

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690766** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.07.29

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

(22) Дата подачи заявки
2013.10.16

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

(86) PCT/EP2013/071599

(87) WO 2015/055240 2015.04.23

(71) Заявитель:
ЗУППРЕМОЛЬ ГМБХ (DE)

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

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

(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 к фармацевтической композиции и набору, содержащим указанный рецептор. Оно дополнительно предусматривает способ лечения AMDB.

201690766
A1

201690766
A1

P21087522EA

РАСТВОРИМЫЙ Fc-ГАММА РЕЦЕПТОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ БУЛЛЕЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

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

[0001] 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. Дермоэпидермальное соединение (DEJ) представляет собой участок кожи, который соединяет эпидермальный и дермальный слои кожи.

[0002] 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.

[0003] AMDB можно разделить на четыре основные группы. Интраэпидермальные пузырьчатки ('группа пузырьчатки') характеризуются потерей межклеточных соединений, таких как десмосомы, накоплением иммуномедиаторов в межклеточных контактах кератиноцитов и образованием интраэпидермальных пузырьков, вызванных в результате нарушения адгезии между клетками. Обычные интраэпидермальные аутоиммунные пузырьчатки включают обыкновенную пузырьчатку (PV) и листовидную пузырьчатку (PF). Остальные заболевания характеризуются образованием субэпидермальных пузырей, вызванных нарушением адгезии между клетками и матриксом, а также накоплением аутоиммунных антител в месте дермоэпидермального 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.

[0004] 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.

[0005] 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, антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), секрецию медиаторов или регуляцию выработки антител (Fridman *et al.* (1992), van de Winkel and Capel (1993)).

[0006] Одним примером непрогнозированной эффективности терапии является ритуксимаб. Антитело распознает антиген CD20, который экспрессируется исключительно на В-клетках. После связывания с мишенью ритуксимаб опосредует цитолиз В-клеток при помощи иммунной системы. Ритуксимаб

разрабатывали для лечения В-клеточной лимфомы, но с тех пор его также использовали для лечения аутоиммунных 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 то 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.

[0007] 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, гипертонии, диабета, анемии и кровотечения в желудочно-кишечном тракте (Mutasim (2007)).

[0008] Таким образом, техническую проблему, лежащую в основе настоящего изобретения, можно рассматривать с точки зрения предоставления альтернативных средств и способа лечения AMDB.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Авторы настоящего изобретения, к немалому их удивлению, выявили, что растворимый Fc-гамма рецептор (sFcγR) уменьшил степень тяжести заболевания и уровень циркулирующих аутореактивных антител в мышечных 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 фигур, sFcγR сохраняют значительный потенциал в качестве средства для лечения множества аутоиммунных буллезных заболеваний.

[0010] 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 sFcγR, 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 EP1870422. 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 в 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.

[0011] Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к растворимому Fc-гамма рецептору для применения в лечении у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний. 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 многих типов пузырчаток, более конкретно, возможность применения растворимого Fc-гамма рецептора в лечении, например, какого-либо из заболеваний, выбранных 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 (линейный IgA-зависимый буллезный дерматоз), пемфигоидный плоский лишай, приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA), герпетиформный дерматит и буллезную системную красную волчанку (BSLE). Несмотря на то, что авторы настоящего изобретения в теории предполагали о

применении растворимого FcRIIB 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 эквимолярное 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 течении 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.

[0012] Fc-гамма рецепторы встречаются в разных изоформах. В соответствии с настоящим изобретением растворимый Fc-гамма рецептор может представлять собой Fc-гамма RIIA, Fc-гамма RIIВ, Fc-гамма RIIIA или Fc-гамма RIIВ. Однако в одном предпочтительном варианте осуществления растворимый Fc-гамма рецептор представляет собой Fc-гамма RIIВ.

[0013] Предпочтительно, чтобы растворимый Fc-гамма рецептор был человеческого происхождения. Он может, например, содержать аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID No: 1, SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 5, SEQ ID №: 7, SEQ ID №: 9 или SEQ ID No: 11. Вышеупомянутые аминокислотные последовательности кодируются нуклеотидными последовательностями, показанными в SEQ ID No: 2, 4, 6, 8, 10 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, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 9 или SEQ ID No: 11, соответственно.

[0014] Последовательности, относящиеся к настоящей заявке, показаны ниже.

SEQ ID No. 1 (SM101)

MAPPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH
 TQPSYRFKAN NNDSGEYTCQ TGQTSLSDPV HLTVLSEWLV LQTPHLEFQE
 GETIVLRCHS WKDKPLVKVT FFQNGKSKKF SRSDPNFSIP QANHSHSGDY
 HCTGNIGYTL YSSKPVITIV 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, кДНК)

1 ATGGCACCGC CGAAAGCAGT TCTGAAACTG GAACCGCAGT GGATTAACGT TCTGCAGGAA
 61 GATAGCGTTA CCCTGACCTG TCGTGGCACC CATAGCCCGG AAAGCGATAG CATTCAAGTGG
 121 TTTACAACG GCAATCTGAT TCCGACCCAT ACCCAGCCGA GCTATCGTTT TAAAGCGAAC
 181 AACAAACGATA GCGGCGAATA TACCTGTCAG ACCGGTCAGA CCAGCCTGAG CGATCCGGTT
 241 CATCTGACCG TTCTGAGCGA ATGGCTGGTT CTGCAGACCC CGCATCTGGA ATTTCAAGAA
 301 GGCAGAACCA TTGTTCTGCG TTGCCACAGC TGGAAAGATA AACCGCTGGT TAAAGTTACC
 361 TTCTTCCAGA ACGGCAAAAG CAAAAAATTC AGCCGTAGCG ATCCGAATTT TAGCATTCCG
 421 CAGGCGAATC ATAGCCATAG CGGCGATTAT CATTGTACCG GCAACATTGG CTATACCCTG
 481 TATAGCAGCA AACCGGTGAC CATTACCGTT CAGGCGCCGA GCAGCAGCCC GTAA

SEQ ID No. 3 (FcγRIIB человека)

MGTPAAPPKA VLKLEPQWIN VLQEDSVTLT CRGTHSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
 FKANNDSGE YTCQTGQTSL SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIVL RCHSWKDKPL
 VKVTFQNGK SKKFSRSDPN FSIPQANHS SGDYHCTGNI GYTLYSSKPV TITVQAPSSS
 P

