

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035931**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|--|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.02</p> <p>(21) Номер заявки
201790862</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2013.02.15</p> | <p>(51) Int. Cl. <i>A61K 38/17</i> (2006.01)
<i>A61K 39/00</i> (2006.01)
<i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>A61K 9/127</i> (2006.01)
<i>C07K 14/755</i> (2006.01)
<i>C07K 16/18</i> (2006.01)
<i>C07K 19/00</i> (2006.01)
<i>C07K 14/47</i> (2006.01)</p> |
|---|--|

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С ЭРИТРОЦИТАМИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

- | | |
|---|---|
| <p>(31) 13/397,202</p> <p>(32) 2012.02.15</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2017.08.31</p> <p>(62) 201491524; 2013.02.15</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭКОЛЬ ПОЛИТЕКНИК ФЕДЕРАЛЬ
ДЕ ЛОЗАН (CH)</p> <p>(72) Изобретатель:
Хаббелл Джеффри А., Конто Стефан,
Дейн Карен И. (CH)</p> <p>(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)</p> | <p>(56) KONTOS S.: "Engineering Erythrocyte Affinity for Improved Pharmacokinetics and Immune Tolerogenesis", THESIS, no. 5075, 23 June 2011 (2011-06-23), page 105pp, XP009170901, Lausanne the whole document
Kontos, Stephane: "Engineering Erythrocyte Affinity for Improved Pharmacokinetics and Immune Tolerogenesis", École polytechnique fédérale de Lausanne EPFL 27 April 2011 (2011-04-27), XP002700436, Retrieved from the Internet: URL: http://infoscience.epfl.ch/record/165397 [retrieved on 2013-07-04] the whole document
"EPFL School of Life Sciences - Annual Report SV 2011", INTERNET CITATION, 31 December 2011 (2011-12-31), page 68, XP009170907, Retrieved from the Internet: URL: http://issuu.com/epfl-sv-ar/docs/sv2011annualreportcomplete [retrieved on 2013-07-05] the whole document
WO-A2-2012021512
US-A1-2012178139
KONTOS S. ET AL.: "Engineering antigens for in situ erythrocyte binding induces T-cell deletion", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, no. 1, 2 January 2013 (2013-01-02), pages E60-E68, XP55068885, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1216353110 the whole document
KONTOS STEPHAN ET AL.: "Improving protein pharmacokinetics by engineering erythrocyte affinity", March 2010 (2010-03), ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, VOL. 239, PAGE(S) 518-BIOT, 239TH NATIONAL MEETING OF THE AMERICAN-CHEMICAL-SOCIETY; SAN FRANCISCO, CA, USA; MARCH 21-25, 2010, XP009170761, ISSN: 0065-7727</p> |
|---|---|

- (57) Описаны фармацевтические композиции, содержащие связывающийся с эритроцитами фрагмент и толерогенный антиген, вызывающий у субъекта нежелательный иммунный ответ, а также применения описанных фармацевтических композиций для производства лекарственного средства для лечения нежелательного иммунного ответа, целиакии, рассеянного склероза или сахарного диабета 1 типа.

B1**035931****035931****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент США с серийным номером 13/397202, поданной 15 февраля 2012 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область изобретения

Область изобретения относится к медицинским композициям и применениям лигандов или антител, которые связываются с эритроцитами. Конкретное применение включает иммунотолеризацию, доставку лекарственных средств и разновидности терапии рака.

Предпосылки изобретения

Отторжение трансплантированной ткани и аутоиммунные заболевания являются патологическими состояниями, которые включают иммунное отторжение чужеродной биомолекулы в связи с ее антигенной природой. В подавление или лечение иммунного отторжения вовлечены многие лекарственные средства и клинические способы. В этом способе вакцины используют для стимуляции иммунного ответа к антигенам на патогенных биомолекулах с целью вызова иммунного ответа против белков или других биомолекул, которые несут антиген.

Краткое описание изобретения

Толерогенез является процессом создания иммунологической толерантности к веществу. Пациент, либо человек, либо представитель другого вида, которого лечат с целью получения толерантности к веществу, будет иметь сниженный адаптивный иммунный ответ к веществу. Снижение адаптивного иммунного ответа можно измерить с помощью анализа количеств циркулирующих антител, реактивных к веществу, или с помощью анализа реакций Т-клеток на вещество и толеризирующее средство. В настоящем документе предложены композиции и способы для толеризации. Многие из вариантов осуществления включают введение молекулы-гибрида, которая имеет толеризирующий антиген, объединенный со связывающимся с эритроцитами фрагментом. Молекула-гибрид связывается с эритроцитом, и начинается процесс презентации толеризирующего антигена иммунной системе таким образом, что вырабатывается толерантность.

Были открыты пептиды, которые специфически связываются с эритроцитами (также известными как красные кровяные клетки). Эти пептидные лиганды являются связывающимися с эритроцитами фрагментами, которые специфически связываются с эритроцитами даже в присутствии других факторов, присутствующих в крови. Эти лиганды можно применять различными способами.

Вариантом осуществления настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, включающая связывающийся с эритроцитами фрагмент, представляющий собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент одноцепочечного антигенсвязывающего домена (scFv), который специфически связывается с Band3, гликофорином А, гликофорином В, гликофорином С или гликофорином D на эритроците человека *in situ* в крови, и толерогенный антиген, представляющий собой антиген, вызывающий у субъекта нежелательный иммунный ответ, причем композиция способна индуцировать: (i) пролиферацию CD8+ Т-клеток, имеющих фенотип апоптотического или истощенного исхода, (ii) делению CD4 и/или CD8+ Т-клеток, специфических для толерогенного антигена, и (iii) регуляторные клеточные фенотипы.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, включающая связывающийся с эритроцитами фрагмент, представляющий собой пептидный лиганд, который специфически связывается с Band3, гликофорином А, гликофорином В, гликофорином С или гликофорином D на эритроците человека *in situ* в крови, и толерогенный антиген, представляющий собой трансплантационный антиген, антиген пищи, терапевтическое средство, аутоантиген, фрагмент любого из таких антигенов или их мимотоп, вызывающий нежелательный иммунный ответ.

Еще одним вариантом осуществления является применение указанных фармацевтических композиций для лечения нежелательного иммунного ответа.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая связывающийся с эритроцитами фрагмент и толерогенный антиген, которые рекомбинантно гибридизированы или химически конъюгированы, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент представляет собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент одноцепочечного антигенсвязывающего домена (scFv), который специфически связывается с Band3, гликофорином А, гликофорином В, гликофорином С или гликофорином D на эритроците человека *in situ* в крови, указанный толерогенный антиген представляет собой антиген, при воздействии которого у субъектов развивается нежелательный иммунный ответ; и при этом толерогенный антиген представляет собой трансплантационный антиген, антиген пищи, терапевтическое средство, аутоантиген или фрагмент любого из таких антигенов.

Еще одним вариантом осуществления является применение указанной фармацевтической приемлемой композиции для производства лекарственного средства для лечения целиакии, для лечения сахарного диабета I типа или для лечения рассеянного склероза.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая связывающийся с эритроцитами фрагмент, представляющий собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент scFv, который специфически связывается с гликофорином А человека, и толерогенный антиген, представляющий собой антиген пищи, терапевтическое средство или аутоантиген.

