

Генно-инженерные биологические препараты в терапии системной красной волчанки

Е.А. Асеева, С.К. Соловьев, Е.Л. Насонов

ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. акад. В.А. Насоновой» РАМН, Москва

Системная красная волчанка (СКВ) является прототипом хронического аутоиммунного заболевания. Распространенность СКВ составляет от 20 до 70 случаев на 100 тыс. женщин и варьирует в зависимости от расовой и этнической принадлежности. Несмотря на значительные успехи традиционной терапии, многие проблемы, связанные с ведением этих больных, требуют незамедлительного решения: так у 50–80% больных СКВ выявляются признаки активности и/или частые обострения, около 30% вынуждены прекратить работу, наличие IV класса волчаночного нефрита увеличивает риск развития терминальной почечной недостаточности. За последние 20 лет достигнут огромный прогресс в изучении патогенеза СКВ: найдены биологические мишени для воздействия лекарственных средств и определены принципиально новые терапевтические задачи. Белimumab — первый генно-инженерный биологический препарат, созданный специально для лечения СКВ, что по праву рассматривается как одно из наиболее крупных достижений ревматологии за последние 50 лет.

Ключевые слова: системная красная волчанка, диагностика, лечение, генно-инженерные биологические препараты, белimumab.

Контакты: Елена Александровна Асеева eaaseeva@mail.ru

Для ссылки: Асеева ЕА, Соловьев СК, Насонов ЕЛ. Генно-инженерные биологические препараты в терапии системной красной волчанки. Современная ревматология. 2013;(3):33–40.

[Aseeva EA, Solovyev SK, Nasonov EL. Genetically engineered biological agents in therapy for systemic lupus erythematosus. Modern Rheumatology. 2013;(3):33–40.]

Genetically engineered biological agents in therapy for systemic lupus erythematosus

E.A. Aseeva, S.K. Solovyev, E.L. Nasonov

V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a prototype for chronic autoimmune disease. Its prevalence is 20 to 70 cases per 100,000 women and varies by race and ethnicity. Despite considerable progress in traditional therapy, many problems associated with the management of these patients need to be immediately solved: thus, 50–80% are found to have activity signs and/or frequent exacerbations and about 30% of the patients have to stop work; Class IV lupus nephritis increases the risk of terminal renal failure. In the past 20 years great progress has been made in studying the pathogenesis of SLE: biological targets to affect drugs have been sought and fundamentally new therapeutic goals defined. Belimumab is the first genetically biological agent specially designed to treat SLE, which is rightly regarded as one of the most important achievements of rheumatology in the past 50 years.

Key words: systemic lupus erythematosus, diagnosis, treatment, genetically engineered biological agents, belimumab.

Contact: Elena Aleksandrovna Aseeva eaaseeva@mail.ru

Системная красная волчанка (СКВ) является прототипом хронического аутоиммунного заболевания, характеризующимся гиперпродукцией аутоантител, образованием иммунных комплексов, фиксирующихся на клеточных мембранах различных тканей в присутствии комплемента, развитием воспалительных реакций и тканевого повреждения [1]. Этиология СКВ неизвестна, определенную роль в развитии заболевания играют экологические триггеры: вирус Эпштейна — Барр, воздействие ультрафиолетового света, эстроген-содержащие препараты, кварцевая пыль и курение [2, 3]. Течение СКВ непредсказуемо, классические методы лечения основаны на применении глюкокортикоидов (ГК), цитостатиков (ЦТ) и гидроксихлорохина (ГХ).

Эпидемиология. По разным оценкам, от 70 до 90% пациентов составляют женщины, у которых начало болезни приходится на детородный возраст. Распространенность СКВ составляет от 20 до 70 случаев на 100 тыс. женщин и варьирует в зависимости от расовой и этнической принадлежности — наиболее высокие показатели зафиксированы среди латиноамериканцев, афроамериканцев, африканцев, в том числе проживающих в Карибском бассейне, и азиатов [4]. Ежегодная заболеваемость СКВ — в среднем 5 на 100 тыс. населения. По данным Центра по контролю и профи-

лактике заболеваний (CDC), в континентальной части США заболеваемость составляет от 1,8 до 7,6 на 100 тыс. в год. По разным сведениям, распространенность СКВ — 52 случая на 100 тыс. населения. По данным National Arthritis Data Working Group (2008), приблизительно 250 тыс. американцев имеют определенную СКВ [5, 6]. Общая выживаемость также варьирует в зависимости от расы и этнической принадлежности. Так, 5-летняя выживаемость составляет около 95% среди белых, 90% среди чернокожих и 87% среди выходцев из Латинской Америки.

Выживаемость и проблемы терапии. Негативное влияние на выживаемость оказывают мужской пол, принадлежность к незащищенным социальным группам, низкий уровень дохода, отсутствие образования и проживание в сельской местности [7]. Основными причинами смерти при СКВ являются развитие нефрита, кардиоваскулярные осложнения (атеросклероз) и инфекции [8]. Несмотря на значительные успехи традиционной терапии, многие проблемы, связанные с ведением этих больных, требуют незамедлительного решения. Так, у 50–80% больных СКВ выявляются признаки активности заболевания и/или частые обострения [8], около 30% вынуждены прекратить работу [9], у 10–30% наличие IV класса волчаночного нефрита (диффузно-проли-

феративный) увеличивает риск развития терминальной почечной недостаточности с последующим переводом на гемодиализ [10]. Среди нерешенных проблем — развитие необратимых повреждений органов в первые 5–6 лет после начала СКВ, что обусловлено как ее течением, так и побочными эффектами терапии, в первую очередь длительным применением высоких и средних доз ГК и ЦТ [11]. Еще одной проблемой при СКВ является высокая стоимость лечения и мониторинга пациентов. Так, по данным К.А. Slawsky и соавт. [12], в 2011 г. прямые годовые расходы на лечение пациента с СКВ в США оценивались в 13 735–20 926 долл.

