный пемфигоид (BP), пемфигоид слизистых оболочек (MMP), гестационный пемфигоид, пемфигоид слизистых оболочек, линейный IgA-зависимый дерматоз, пемфигоидный плоский лишай, приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA), герпетиформный дерматит и буллезную системную красную волчанку (BSLE).

Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что AMBD опосредованы аутореактивными антителами, главным образом типа IgG, которые распознают структурные элементы кожи и связываются с ними, включая десмоглеины, интегрины, коллагены типа VII и белки BP, формируя тем самым иммунные комплексы (IC). Fc-фрагменты антитела IgG, связанные в иммунных комплексах, затем могут распознаваться при помощи активации FcγR экспрессируемых на поверхности иммунных эффекторных клеток, запускающих воспалительные и деструктивные ответы, такие как окислительная реакция, высвобождение цитокинов и фагоцитоз макрофагами, антитело-зависимая цитотоксичность (ADCC) натуральными клетками-киллерами, дегрануляция тучных клеток и высвобождение ROS из нейтрофилов. Предполагается, что sFcγR может частично проявлять свои благоприятные эффекты путем препятствования связывания мембранно-связанного FcγR, экспрессируемого на эффекторных клетках иммунной системы, с различными IC. Кроме того, это может предупреждать связывание C1q и активацию системы комплемента.

Выражение "аутореактивное антитело" используется в данном документе взаимозаменяемо с термином "аутоиммунное антитело" и описывает антитело, направленное против одного или более собст-

венных белков хозяина.

AMDB представляют собой объект настоящего исследования, и некоторые заболевания AMDB являются чрезвычайно редкими. Таким образом, в будущем могут быть описаны более различные заболевания AMDB или варианты известных заболеваний AMDB. Также рассматривается лечение таких заболеваний и их вариантов.

Субъект, подлежащий лечению, предпочтительно является млекопитающим и более предпочтительно человеком.

Применимым является множество путей введения sFcγR по настоящему изобретению, включая без ограничений пероральный, местный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный или внутриглазной. В одном предпочтительном варианте осуществления sFcγR вводят внутривенно, трансдермально, внутрикожно или подкожно. Однако при необходимости какой-либо другой путь может быть с легкостью выбран специалистом в данной области. Например, если sFcγR по настоящему изобретению предпочтительно вводят внутрикожно, то введение предпочтительно осуществляют путем инъекции, например, с помощью шприца или шприца-ручки, близко к пузырям, рядом с пузырями или совсем рядом с пузырями или какими-либо другими микроскопическими или макроскопическими видимыми признаками или симптомами пемфигоидного заболевания.

Системы для трансдермальной доставки изготавливают в виде многослойных полимерных слоев, где депо лекарственного средства или полимерная матрица с лекарственным средством расположены между двумя полимерными слоями: наружным непроницаемым защитным слоем, который предупреждает потерю лекарственного средства через защитную поверхность, и внутренним полимерным слоем, который выполняет функцию адгезива и/или мембраны, регулирующей скорость высвобождения. Системы для трансдермальной доставки лекарственного средства предусматривают разные системы, такие как резервуарные системы, микрорезервуарные системы и комбинация резервуарных и матрично-дисперсных систем.

В резервуарной системе депо лекарственного средства заключено в непроницаемый защитный слой и мембрану, контролирующую скорость высвобождения. Лекарственное средство высвобождается только через мембрану, контролирующую скорость высвобождения, которая может быть микропористой или не иметь пор. В компартменте депо лекарственного средства лекарственное средство может быть в форме раствора, суспензии или геля, или может быть диспергировано в твердой полимерной матрице. На наружную поверхность полимерной мембраны можно нанести тонкий слой гипоаллергенного адгезивного полимера, совместимого с лекарственным средством. В матричных системах и системах лекарственного средства в адгезиве депо препарата формируют путем диспергирования лекарственного средства в адгезивном полимере с последующим распределением на непроницаемом защитном слое содержащего лекарственное средство полимерного адгезива путем формования окутанием в раствор или расплавления адгезива (в случае с термопластичными адгезивами). На верхнюю часть резервуара наносят слой необработанного адгезивного полимера. В матрично-дисперсных системах лекарственное средство равномерно распределяют в гидрофильной или липофильной полимерной матрице. Этот полимерный диск, содержащий лекарственное средство, затем закрепляют на герметично закрытом основании в компартменте, изготовленном из непроницаемого для лекарственного средства защитного слоя. Вместо нанесения адгезива на поверхность депо лекарственного средства его распределяют по периферии с формированием полосы адгезивного ободка. Система для доставки лекарственного средства представляет собой комбинацию резервуарной и матрично-дисперсной систем. Депо лекарственного средства сперва формируют при помощи суспендирования лекарственного средства в водном растворе водорастворимого полимера, а затем путем однородного диспергирования раствора в липофильном полимере с образованием множества невыщелачиваемых микроскопических сфер, представляющих депо лекарственного средства. Термодинамически нестабильную дисперсию быстро стабилизируют путем непосредственного перекрестного сшивания полимера *in situ*. Трансдермальная технология доставки лекарственного средства представляет одну из наиболее быстро развивающихся областей доставки новых лекарственных средств. Этот рост ускоряется развитием области науки о полимерах. Полимеры применяют в трансдермальных системах доставки различными способами, включая матрицеобразующие средства, мембраны, контролирующие скорость высвобождения, чувствительные к давлению адгезивы (PSA), защитные слои или высвобождающие подложки.