SEQ ID No. 4 (FcγRIIB человека, кДНК)

1 atgggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcagccccca gtggatcaac
 61 gtgtccagg aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctacagccc tgagagcgac
 121 tccattcagt ggttccaaa tgggaatctc attcccacc acacgcagcc cagctacagg
 181 tcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc
 241 agcgaccctg tgcattctgac tgtgcttct gactggctgg tgctccagac cctcacctg
 301 gactccagg agggagaaac catcgtgctg agtgccaca gctggaagga caagcctctg
 361 gtcaaggtca cattctcca gaatggaaa tccaagaaat ttcccgttc ggatcccaac
 421 ttctcatcc cacaagcaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaaacata
 481 ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctctca
 541 ccg

SEQ ID No. 5 (FcγRIIA человека)

MGTPAAPPKA VLKLEPPWIN VLQEDSVTLT CQGARSPESD SIQWFHNGNL IPTHTQPSYR
 FKANNDSGE YTCQTGQTSL SDPVHLTVLS EWLVLQTPHL EFQEGETIML RCHSWKDKPL
 VKVTFQNGK SQKFSHLDPT FSIPQANHS SGDYHCTGNI GYTLFSSKPV TITVQVPSMG
 SSSP

SEQ ID No. 6 (FcγRIIA человека, κДНК)

1 atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac ttgagcccc gtggatcaac
61 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccaggggg ctgcagccc tgagagcgac
121 tccattcagt ggttccaca tgggaatctc attcccacc acacgcagcc cagctacagg
181 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc
241 agcgaccctg tgcattgac tgtgcttcc gaatggctgg tgctccagac cctcactg
301 gaggccagg agggagaaac catcatgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg
361 gtcaaggtca cattctcca gaatgaaaa tcccagaaat tctccattt ggatcccacc
421 ttctcatcc cacaagcaa ccacagtcac agtgggtatt accactgcac aggaaacata
481 ggctacagc tgttctcatc caagcctgtg accatcactg tccaagtgc cagcatgggc
541 agctcttcac caat

SEQ ID No. 7 (FcγRIIA человека)

MDLPKAVVFL EPQWYRVLEK DSVTLKCQGA YSPEDNSTQWF HNESLISSQA SSYFIDAATV
DDSGEYRCQ TNLSTLSDPV QLEVHIGWLL LQAPRWVFKEE DPIHLRCHSW KNTALHKVTY
LQNGKGRKY FHHNSDFYIP KATLKDSGSY FCRGLVGSKNV SSETVNITIT QGLSVSTISS
F

SEQ ID No. 8 (FcγRIIA человека, κДНК)

1 atggatctcccaa aggctgtggt gttctggag cctcaatggt acagggtgct cgagaaggac
61 agtgtgactc tgaagtcca gggagcctac tcccctgagg acaattccac acagtgttt
121 cacaatgaga gcctcatctc aagccaggcc tcgagctact tcattgacgc tgccacagt
181 gacgacagtg gagagtacag gtgccagaca aacctctcca cctcagtga cccggtgcag
241 ctagaagtc atatggctg gctgtgctc caggcccctc ggtgggtgtt caaggaggaa
301 gaccctattc acctgaggtg tcacagctgg aagaacactg ctctgcataa ggtcacatat
361 ttacagaatg gcaaaggcag gaagtattt catcataatt ctgacttcta cattcaaaa
421 gccactca aagacagcgg ctectactc tgcagggggc ttgtgggag taaaaatgtg
481 tctcagaga ctgtgaacat caccatcact caaggttgt cagtgtcaac catctcatc
541 ttc

SEQ ID No. 9 (FcγRIIB человека)

MDLPKAVVFL PQWYSVLEKD SVTLKCQGAY SPEDNSTQWF HNENLISSQA SSYFIDAATV
NDSGEYRCQT NLTSLSDPVQ LEVHIGWLLL QAPRWVFKEE DPIHLRCHSW KNTALHKVTY
LQNGKDRKYF HHNSDFHIPK ATLKDSGSYF CRGLVGSKNV SSETVNITIT QGLAVSTISS
F

SEQ ID No. 10 (FcγRIIB человека, κДНК)

1 atgatctcc caaaggctgt ggtgttctg gagcctcaat ggtacagct gcttgagaag
61 gacagtgtga ctctgaagt ccaggagcc tactcccctg aggacaatic cacacagtgg

121 ttccacaatg agaacctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca
181 gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccacctcag tgaccgggtg
241 cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctgggtgggt gtcaaggag
301 gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggagaaca ctgcctgca taaggtcaca
361 tatttacaga atggcaaaga caggaagtat ttcatcata attctgactt ccacattcca
421 aaagccacac tcaaatagat cggctcctac ttctgcaggg ggcttggg gagtaaaat
481 gtgtcttcag agactgtgaa catcacatc actcaaggtt tggcagtgic aaccatctca
541 tcattc

SEQ ID No. 11 (отличающийся SM101)

APPKAVLKL EPQWINVLQE DSVTLTCRGT HSPESDSIQW FHNGNLIPTH
TQPSYRFKAN 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 и представляет собой предпочтительную аминокислотную последовательность по настоящему изобретению.

SEQ ID No. 12 (вариант SM101, кДНК)

1 GCACCGC CGAAAGCAGT TCTGAAACTG GAACCGCAGT GGATTAACGT TCTGCAGGAAGAT
61 AGCGTTA CCCTGACCTG TCGTGGCACC CATAGCCCGG AAAGCGATAG CATTTCAGTGGTTT
121 CACAACG GCAATCTGAT TCCGACCCAT ACCCAGCCGA GCTATCGTTT TAAAGCGAACAAC
181 AACGATA GCGGCGAATA TACCTGTCAG ACCGGTCAGA CCAGCCTGAG CGATCCCGTTTCAT
241 CTGACCG TTCTGAGCGA ATGGCTGGTT CTGCAGACCC CGCATCTGGA ATTTTCAGGAAGGC
301 GAAACCA TTGTTCTGCG TTGCCACAGC TGGAAAGATA AACCGCTGGT TAAAGTTACCTTC
361 TTCCAGA ACGGCAAAAAG CAAAAAATTC AGCCGTAGCG ATCCGAATTT TAGCATTCCGCAG
421 GCGAATC ATAGCCATAG CGGCGATTAT CATTGTACCG GCAACATTGG СТАТАСССТГТАТ
481 AGCAGCA AACCGGTGAC CATTACCGTT CAGGCGCCGA GCAGCAGCCC GTAA.