Диагностика. Диагноз СКВ должен основываться на наличии клинических проявлений заболевания и данных лабораторного обследования. Для подтверждения диагноза требуется не менее 4 из 11 критериев ACR, 1997 (чувствительность — 85%, специфичность — 95%).

Диагностические критерии СКВ (ACR, 1997)

- ☐ 1. Сыпь на скулах: фиксированная эритема с тенденцией к распространению на носогубную зону.
- ☐ 2. Дискоидная сыпь: эритематозные приподнимающиеся бляшки с прилипающими кожными чешуйками и фолликулярными пробками, на старых очагах возможны атрофические рубцы.
- ☐ 3. Фотосенсибилизация: кожная сыпь, возникающая в результате реакции на солнечный свет.
- ☐ 4. Язвы в ротовой полости: изъязвления полости рта или носоглотки, обычно безболезненные.
- ☐ 5. Артрит: неэрозивный, поражающий ≥ 2 периферических суставов, проявляющийся болезненностью, отеком и выпотом.
- ☐ 6. Серозит:
 - ☐ плеврит (плевральные боли и/или шум трения плевры, и/или плевральный выпот);
 - ☐ перикардит (шум трения перикарда при аускультации и/или признаки перикардита при эхокардиографии).
- ☐ 7. Поражение почек:
 - ☐ персистирующая протеинурия $\geq 0,5$ г/сут и/или цилиндрурия (эритроцитарная, зернистая или смешанная).
- ☐ 8. Поражение ЦНС:
 - ☐ судороги;
 - ☐ психоз (в отсутствие приема лекарственных средств или метаболических нарушений).
- ☐ 9. Гематологические нарушения:
 - ☐ гемолитическая анемия с ретикулоцитозом;
 - ☐ лейкопения $< 4,0 \cdot 10^9/\text{л}$ (зарегистрированная ≥ 2 раз);
 - ☐ тромбоцитопения $< 100 \cdot 10^9/\text{л}$ (при отсутствии приема лекарственных препаратов).
- ☐ 10. Иммунологические нарушения:
 - ☐ 1) антитела к ДНК (а-ДНК);
 - ☐ 2) антитела к SM (а-SM);
 - ☐ 3) антитела к фосфолипидам (АФЛ);
 - ☐ 4) положительный тест на волчаночный антикоагулянт;
 - ☐ 5) стойкая ложноположительная реакция Вассермана (≥ 6 мес) при лабораторно подтвержденном отсутствии сифилиса.
- ☐ 11. Повышение титров АНФ (при отсутствии приема лекарств, вызывающих волчаночноподобный синдром).

ИТОГО: ☐☐ из 11 критериев.

В 2012 г. группа SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) пересмотрела критерии СКВ (чувствительность — 97%, специфичность — 84%) [13]. Диагноз устанавливается в случае наличия подтвержденного биопсией волчаночного нефрита с антинуклеарным фактором (АНФ), или а-ДНК, или 4 критериев (табл. 1), 1 из которых должен быть обязательно иммунологическим (любой из: а-ДНК, АНФ, а-SM, антитела к кардиолипину — а-КЛ, С3, С4) и 1 — клиническим. Последние критерии СКВ являются высокочувствительными, однако их использование подразумевает наличие у ревматолога данных развернутого иммунологического анализа и морфологического исследования биоптата почки (при наличии нефрита), что весьма затруднительно в условиях рутинной клинической практики городских и сельских поликлиник.

Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП). За последние 20 лет достигнут огромный прогресс в изучении патогенеза СКВ, определены биологические мишени для воздействия лекарственных средств, поставлены принципиально новые терапевтические задачи (табл. 2).

Несмотря на большое число клинических исследований новых ГИБП и попыток реализовать результаты испытаний в реальной клинической практике, клиническая и иммунологическая гетерогенность СКВ не позволяет дать однозначные рекомендации в отношении эффективности и безопасности новых методов лечения, в то же время появилась надежда на решение принципиальных проблем терапии СКВ [14]. Неоднозначность результатов оценки эффективности ГИБП при СКВ способствовала созданию специального инструмента — индекса ответа СКВ (Systemic Lupus Erythematosus Responder Index — SRI), использование которого рекомендуется для проведения клинических исследований [15]. Другим важным обстоятельством необходимости внедрения ГИБП в терапию СКВ явилось доказательство значительного повреждающего действия ГК, особенно при длительном использовании их неадекватных доз [16].

Анти-В-клеточная терапия. Поскольку гиперпродукция аутоантител является основным патогенетическим механизмом развития СКВ, подавление активности В-лимфоцитов становится одной из стратегических целей терапии. Основным анти-В-клеточным препаратом в современной клинической практике является *ритуксимаб* (РТМ), который в значительной степени угнетает функцию и уменьшает количество В-лимфоцитов (деплегия), способствуя развитию ремиссии и минимизации использования ГК и других иммунодепрессантов. РТМ — химерные антитела к мембранному рецептору В-лимфоцита (анти-CD20). Эффект РТМ обусловлен несколькими механизмами, обеспечивающими полную деплецию В-лимфоцитов. Влияние РТМ не затрагивает плазматические клетки, так как они лишены рецептора CD20 на своей поверхности [17]. РТМ разрешен для лечения в основном тяжелых больных СКВ с 2002 г. За последние 12 лет накоплен большой опыт применения РТМ у пациентов с критическим течением СКВ, поражением почек, ЦНС, генерализованным васкулитом, цитопеническим кризом [18–22]. Клиническое улучшение у больных СКВ в неконтролируемых клинических исследованиях отмечалось в 60–80% случаев и всегда сопровождалось транзиторной деплецией В-лимфоцитов. Побочные эффекты и осложнения терапии РТМ в основном сводились к развитию инфузионных реакций и поздней нейтропении, а частота серьезных