Полимеры, используемые в трансдермальных системах доставки, должны обладать биологической совместимостью и химической совместимостью с лекарственным средством и другими компонентами системы, такими как вещества, способствующие проникновению, и PSA. Они также должны обеспечивать постоянную эффективную доставку лекарственного средства на протяжении предполагаемого срока годности продукта или периода доставки и должны быть признаны абсолютно безвредными.

Препараты для ректального введения могут быть составлены в виде множества форм. Жидкие медицинские растворы для ректального введения вводят с помощью клизмы. Кремы, лосьоны и мази наносят наружно или вводят внутренне с использованием аппликатора. Суппозитории могут быть получены путем смешивания терапевтического средства с воскоподобным веществом с получением полутвердой, пулевидной формы, которая плавится после введения в прямую кишку. Внутривнутрибрюшинная инъекция или

IP инъекция представляет собой инъекцию вещества в перитонеальную (брюшную полость). Дополнительная форма введения композиции по настоящему изобретению представляет собой местное нанесение, например, в форме мази или крема. Такая мазь или крем могут дополнительно содержать традиционные ингредиенты, как, например, носители или наполнители, как описано в данном документе. sFcγR можно также применять в форме аэрозольного спрея, например, для ингаляции. Также sFcγR можно добавлять в еду.

Введение sFcγR можно осуществлять однократно или может потребоваться периодичное введение, в частности, с интервалами, например, каждые 12, каждые 24, каждые 36, каждые 48, каждые 60 или каждые 72 ч. В других вариантах осуществления sFcγR можно вводить каждую неделю или каждый месяц.

Растворимые Fc-гамма рецепторы, которые применяют в соответствии с настоящим изобретением, могут быть химически модифицированы. В целом, все виды модификаций растворимого Fc-гамма рецептора относятся к настоящему изобретению до тех пор, пока они не прекращают оказывать терапевтический эффект в отношении рецептора. В контексте настоящего изобретения выражение "терапевтический эффект" в целом относится к требуемому или благоприятному воздействию лечения, например к уменьшению интенсивности проявлений заболевания или к ремиссии заболевания. Термин "проявление" заболевания используется в данном документе для описания видимого проявления заболевания и включает как клинические проявления, далее определенные как признаки заболевания, которые можно обнаружить во время физического осмотра и/или которые ощущает пациент (то есть симптомы), так и патологические проявления, подразумевающие проявления заболевания на клеточном и молекулярном уровнях.

Кроме того, терапевтический эффект, обусловленный применениями и способами, описанными в настоящем документе, поддается обнаружению при помощи всех способов и подходов, которые утверждены для проведения оценки терапевтического эффекта во время лечения AMDB. Способы мониторинга терапевтической эффективности соединения в соответствии с настоящим изобретением включают без ограничения способы, описанные Mihai and Sitaru (2007), такие как клиническое обследование пациента на наличие, количество и степень тяжести повреждений кожи, гистологическое исследование свежих пузырей путем окрашивания при помощи H&E, прямой и непрямой флуоресцентной микроскопии, и обнаружение аутореактивных циркулирующих антител с помощью иммунологических анализов, включая иммунофлуоресценцию, иммуноблоттинг, иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA) и иммунопреципитацию. Для обнаружения тканевых аутореактивных антител можно использовать прямую флуоресцентную микроскопию, которую осуществляют после биопсии кожи, расположенной по периферии патологического очага, или нетронутой кожи, и последующей обработки при помощи, например, флуоресцентно-меченых антител к IgG.

Циркулирующие аутореактивные антитела в сыворотке крови можно обнаружить путем непрямой флуоресцентной микроскопии, выполняемой с замороженными срезами нормальных тканей, таких как пищевод обезьян, мочевого пузыря грызунов или обезьян и кожа человека. Методику можно проводить с расщепленной солью кожей, которую предварительно инкубировали в 1 M NaCl. Сыворотку крови пациента добавляют к ткани и флуоресцентно-меченые вторичные антитела добавляют для обнаружения аутореактивных антител, связавшихся с антигенами в коже.