Еще одним вариантом осуществления является применение фармацевтической композиции для производства лекарственного средства для лечения нежелательного иммунного ответа, а также для лечения целиакии или для лечения сахарного диабета 1 типа.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена экспериментальная схема и результаты для гибридной молекулы ERY1 и овальбумина (OVA), где гибрид ERY1-OVA с высокой аффинностью связывается с экваториальной периферией эритроцитов мыши; секция (а) схематическое изображение конъюгации пептида ERY1 с овальбумином (OVA), результатом чего является связывание с поверхностным гликофоорином А эритроцита; секция (b) связывание как конъюгатов, так и промежуточных соединений OVA, характеризуемое с помощью проточной цитометрии; гистограмма, закрашенная черным цветом, ERY1-OVA; незакрашенная гистограмма, SMCC-OVA; пунктирная гистограмма, MIS-OVA; связывающийся с эритроцитами пептид ERY1 WMVLPWLPGLTD (SEQ ID NO: 1), MIS = несовпадающий пептид PLLTVGMDLWPW (SEQ ID NO: 2), SMCC = сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, применяемый для конъюгации ERY1 с OVA; секция (c) равновесное связывание ERY1-OVA с эритроцитами, характеризующееся низкой константой диссоциации ERY1-OVA ($R^2 = 0,97$, связывание с одним сайтом), определенное с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 2 объединены результаты, показывающие, что связывание с эритроцитами вызывает толерантность к антигенной стимуляции; секция (а) модель толерантности адаптивного переноса CD8+ Т-клеток OTI, на которой представлен протокол эксперимента для экспериментальной группы, а также для групп стимуляции и наивного контроля (n = 5); секция (b) выявление с помощью проточной цитометрии популяций CD8+ Т-клеток OTI (CD3ε⁺ CD8α⁺ CD45.2⁺); секция (c) количественное определение популяции CD8+ Т-клеток OTI в дренирующих лимфатических узлах (паховом и подколенном) через 4 дня после антигенной стимуляции мышью CD45.1⁺ (**P<0,01); секция (d) выявление с помощью проточной цитометрии CD8+ Т-клеток OTI, экспрессирующих IFNγ; секция (e) CD8+ Т-клетки OTI, экспрессирующие IFNγ, в дренирующих лимфатических узлах через 4 дня после антигенной стимуляции и повторной стимуляции пептидом SIINFEKL (SEQ ID NO: 3) (**P<0,01); секция (f) концентрации IFNγ в средах клеточных культур лимфатических узлов через 4 дня после повторной стимуляции пептидом SIINFEKL (SEQ ID NO: 3), определенные с помощью ELISA (**P<0,01); секция (g) концентрации IL-10 в среде клеточной культуры лимфатических узлов через 4 дня после повторной стимуляции OVA, определенные с помощью ELISA (*P<0,05). Данные представляют среднее медианное значение ± значение от минимального до максимального; секция (h) титры OVA-специфического IgG в сыворотке на день 19 (*P<0,05), данные представляют среднее значение ± SE; секция (i) комбинированная модель толерантности с использованием OTI и экспрессирующей OVA опухоли тимомы EL4 (E.G7-OVA), на которой представлен протокол эксперимента для экспериментальной, а также для контрольной групп (n = 4, 3 соответственно); секция (j) количественное определение непролиферирующих (поколение 0) CD8+ Т-клеток OTI, циркулирующих в крови через 5 дней после адаптивного переноса; данные представляют медианное значение ± значение от минимального до максимального (**P<0,01); секция (k) профиль роста опухолей E.G7-OVA, инъецированных подкожно через 9 дней после адаптивного переноса OTI, данные представляют среднее значение ± SE (*P<0,05).

Фиг. 3 представляет собой столбиковую диаграмму, показывающую, как связывание с эритроцитами ослабляет антиген-специфические гуморальные ответы у мышей C57BL/6. Выявление OVA-специфического IgG в сыворотке через 19 дней после двух введений 1 мкг OVA или 1 мкг ERY1-OVA через 6 дней у мышей C57BL/6 (*P<0,05).

На фиг. 4 представлены результаты эксперимента, в которых PEG-ERY1 с 8 ветвями связывается с эритроцитами *in vitro* и *in vivo*; секция (а) PEG-ERY1 с 8 ветвями (гистограмма, закрашенная черным цветом), но не PEG-MIS с 8 ветвями (гистограмма, закрашенная серым цветом) или PEG-пиримидилдисульфид с 8 ветвями связывается с эритроцитами мыши после инкубации *in vitro*; секция (b) PEG-ERY1 с 8 ветвями (гистограмма, закрашенная черным цветом), но не PEG-MIS с 8 ветвями (гистограмма, закрашенная серым цветом), связывается с циркулирующими эритроцитами при внутривенной инъекции.

На фиг. 5 представлены результаты эксперимента, в которых описано время полужизни на клеточной поверхности эритроцита PEG-ERY1, имеющего 8 Fab-фрагментов, (закрашенные кружки) и PEG-MIS, имеющего 8 Fab-фрагментов, (незакрашенные прямоугольники), определенное с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 6 представлены результаты эксперимента в виде столбиковой диаграммы, показывающей связывание пептидных лигандов с эритроцитами человека.

На фиг. 7 представлены результаты эксперимента в виде гистограммы проточной цитометрии. Эритроциты мыши инкубировали с TER119-SIINFEKL (гистограмма, закрашенная серым цветом) или альбумином (незакрашенная гистограмма). Флуоресцентный сигнал исходит от антитела к бхHis-PE, применяемого при выявлении scFv.

Фиг. 8 представляет собой график результатов эксперимента, показывающий пролиферирующие

CD8 T-клетки OT-I в селезенке после внутривенного введения физиологического раствора, OVA, ERY1-OVA или TER119-SIINFEKL, **P<0,01, ***P<0,001.

Фиг. 9 представляет собой график результатов эксперимента, показывающий фенотипическую характеристику T-клеток OTI после адоптивного переноса и внутривенного введения физиологического раствора, OVA, ERY1-OVA или TER119-SIINFEKL. Левая секция: индукция апоптических клеток OTI, характеризуемая связыванием аннексина-V при проточной цитометрии; правая секция: индукция истощенных клеток OTI, характеризуемая экспрессией PD-1 при проточной цитометрии.

Фиг. 10 представляет собой график результатов эксперимента, показывающий характеристику воспалительных (IFN γ^+) T-клеток OTI в лимфатических узлах, дренирующих место стимуляции, полученных от мышей, толеризированных различными инъекционными составами, исследованную с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 11 представляет собой график результатов эксперимента, показывающий титры аспарагиназа (ASNase)-специфического IgG в сыворотке у мышей, получающих 2 или 6 доз ERY1-ASNase или ASNase дикого типа, через 21 день после введения, определенные с помощью ELISA.

Фиг. 12 представляет собой график результатов эксперимента, показывающий пролиферацию CD4 T-клеток, полученных от трансгенной мыши NODBDC2.5, в совместной культуре с DC (дендритными клетками) селезенки, с различными средовыми добавками.