Таблица 1. Диагностические критерии СКВ (SLICC/ACR, 2012)

КЛИНИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ

- ☐ 1. **Острое активное поражение кожи**
Сыпь на скулах (не учитываются дискоидные высыпания)
Буллезные высыпания
Токсический эпидермальный некроз как вариант СКВ
Макулопапулезная сыпь
Фотосенсибилизация: кожная сыпь, возникающая в результате реакции на солнечный свет, или подострая кожная волчанка (неиндуцированные псориазоформные и/или круговые полициклические повреждения, которые проходят без образования рубцов, но с возможной поствоспалительной депигментацией или телеангиоэктазиями)
- ☐ 2. **Хроническая кожная волчанка**
Классическая дискоидная сыпь:
локализованная (выше шеи)
генерализованная (выше и ниже шеи)
Гипертрофические (бородавчатые) поражения кожи
Панникулит
Поражение слизистых оболочек
Отечные эритематозные бляшки на туловище
Капилляриты (красная волчанка обморожения, болезнь Гетчинсона, проявляющаяся поражением кончиков пальцев, ушных раковин, пяточных и икроножных областей)
Дискоидная красная волчанка по типу красного плоского лишая или *overlap*
- ☐ 3. **Язвы слизистой оболочки** (в отсутствие следующих причин: васкулит, болезнь Бехчета, инфицирование вирусом герпеса, воспалительные заболевания кишечника, реактивный артрит и употребление кислых пищевых продуктов)
Ротовой полости:
неба
щеки
языка
Носовой полости
- ☐ 4. **Нерубцовая алопеция**, в том числе диффузное истончение волос или повышенная хрупкость волос с видимыми обломанными участками (в отсутствие следующих причин: алопеция очаговая, вследствие приема лекарств, дефицита железа и андрогенная)
- ☐ 5. **Артрит**
Синовит с вовлечением ≥ 2 суставов, характеризующийся отеком или выпотом или болезненность ≥ 2 суставов и утренняя скованность по крайней мере 30 мин
- ☐ 6. **Серозит**
Типичный плеврит в течение >1 дня, или плевральный выпот, или шум трения плевры
Типичная перикардальная боль (боль в положении лежа, купирующаяся в положении сидя с наклоном вперед) >1 дня, или перикардальный выпот, или шум трения перикарда, или электрокардиографические признаки перикардита
(в отсутствие следующих причин: инфекция, уремия и перикардит Дресслера)
- ☐ 7. **Поражение почек**
Соотношение уровня белок/креатинин (или суточная протеинурия) в моче >500 мг белка за 24 ч, или эритроциты в моче (≥ 5), или цилиндры в моче (≥ 5)
- ☐ 8. **Нейропсихические поражения**
Эпилептический приступ
Психоз
Моно/полиневрит (в отсутствие других причин, таких как первичный васкулит)
Миелит
Патология черепно-мозговых нервов/периферическая нейропатия (в отсутствие других причин: первичный васкулит, инфекции и сахарный диабет)
Острое нарушение сознания (в отсутствие других причин: токсические/метаболические, уремия, прием лекарств)
- ☐ 9. **Гемолитическая анемия**
- ☐ 10. **Лейкопения** $<4,0 \cdot 10^9/\text{л}$ по крайней мере один раз (в отсутствие других причин: синдром Фелти, прием лекарств, портальная гипертензия) или **лимфопения** $<1,0 \cdot 10^9/\text{л}$ по крайней мере один раз (в отсутствие других причин: прием ГК, других лекарств, инфекция)
- ☐ 11. **Тромбоцитопения** $<100 \cdot 10^9/\text{л}$ по крайней мере один раз (в отсутствие других причин: прием лекарств, портальная гипертензия и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура)

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ

- ☐ 1. АНФ выше референсного уровня
- ☐ 2. Анти-дсДНК выше референсного уровня (или >2-кратное увеличение, определяемое методом ELISA)
- ☐ 3. A-Sm
- ☐ 4. АФЛ положительные, определенные любым из следующих способов:
☐ положительный волчаночный антикоагулянт
☐ ложноположительная реакция Вассермана
☐ средний или высокий титр аКЛ (IgA, IgG или IgM)
☐ положительный результат теста на анти-β₂-гликопротеин I (IgA, IgG или IgM)
- ☐ 5. Низкий уровень комплемента:
 C₃
 C₄
 CH₅₀
- ☐ 6. Положительная реакция Кумбса при отсутствии гемолитической анемии

Клинических критериев ☐Иммунологических критериев ☐

ных инфекций не превышала 5–10% [22]. Несмотря на эффективность РТМ, продемонстрированную в открытых испытаниях, в 2 рандомизированных клинических исследованиях (РКИ) не подтверждена его эффективность по сравнению с плацебо (ПЛ) у больных с волчаночным нефритом (LUNAR) [23, 24] и СКВ без поражения почек (EXPLORER) [25]. В то же время при более детальном анализе данных установлен значительно более выраженный эффект РТМ по сравнению с ПЛ у больных с достигнутой деплецией, высоким уровнем а-ДНК и низким уровнем комплемента [25]. К возможным объяснениям неудач в этих РКИ можно отнести слишком малый срок наблюдения, высокие дозы ГК и назначение микофенолата мофетила (ММФ) в группе ПЛ. РТМ продолжает использоваться не по прямому назначению у больных с высокой активностью СКВ, обусловленной прогрессирующим нефритом, поражением ЦНС и цитопенией, в случаях неэффективности высоких доз ГК и ЦТ. Дополнительное преимущество назначения РТМ в комбинации с ММФ при СКВ – его эффективность и возможность значительно снизить дозу ГК у больных с IV классом волчаночного нефрита. Новая стратегия лечения волчаночного нефрита РТМ в фазе индукции, принятая в Великобритании, предусматривает значительное уменьшение дозы и длительности применения ГК в фазе поддерживающей терапии [26].