Дополнительно или в качестве альтернативы также можно оценивать общее состояние соответствующего пациента (например, физическую форму, хорошее самочувствие), которое также поможет специалисту в данной области оценить, был ли достигнут терапевтический эффект. Специалист в данной области осведомлен о ряде других способов, подходящих для определения терапевтического эффекта соединений по настоящему изобретению.

Возможные химические модификации sFcγR включают ацилирование или ацетилирование аминоконца или амидирование или этерификацию карбоксиконца либо в качестве альтернативы и первую, и вторую. Модификации также могут воздействовать на аминокгруппу в боковой цепи лизина или гидроксильную группу треонина. Другие подходящие модификации включают, например, удлинение аминокгруппы с помощью полипептидных цепей различной длины (например, технология XTEN или PASylation®), N-гликозилирование, O-гликозилирование и химическую конъюгацию углеводов, таких как гидроксипропиловый крахмал (например, HESylation®) или полисиаловая кислота (например, технология PolyXen®). Также возможны и предусмотрены такие химические модификации, как алкилирование (например, метилирование, пропилирование, бутилирование), арилирование и этерификация.

Предпочтительно, чтобы указанные модификации не уменьшали или не отменяли благоприятных свойств sFcγR, описанных в данном документе, то есть химическим модифицированные соединения по настоящему изобретению должны предпочтительно характеризоваться свойствами, аналогичными свойствам соединений, которые оценивали в прилагающихся примерах.

Также sFcγR можно применять в составе фармацевтической композиции. Таким образом, дополнительный вариант осуществления по настоящему изобретению представляет собой применение sFcγR для изготовления фармацевтической композиции для лечения AMDB. Необходимо признать, что варианты осуществления, описанные в контексте применений в sFcγR соответствии с настоящим изобретением, являются в равной степени пригодными для применений фармацевтической композиции, содержащей

указанные sFcγR, с соответствующими изменениями. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Известные *per se* способы получения терапевтических препаратов указаны в Forth, Henschler, Rummel (1996) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer.

Фармакологические композиции по настоящему изобретению содержат терапевтически эффективное количество FcγR и их можно составлять в различных формах, например в твердой, жидкой, газообразной или лиофилизированной формах, и они могут быть, в частности, в форме мази, крема, трансдермальных пластырей, геля, порошка, таблетки, раствора, аэрозоля, гранул, пилюль, суспензий, эмульсий, капсул, сиропов, жидкостей, эликсиров, экстрактов, настойки или жидких экстрактов, или в форме, которая является частично подходящей для местного нанесения или перорального введения.

Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевают количество sFcγR, которое проявляет терапевтический эффект, описанный в данном документе. Точная величина дозы будет зависеть от цели лечения и ее определяют специалисты в данной области, использующие известные методики. Как известно из уровня техники и описано выше, может быть необходимым внесение поправок на возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, питание, взаимодействие лекарственных средств и тяжесть состояния, при этом специалист в данной области определит их путем общепринятых в уровне техники экспериментальных исследований. Например, FcγR, в частности sFcγRIIB, человека можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 мг/кг, например 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг. Другие предпочтительные дозы составляют приблизительно 0,1-50, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-60, 1-70, 1-80, 1-90 или 1-100 мг/кг. Дополнительно предпочтительные дозы составляют приблизительно 10-100, 20-100, 30-100, 40-100 или 50-100 мг/кг.

Как описано в данном документе, пациенту можно вводить фармацевтическую композицию с фармацевтически приемлемым носителем. В конкретном варианте осуществления выражение "фармацевтически приемлемый" означает утвержденный регуляторным органом или другим общепризнанным органом фармаконадзора для применения у животных и, более конкретно, у людей. Таким образом, фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для составления композиции в соответствии с настоящим изобретением, содержат вещества, которые описаны ниже для композиции. Иллюстративные носители включают (биоразлагаемые) липосомы; микросферы, полученные из биоразлагаемого сополимера D,L-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альбуминовые микросферы; синтетические полимеры (растворимые); нановолокна, комплексы белок-ДНК; белковые конъюгаты; эритроциты или вирусомы. Лекарственные формы на основе разных носителей содержат твердые липидные наночастицы (SLN), полимерные наночастицы, керамические наночастицы, гидрогелевые наночастицы, сополимеризованные белковые наночастицы, нанокристаллы и наносuspensions, нанокристаллы, нанотрубки и нанонити, функционализированные наноносители наносферы, нанокapsулы, липосомы, липидные эмульсии, липидные микротрубки/микроцилиндры, липидные микропузырьки, липосферы, липополиплексы, обращенные липидные мицеллы, дендримеры, этосомы, мультисомы, ультратонкие капсулы, аквасомы, фармакосомы, коллоидосомы, нисомы, дисксомы, прониосомы, микросферы, микроэмульсии и полимерные мицеллы. Другими подходящими фармацевтически приемлемыми носителями и вспомогательными веществами являются описанные среди прочих в Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publishing Co., New Jersey (1991) и Bauer et al., *Pharmazeutische Technologie*, 5th Ed., Govi-Verlag Frankfurt (1997).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать одно или более дополнительных средств. Предпочтительно указанные средства являются терапевтически эффективными в лечении AMDB и более предпочтительно выбраны из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитела к CD20. Предпочтительно специалист в данной области выберет средства, которые являются терапевтически эффективными в лечении, направленном на конкретное AMDB. Терапевтические подходы для лечения разных AMDB были рассмотрены, например, в Han et al. (2009), Mutasim (2007) и Bickle and York (2002).