Фиг. 13 представляет собой график результатов эксперимента, показывающий результаты количественного определения непролиферирующих NODBDC2.5 CD4 T-клеток после адоптивного переноса и внутривенного введения TER119-ChrA, свободного пептида 1040-p31 или физиологического раствора, полученные с помощью проточной цитометрии.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

Для толерогенеза предложены разновидности молекулярного дизайна. Белок или другой молекулярный антиген, к которому определяют толерантность, получают в виде конъюгата со связывающимся с эритроцитами фрагментом. Фрагмент может содержать пептидный лиганд, антитело, аптамер или фрагмент антитела. Конъюгат, также называемый гибридной молекулой, может представлять собой гибридный белок или может включать линкер, например конъюгат с полимером или полимерной мицеллой или полимерными наночастицами.

В настоящем документе описаны пептиды, которые специфически связываются с эритроцитами. Они предложены в виде пептидных лигандов с последовательностями, которые специфически связываются, или в виде антител или их фрагментов, которые обеспечивают специфическое связывание с эритроцитами. Пептиды можно получить в виде гибридных молекул с терапевтическими средствами, толеризирующими антигенами или нацеливающими пептидами. Терапевтические средства преимущественно могут иметь повышенный период полужизни в кровотоке *in vivo*, если они являются частью гибрида. Иммунотолерантность можно создать с помощью гибридов и выбора антигена на веществе, к которому необходима толерантность. Термин антиген в настоящем контексте обозначает непроцессированный антиген, его антигенный фрагмент или миметик толерогенного антигена. Гибридизации с нацеливающими пептидами направляют гибриды к мишени, например к опухоли, где связывающиеся с эритроцитами лиганды снижают или полностью прекращают ток крови к опухоли путем рекрутинга эритроцитов к мишени.

Пептидные последовательности, которые специфически связываются с эритроцитами.

Пептиды, которые специфически связываются с эритроцитами, были обнаружены и описаны заявителем в PCT/US 2011/047078, включали пептид, называемый ERY1, который специфически связывается с эритроцитом. Также были описаны шесть пептидов (ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 и ERY162), которые специфически связываются с эритроцитами человека. В примере 9 подробно описано, как пептидные лиганды (ERY64, ERY123 и ERY141) вводили в состав гибридного белка с флуоресцентным белком-репортером и сохраняли их свойства специфического связывания. Вариантом осуществления настоящего изобретения является практически чистый полипептид, содержащий аминокислотную последовательность ERY1, или один из связывающихся с эритроцитами пептидов человека, или его консервативную замену, или нуклеиновую кислоту, кодирующую их. Такие полипептиды специфически связываются с эритроцитами и являются лигандом для них. Лиганд является термином, который обозначает химическую молекулу, специфически связывающуюся с молекулой-мишенью. Мишень обозначает заранее определенную молекулу, ткань или место, которое потребитель намеревается связать с лигандом. Таким образом, целенаправленная доставка в ткань обозначает доставку молекулы или другого материала, такого как клетка, к предполагаемой ткани-мишени. Соответственно, варианты осуществления включают молекулы или композиции, содержащие по меньшей мере один из раскрытых в данном документе лигандов, которые применяют для связывания с эритроцитом. Связывающую активность полипептида к эритроциту можно легко определить согласно описанным в настоящем документе протоколам эксперимента. С помощью таких способов можно определить показатели силы связывания вариантов полипептидов по отношению к ERY1 или связывающегося с эритроцитами пептида человека при определенных физиологических условиях, например последовательностей, созданных с использованием консервативных замен, добавления или удаления фланкирующих групп или изменений или добавлений для корректировки растворимости последовательности в водном растворе. Можно получить пептидные лиганды,

специфичные к одной или нескольким следующим мишеням или группам мишеней: поверхностной молекуле эритроцита (белку, гликопротеину), белку полосы 3 (CD233), гликофору, в частности гликофору А (CD235a), гликофору В (CD235b), гликофору С (CD235c) и гликофору D (CD235d), аквапорину-1, Glut-1, антигену Kidd, RhAg/Rli50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, Kell (CD238), Duffy/DARC (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), глобозиду, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/нейротелину (CD147), JMН, гликозилтрансферазе, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, стоматину, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 и антигена H (CD173). Белки клеточной поверхности эритроцитов, либо очищенные препараты, либо их смесь, можно подвергнуть скринингу на предмет пептидных лигандов. Белки клеточной поверхности эритроцитов можно рекомбинантно экспрессировать в их полной форме или в виде частичных доменов, гибридизированных с метками, которые повышают экспрессию или стабильность белка. Затем рекомбинантный белок-мишень можно иммобилизовать на пластине или сфере и применять в качестве аффинной мишени для способа скрининга библиотеки. Белки клеточной поверхности эритроцитов также можно выделить из клеточных препаратов цельной крови, из которой очищенные или комплексные смеси мембранных белков можно иммобилизовать на твердой матрице (сфере, пластине или др.) и применять в качестве аффинных мишеней для способов скрининга. Весь способ скрининга можно выполнять в присутствии высокой концентрации сывороточного альбумина (например, 50 мг/мл) и при температуре 37°C для снижения числа событий неспецифического связывания и для отбора пептидов с благоприятными характеристиками связывания в сыворотке крови. Пептидные лиганды наиболее предпочтительно выбирают из белка полосы 3 (CD233), гликофорина В (CD235b), гликофорина С (CD235c) и гликофорина D (CD235d).

Было замечено, что пептидные лиганды связываются с клеточными поверхностями эритроцитов без изменения морфологии клетки и без цитоплазматической транслокации. Лиганды были распределены по поверхности мембраны и не образовывали кластеров. Гликофорин-А (GYPA) был отдельным белком, идентифицированным в качестве мишени ERY-1. ERY-1 был реактивным только у мышей и крыс. Было установлено, что пептидные лиганды, которые специфически связываются с эритроцитами человека, являются специфическими по отношению к эритроцитам человека, а не для других видов. Описан клон фага с дисплеем пептида с высокой аффинностью WMVLPWLPGLTD (SEQ ID NO: 1, обозначенный в настоящем документе как ERY1) к клеточной поверхности эритроцитов мыши. Другие эксперименты выявили связывающие лиганды к эритроцитам человека, показанные в табл. 1-2. Шесть последовательностей специфически связывались с эритроцитами человека. Седьмая последовательность, названная ERY50, связывалась с эритроцитами человека и также связывалась с эпителиальными/эндотелиальными клетками.

Таблица 1

Пептидные лиганды, которые связываются с эритроцитами человека

Название пептида	Последовательность пептида, связывающегося с эритроцитами человека	Идентификатор последовательности
ERY19	<u>G</u> QSGQPNSRWIYMTPLSPGIYR <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:4
ERY50	<u>G</u> QSGQSWSRAILPLFKIQVP <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:5
ERY59	<u>G</u> QSGQYICTSAGFGEYCFID <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:6
ERY64	<u>G</u> QSGQTYFCTPLLQYCSV <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:7
ERY123	<u>G</u> QSGHWHCQGPFANWV <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:8
ERY141	<u>G</u> QSGQFCTVIYNTYTCVPSS <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:9
ERY162	<u>G</u> QSGQSVWYSSRGNPLRCT <u>GSSGGS</u>	SEQ ID NO:10

Подчеркнутые части последовательностей указывают линкерные последовательности.