Энратузмаб (ЭПМ) – моноклональные антитела (МАТ) к CD22-рецепторам В-лимфоцита. В настоящее время проводится РКИ эффективности ЭПМ у больных СКВ со средней и тяжелой степенью активности. CD22 является трансмембранным лектиноподобным рецептором, который присутствует на поверхности зрелых, наивных и переходных клеток, но отсутствует на клетках памяти и плазматических клетках и играет важную роль в регуляции функции В-клеток [27]. ЭПМ вызывает умеренное истощение В-лимфоцитов, однако в отличие от РТМ не приводит к апоптозу и полной деплеции В-лимфоцитов. Его основной мишенью являются наивные, зрелые и переходные В-лимфоциты, содержание которых уменьшается на 40% после применения ЭПМ [28].

В настоящее время получены промежуточные результаты РКИ EMBLEM – 12-недельного многоцентрового рандомизированного двойного слепого плацебоконтролируемого исследования IIb фазы, в котором оцениваются эффективность и безопасность ЭПМ, а также его доза у пациентов с умеренной и тяжелой СКВ. В исследование включено 227 пациентов. Продemonстрирована выраженная клиническая эффективность ЭПМ в кумулятивной дозе 2400 мг: снижение активности заболевания, измеряемой с помощью специального композитного индекса BILAG. Применение ЭПМ в дозе 600 мг/нед сопровождалось наибольшим улучшением оценки по BILAG-2004 (от A/B до C/D) по сравнению с ПЛ во всех доменах органов, при этом отмечены также хорошая переносимость препарата и отсутствие тяжелых осложнений [27]. В настоящее время заканчиваются еще 2 РКИ III фазы, состоящих из 12-недельных циклов, у пациентов с умеренной и тяжелой СКВ (EMBODYTM1 и EMBODYTM2). В исследовании планируется включить 780 пациентов, срок окончания исследований – февраль 2014 г. (NCT01262365, NCT01261793, HYPERLINK «<http://www.clinicaltrials.gov>» www.clinicaltrials.gov). Еще одно открытое клиническое исследование эффективности и безопасности ЭПМ, включающее 1400 пациентов с умеренной и тяжелой СКВ, планируется завершить в 2016 г. (NCT01408576, HYPERLINK «<http://www.clinicaltrials.gov>» www.clinicaltrials.gov).

Анти-BLyS-терапия. При отсутствии прямых показаний для применения РТМ при СКВ и незавершенных к настоящему времени исследований эффективности ЭПМ настоящей сенсацией стало сообщение о регистрации FDA нового биологического препарата для лечения СКВ – белимумаба [44, 45]. Белимумаб – первый ГИБП, специально созданный для лечения СКВ, что явилось одним из наиболее крупных достижений ревматологии за последние 50 лет [29, 30]. Открытие ключевого значения В-клеток в иммунопатогенезе СКВ привлекло внимание к изучению не только самих В-клеток, но и В-клеточных цитокиновых лигандов в качестве возможных мишеней терапевтического воздействия. Особый интерес исследователей вызвал В-лимфоцитарный стимулятор (B-lymphocyte stimulator – BLyS) [31], известный также как В-клеточный активирующий фактор (B-cell-activating factor – BAFF) и лиганд суперсемейства фактора некроза опухоли 13b, который является важней-

Таблица 2. Биологические мишени и ГИБП при СКВ

ГИБП	Молекула	Клинические исследования	Механизм действия	Результат
РТМ	Анти-CD20-мАТ	EXPLORER: 257 больных СКВ, активность ≥ 1 BILAG A или ≥ 2 BILAG B, LUNAR: 144 пациента с люпус-нефритом III–IV класса	Апоптоз или лизис В-клеток	Эффективность по сравнению с ПЛ не доказана
Белимумаб	Анти-BLyS-мАТ	BLISS-52, 76: 1693 пациента, SELENA-SLEDAI ≥ 6 , без нефрита и поражения ЦНС	Блокирование растворимого BLyS и его связывания с В-клетками	Доказана эффективность по сравнению с ПЛ. Зарегистрирован FDA и EMA
ЭПМ	Анти-CD22-мАТ	EMBLEM, EMBODY: 227 и 1400 пациентов со средней/тяжелой степенью СКВ, без нефрита и поражения ЦНС	Модуляция функции В-клеток, частичный апоптоз	Через 12 нед превосходит ПЛ. Исследование продолжается
АБЦ	CTL4-Ig	РКИ III фазы: пациенты с полиартритом, серозитом, перикардитом, эритемой	Блокирование костимуляции Т- и В-лимфоцитов	Продолжается после неудачи при волчаночном нефрите
ТЦЗ	Анти-ИЛ6Р-мАТ	РКИ I фазы: пациенты со средней/тяжелой степенью СКВ	Блокирование рецепторов ИЛ6	Продолжается. Улучшение через 12 нед
Сифалимумаб	Анти-ИФН α -мАТ	РКИ: NCT01283139 I фазы	Блокирование ИФН α	Продолжается
Ронтализумаб	Анти ИФН α -рекомбинантные антитела	РКИ I фазы	Блокирование ИФН α	Продолжается
Атацицепт	Рекомбинантная молекула TACI-Ig	РКИ I–II–III фазы	Ингибция активации В-клеток цитокинами BLyS и APRIL	Досрочно прекращены из-за развития побочных эффектов
Блисибимод	Anti-BLyS-белок	РКИ CHABLIS-SC2: пациенты с активной СКВ, SELENA-SLEDAI >10	Ингибция BLyS	Продолжается

Примечание. ИФН – интерферон.