"Противовоспалительные средства" ингибируют или уменьшают воспаление, например, индуцируя выработку противовоспалительных медиаторов и/или ингибируя выработку провоспалительных медиаторов. Подходящие противовоспалительные средства для лечения AMDB включают глюкокортикоиды, например преднизон или метилпреднизолон, и антибиотики, обладающие противовоспалительным действием, такие как дапсон и тетрациклин, а также ниаминамид.

Иммунодепрессанты ингибируют или предупреждают активацию иммунной системы, например уменьшают пролиферацию лимфоцитов.

Иллюстративные иммунодепрессанты, подходящие для лечения AMDB, включают, например, азатиоприн, микофенолат мофетил (MMF), пиклофосфамид, метотрексат и циклоспорин. Специалист в данной области подтвердит, что некоторые иммунодепрессанты также можно отнести к противовоспалительным средствам и наоборот.

Иллюстративным антителом к CD20, подходящим для лечения AMDB, является ритуксимаб.

Также предусматривается, что sFcγR можно использовать в составе набора. Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение также относится к набору, содержащему sFcγR, для применения в способе лечения аутоиммунных буллезных заболеваний.

Набор может представлять собой набор из двух или более частей, и содержит sFcγR и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или наполнитель. Компоненты набора могут содержаться в контейнере или флаконах. Необходимо отметить, что все варианты осуществления, описанные в контексте sFcγR, фармацевтическая композиция, содержащая указанный sFcγR, и способы лечения также можно применять по отношению к набору по настоящему изобретению с соответствующими изменениями. В целом, подходящими являются все носители, которые являются фармацевтически приемлемыми и обеспечивают высвобождение в необходимом месте приложения действия. Специалисту в данной области известно, какой тип носителя является подходящим в зависимости от выбранного пути введения. Например, носители в контексте, например, ректального введения представляют собой, например, многослойные системы, в которых используются сополимеры метакриловой кислоты. Если, например, необходимым местом приложения действия является толстая кишка, а sFcγR вводят перорально, то носитель должен быть устойчивым к желудочному соку, чтобы обеспечить высвобождение sFcγR в толстом кишечнике.

Набор может дополнительно содержать одно или более средств, выбранных из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20, вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем. Подходящие средства для применения в наборе были описаны в данном документе. Предусматривается, что применительно к введению FcγR средства вводятся одновременно, или последовательно, или раздельно. Настоящее изобретение дополнительно охватывает введение средств посредством разных путей введения. Таким образом, подходящие средства для применения в наборе дополнительно содержат, например, составы на основе топических глюкокортикоидов для одновременного, или последовательного, или раздельного применения с вводимым внутривенно sFcγR.

Другой аспект по настоящему изобретению представляет собой способ лечения AMDB у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества растворимого Fc-гамма рецептора. Специалист в данной области подтвердит, что варианты осуществления, описанные в данном документе, в контексте sFcγR фармацевтической композиции и набора по настоящему изобретению, являются применимыми к способу лечения с соответствующими изменениями. Стадию введения sFcγR можно необязательно дополнительно объединить с одной или более стадиями лечения AMDB, при этом указанные стадии выбраны из группы с введением IVIg, проведением плазмафереза и экстракорпоральной фототерапии.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора в получении фармацевтической композиции для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний. В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний. Специалист в данной области подтвердит, что варианты осуществления, описанные в данном документе, в контексте FcγR, фармацевтической композиции и набора по настоящему изобретению, являются применимыми к данным способам лечения с соответствующими изменениями.

Также настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, предусматривающему смешивание растворимого Fc-гамма рецептора с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем.