Пептидные лиганды, которые связываются с эритроцитами человека или мыши

Пептид		Идентификатор последовательности
ERY19'	PNSRWIYMTPLSPGIYR	SEQ ID NO:11
ERY50'*	SWSRAILPLFKIQVP	SEQ ID NO:12
ERY59'	YICTSAGFGEYCFID	SEQ ID NO:13
ERY64'	TYFCTPLLGGQYCSV	SEQ ID NO:14
ERY123'	HWHCQGPFANWV	SEQ ID NO:15
ERY141'	FCTVIYNTYTCVPSS	SEQ ID NO:16
ERY162'	SVWYSSRGNPLRCTG	SEQ ID NO:17
ERY1**	WMVLPWLPGLD	SEQ ID NO:1

*не специфичен к эритроцитам

**к эритроцитам мыши

Варианты осуществления настоящего изобретения включают пептиды, которые специфически связываются с поверхностью эритроцитов. Последовательности не оптимизировали по минимальной длине. Такая оптимизация известна из уровня техники и ее можно осуществлять на практике с помощью методик, описанных в настоящем документе. Например, Kenrick et al. (Protein Eng. Des. Sel. (2010) 23(1):9-17) исследовали при помощи скрининга библиотеку из 15 остатков и затем обнаружили минимальные связывающие последовательности длиной в 7 остатков. Getz (ACS Chem. Biol., May 26, 2011) обнаружил минимальные связывающие домены длиной до 5 остатков. Связывающиеся с эритроцитами пептиды могут присутствовать в повторах тех же самых последовательностей, например от 2 до 20 повторов; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных пределах. Более того, пептиды могут присутствовать в комбинации, причем две или более последовательностей расположены в одном пептиде или являются частью одной гибридной молекулы.

Полагают, что число последовательных остатков, которые обеспечивают специфическое связывание, находится от приблизительно 4 до 12 остатков. Соответственно, раскрыты все пептиды длиной из четырех последовательных остатков, которые можно найти в табл. 2, а также пептиды, например, из 5, 6, 7 или 8 последовательных остатков. Это число основано на числе остатков для других пептидных связывающихся с белком лигандов. Варианты осуществления настоящего изобретения включают последовательности минимальной длины для одной из связывающихся с эритроцитами SEQ ID, изложенных в данном документе, включая табл. 1. Соответственно, некоторые варианты осуществления относятся к композиции, содержащей пептид или выделенный (или очищенный) пептид, содержащий ряд последовательностей последовательных аминокислот с 4-12 последовательными аминокислотными остатками из последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 1 и их консервативные замены, при этом указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом. Альтернативно число последовательных остатков можно выбрать равным от приблизительно 3 до приблизительно 18; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных пределах, например 7, 8, 9, 10 или от 8 до 18. Связывающаяся с эритроцитами последовательность может иметь, например, консервативную замену по меньшей мере одной и не более двух аминокислот последовательности, или 1, 2 или 3 замены, или от 1 до 5 замен. Более того, в обнаруженной последовательности часто может осуществить замену L-аминокислот на D-аминокислоты, как описано у Giordano. Пептид или композиция может в некоторых вариантах осуществления преимущественно состоять из последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 1. Пептид может быть ограничен по длине, например, с числом остатков от приблизительно 10 до приблизительно 100; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных пределах, например от приблизительно 10 до приблизительно 50 или от приблизительно 15 до приблизительно 80. Можно пред-

ложить пептидный связывающийся с эритроцитами фрагмент, который содержит пептидный лиганд, который имеет константу диссоциации от приблизительно 10 до 0,1 нМ, определенную с помощью измерений равновесного связывания между пептидом и эритроцитами; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных пределах, например от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 1 нМ. Пептид может дополнительно содержать терапевтическое средство. Терапевтическим средством может быть, например, белок, биопрепарат, фрагмент антитела, ScFv или пептид. Пептид может дополнительно содержать толерогенный антиген, например белок человека, применяемый человеком с недостаточностью по этому белку (например, факторы крови, такие как фактор VIII или фактор IX), белки с гликозилированием, отличным от гликозилирования у человека, синтетические белки, не встречающиеся в естественных условиях у людей, пищевые аллергены человека или аутоиммунные антигены человека.

Полипептиды с различной длиной могут быть пригодны для определенного применения. В целом, полипептиды, которые содержат полипептидные последовательности лигандов, будут проявлять специфическое связывание в случаях, если полипептид может взаимодействовать с эритроцитами *in vivo*. Пептиды, способные сворачиваться, можно протестировать с помощью способов, описанных в настоящем документе. Соответственно, некоторые варианты осуществления относятся к полипептидам, которые имеют полипептидный лиганд, но не встречаются в естественных условиях, а некоторые варианты осуществления относятся к полипептидам, имеющим определенную длину, например от 6 до 3000 остатков, или 12-1000, или 12-100, или 10-50; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных пределах.

Некоторые варианты осуществления предлагают различные полипептидные последовательности и/или очищенные или выделенные полипептиды. Полипептид представляет собой термин, который обозначает цепь аминокислотных остатков, не принимая во внимание посттрансляционную модификацию (например, фосфорилирование или гликозилирование) и/или комплексообразование с дополнительными полипептидами, синтез в комплексы из многих субъединиц, с нуклеиновыми кислотами и/или углеводами, или другими молекулами. Таким образом, в настоящем документе протеогликаны также называют полипептидами. Применяемый в настоящем документе "функциональный полипептид" является полипептидом, способным к активации указанной функции. Полипептиды можно получить рядом способов, многие из которых хорошо известны в данной области. Например, полипептиды можно получить с помощью экстракции (например, из выделенных клеток), экспрессии рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, или химического синтеза. Полипептиды можно получить, например, с помощью рекомбинантной технологии и векторов экспрессии, кодирующих полипептид, введенный в клетки-хозяева (например, с помощью трансформации или трансфекции) для экспрессии кодируемого полипептида.

Существует ряд консервативных изменений, которые обычно можно выполнить без изменения активности. Эти изменения называются консервативными заменами или мутациями; другими словами, аминокислоту, принадлежащую к группе аминокислот, имеющих определенный размер и характеристику, можно заменить на другую аминокислоту. Замены для аминокислотной последовательности можно выбрать из других членов класса, к которому принадлежит аминокислота. Например, неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан, метионин и тирозин. Полярные нейтральные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Предполагают, что такие изменения существенно не повлияют на кажущийся молекулярный вес, определенный с помощью электрофореза в полиакриламидном геле или изоэлектрической точки. Консервативные замены также включают замену оптических изомеров последовательностей другими оптическими изомерами, а именно D-аминокислот на L-аминокислоты для одного или нескольких остатков последовательности. Более того, все аминокислоты в последовательности можно подвергнуть замене D-изомера на L-изомер. Иллюстративные консервативные замены включают, но без ограничения, Lys на Arg и наоборот для поддержания положительного заряда; Glu на Asp и наоборот для поддержания отрицательного заряда; Ser на Thr для поддержания свободной OH-группы и Gln на Asn для поддержания свободной NH₂-группы. Более того, точечные мутации, делеции или вставки полипептидных последовательностей или соответствующих последовательностей нуклеиновых кислот в некоторых случаях можно получить без потери функции фрагмента полипептида или нуклеиновой кислоты. Замены могут содержать, включать 1, 2, 3 или более остатка. Для аминокислотных остатков, описанных в настоящем документе, используют либо однобуквенное обозначение аминокислот, либо трехбуквенную аббревиатуру. Применяемые в настоящем документе аббревиатуры соответствуют стандартной номенклатуре полипептидов, *J. Biol. Chem.*, (1969), 243, 3552-3559. Все последовательности аминокислотных остатков представлены в настоящем документе с помощью формулы с левой и правой ориентацией в стандартном направлении от аминоконца к карбоксиконцу.