[0015] Растворимый Fc-гамма рецептор можно вводить в любой подходящей форме. Однако в одном предпочтительном варианте осуществления рецептор вводят внутривенно.

[0016] Дополнительно предполагается, что растворимый Fc-гамма рецептор можно вводить однократно или периодически.

[0017] Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей растворимый Fc-гамма рецептор, для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний. Указанная фармацевтическая композиция может дополнительно необязательно содержать противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20 вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.

[0018] В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий растворимый Fc-гамма рецептор, для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний. Указанный набор может дополнительно необязательно содержать одно или более из противовоспалительных средств, иммунодепрессантов и/или антитела к CD20 вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.

[0019] 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.

[0020] В другом аспекте настоящее изобретение также относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для получения фармацевтической композиции для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний.

[0021] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний.

[0022] Также настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, предусматривающему смешивание растворимого Fc-гамма рецептора с фармацевтически приемлемыми носителем, разбавителем или наполнителем.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 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, активированных IC. Данные основаны на 5 экспериментах на группу (* $p < 0,05$, ANOVA), и выражены как среднее значение \pm SEM.

Фигура 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.

Фигура 3А. 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). В. Показано, что общая степень тяжести заболевания (AUC) была более низкой у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (SM101)

($p = 0,031$, t-тест). С. 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).

Фигура 4А. Показатель инфильтрации кожи является значительно более низким у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (SM101) ($p < 0,05$, t-тест). **В.** Репрезентативные гистологические изображения свидетельствуют об уменьшении воспалительных дермальных инфильтратов у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (SM101) (справа) в сравнении с PBS (слева).

Фигура 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).

Фигура 6А. 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. **В.** Репрезентативные изображения накоплений IgG, полученные с помощью, в конце периода лечения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0023] 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 мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).

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.

[0024] Следовательно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к применению растворимого Fc-гамма рецептора для использования в способе лечения аутоиммунных буллезных заболеваний.

[0025] Термин “Fc-гамма рецептор” используется в данном документе взаимозаменяемо с “Fc γ R”, или “Fc γ -рецептор”, или “Fc γ R” и предусматривает как мембранные Fc γ R, так и растворимые Fc γ R. 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.

[0026] Fc γ R 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 Fc γ R: Fc γ R1 (CD64), Fc γ R2 (CD32) и Fc γ R3 (CD16). Кроме того, Fc γ R встречаются в различных изоформах, т.е. функционально подобные Fc-гамма рецепторы, которые имеют подобную, но не идентичную аминокислотную последовательность. Указанные изоформы включают Fc γ RIA, B1, B2, C; Fc γ RIA1-2, 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).

[0027] 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 sFcγR 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 RIIb, Fc-гамма RIIIA или Fc-гамма RIIb. Однако растворимые FcγRIIIb-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.

[0028] Как правило, в отличие от мембранного (т.е. мембранно-связанного) FcγR, растворимый FcγR не содержит трансмембранный участок или внутрицитоплазматический хвост.

[0029] Предпочтительно, растворимый sFcγR 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)).

[0030] 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, ВНК, 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.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0033] В соответствии с настоящим изобретением sFcγR применяют для лечения аутоиммунных буллезных заболеваний. Термин “аутоиммунные буллезные заболевания”, сокращенно AMBD, иногда также относится к “аутоиммунным пузырьчаткам”, “аутоиммунным буллезным дерматозам” или “аутоиммунным пузырьчатым дерматозом”, как используется в данном документе, представляющим собой приобретенные хронические заболевания, которые характеризуются пузырьчаткой 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 AMDB, 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 пузырьчатки и виды пемфигоида, приобретенный буллезный эпидермолиз и герпетиформный дерматит. Группа пузырьчатки предусматривает пузырьчатки, обычно характеризующиеся формированием интрадермальных пузырей, потерей

кератиноцитами адгезии типа клетка-клетка и накоплением аутоантител в межклеточных контактах кератиноцитов.

[0034] Другие заболевания обычно характеризуются субэпидермальной пузырьчаткой, вызванной потерей базальными кератиноцитами связи с расположенной ниже базальной мембраной, и эти заболевания ассоциируются с накоплением иммуномедиаторов в месте дермоэпидермального соединения. “Имуномедиаторы” 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 пузырьчатку (PV), листовидную пузырьчатку (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).

[0035] Не вдаваясь в конкретную теорию, полагают, что AMDB 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 оксидантная 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.

[0036] Выражение “аутореактивное антитело” используется в данном документе взаимозаменяемо с термином “аутоиммунное антитело” и описывает антитело, направленное против одного или более собственных белков хозяина.

[0037] AMDB представляют собой объект настоящего исследования, и некоторые заболевания AMDB являются чрезвычайно редкими. Таким образом, в будущем могут быть описаны более различимые заболевания AMDB или варианты известных заболеваний AMDB. Также рассматривается лечение таких заболеваний и их вариантов.

[0038] Субъект, подлежащий лечению, предпочтительно является млекопитающим, и более предпочтительно человеком.

[0039] Применимым является множество путей введения sFcγR по настоящему изобретению, включая без ограничений пероральный, местный, трансдермальный, подкожный, внутривенный, внутривенный, внутривенный, внутривенный, 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 пузырькам, рядом с пузырьками или совсем рядом с пузырьками или какими-либо другими микроскопическими или макроскопическими видимыми признаками или симптомами пемфигоидного заболевания.

[0040] 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.

[0041] 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 окунанием в раствор или расплавления адгезива (в случае с термоплавкими адгезивами). На верхнюю часть резервуара наносят слои 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.

[0042] 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.

[0043] 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. Внутривентрикулярная 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.

[0044] Введение sFcγR можно осуществлять однократно или может потребоваться периодичное введение, в частности, с интервалами, например каждые 12 часов, каждые 24 часа, каждые 36 часов, каждые 48 часов, каждые 60 часов или каждые 72 часа. В других вариантах осуществления sFcγR можно вводить каждую неделю или каждый месяц.

[0045] 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.

[0046] 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 М NaCl. Сыворотку крови пациента добавляют к ткани и флуоресцентно-меченые вторичные антитела добавляют для обнаружения аутореактивных антител, связавшихся с антигенами в коже.

[0047] 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.