"IVIg" или "высокодозированный внутривенный иммуноглобулин" представляет собой препарат крови, который содержит объединенный в пул поливалентный IgG, выделенный из плазмы крови, полученной от более чем 1000 доноров крови, и который вводят внутривенно. "Плазмаферез", как используется в данном документе, означает отбор крови у пациента, фильтрацию клеточных компонентов и их обратное введение пациенту. "Экстракорпоральная фототерапия" включает введение пациенту фотоактивирующего средства (например, метоксипсоралена), отбор у пациента периферической крови и воздействие на часть периферических лимфоцитов ультрафиолетовым (UV-A) светом. В дальнейшем осуществляют реинфузию крови пациенту вместе с обработанными лимфоцитами. Данные способы были рассмотрены, среди прочих, у Mutasim (2007). Специалист в данной области без труда установит, что комбинацию какого-либо из данных видов лечения с предусмотренным введением FcγR необходимо тщательно оценивать, например, относительно момента времени введения, чтобы вызвать требуемые терапевтические эффекты. Затем терапевтический эффект можно оценить, как описано в данном документе.

Точная доза sFcγR будет зависеть от цели лечения (например, поддержание ремиссии в противоположность обострению заболевания) и будет определена специалистом в данной области с использованием известных методик. Как известно из уровня техники и описано выше, может быть необходимым внесение поправок на возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, питание, время введения, взаимодействие лекарственных средств и тяжесть состояния, при этом специалист в данной области определит их путем общепринятых в уровне техники экспериментальных исследований.

Выражение "лечение" во всех своих грамматических формах включает терапевтическое или профилактическое лечение AMDB. "Терапевтическое или профилактическое лечение" предусматривает виды профилактического лечения, направленные на полное предупреждение клинических и/или патологических проявлений, или терапевтическое лечение, направленное на уменьшение интенсивности клинических и/или патологических проявлений или на ремиссию заболевания. Таким образом, выражение "лечение" также включает уменьшение интенсивности или предупреждение AMDB.

Лучшее понимание настоящего изобретения и его преимуществ будет получено из следующих примеров, представленных исключительно для иллюстративных целей. Примеры не предполагают ограничение объема настоящего изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Выработка рекомбинантного растворимого sCD32.

Человеческий sCD32 (SM101) экспрессировали и очищали, как описано в других разделах (Sondermann and Jacob, 1999).

Пример 2. Получение потомства мышей с ЕВА.

Пример 2.1. Содержание.

Мышей SJL/J получали из The Jackson Laboratories (Бар Харбор, Мэн). Животным без ограничения выпаивали подкисленную питьевую воду и скармливали стандартный рацион, при этом в виварии Университета Любека поддерживали 12-часовой цикл чередования освещения и затемнения. Для экспериментов использовали мышей возрастом 8-10 недель. Все клинические исследования, биопсии и кровопускания проводили под анестезией с внутривенным введением смеси кетамина (100 мг/г) и ксилазина (15 мг/г). Эксперименты были одобрены Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных (Киль, Германия), и эксперименты проводил квалифицированный персонал.

Пример 2.2. Иммунизация и лечение мышей с помощью sCD32.

Иммунизацию и оценку проводили, как описано ранее (Iwata et al., 2013). Вкратце, мышей иммунизировали в подушечку стопы задней конечности с использованием 60 мкг рекомбинантного домена vWFA2 из COL7 мыши (Leineweber et al., 2011), эмульгированного в неиногенном блок-сополимерном адъюванте TiterMax (ALEXIS Biochemicals). Оценивание мышей проводили каждую неделю в отношении наличия повреждения кожи (то есть эритемы, пузырей, эрозий, участков выпадения волос и струпов). Степень тяжести заболевания выражали в виде процента площади повреждений поверхности тела, а общую тяжесть заболевания в течение периода наблюдения рассчитывали в виде площади под кривой (AUC) установленной тяжести заболевания в течение периода наблюдения. Относительный показатель тяжести заболевания рассчитывали в виде показателя тяжести заболевания на момент назначения лечения. Терапевтическое лечение при помощи sCD32 или PBS начинали с внутривенной инъекции, если 2% или более площади поверхности тела имели повреждения кожи. Каждую неделю мышам вводили 200 мкг sCD32, при этом контрольные мыши получали PBS. Сыворотку крови отбирали каждую неделю. Образцы сыворотки крови, кожи уха, кожи хвоста отбирали в заключительный день 4-недельного периода лечения и готовили для гистологического исследования и иммунофлуоресцентной (ИФ) микроскопии.