В некоторых случаях может быть необходим процент идентичности пептида к последовательности, изложенной в настоящем документе. В таких случаях процент идентичности измеряют как число остат-

ков пептида или части пептида. Полипептид, например, с идентичностью в 90% также может быть частью более крупного пептида.

Применяемый в настоящем документе термин "очищенный" в отношении полипептида обозначает полипептид, который синтезировали химически, и, таким образом, он практически не загрязнен другими полипептидами, или который отделили или очистили от большинства других клеточных компонентов, сопровождающих его в естественных условиях (например, других клеточных белков, полинуклеотидов или клеточных компонентов). Примером очищенного полипептида является такой полипептид, который по меньшей мере на 70% относительно сухого веса не содержит белки и органические молекулы природного происхождения, с которыми он связан в естественных условиях. Препарат очищенного полипептида, таким образом, может, например, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 99% относительно сухого веса представлять собой полипептид. Также можно сконструировать полипептиды, содержащие последовательность метки (например, полигистидиновой метки, тус-метки или FLAG -метки), что облегчает очистку или маркировку полипептида (например, захват на аффинных матрицах, визуализацию под микроскопом). Таким образом, очищенная композиция, которая содержит полипептид, обозначает очищенный полипептид, если не указано иное. Термин "выделенный" указывает на то, что полипептиды или нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению находятся не в своей естественной среде. Выделенные продукты по настоящему изобретению могут, таким образом, содержаться в надосадочной жидкости культуры, частично обогащенной, полученной из гетерологичных источников, клонированной или находящейся в составе с основой и др.

Полипептиды могут включать химическую модификацию; термин, который в настоящем контексте обозначает изменение естественной химической структуры аминокислот. Такие модификации можно создать в боковой цепи или в концевом участке, например, изменяя аминоконец или карбоксиконец. При некоторых вариантах осуществления модификации подходят для создания химических групп, которые в целях удобства можно применять для связывания полипептидов с другими материалами или для присоединения терапевтического средства.

Специфическое связывание в силу того, что термин часто применяется в биологических областях, относится к молекуле, которая связывается с мишенью с относительно высокой аффинностью по сравнению с тканями, не являющимися мишенью, и, как правило, включает множество нековалентных взаимодействий, таких как электростатические взаимодействия, ван-дер-ваальсовы взаимодействия, образование водородных связей и др. Взаимодействия при специфическом связывании характеризуют взаимодействия при связывании типа антитело-антиген, связывании типа фермент-субстрат и особенно связывании типа белок-рецептор; вместе с тем такие молекулы время от времени помимо своих мишеней могут связываться с тканями, полагают, что такое связывание не обладает специфичностью и не является специфическим связыванием. Пептид ERY1 и его производные, а также связывающиеся с эритроцитами пептиды человека и их производные при некоторых обстоятельствах могут связываться с объектами, не являющимися эритроцитами, но было замечено, что такое связывание было неспецифическим, доказательством чего является значительно большее связывание пептидов с эритроцитами в отличие от других клеток и белков.

Поэтому варианты осуществления включают лиганд, который специфически связывается с эритроцитом и не специфически связывается с другими компонентами крови, например одним или несколькими из белков крови, альбумина, фибронектина, тромбоцитов, лейкоцитов, практически всех компонентов, обнаруживаемых в образце крови, взятом у обычного человека. В контексте образца крови термин "практически все" обозначает компоненты, которые присутствуют обычно, но исключают случайные компоненты в очень низких концентрациях, поэтому они не существенно снижают титр биодоступных в другом отношении лигандов.

Пептиды антител.

В дополнение к пептидам, которые связываются с эритроцитами, в данном документе также представлены белки, в частности антитела и особенно фрагменты одноцепочечных антител. Хорошо известны методики по индукции выработки антител против антигена. Термин антиген, в этом контексте, относится к сайту, распознаваемому иммунной системой хозяина, которая отвечает на антиген. Выбор антигенов известен в областях по индукции выработки антител, наряду с другими областями. Варианты осуществления включают применение этих пептидов в молекулярной гибридизации и других способах, представленных в данном документе. Антигены могут рекомбинантно экспрессироваться в своей полной форме или в виде частичных доменов, гибридизированных с метками, которые усиливают экспрессию или стабильность белка. Затем антиген рекомбинантного белка можно иммобилизовать на пластине или сфере и применять в качестве аффинной мишени для способа скрининга библиотеки. Антигены также можно выделить из клеточных препаратов цельной крови, из которых очищенные или сложные смеси мембранных белков можно иммобилизовать на твердой матрице (сфере, пластине или др.) и применять в качестве аффинных мишеней для способа скрининга.

Специалисты в данной области, читающие настоящее раскрытие, смогут создать антитела, которые специфически связываются с эритроцитами. Примеры 4-6 имеют отношение к созданию антител или их фрагментов. Для выявления новых антител или фрагментов антител или для создания композиций, со-

державших такие фрагменты, активные в отношении эритроцитов, включая, но без ограничения, фаговый дисплей, дрожжевой дисплей и бактериальный дисплей, применяют многочисленные параллельные методики. Дополнительные связывающиеся с эритроцитами антитела или фрагменты антител или scFv можно, в частности, создать для одной или нескольких из следующих мишеней или групп мишеней (совместно называемых в данном документе как целевая группа эритроцита), выбранных из группы, включающей белок полосы 3 (CD233), аквапорин-1, Glut-1, антиген Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, гликофорин А (CD235a), гликофорин В (CD235b), гликофорин С (CD235c), гликофорин D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARC (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), глобозид, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/нейротелин (CD147), JMН, гликозилтрансферазу, Cartwright, Dombrock, 4A/CAB, Scianna, MER2, стоматин, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 и антиген H (CD173).

Дополнительно можно создавать новые специфичные к эритроцитам антитела с помощью иммунизации мышей интактными или белковыми препаратами эритроцитов человека. После иммунизации мишени, находящейся в составе с адьювантом, мышей умерщвляют в заранее определенные моменты времени, и репертуары их антител секвенируют и/или их В-клетки выделяют для скрининга на основе гибридом. Эти антитела или фрагменты антител можно оптимизировать с помощью ряда упомянутых выше методик *in vitro* с целью улучшения параметров связывания и/или стабильности. Можно создавать дополнительные связывающиеся с эритроцитами антитела или фрагменты антител с помощью гибридных клонов антител с ранее обнаруженной способностью к связыванию с эритроцитами. Их можно создавать, например, с помощью способа, применяемого для создания scFv TER119. В качестве матрицы, или в качестве источника антитела, можно применять следующие гибридные клоны среди прочих: BRIC 4, 5, 6, 10, 14, 18, 39, 66, 68, 69, 87, 108, 110, 111, 125, 126, 128, 145, 155, 157, 163, 170, 198, 203, 216, 220, 221, 222, 229, 230, 231, 235 или 256; BRAC 17, 18; BGRL 1, 2, 11, 100; BRAD 3; BIRMA D6, D10, K3, 84B; 6A7; COE или KZ1.