[0048] Возможные химические модификации sFc γ R включают ацилирование или ацетилирование амино-конца, или амидирование или этерификацию карбокси-конца или, 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 гидроксиэтиловый 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.

[0049] 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. Под аналогичными, как используется в данном документе, понимают,

[0050] 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 применения sFcγR в 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 приемлемые носитель или разбавитель. Известные *per se* способы получения терапевтических препаратов указаны в Forth, Henschler, Rummel (1996) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer.

[0051] Фармакологические композиции по настоящему изобретения содержат терапевтически эффективное количество sFcγR 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.

[0052] 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, sFcγR, 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 мг/кг, 1-10 мг/кг, 1-20 мг/кг, 1-30 мг/кг, 1-40 мг/кг, 1-50 мг/кг, 1-60 мг/кг, 1-70 мг/кг, 1-80 мг/кг, 1-90 мг/кг или 1-100 мг/кг. Дополнительно предпочтительные дозы составляют приблизительно 10-100 мг/кг, 20-100 мг/кг, 30-100 мг/кг, 40-100 мг/кг или 50-100 мг/кг.

[0053] 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 приемлемые носитель или наполнитель.

[0054] 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 виросомы. Лекарственные формы на основе разных носителей содержат твердые липидные наночастицы (SLN), полимерные наночастицы, керамические наночастицы, гидрогелевые наночастицы, сополимеризованные белковые наночастицы, нанокристаллы и наносуспензии, нанокристаллы, нанотрубки и нанонити, функционализированные наноносители наносферы, нанокапсулы, липосомы, липидные эмульсии, липидные микротрубки/микроцилиндры, липидные микропузырьки, липосферы, липополиплексы, обращенные липидные мицеллы, дендримеры, этосомы, мультикомпозиционные ультратонкие капсулы, аквасомы, фармакосомы, коллойдосомы, ниосомы, дискомы, 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).

[0055] 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).

[0056] “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 ниацинамид.

[0057] Иммунодепрессанты ингибируют или предупреждают активацию иммунной системы, например, уменьшают пролиферацию лимфоцитов. Иллюстративные иммунодепрессанты, подходящие для лечения AMDB, включают, например, азатиоприн, микофенолата мофетил (MMF), циклофосфамид, метотрексат и циклоспорин. Специалист в данной области подтвердит, что некоторые иммунодепрессанты также можно отнести к противовоспалительным средствам и *наоборот*.

[0058] Иллюстративным антителом к CD20, подходящим для лечения AMDB, является ритуксимаб.

[0059] 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.

[0060] 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, многоатричные 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.

[0061] 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 sFcγR средства вводят одновременно, или последовательно, или отдельно. 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 отдельного применения с вводимым внутривенно sFcγR.

[0062] 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.

[0063] 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 sFc γ R, фармацевтической композиции и набора по настоящему изобретению, являются применимыми к данным способам лечения с соответствующими изменениями.

[0064] Также настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции для лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний, предусматривающему смешивание растворимого Fc-гамма рецептора с фармацевтически приемлемыми носителем, разбавителем или наполнителем.

[0065] “IVIg” или “высокодозированный внутривенный иммуноглобулин” представляет собой препарат крови, который содержит объединенный в пул поливалентный IgG, выделенный из плазмы крови, полученной от более чем одной тысячи 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 sFcγR необходимо тщательно оценивать, например, относительно момента времени введения, чтобы вызвать требуемые терапевтические эффекты. Затем терапевтический эффект можно оценить, как описано в данном документе.

[0066] 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.

[0067] 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.

[0068] 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 CD32

[0069] Человеческий sCD32 (SM101) экспрессировали и очищали, как описано в других разделах (Sondermann and Jacob, 1999).

Пример 2. Получение протомства мышей с ЕВА

Пример 2.1. Содержание

[0070] 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 мкг/г) и ксилазина (15 мкг/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

[0071] 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.

[0072] В сравнении с мышами, которым вводили PBS, лечение с помощью sCD32 приводило к значительному снижению тяжести клинического заболевания (фигура 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 (фигура 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 струпья на ушах и хвосте, а также выпадение волос вокруг глаз (фигура 3С, слева). Напротив, отмечали менее интенсивную эритему на ушах и отсутствие поражений на хвосте или вокруг глаз у мышей, которых лечили с помощью sCD32 (фигура 3С, справа).

Пример 3. Анализы ex vivo

Пример 3.1. Выработка ROS

[0073] 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 x 10 мкг/мл) в 96-луночных микропланшетах (Maxisorb; Nunc, Роскилле, Дания) при 4°C в течение ночи. После промывания планшета добавляли свежесыведенные нейтрофилы

человека ($50 \text{ мкл} \times 10^7$ клеток/мл) в присутствии или в отсутствии 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).

[0074] Индуцированную IC выработку нейтрофилами ROS ингибировал sCD32 в зависимости от дозы (фигура 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

[0075] 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 1M 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.

[0076] Ex vivo зависимое от нейтрофилов разделение дермы и эпидермиса, вызванное аутоиммунным антителом, проводили, как описано ранее (Sitaru et al, 2002). Вкратце, криосрезы нормальной кожи человека толщиной 6 мкм инкубировали с сывороткой крови пациентов с ВР при 37°C в течение 1 часа. После промывания с использованием PBS срезы инкубировали со свежевыделенными лейкоцитами человека в концентрации 10^7 клеток/мл в присутствии или отсутствии 0,01, 0,1 и 0,5 мг/мл sCD32 при 37°C на протяжении 3 часов. 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.

[0077] Данное соединение замедляло FcγR-зависимое (Yu et al, 2010) разделение дермы и эпидермиса в криосрезах кожи человека, инкубированных с сывороткой крови пациентов с ВР в присутствии РВМС (фигура 2).

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

[0078] Образцы кожи ушей фиксировали в забуференном 4% формалине. Срезы толщиной 4 мкм, полученные из залитых в парафин тканей, окрашивали при помощи Н&Е. 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.

[0079] У мышей, которых лечили с помощью sCD32, проявлялось значительное уменьшение лейкоцитарной инфильтрации дермы по сравнению с мышами, которых лечили с помощью PBS ($p < 0,05$, фигура 4А и В).