В сравнении с мышами, которым вводили PBS, лечение с помощью sCD32 приводило к значительному снижению тяжести клинического заболевания (фиг. 3А, слева, $*p < 0,05$, t-тест). На момент включения в фазу лечения (0 неделя) средние показатели тяжести заболевания по площади пораженной поверхности тела не отличались среди групп ($3,4 \pm 0,21\%$ и $3,4 \pm 0,20\%$) при лечении с помощью PBS и sCD32 соответственно). Суммарная степень тяжести заболевания, выраженная в виде AUC, во время всего наблюдения также в значительной степени снижалась у мышей, которых лечили с помощью sCD32, в сравнении с контрольными мышами, которых лечили с помощью PBS (фиг. 3В, справа, $p = 0,031$, t-тест). Данная степень уменьшения является похожей на ту, которую отмечали при лечении высокими дозами кортикостероидов (20 мг/кг внутривенно, ежедневно) (Hirose et al., 2013). В конце 4-недельного периода лечение у мышей, которых лечили с помощью PBS, проявлялись разлитая эритема и струпа на ушах и хвосте, а также выпадение волос вокруг глаз (фиг. 3С, слева). Напротив, отмечали менее интенсивную эритему на ушах и отсутствие поражений на хвосте или вокруг глаз у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (фиг. 3С, справа).

Пример 3. Анализы ex vivo.

Пример 3.1. Выработка ROS.

Способность к высвобождению активных форм кислорода (ROS) аутоиммунными антителами при буллезном пемфигоиде оценивали с использованием анализов ex vivo, как сообщали ранее (Yu et al., 2010). Вкратце, для изучения выработки ROS индуцировали формирование иммунных комплексов (IC) путем инкубации 500 нг IgG человека (50 мкл $\times$ 10 мг/мл) в 96-луночных микропланшетах (Maxisorb; Nunc, Роскилле, Дания) при 4°C в течение ночи. После промывания планшета добавляли свежевыделенные нейтрофилы человека (50 мкл $\times$ 10^7 клеток/мл) в присутствии или в отсутствие 0,01, 0,1 и 0,5 мг/мл sCD32. Активацию нейтрофилов анализировали для измерения выработки ROS с помощью планшет-ридера (VICTOR3, PerkinElmer, Санта Клара, Калифорния).

Индукцию IC выработку нейтрофилами ROS ингибировал sCD32 в зависимости от дозы

(фиг. 1). Более подробно, по сравнению с положительным контролем 0,01, 0,1 и 0,5 мг/мл sCD32 в значительной степени уменьшали выработку ROS соответственно на 30, 65 или 75%.

Пример 3.2. Разделение дермы и эпидермиса.

Для данного исследования использовали образцы сыворотки крови от 21 пациента с буллезным пемфигоидом. Все пациенты соответствовали следующим критериям включения в фазу лечения: (i) клиническая картина пузырчатки кожи, (ii) связывание аутоиммунных антител IgG с эпидермальной стороной пузырей нормальной кожи человека, расщепленной при помощи 1 М NaCl, как показано при помощи непрямой флуоресцентной (ИФ) микроскопии, (iii) способность вступать в реакцию с NC16A в ELISA. Отрицательным контролем служила сыворотка крови от здоровых добровольцев. Перед началом всех процедур получили информированное согласие в письменной форме от всех пациентов и контрольных пациентов. Исследование было одобрено комитетом по этике Университета Любека и его проводили в соответствии с Хельсинкской Декларацией.

Ex vivo зависимое от нейтрофилов разделение дермы и эпидермиса, вызванное аутоиммунным антителом, проводили, как описано ранее (Sitru et al., 2002). Вкратце, криосрезы нормальной кожи человека толщиной 6 мкм инкубировали с сывороткой крови пациентов с BP при 37°C в течение 1 ч. После промывания с использованием PBS срезы инкубировали со свежеразделенными лейкоцитами человека в концентрации 10 клеток/мл в присутствии или отсутствии 0,01, 0,1 и 0,5 мг/мл sCD32 при 37°C на протяжении 3 ч. Затем срезы окрашивали при помощи H&E. Эксперт, не информированный о проведении лечения пациентов, у которых отбирали срезы, в каждом срезе оценивал степень разделения дермы и эпидермиса, выраженную в виде процента эпидермиса, отделившегося от дермы.

Данное соединение замедляло FcγR-зависимое (Yu et al., 2010) разделение дермы и эпидермиса в криосрезах кожи человека, инкубированных с сывороткой крови пациентов с BP в присутствии РВМС (фиг. 2).

Пример 4. Гистологические исследования и исследование при помощи ИФ-микроскопии.

Образцы кожи ушей фиксировали в забуференном 4% формалине. Срезы толщиной 4 мкм, полученные из залитых в парафин тканей, окрашивали при помощи H&E. При слепой гистологической оценке дермальных инфильтратов им присваивали следующий балл: 0 (отсутствие инфильтратов), 1 (умеренный), 2 (средний) и 3 (тяжелый). Тканевые антитела обнаруживали при помощи прямой ИФ-микроскопии замороженных срезов толщиной 6 мкм, приготовленных из тканевых биоптатов, при использовании разбавленных в 100 раз ФИТЦ-меченных антител, специфичных к IgG кролика (DakoCytomation) и С3 мыши (Cappel Organon-Teknika). Интенсивность флуоресценции в месте DEJ вычисляли при помощи ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), используя флуоресценцию дермы для вычитания фона.