В данном документе термин "пептид" применяют взаимозаменяемо с термином "полипептид". Антитела и фрагменты антител являются пептидами. Термин "фрагмент антитела" обозначает часть антитела, которая сохраняет антигенсвязывающую функцию антитела. Фрагмент можно буквально создать из части более крупного антитела или, альтернативно, можно синтезировать *de novo*. Фрагменты антител включают, например, одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv). scFv является гибридным белком на основе варибельных участков тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулина, соединенных линкерным пептидом размером, например, от приблизительно 10 до приблизительно 50 аминокислот. Линкер может соединять N-конец VH с C-концом VL или наоборот. Термин "scFv" включает бивалентные scFv, диатела, триатела, тетраатела и другие комбинации фрагментов антител. Антитела имеют антигенсвязывающую часть, обозначаемую как паратоп. Термин "пептидный лиганд" обозначает пептид, который не является частью паратопа.

Связывание эритроцитов с помощью антител и их фрагментов, пептидных связывающих лигандов и аптамеров можно выполнять без ковалентного связывания с эритроцитами. Связывание можно выполнять *in vivo* и без события связывания с эритроцитами *ex vivo*. Такое событие связывания, в том числе получаемую в результате ассоциацию антигена с эритроцитом, можно выполнять, не вызывая апоптоз эритроцитов. Этот процесс можно выполнить так, что поверхностные молекулы эритроцитов не сшиваются друг с другом посредством сшивающего средства и/или события связывания и не сшиваются с помощью ковалентных связей.

Биспецифические белковые конструкторы для связывания антигенов с эритроцитами.

При создании белковых конструкторов для связывания с эритроцитами основным вариантом разработки является создание одного белка или гибридной молекулы, которые содержат как антиген, представляющий интерес, так и связывающийся с эритроцитами фрагмент.

Альтернативной разработкой, которая может быть более эффективной в создании и применении, является биспецифический белок или молекулярный конструктор, который содержит один домен, связывающийся с эритроцитами, гибридный с дополнительным доменом, связывающимся прямо или непрямо с антигеном, представляющим интерес. В эту гибридную молекулу включают не сам антиген, представляющий интерес, а только фрагмент, который прямо или непрямо связывается с антигеном, представляющим интерес. По этой причине требования по модификации или конструированию антигена, представляющего интерес, отсутствуют. Одним примером такой разработки является биспецифическое антитело или фрагмент антитела, причем один домен антитела, специфичный для эритроцитов, подвергнут рекомбинантной гибридизации со вторым доменом антитела, который специфически связывается с биомолекулой, содержащей антиген, представляющий интерес. Внедряют множество различных конструкторов на основе биспецифических антител, включая, без ограничения, тандемные scFv, диатела и тандемные молекулы scFv-IgG (62). Также применяют другие небелковые каркасные структуры, включая полимерные наночастицы или другие поливалентные полимерные конъюгаты, которые сконструированы обладающими двойной специфичностью благодаря тому, что содержат домен, который связывается с антигеном, представляющим интерес, и другой домен, который связывается с эритроцитами.

Аффинные фрагменты биспецифического конструктора могут представлять собой любую комбина-

цию пептидных доменов и/или доменов фрагментов антител. Пептиды, которые связываются с эритроцитами или антигеном белка-мишени, получают с помощью традиционных методик скрининга библиотек пептидов, включая, например, скрининг библиотек пептидов на гранулах или в мультиплексном формате, фаговый дисплей, бактериальный дисплей и дрожжевой дисплей. Специфичность и аффинность сконструированного пептида к своей связываемой мишени характеризуют при помощи стандартных биохимических анализов, например способов на основе ELISA, поверхностного плазмонного резонанса и проточной цитометрии. Антитела или фрагменты антител, которые связываются с эритроцитами или антигенами белков-мишеней, получают с помощью традиционных методик, например способов гибридной селекции, фагового дисплея, дрожжевого дисплея, бактериального дисплея, рибосомного дисплея или способов прямого секвенирования генов антител или протеомного секвенирования с участием иммунизированных животных. Специфичность и аффинность сконструированного антитела или фрагмента антитела к своей связываемой мишени характеризуют при помощи стандартных биохимических анализов, например способов на основе ELISA, поверхностного плазмонного резонанса и проточной цитометрии.

После обнаружения и характеристики каждого аффинного фрагмента (пептида, антитела и/или домена антитела) их гибридизируют с образованием биспецифического молекулярного конструкта с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, таких как сборочная ПЦР или прямой синтез генов, затем гибридный белок экспрессируется у подходящего хозяина. Биспецифические конструкты также создают путем химической конъюгации двух отдельных фрагментов совместно в любой комбинации, считающейся пригодной для биспецифического связывания (пептид-пептид, пептид-фрагмент антитела и др.). Для создания биспецифических антител с применением различных конфигураций из современного уровня техники (1) применяют два домена антитела. Дополнительно для создания стабильных связей между каждым связывающим фрагментом и улучшения гибкости конструкта применяют синтетическую полимерную каркасную структуру (PEG, PPG или другую). Для повышения аффинности связывания с эритроцитом, антигеном белка или обоими вследствие эффектов avidности также применяют разветвленные полимеры.

Характеристику эффективности связывания биспецифического конструкта проводят с помощью стандартных биохимических анализов аффинности связывания *in vitro*, таких как ELISA и поверхностный плазмонный резонанс. Функциональные характеристики биспецифического конструкта *in vivo* демонстрируют с помощью инъекции биспецифического конструкта или биспецифического конструкта и антигена модельным животным, таким как мыши или крысы, с последующим взятием образца крови и тестированием связывания как с эритроцитами, так и с антигенами с помощью аналогичных анализов *in vitro*.

Варианты осуществления включают фармацевтически приемлемую композицию, содержащую связывающийся с эритроцитами фрагмент, соединенный с доменом, который специфически связывается с мишенью. Мишень может включать в себя белок, при этом белок дополнительно содержит толерогенный антиген. Связывающийся с эритроцитами фрагмент может включать в себя пептидный лиганд, антитело, фрагмент антитела, одноцепочечный антигенсвязывающий домен (scFv) или аптамер. Домен можно выбрать из группы, включающей антитело, фрагмент антитела и одноцепочечный антигенсвязывающий домен (scFv), пептидный лиганд и аптамер. Вариантом осуществления является композиция, которая содержит член группы, выбранный из гибридной молекулы, тандемного scFv, диатела и тандемной молекулы scFv-IgG, при этом связывающийся с эритроцитами фрагмент и домен составляют часть указанного члена. Отдельный гибридный белок или кодирующая его нуклеиновая кислота могут содержать связывающийся с эритроцитами домен и другой домен, который связывается с мишенью.

Терапевтическое истощение антиген-специфических антител с помощью связывающихся с эритроцитами антигенов.