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

[0080] 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 (фигура 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 (фигура 6A). Репрезентативные изображения, полученные в результате ПИФ, демонстрируют накопление IgG в месте DEJ (фигура 6B). 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.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Зуппремоль Гмбх

<120> РАСТВОРИМЫЙ FC-ГАММА РЕЦЕПТОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННЫХ БУЛЛЕЗНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

<130> SUP14857PCT

<160> 12

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 177

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> растворимый Fc-гамма рецептор IIB

<400> 1

Met Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn
1 5 10 15

Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro
35 40 45

Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu
85 90 95

Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys
115 120 125

Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His
130 135 140

Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu
145 150 155 160

Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser

Pro

<210> 2
 <211> 534
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> растворимый Fc-гамма рецептор IIB

<400> 2
 atggcaccgc cgaagcagt tctgaaactg gaaccgcagt ggattaacgt tctgcaggaa 60
 gatagcgтта ccctgacctg tcgtggcacc catagcccgg aaagcgatag cattcagtgг 120
 tttcacaacg gcaatctgat tccgacccat acccagccga gctatcgттt taaagcgaac 180
 aacaacgata gcggcgaata tacctgtcag accggtcaga ccagcctgag cgatccggтт 240
 catctgaccg ttctgagcga atggctggтт ctgcagaccc cgcатctgга atttcaggaa 300
 ggcgaaacca ttgttctgcg ttgccacagc tggaaagata aaccgctggт taaagттacc 360
 ttcttcaga acggcaaaag caaaaaattc agccgtagcg атccgaттt tagcатtccг 420
 caggcgaatc atagccatag cggcgattat cattgtaccg gcaacattgg ctataccctг 480
 tatagcagca aaccggtgac cattaccгтт caggcgccga gcagcagccc gtaa 534

<210> 3
 <211> 181
 <212> БЕЛОК
 <213> человек

<220>
 <221> иной_признак
 <222> (1)..(181)
 <223> Fc-гамма RIIB человека

<400> 3

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro
 1 5 10 15

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg
 20 25 30

Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
 35 40 45

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
 50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro
130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala
165 170 175

Pro Ser Ser Ser Pro
180

<210> 4
<211> 543
<212> ДНК
<213> человек

<220>
<221> иной_признак
<222> (1) .. (5443)
<223> Fc-гамма RIIB человека

<400> 4
atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac 60
gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac 120
tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg 180
ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc 240
agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttct gagtggctgg tgctccagac ccctcacctg 300
gagttccagg agggagaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg 360
gtcaaggcca cattcttcca gaatggaaaa tccaagaat tttcccgttc ggatcccaac 420
ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaaacata 480
ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca 540
ccg 543

<210> 5
<211> 184
<212> БЕЛОК
<213> человек

<220>
<221> иной_признак
<222> (1)..(184)
<223> Fc-гамма RIIA человека

<400> 5

Met Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro
1 5 10 15

Pro Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln
20 25 30

Gly Ala Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
35 40 45

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys
100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
115 120 125

Gly Lys Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro
130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val
165 170 175

Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro
180

<210> 6
<211> 554

<212> ДНК
<213> человек

<220>
<221> иной_признак
<222> (1)..(554)
<223> Fc-гамма RIIA человека

<400> 6
atggggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac ttgagcccc gtggatcaac 60
gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccaggggg ctcgcagccc tgagagcgac 120
tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg 180
ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc 240
agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttcc gaatggctgg tgctccagac ccctcacctg 300
gagttccagg agggagaaac catcatgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg 360
gtcaaggcca cattcttcca gaatggaaaa tcccagaaat tctcccattt ggatcccacc 420
ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaaacata 480
ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc 540
agctcttcac caat 554

<210> 7
<211> 182
<212> БЕЛОК
<213> человек

<220>
<221> иной_признак
<222> (1)..(182)
<223> Fc-гамма RIIIA человека

<400> 7
Met Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Arg
1 5 10 15
Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser
20 25 30
Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Ser Leu Ile Ser
35 40 45
Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asp Asp Ser
50 55 60
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp
85 90 95

Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Gly Arg
115 120 125

Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro Lys Ala Thr Leu
130 135 140

Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn
145 150 155 160

Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ser Val
165 170 175

Ser Thr Ile Ser Ser Phe
180

<210> 8
<211> 546
<212> ДНК
<213> человек

<220>
<221> человек
<222> (1)..(546)
<223> Fc-гамма RIIIA человека

<400> 8
atgatctcc caaaggctgt ggtgttctctg gaggcctcaat ggtacagggt gctcgagaag 60
gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 120
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 180
gttgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccogggtg 240
cagctagaag tccatattcg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 300
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 360
tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca 420
aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttggttg gagtaaaaat 480
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tgtcagtgtc aaccatctca 540
tcattc 546

<210> 9
<211> 182
<212> БЕЛОК

<213> человек

<220>

<221> иной признак

<222> (1)..(182)

<223> Fc-гамма RIIIB человека

<400> 9

Met Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro Gln Trp Tyr Ser
1 5 10 15

Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln Gly Ala Tyr Ser
20 25 30

Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu Asn Leu Ile Ser
35 40 45

Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr Val Asn Asp Ser
50 55 60

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu Ser Asp Pro Val
65 70 75 80

Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln Ala Pro Arg Trp
85 90 95

Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
100 105 110

Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Asp Arg
115 120 125

Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro Lys Ala Thr Leu
130 135 140

Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val Gly Ser Lys Asn
145 150 155 160

Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln Gly Leu Ala Val
165 170 175

Ser Thr Ile Ser Ser Phe
180

<210> 10

<211> 486

<212> ДНК

<213> человек

<220>
<221> иной_признак
<222> (1)..(486)
<223> Fc-гамма RIIIB человека

<400> 10
gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 60
tttcasaatg agaacstcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 120
gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccocggg 180
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctccgggtgggt gttcaaggag 240
gaagaccsta ttcacstgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 300
tatttacaga atggcaaaga caggaagtat tttcatcata attctgactt ccacattcca 360
aaagccacac tcaaagatag cggctcctac ttctgcaggg ggcttggttg gagtaaaaat 420
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tggcagtgtc aaccatctca 480
tcattc 486

<210> 11
<211> 176
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> растворимый Fc-гамма рецептор IIB

<400> 11

Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val
1 5 10 15
Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro
20 25 30
Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr
35 40 45
His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly
50 55 60
Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His
65 70 75 80
Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu
85 90 95
Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp
100 105 110
Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys

115

120

125

Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser
130 135 140

His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr
145 150 155 160

Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro
165 170 175

<210> 12

<211> 531

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> растворимый Fc-гамма рецептор IIB