У мышей, которых лечили с помощью sCD32, проявлялось значительное уменьшение лейкоцитарной инфильтрации дермы по сравнению с мышами, которых лечили с помощью PBS ($p < 0,05$, фиг. 4А и В).

Пример 5. Измерение уровня IgG и антител к vWFA2 в сыворотке крови.

Уровень антител к vWFA2 в сыворотке крови измеряли при помощи ELISA, как описано ранее (Iwata H. et al., 2013). Общее количество IgG измеряли при помощи набора ELISA для количественного определения IgG мыши (Bethyl Laboratories, Монтгомери, Техас) согласно инструкции производителя.

Лечение с помощью sCD32 также приводило примерно к 20% уменьшению циркулирующих антиген-специфичных аутоиммунных антител по сравнению с мышами, которых лечили с помощью PBS (фиг. 5, $p = 0,048$; t-тест), в то время как общее количество IgG в значительной степени не отличалось (данные не представлены). В тоже время, у всех мышей проявились аналогичные накопления IgG в месте DEJ, что определили при помощи прямой иммунофлуоресценции (фиг. 6А). Репрезентативные изображения, полученные в результате ПИФ, демонстрируют накопление IgG в месте DEJ (фиг. 6В). Данное несоответствие между циркулирующими антителами и тканевыми антителами может возникать по причине разного времени полужизни (Kasperkiewicz et al., 2010).

Список литературы.

- Bickle, K M, T R Roark and S Hsu. "Autoimmune Bullous Dermatoses: A review." *American Family Physician* 2002: 1861-1870.
- Burnouf, T. „Modern plasma fractionation.“ *Transfusion Medicine Reviews* 2007: 101-117.
- Collin, M und M Ehlers. „The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies.“ *Experimental Dermatology* 2013: 511-514.
- Coca A, Sanz I B cell depletion in lupus and Sjögren's syndrome: an update. *Current Opinions in Rheumatology* 2009: 483-8.
- Hauser SL et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine* 2008 :676-88.
- Hertl, M und D Zillikens. „Clinical and Molecular characterization of Autoimmune Bullous Diseases.“ *Journal of Investigative Dermatology* 2008: E19-21.
- Kasperkiewicz et al., J. Pathol. (2012), Vol. 228, No. 1, 8-19
- Kontermann, R E. „Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics.“ *Current Opinion in Biotechnology* 2011, 22 Aug.: 868-876.
- Liu, Z und D S Rubinstein. „Pathophysiology of autoimmune bullous diseases.“ *The Journal of Investigative Dermatology* 2008: E22-24.
- Ludwig,R. J., ISRN Dermatology Volume 2013
- Magnusson, S E, M Andrén und K E Nilsson. „Amelioration of collagen-induced arthritis by human recombinant soluble Fc gamma RIIB.“ *Clinical Immunology* 2008: 225-233.
- Mihai, S and C Sitaru. "Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2007: 462-481.
- Mutasim, D F. "Therapy of autoimmune bullous diseases." *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2007: 29-40.

Patel VL et al. Long-term outcome following B-cell depletion therapy with rituximab in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood* 2010:72.

Pescovitz MD et al. (2009) Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *The New England Journal of Medicine* 2009:2143-52.

Schmidt, E und R J Zillikens. „Pemphigoid diseases.“ *Lancet* 2013: 320-332.

Sitaru, C, S Mihai und D Zillikens. „The relevance of IgG subclass of autoantibodies for blister induction in autoimmune bullous skin diseases.“ *Archives of Dermatological Research* 2007: 1-8.

Sondermann, P und U Jacob. „Human Fc gamma receptor IIb expressed in Escherichia coli reveals IgG binding capability.“ *Biological Chemistry* 1999: 717-721.

Stone JH et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *The New England Journal of Medicine*. 2010: 221-32.

Takai, T. „Roles of Fc Receptors in Autoimmune diseases.“ *Nature Reviews Immunology* 2002: 580-592.

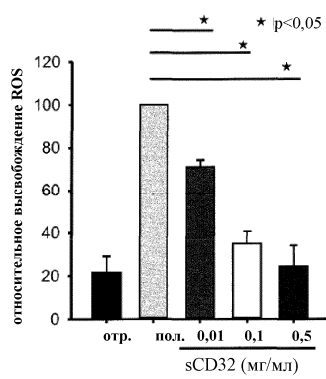
Weinblatt, M E, A Kavanaugh und M C Genovese. „An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis.“ *The New England Journal of Medicine* 2010: 1303-1312.