Индукция антиген-специфических антител неблагоприятно сказывается на лечении и может приводить к опасным побочным эффектам во время применения методов заместительной белковой терапии, в патогенезе аутоиммунитета и во время лечения биопрепаратами в целом (63-68). Терапевтические вмешательства, способные истощить циркулирующие антиген-специфические антитела в крови, должны оказывать положительное клиническое влияние в том, что истощение таких специфических к лекарственному средству антител способствовало бы дальнейшему лечению этим лекарственным средством при снижении в то же время риска нежелательных иммунологических побочных эффектов, обусловленных комплексами лекарственное средство-антитело. В типичном случае гемофилии А примерно у 30% пациентов происходит индукция антител к стандартному терапевтическому белковому лекарственному средству фактору VIII, что, таким образом, делает дальнейшее лечение фактором VIII опасным и неэффективным.

Терапевтическое вмешательство, истощающее циркулирующие антитела, специфичные к фактору VIII, у такого пациента, снова дает возможность применения схемы лечения фактором VIII и избавляет от необходимости перехода пациента к другим более дорогостоящим и менее эффективным альтернативным методам лечения. В типичном случае системной красной волчанки (SLE, волчанка), аутоиммунного заболевания, опосредованного главным образом индукцией антител к нативным аутоантигенам ор-

ганизма, терапевтическое лечение, способное истощить антитела, специфичные к аутоантигенам, циркулирующим в крови, должно значительно уменьшить патогенез и прогрессирование заболевания после его начала.

Для истощения антиген-специфических антител конструируют антигены для связывания с циркулирующими эритроцитами после введения. Для образования связывающегося с эритроцитами антигена создают молекулярные конструкторы на основе связывающегося с эритроцитами фрагмента, гибридного с антигеном, представляющим интерес. Альтернативно, можно применять биспецифический конструктор для создания связывающегося с эритроцитами состава на основе антигена, описанного выше. Таким образом, при инъекции связывающегося с эритроцитами антигена любое циркулирующее антитело, специфичное к этому антигену, будет связываться с сконструированным антигеном и таким образом будет тесно ассоциированным с циркулирующим эритроцитом *in situ*. При тесной физической ассоциации антиген-специфического антитела и циркулирующей в естественных условиях клетки, такой как эритроцит, опасные воспалительные иммунные эффекты ингибируются регуляторными сигнальными молекулами, присутствующими на поверхности эритроцита. Эритроциты экспрессируют несколько регуляторных молекул на своей поверхности, в том числе, среди прочих, CD55 и CD59 (67). Таким образом, антиген-специфические антитела остаются связанными с эритроцитами и направляются в места естественного выведения эритроцитов, во время чего они также выводятся. Эритроцит, декорированный антигенами, выполняет функцию клеточного хранилища и истощающего носителя для антиген-специфического антитела.

Истощение антиген-специфических антител характеризуют *in vivo* после введения сконструированного антигенного конструктора с помощью периодического взятия крови у подопытных животных и выполнения методик титрования антиген-специфических антител, таких как ELISA. Специфическое истощение или инактивация иммунных клеток, секретирующих антитела (В-клеток, плазматических клеток или других клеток) также характеризуют с помощью выделения иммунных клеток из крови, костного мозга, селезенки или лимфатической системы мышей-реципиентов и выполнения *in vitro* антиген-специфических анализов ELISpot с повторной стимуляцией В-клеток и многопараметрической проточной цитометрии. В исследованиях, связанных с аутоиммунитетом, для характеристики эффектов связывающихся с эритроцитами антигенов в истощении аутоантигена применяются соответствующие мышечные модели аутоиммунных нарушений.

Применение композиций включает удаление антител из кровотока и/или их связывание с красными кровяными клетками. Вариантом осуществления является фармацевтически приемлемая композиция, содержащая связывающийся с эритроцитами фрагмент, соединенный с антигеном. Антиген может быть нативным аутоантигеном, например антигеном системной красной волчанки. Антиген может альтернативно быть антигеном для терапевтического белка, который вводится пациенту, например, антигеном фактора VIII.

Аптамеры для специфического связывания с эритроцитами.

В дополнение к пептидным лигандам, которые связываются с эритроцитами, приводятся нуклеотидные аптамерные лиганды для поверхностных компонентов эритроцитов. Соответственно, аптамеры следует создавать и применять, как описано в данном документе для других связывающихся с эритроцитами фрагментов. ДНК- и РНК-аптамеры можно применять для обеспечения нековалентного связывания с эритроцитами. Поскольку аптамеры состоят только из нуклеотидов, они являются многообещающими молекулами нацеливающимися на биомолекулы, в том смысле, что для них надежно отработана методика скрининга, они легко синтезируются химическим путем и проявляют ограниченные побочные эффекты в виде токсичности и/или иммуногенности благодаря своему быстрому выведению *in vivo* (Keefe, Pai, et al., 2010). Кроме того, благодаря неканонической природе взаимодействия нуклеотид-белок-мишень, любая эффективная сигнализация со стороны агониста при связывании с мишенью *in vivo* маловероятна, что способствует, таким образом, низкой иммуногенности и токсичности. По этой причине в настоящее время в клинических испытаниях с участием людей для ряда клинических показаний, включая лейкоз, макулярную дегенерацию, тромбоз и сахарный диабет 2 типа (Keefe, Pai, et al., 2010), находятся многочисленные молекулы на основе аптамеров. Аптамеры также применялись в качестве нацеливающих средств для доставки нагрузки в виде лекарственных средств в конкретные ткани *in vivo* в таких путях применения, как противоопухолевая химиотерапия или методики флуоресцентной или рентгенологической детекции опухолей (Rockey, Huang, et al., 2011; Savla, Taratula, et al., 2011).

Аптамеры представляют собой олигонуклеиновые кислоты или пептиды, которые связываются со специфической молекулой-мишенью. Аптамеры, как правило, создают для связывания с мишенью, представляющей интерес, путем их отбора из большого пула случайных последовательностей. Аптамеры можно классифицировать как ДНК-аптамеры, РНК-аптамеры или пептидные аптамеры. Аптамеры в виде нуклеиновых кислот являются разновидностями нуклеиновых кислот, которые сконструировали в ходе повторных циклов селекции *in vitro* или с помощью способа систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) (Archemix, Кембридж, Массачусетс, США) (Sampson, 2003) для специфического связывания с мишенями, такими как малые молекулы, белки, нуклеиновые кислоты, клетки, ткани и организмы. Пептидные аптамеры обычно имеют короткий варибельный пептидный до-

мен, прикрепленный обоими концами к белковой каркасной структуре. Пептидные аптамеры являются белками, предназначенными для препятствования взаимодействию других белков в клетках. Они содержат переменную пептидную петлю, прикрепленную обоими концами к белковой каркасной структуре. Это двойное структурное ограничение значительно повышает аффинность связывания пептидного аптамера до значения, сравнимого с таковым для антитела. Длина переменной петли обычно составляет от приблизительно десяти до приблизительно двадцати аминокислот, и каркасная структура является белком, который имеет хорошую растворимость и является компактным. Например, бактериальный белок тиоредоксин А является каркасным белком с переменной петлей, вставленной в восстанавливающий активный центр, которая в белке дикого типа представляет собой петлю -Cys-Gly-Pro-Cys-, при этом две боковые цепи цистеина способны образовывать дисульфидный мостик.

Некоторые методики создания аптамеров подробно описаны в Lu et al., Chem Rev 2009:109(5): 1948-1998, а также в US 7892734, US 7811809, US 2010/0129820, US 2009/0149656, US 2006/0127929 и US 2007/0111222. В примере 8 дополнительно подробно рассматриваются материалы и способы создания и применения аптамеров для применения в вариантах осуществления, раскрытых в данном документе.