<400> 12

gcaccgccga aagcagttct gaaactgga cgcagtgga ttaacgttct gcaggaagat 60
agcgttacc tgacctgtcg tggcacccat agcccggaaa gcgatagcat tcagtggttt 120
cacaacggca atctgattcc gaccatacc cagccgagct atcgttttaa agcgaacaac 180
aacgatagcg gcgaatatac ctgtcagacc ggtagacca gcctgagcga tccggttcat 240
ctgaccgttc tgagcgaatg gctggttctg cagaccccg c atctggaatt tcaggaaggc 300
gaaaccattg ttctgctgtg ccacagctgg aaagataaac cgctgggtaa agttaccttc 360
ttccagaacg gcaaaagcaa aaaattcagc cgtagcgatc cgaattttag cattccgcag 420
gcgaatcata gccatagcgg cgattatcat tgtaccggca acattggcta taccctgtat 480
agcagcaaac cggtgacat taccgttcag gcgccgagca gcagcccgta a 531

Формула изобретения

1. Растворимый Fc-гамма рецептор человека для применения в способе лечения у субъекта аутоиммунных буллезных заболеваний.
2. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по п. 1, где рецептор представляет собой Fc-гамма RIIВ, Fc-гамма RIIА, Fc-гамма RIIIA или Fc-гамма RIIВ.
3. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по п. 1 или п. 2, где рецептор представляет собой Fc-гамма RIIВ.
4. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по любому из предыдущих пунктов, где рецептор содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 11.
5. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по любому из предыдущих пунктов, где рецептор содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID No: 1 или 11.
6. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по п. 5, где рецептор вводится в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,0 мг/мл.
7. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по любому из предыдущих пунктов, где субъектом является млекопитающее, предпочтительно человек.
8. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по любому из предыдущих пунктов, где рецептор вводится внутривенно или внутрикожно.
9. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по любому из предыдущих пунктов, где рецептор вводится периодически.

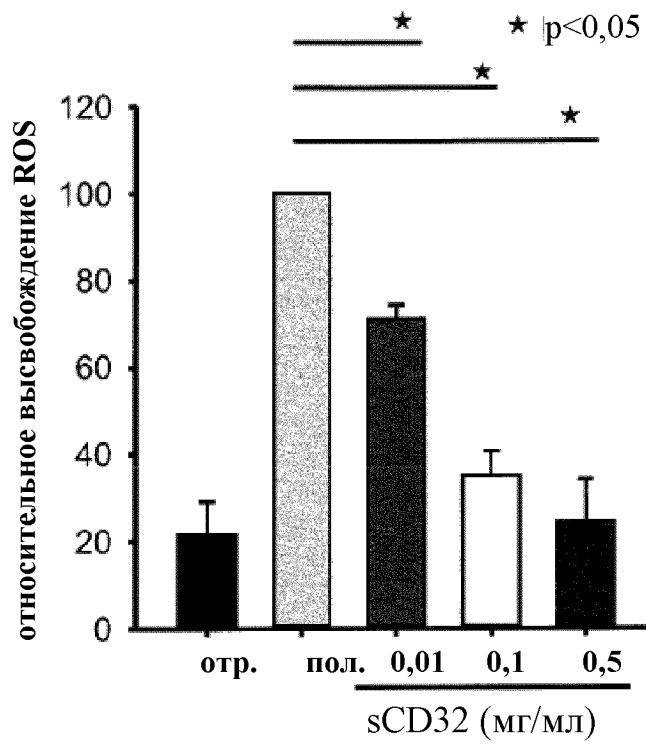
10. Растворимый Fc-гамма рецептор для применения по любому из предыдущих пунктов, где заболевание выбрано из группы, включающей обыкновенную пузырчатку, листовидную пузырчатку, буллезный пемфигоид, пемфигоид слизистых оболочек, гестационный пемфигоид, пемфигоид слизистых оболочек, линейный IgA-зависимый дерматоз, пемфигоидный плоский лишай, приобретенный буллезный эпидермолиз, герпетиформный дерматит и буллезную системную красную волчанку.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая растворимый Fc-гамма рецептор, для применения в способе лечения аутоиммунных буллезных заболеваний.

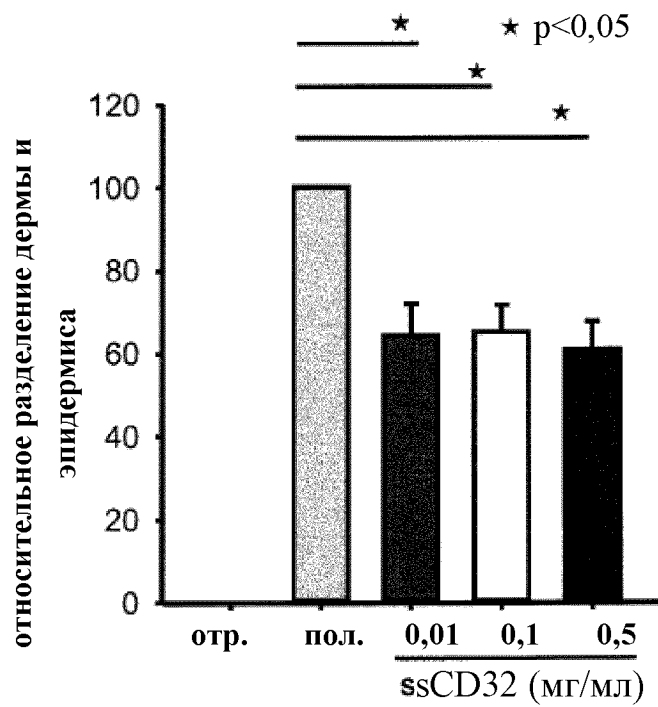
12. Фармацевтическая композиция для применения по п. 11, дополнительно содержащая одно или более средств, выбранных из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20, вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.

13. Набор, содержащий растворимый Fc-гамма рецептор, для применения в способе лечения аутоиммунных буллезных заболеваний.