шим компонентом цитокиновой регуляции функции, пролиферации и дифференцировки В-клеток [32, 33]. На мембране В-клеток экспрессируются 3 типа рецепторов для BLyS и APRIL, BLyS-рецептор 3 (BR3), трансмембранный активатор и кальциевый модулятор и циклофилиновый лиганд интерактор (Transmembrane Activator and Calcium modulator and cyclophilin ligand Interactor – TACI), а также В-клеточный антиген созревания (В-cell maturation antigen – BCMA) [34]. При этом BLyS более мощно взаимодействует с BR3, чем с другими рецепторами, а APRIL – только с TACI и BCMA. У мышей со спонтанно развивающимся волчаночноподобным синдромом (MRL/Mr-lpr/lpr, NZB/NZW F1) выявлена гиперпродукция BLyS, а введение им рецептора rBLyS существенно продлевало жизнь [35]. В клинических исследованиях показано, что у пациентов с СКВ наблюдается увеличение концентрации BLyS в сыворотке, коррелирующей с концентрацией антител к двуспиральной (дс) ДНК (анти-дсДНК) и динамикой активности заболевания [36, 37]. Эти и многие другие данные [38] послужили теоретическим обоснованием для разработки анти-BLyS-препаратов, в первую очередь белимумаба, для лечения СКВ.

Белимумаб (Belimumab, BENLYSTA, GlaxoSmithKline) – полностью человеческие рекомбинантные мАТ (IgG1 λ), предотвращающие взаимодействие rBLyS с клеточными рецепторами аутореактивных «переходных» (transitional) и наивных

В-клеток [38], что в свою очередь приводит к подавлению характерной для СКВ В-клеточной гиперреактивности, в частности синтеза аутоантител [39]. Кроме того, блокада BLyS может снижать выживаемость В-клеток в ростковых центрах лимфоидных органов, дифференцировку В-клеток памяти в продуцирующие аутоантитела клетки и синтез «провоспалительных» цитокинов (ИЛ21, ИЛ17 и др.), которые играют важную роль в иммунопатогенезе СКВ [40]. Белимумаб вводят путем внутривенных инфузий. Продолжительность полужизни ($T_{1/2}$) препарата составляет 19–20 дней, объем распределения небольшой (69–112 мл/кг), клиренс медленный (7 мл/сут/кг). На фармакокинетику белимумаба не влияет сопутствующая терапия нестероидными противовоспалительными препаратами, антималярийными препаратами, ГК, метотрексатом (MT), азатиоприном (АЗА) и ММФ [41]. Длительность инфузии – 1 ч, доза препарата – 10 мг/кг. Первые 3 инфузии проводят каждые 3 нед, а последующие – каждые 4 нед.

Официальные показания для назначения белимумаба при СКВ: умеренная/высокая активность заболевания, наличие выраженных серологических нарушений (положительные результаты определения АНФ и/или анти-дсДНК) и недостаточная эффективность стандартной терапии (в соответствии с инструкцией препарат назначают при наличии всех трех показаний у одного пациента). Программа клинических исследований белимумаба при СКВ продолжается более 10 лет и вклю-

чает 4 рандомизированных плацебоконтролируемых исследования (РПКИ). В основные РПКИ (BLISS-52 и BLISS-76) вошло 1693 пациента из 31 страны (223 клинических центра), открывая фаза этих исследований продолжается в настоящее время (более 6 лет). На сегодня завершены 2 РПКИ III фазы, BLISS-52 и BLISS-76 [42, 43], результаты которых послужили основанием для регистрации препарата. Первичной конечной точкой BLISS-52 и BLISS-76 был индекс SRI, разработанный в рамках исследования II фазы. Критериями включения в исследования были стабильная стандартная терапия аминокислотными и иммуносупрессивными препаратами (МТ, АЗА, ММФ), ГК в течение 1 мес. При этом среднее значение индекса SLEDAI у пациентов, включенных в исследование, составило 9,6 преимущественно за счет мышечно-скелетных и кожно-слизистых проявлений. Критериями исключения были тяжелое поражение почек и ЦНС. В исследование BLISS-52, в котором принимали участие российские ревматологические центры (Москва, Санкт-Петербург, Ярославль), включено 865 пациентов, серопозитивных по АНФ и/или анти-дсДНК [44]. Улучшение индекса SRI через 52 нед достоверно чаще наблюдалось у пациентов, получавших белимумаб (1 и 10 мг/кг), чем ПЛ (51 и 58% против 44%). Различий в частоте нежелательных явлений (НЯ) на фоне лечения белимумабом и плацебо не отмечено. В исследование BLISS-76 вошло 819 пациентов, серопозитивных по АНФ и/или анти-дсДНК, длительность исследования — 76 нед [45]. Не установлено достоверных различий в эффективности белимумаба в дозе 1 мг/кг по сравнению с ПЛ (40,6% против 33,8%). Однако на фоне лечения белимумабом в дозе 10 мг/кг через 52 нед улучшение индекса SRI отмечалось достоверно чаще, чем в группе ПЛ (43,2% против 33,8%), хотя через 76 нед не получено статистически достоверных различий. Таким образом, в обоих исследованиях на фоне лечения белимумабом достигнута первичная конечная точка (более высокая частота ответа по индексу SRI), что свидетельствует об эффективности препарата.