Werwitzke, S, D Trick und P Sondermann. „Treatment of lupus-prone NZB/NZW F1 mice with recombinant soluble Fc gamma receptor II (CD32).“ *Annals of the Rheumatic Diseases* 2008: 154-161.

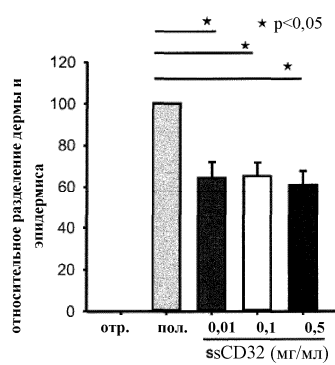
Yu et al. *J. Inv. Dermatol.* 2010, Vol. 130, No. 12, 2841-2844.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

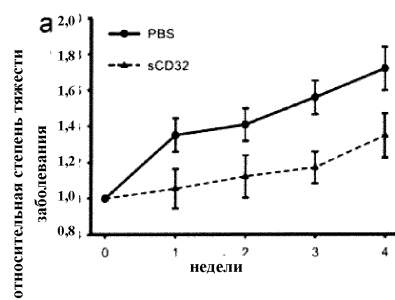
1. Применение растворимого Fc-гамма рецептора человека для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11.
2. Способ лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, включающий введение субъекту растворимого Fc-гамма рецептора человека, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11, в дозе от 0,1 до 1,0 мг/мл.
3. Способ по п.2, где субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.
4. Способ по п.2, где рецептор вводится внутривенно или внутрикочно.
5. Способ по п.2, где рецептор вводится периодически.
6. Применение по п.1, где заболевание выбрано из группы, включающей буллезный пемфигоид и приобретенный буллезный эпидермолиз.
7. Применение фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество растворимого Fc-гамма рецептора, для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или 11.
8. Применение по п.7, где композиция дополнительно содержит одно или более средств, выбранных из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20, вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.
9. Применение набора, содержащего растворимый Fc-гамма рецептор и одно или более средств, выбранных из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20, вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем, для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний, где рецептор состоит из аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 1 или 11.



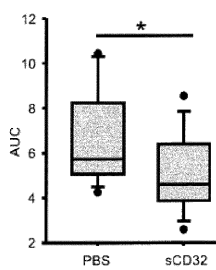
Фиг. 1



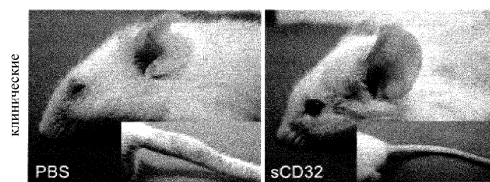
Фиг. 2



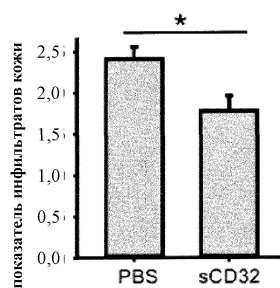
Фиг. 3А



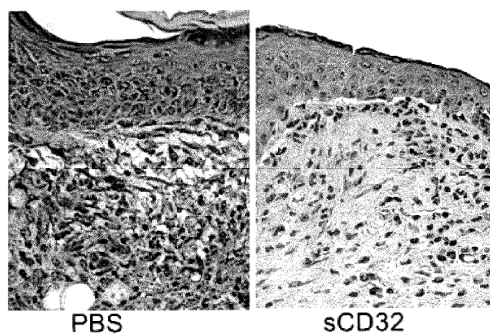
Фиг. 3В



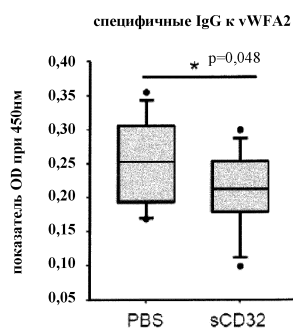
Фиг. 3С



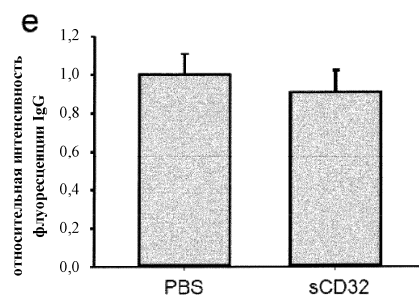
Фиг. 4А



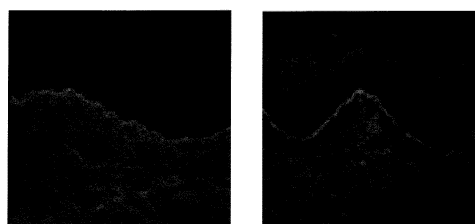
Фиг. 4В



Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В