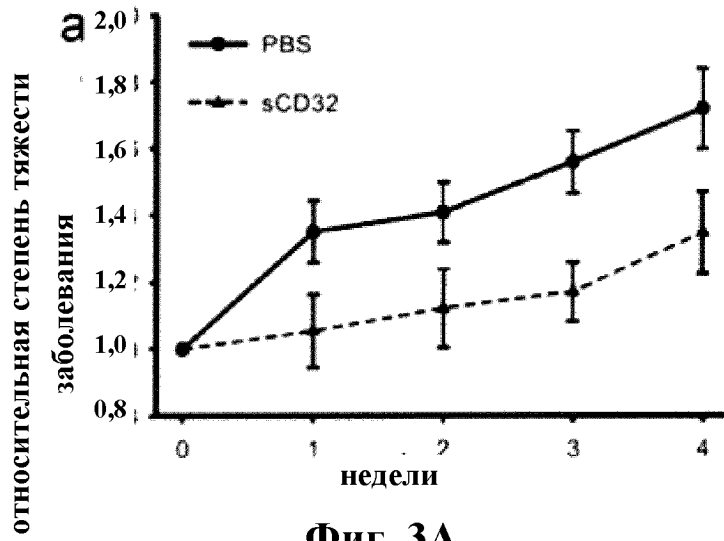
14. Набор для применения по п. 13, дополнительно содержащий одно или более средств, выбранных из группы, включающей противовоспалительные средства, иммунодепрессанты и/или антитело к CD20, вместе с фармацевтически приемлемыми носителем или разбавителем.