В обоих исследованиях уменьшение индексов SLEDAI и BILAG прежде всего связано с положительной динамикой мышечно-скелетных, кожно-слизистых и серологических проявлений. Как и в исследовании II фазы, на фоне лечения белимумабом наблюдалось снижение общей частоты обострений и тяжелых обострений. Этот важный эффект был особенно заметен в открытой фазе этих исследований (более 6 лет) и обусловлен механизмом действия белимумаба (нормализация роста и выживаемости В-клеток), для реализации которого требуется длительное время, а не цитотоксическими свойствами препарата.

Другими важными вторичными конечными точками было снижение дозы ГК и улучшение качества жизни (КЖ) пациентов. При суммарном анализе исследований BLISS-52 и BLISS-76 у значительно большего числа больных, получавших белимумаб (10 мг/кг), чем в группе ПЛ, было возможным снижение дозы ГК (25% уменьшение дневной дозы <7,5 мг/сут через 52 нед). Отмечена отчетливая тенденция к положительной динамике показателей КЖ (fatigue scale — FACIT и SF-36), особенно в исследовании BLISS-52 и при использовании белимумаба в дозе 10 мг/кг. По данным суммарного анализа пациентов, вошедших в исследования BLISS-52 и BLISS-76, через 52 нед у значительно большего числа, получавших белимумаб (1 и 10 мг/кг), по сравнению с ПЛ отмечалось улучшение мышечно-скелетных и кожно-слизистых проявлений (домены шкал BILAG и SELENA—SLEDAI) и иммунологических пока-

зателей (домен шкалы SELENA—SLEDAI) [46]. Особый интерес представляет положительная динамика иммунологических показателей, что согласуется с клиническими данными на фоне лечения белимумабом (анализ пациентов, вошедших в исследования BLISS-52 и BLISS-75). Наблюдалась нормализация биомаркеров, отражающих активность СКВ: гипергаммаглобулинемии, титров аутоантител (а-ДНК, а-Sm, антирибосомальных антител и а-КЛ), а также увеличение концентрации С₃- и С₄-компонентов комплемента. Кроме того, отмечено снижение (на 20–25%) общего числа В-клеток и определенных субпопуляций В-лимфоцитов (наивных и активированных В-клеток и плазматических клеток), свидетельствующее о выраженном иммуномодулирующем действии препарата. По данным R.F. van Vollenhoven и соавт. [47], эффективность белимумаба у больных с исходно высоким индексом SELENA—SLEDAI (≥10), гипокомплементемией и увеличением уровня анти-дсДНК (по сравнению с ПЛ) была существенно выше, чем в общей популяции пациентов, получавших белимумаб. Кроме того, у пациентов этой подгруппы наблюдалось существенное улучшение таких отдаленных исходов, как частота обострений, потребность в ГК и КЖ. Это согласуется с данными предыдущих исследований, в которых было показано, что количество плазматических клеток коррелирует с активностью СКВ [48], а высокий уровень анти-дсДНК и снижение концентрации комплемента — с активностью СКВ и риском развития обострений [49, 50].

Нежелательные явления на фоне терапии белимумабом.

По данным РПКИ, белимумаб хорошо переносится, наиболее частыми НЯ были инфекционные осложнения, боль в суставах, головная боль, диарея, тошнота, изредка наблюдались инфузионные реакции, нейтропения и тромбоцитопения. Очень редко отмечались тяжелые инфекции и депрессия. В целом частота НЯ в группах пациентов, леченных белимумабом, была сопоставима с таковой в группе ПЛ. Данные, касающиеся очень хорошей переносимости белимумаба, полученные в РПКИ, были подтверждены в открытой фазе (в течение 4–6 лет) этих исследований [51].

В заключение необходимо подчеркнуть, что несмотря на умеренную эффективность белимумаба при СКВ, в первую очередь у пациентов с иммунологически активным вариантом заболевания, но без тяжелых потенциально смертельных проявлений (волчаночный нефрит, поражение ЦНС), создание и внедрение препарата в клиническую практику — важный шаг к совершенствованию фармакотерапии заболевания. В настоящее время только на фоне лечения белимумабом были получены достоверные положительные результаты РПКИ, позволившие зарегистрировать этот препарат для лечения СКВ. В то же время место белимумаба в реальной клинической практике требует уточнения. С учетом данных клинических исследований и механизма действия препарата (подавление накопления патологических аутореактивных В-клеток и синтеза аутоантител) создается впечатление, что белимумаб перспективен для замедления прогрессирования и поддержания ремиссии СКВ, индуцированной высокими дозами ГК, ЦФ или РТМ, оптимизации поддерживающей терапии ГК, снижения риска необратимого повреждения внутренних органов. Четкая связь между эффективностью белимумаба и показателями иммунологических биомаркеров активности СКВ, а также этническими характеристиками пациентов (белимумаб менее эффективен у афроамериканцев) открывает новые перспективы персонализированной терапии этого заболевания, по-

вышает значение стандартизованного иммунологического обследования больных, стимулирует поиск новых биомаркеров, позволяющих прогнозировать эффективность терапии. На основании пока единственного широкомасштабного исследования эффективности белимумаба в реальной клинической практике, результаты которого были доложены на X Международной конференции по СКВ (Буэнос-Айрес, Аргентина, 18–19 апреля 2013 г.) С. Molta и соавт. [52], показана высокая эффективность белимумаба у 501 больного СКВ. Применение белимумаба в дозе 10 мг/кг ежемесячно в течение 6 мес приводило к улучшению у 57–65% больных с высокой/средней активностью СКВ. У 77% больных, получавших белимумаб, удалось значительно снизить дозу ГК, а у 9% полностью отменить ГК. Терапия белимумабом приводила к уменьшению частоты обострений, госпитализаций, снижению уровня а-ДНК и других показателей активности СКВ. Немаловажное значение имеет скорость развития эффекта белимумаба. Первые признаки улучшения, как правило, наблюдаются на 8-й неделе терапии: уменьшение чувства усталости, снижение индексов активности СКВ (SELENA-SLEDAI ≥ 4 балла и BILAG на 10 баллов, уровня а-ДНК). Более выраженное улучшение наблюдается к 12–16-й неделе.

Появление белимумаба ознаменовало новую эру в лечении СКВ, связанную с началом широкого применением ГИБП и созданием нового класса лекарственных препаратов — ингибиторов *BLyS*, которые могут играть важную роль в лечении не только СКВ, но и широкого круга аутоиммунных заболеваний.

Показания для назначения белимумаба (бенлиста) при СКВ (адаптировано из [53]):

1. Недостаточная эффективность предшествующей терапии ГК, ГХ и/или одним из ЦТ в течение по крайней мере 3 мес.
2. Высокая или средняя активность СКВ (>6 баллов по SELENA-SLEDAI).
3. Необходимость назначения ГК ($\geq 7,5$ мг преднизолона в день) + ГХ и/или ЦТ для поддержания ремиссии.
4. Противопоказания для назначения одного из ЦТ или необходимость назначения ЦТ в дозе, превышающей рекомендованную.
5. Высокий уровень а-ДНК, низкий уровень комплемента.
6. Рефрактерное к стандартной терапии поражение кожи, суставов, мышц, слизистых оболочек, тромбоцитопения $\leq 30\ 000$.
7. Нефрит III класса с низкой степенью клинической и морфологической активности.
8. Полиорганная рефрактерность к стандартной терапии.

Цели терапии:

- снижение активности заболевания;
- предотвращение рецидивов появления активности;
- снижение суточной дозы преднизолона/другого ГК;
- снижение риска развития необратимых повреждений органов;
- улучшение КЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2003;349(16):1526–33. DOI: 10.1056%2FNEJMoa021933.
2. James JA, Harley JB, Scofield RH. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18(5):462–7. DOI: 10.1097%2F01.bor.0000240355.37927.94.
3. Costenbader KH, Gay S, Alarcón-Riquelme ME et al. Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev*. 2012;11(8):604–9. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.10.022. Epub 2011 Oct 25.
4. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 2010; 39(4):257–68. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2008.10.007. Epub 2009 Jan 10.
5. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15(5):308–18. DOI: 10.1191%2F0961203306lu2305xx.
6. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):15–25. DOI: 10.1002/art.23177.
7. Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L et al. Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006;54(8):2550–7. DOI: 10.1002%2Fart.21955.
8. Nikpour M, Urowitz MB, Ibañez D, Gladman DD. Frequency and determinants of flare and persistently active disease in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2009;61(9):1152–8. DOI: 10.1002/art.24741.
9. Yelin E, Tonner C, Trupin L et al. Longitudinal study of the impact of incident organ anifestations and increased disease activity on work loss among persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(2):169–75. DOI: 10.1002/acr.20669.
10. Rose BD, Appel GB. End-stage renal disease due to lupus nephritis. *UpToDate*, 2012 (<http://www.uptodate.com/contents/end-stage-renal-disease-due-to-lupus-nephritis>).
11. Fessler BJ, Alarcón GS, McGwin G Jr et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XVI. Association of hydroxychloroquine use with reduced risk of damage accrual. *Arthritis Rheum*. 2005;52(5):1473–80. DOI: 10.1002%2Fart.21039.
12. Slawsky KA, Fernandes AW, Fusfeld L et al. A structured literature review of the direct costs of adult systemic lupus erythematosus in the US. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(9):1224–32. DOI: 10.1002/acr.20502.
13. Petri M et al. Derivation and Validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677–86. DOI: 10.1002/art.34473.
14. Jordan B, Lutalo PMK, DXCruz DP. Novel therapeutic agents in clinical development for systemic lupus erythematosus. *BMC Med*. 2013;11:120. DOI: 10.1186/1741-7015-11-120.
15. Furie RA, Petri MA, Wallace DJ et al. Novel evidencebased systemic lupus erythematosus responder index. *Arthritis Rheum*. 2009;61(1):1143–51.
16. Zonana-Nacach A, Barr SG, Magder LS, Petri M. Damage in systemic lupus erythematosus and its association with corticosteroids. *Arthritis Rheum*. 2000;43(8):1801–8. DOI: 10.1002%2F1529-0131%28200008%2943%3A8%3C1801%3A%3AAID-ANR16%3E3.0.CO%3B2-O.
17. Sanz I, Lee FE. B-cells as therapeutic targets in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(6):326–37. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.68.
18. Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC et al. B-cell depletion in the treatment of patients with systemic lupus erythematosus: a longitudinal analysis of 24 patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(12):1542–5. DOI: 10.1093%2Frheumatology%2F44.12.1542.
19. Lindholm C, Björnsen-Asp K, Zengjanchi K et al. Longterm clinical and immunological effects of anti-CD20 treatment in patients with refractory systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2008;35(5):826–33. Epub 2008 Apr 1.
20. Looney RJ, Anolik JH, Campbell D et al.