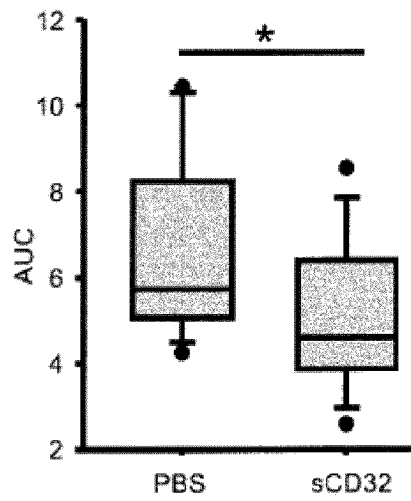
Фиг. 1



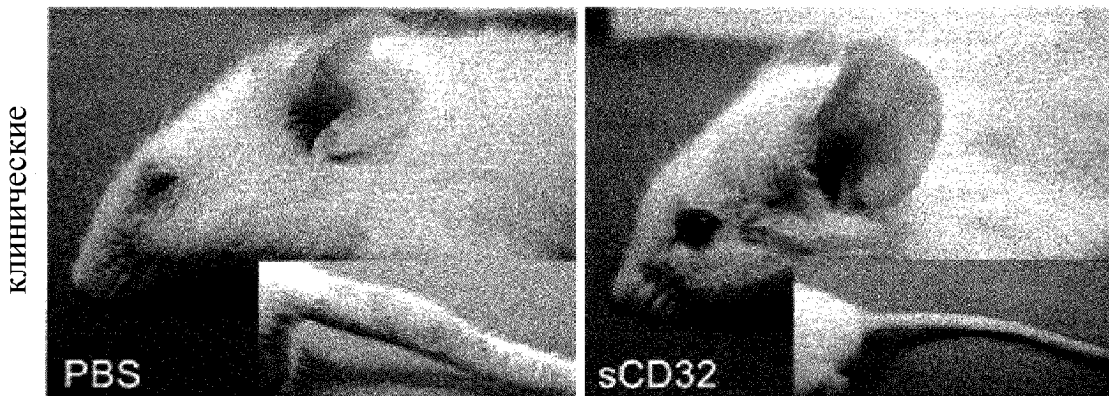
Фиг. 2



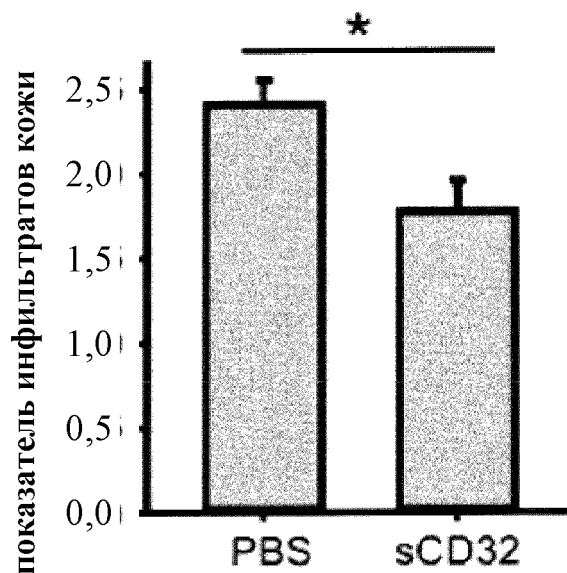
Фиг. 3А



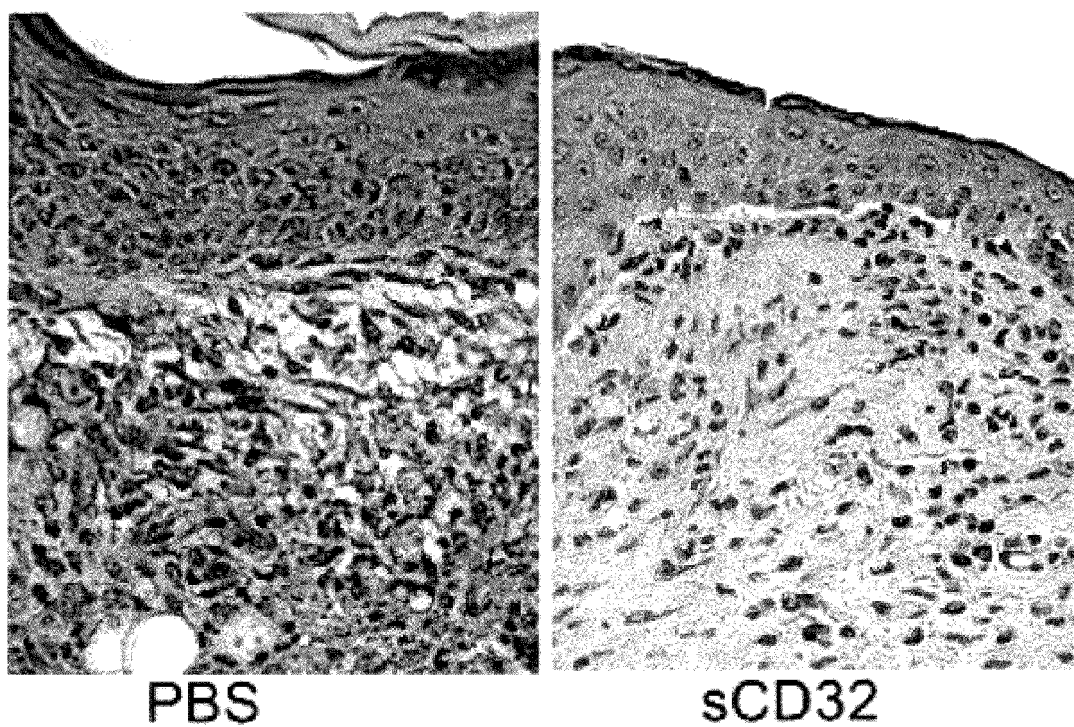
Фиг. 3В



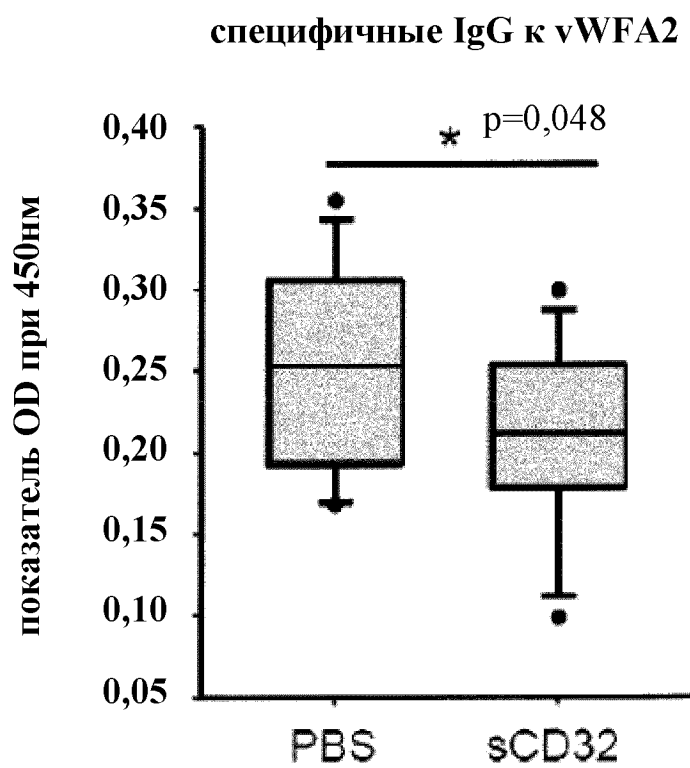
Фиг. 3С



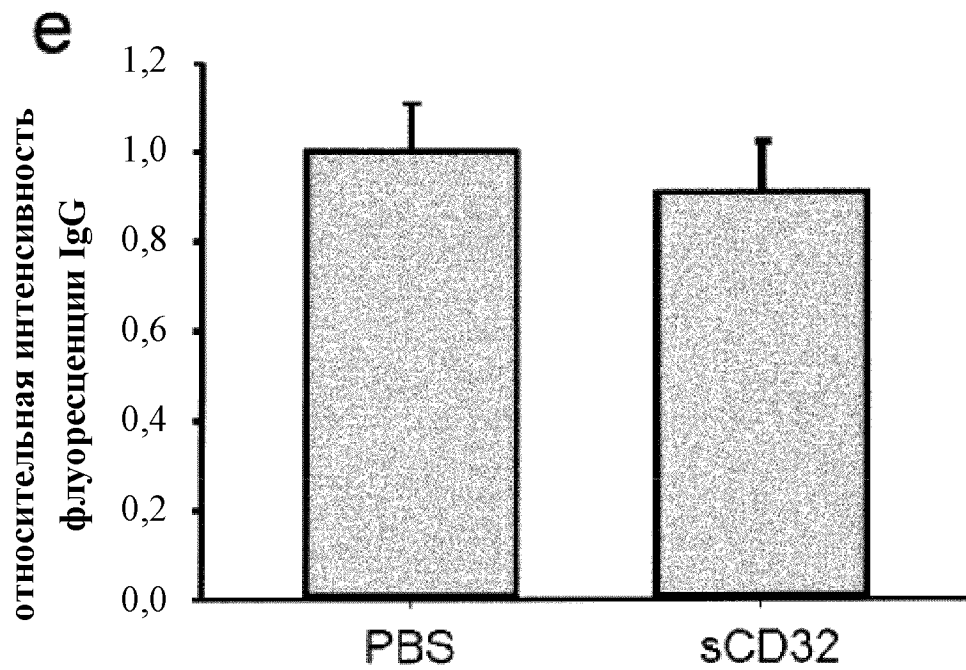
Фиг. 4А



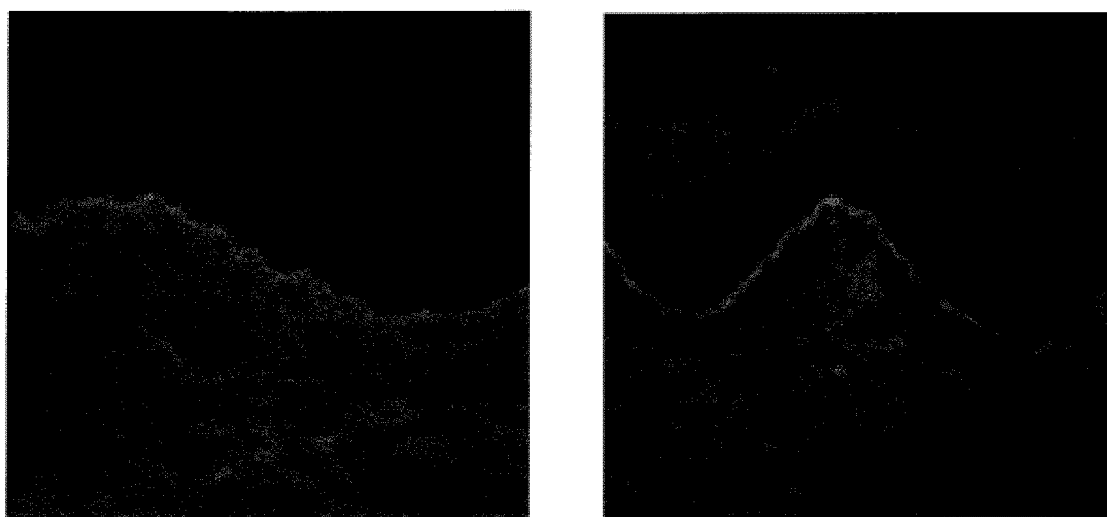
Фиг. 4В



Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В