- B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum.* 2004;50(8):2580–9. DOI: 10.1002/art.20430.
21. Turner-Stokes T, Lu TY, Ehrenstein MR et al. The efficacy of repeated treatment with B-cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: an evaluation. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(8):1401–8. DOI: 10.1093/rheumatology/ker018. Epub 2011 Mar 12.
22. Terrier B, Amoura Z, Ravaud P et al. Safety and efficacy of rituximab in systemic lupus erythematosus: results from 136 patients from the French AutoImmunity and Rituximab registry. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2458–66. DOI: 10.1002/art.27541.
23. Furie R, Looney RJ, Rovin B et al. Efficacy and safety of rituximab in subjects with active proliferative lupus nephritis (LN): results from the randomized, double-blind phase III LUNAR study. *Arthritis Rheum.* 2009;60(Suppl 1):S429.
24. Lightstone L. The landscape after LUNAR: rituximabXs crater-filled path. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):962–5. DOI: 10.1002/art.34362. Epub 2012 Jan 9.
25. Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):222–33. DOI: 10.1002/art.27233.
26. Pepper R, Griffith M, Kirwan C et al. Rituximab is an effective treatment for lupus nephritis and allows a reduction in maintenance steroids. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(12):3717–23. DOI: 10.1093/ndt/gfp336. Epub 2009 Jul 17.
27. Traczewski P, Rudnicka L. Treatment of systemic lupus erythematosus with epratuzumab. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;71(2):175–82. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2010.03767.x.
28. Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F et al. Differential effects of epratuzumab on peripheral blood B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(4):450–7. DOI: 10.1136/ard.2007.075762. Epub 2007 Aug 2.
29. FDA approves Benlysta to treat lupus. [Last accessed on 2011 Mar 28]. Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm246489.htm>
30. European Medicines Agency. Benlysta: belimumab. 9cited August 8, 2011). Available from: www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines.002015/human_med_001466.jsp&mid=WC0bac058001d124
31. Lied GA, Berstad A. Functional and clinical aspects of the B cell-activation factor (BAFF): a narrative review. *Scand J Immunol.* 2011;73(1):1–7. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2010.02470.x.
32. Moore PA, Belvedere O, Orr A. et al. BLyS: Member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science.* 1999;285(5425):260–3. DOI: 10.1126/science.285.5425.260.
33. Schneider P, MacKay F, Steiner V et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med.* 1999;189(11):1747–56. DOI: 10.1084/jem.189.11.1747.
34. Trembl JF, Hao Y, Stadanlick JE et al. The BLyS family: Toward a molecular understanding of B cell homeostasis. *Cell Biochem Biophys.* 2009;53(1):1–16. DOI: 10.1007/s12013-008-9036-1. Epub 2008 Nov 26.
35. Gross JA, Johnston J, Murdi S et al. TACI and BCMA are receptors for TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature.* 2000;404(6781):995–9.
36. Stahl W, Mettas S, Tan SM et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: Longitudinal observations. *Arthritis Rheum.* 2003;48(12):3475–86. DOI: 10.1002/art.11354.
37. Petri M, Stahl W, Chatham W et al. Association of plasma B lymphocyte stimulator levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58(2):2453–9. DOI: 10.1002/art.23678.
38. Sanz I. Targeting B-cell in SLE: good news at last. *Nat Rev Rheum.* 2011; 7(5):255–6. DOI: 10.1038/nrrheum.2011.48.
39. Halpern WG, Lappin P, Zanardi T et al. Chronic administration of belimumab, a BLyS antagonist, decreases tissue and peripheral blood B-lymphocyte populations in cynomolgus monkeys: Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicologic effects. *Toxicol Sci.* 2006;91(2):586–99. DOI: 10.1093/toxsci/tkf148. Epub 2006 Mar 3.
40. Baker KP, Edwards BM, Main SH et al. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator. *Arthritis Rheum.* 2003;48(11):3253–65. DOI: 10.1002/art.11299.
41. Label approved on 03/10/2011 (PDF) for BENLYSTA, BLA no.125370 [Last accessed 2011 Mar 28]. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/12537
42. Navarra SV, Guzman RM, Gallacher AE et al. BLISS-52 Study Group. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: A randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2011;377(9767):721–31. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61354-2. Epub 2011 Feb 4.
43. Furie R, Petri M, Zamani E et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3918–30. DOI: 10.1002/art.30613.
44. Furie R, Petri MA, Wallace DJ et al. Novel evidence-based systemic lupus erythematosus responder index. *Arthritis Rheum.* 2009;61(9):1143–51. DOI: 10.1002/art.24698.
45. Furie R, Petri M, Zamani E et al. A phase III, randomized, placebo-controlled study of belimumab, a monoclonal antibody that inhibits B lymphocyte stimulator, in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):3918–30. DOI: 10.1002/art.30613.
46. Manzi S, Sanchez-Guerrero J, Merrill JT et al. Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(11):1833–8. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200831. Epub 2012 May 1.
47. Van Vollenhoven RF, Petri MA, Cervera R et al. Belimumab in the treatment of systemic lupus erythematosus: high disease activity predictors of response. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(8):1343–9. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-200937. Epub 2012 Feb 15.
48. Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K et al. Correlation between circulating CD29high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48(5):1332–42. DOI: 10.1002/art.10949.
49. Petri M, Singh S, Tesfayone H et al. Prevalence of flare and influence of demographic and serologic factors on flare risk in systemic lupus erythematosus: a prospective study. *J Rheumatol.* 2009;36(11):2476–80. DOI: 10.3899/jrheum.090019. Epub 2009 Oct 15.
50. Tseng CE, Buyon JP, Kim M et al. The effect of moderate dose corticosteroids in preventing of severe flares in patients with serologically active, but clinically stable systemic lupus erythematosus: finding of a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3623–32. DOI: 10.1002/art.22198.
51. Merrill JT, Ginzler EM, Wallace DJ et al. Long-term safety profile of belimumab plus standard therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(10):3364–73. DOI: 10.1002/art.34564.
52. Molta et al. Outcomes Associated with Belimumab in Patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in Clinical Practice Settings: Results from OBSERVE Study in the United States (U.S.). *Lupus.* 22, Abstr Suppl; 036, 2013.
- Ramos-Casals M et al. Recomendaciones sobre el uso de belimumab en el lupus eritematoso sistémico. *Guía de Práctica Clínica GEAS-SEMI. Rev Clin Esp.* 2012; 213(1):66–7. DOI: 10.1016/j.rce.2012.10.004.