Гибридная молекула.

Гибридную молекулу можно создать из первого пептидного связывающегося с эритроцитами лиганда и второго пептида. Гибрид содержит пептиды, конъюгированные прямо или непрямо друг с другом. Пептиды можно конъюгировать друг с другом прямо или непрямо, посредством линкера. Линкером может быть пептид, полимер, аптамер, нуклеиновая кислота или частица. Частицей может быть, например, микрочастица, наночастица, полимерсома, липосома или мицелла. Полимер может быть, например, природным, синтетическим, линейным или разветвленным. Гибридный белок, который содержит первый пептид и второй пептид, является примером гибридной молекулы, содержащей пептиды, при этом гибридный белок содержит пептиды, соединенные друг с другом напрямую или с помощью находящихся между ними линкерных последовательностей и/или дополнительных последовательностей на одном или обоих концах. Конъюгация с линкером может происходить посредством ковалентных связей. Другие связи включают ионные связи. Способы включают создание гибридной молекулы или композиции, содержащей гибридную молекулу, где гибридная молекула содержит пептиды, которые специфически связываются с эритроцитами и терапевтическим средством, толеризирующим антигеном или другим веществом.

Термин "гибридная молекула" или термин "конъюгированный" относится к прямой или непрямо ассоциации с помощью химических связей, включая ковалентные, электростатические ионные, между заряженными частицами. При конъюгации создается единица, поддерживаемая с помощью химического связывания. Прямая конъюгация обозначает химическое связывание со средством при наличии или в отсутствие промежуточных линкеров или химических групп. Непрямая конъюгация обозначает образование химической связи с носителем. Носитель может в значительной мере инкапсулировать средство, например, в случае полимерсомы, липосомы или некоторых видов наночастиц, или содержать средство на своей поверхности, например, в случае металлических наночастиц или гранул, или могут проявляться оба варианта, например, в случае частицы, которая содержит часть средства во внутренней части, а также на внешней части. Носитель также может инкапсулировать антиген для иммунотолерантности. Например, можно создать полимерсому, липосому или частицу, которые инкапсулируют антиген. Термин "инкапсулировать" обозначает полностью покрывать, фактически не оставляя открытой никакую часть, например, можно создать полимерсому, которая инкапсулирует антиген или средство. Примерами терапевтических средств являются одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), фрагменты антител, лекарственные средства на основе малых молекул, биологически активные пептиды, биологически активные белки и биологически активные биомолекулы.

Конъюгацию можно выполнять посредством ковалентного связывания пептида с другой молекулой при наличии или в отсутствие линкера. Создание таких конъюгатов находится в пределах компетенции специалистов в данной области, и известны различные методики для выполнения конъюгации, при этом выбор определенной методики определяется материалами, которые необходимо конъюгировать. Добавляемые к полипептиду (на С- или N-конце) аминокислоты, которые содержат ионизируемые боковые цепи, например аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин, аргинин, цистеин, гистидин или тирозин, и которые не содержатся в активной части последовательности полипептида, служат в своем протонированном состоянии мощными нуклеофилами для включения в различные реакции биоконъюгации с реакционноспособными группами, присоединенными к полимерам, т.е. с гомо- и гетеробифункциональными PEG (например, Lutolf and Hubbell, Biomacromolecules 2003;4:713-22, Hermanson, Bioconjugate Techniques, London. Academic Press Ltd; 1996). В некоторых вариантах осуществления применяется растворимый полимерный линкер, и его можно вводить пациенту в фармацевтически приемлемой форме. В противном случае лекарственное средство можно инкапсулировать в полимерсома или пузырьки или ковалентно присоединить к лиганду.

Вариантом осуществления является конъюгация небелкового терапевтического средства и пептидного лиганда, антитела, фрагмента антитела или аптамера, которые специфически связываются с эритроцитом. Применение методики, основанной на связывающихся с эритроцитами пептидах, не ограничива-

ется полипептидными терапевтическими средствами; наоборот, ее можно переносить на другие лекарственные составы, такие как малые молекулы или полимерные частицы. В ходе продолжительного исследования малых молекул и их применения в медицине короткие периоды полужизни в кровотоке и низкая биодоступность постоянно ослабляли их эффективность *in vivo*. Полимерные мицеллы и наночастицы представляют сравнительно более новое поколение класса лекарственных средств, однако их фармакокинетическое поведение остается субоптимальным по причинам, которые включают высокую скорость выведения в результате работы ретикулоэндотелиальной системы (Moghimi and Szebeni, 2003). Разработки в направлении связывания с эритроцитами можно распространить на эти другие классы лекарственных средств для повышения их периодов полужизни в кровотоке и клинической эффективности.

Конъюгат может содержать частицу. Связывающийся с эритроцитами пептид может присоединяться к этой частице. Антиген, средство или другое вещество может находиться внутри или на поверхности частицы. Примеры наночастиц, мицелл и других частиц находятся, например, в US 2008/0031899, US 2010/0055189, US 2010/0003338, каковые заявки настоящим включены в данный документ посредством ссылки для всех целей, включая их объединение с лигандом, изложенное в данном документе; однако в случае конфликта контрольным документом является настоящее описание.

Наночастицы можно получать в виде наборов частиц, имеющих средний диаметр от приблизительно 10 нм до приблизительно 200 нм, включая все диапазоны и значения между точно обозначенными границами, например от приблизительно 20 до приблизительно 200 и от приблизительно 20 до приблизительно 40, до приблизительно 70 или до приблизительно 100 нм, в зависимости от полидисперсных свойств, достигаемых с помощью препаративного способа. Можно применять различные системы наночастиц, как, например, образованные из сополимеров полиэтиленгликоля и полимолочной кислоты, образованные из сополимеров полиэтиленоксида и поли(β -аминоэфира) и образованные из различных белков, таких как сывороточный альбумин. Специалистам в данных областях известны другие системы наночастиц. Также см. Devalapally et al., *Cancer Chemother Pharmacol*, 07-25-06; Langer et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 257:169-180 (2003); и Tobio et al., *Pharmaceutical Research*, 15(2):270-275 (1998).

Также можно получать более крупные частицы со средним диаметром более чем приблизительно 200 нм, содержащие лиганды, связывающиеся с хрящевой тканью, причем эти частицы называются в данном документе микрочастицами, поскольку их размер начинает приближаться к микронному диапазону и примерно находится в пределах оптического разрешения. Например, некоторые методики создания микрочастиц изложены в патентах США №№ 5227165, 6022564, 6090925 и 6224794.

Функционализация наночастиц для задействования способности к нацеливанию требует ассоциации нацеливающего полипептида и частицы, например, достигаемой путем ковалентного связывания с помощью методики биоконъюгации, при этом выбор конкретной методики определяется частицей, или наночастицей, или другим конструктом, с которым полипептид должен быть соединен. Как правило, многие методики биоконъюгации для присоединения пептидов к другим материалам хорошо известны, и для конкретного материала можно выбрать наиболее подходящую методику. Например, с последовательностями полипептидов могут связываться дополнительные аминокислоты, такие как цистеин в случае присоединения полипептида к тиол-реактивным молекулам.

Для создания мультимерной молекулы, способной представлять несколько других биологически активных молекул, коммерчески доступный дендример PEG с 8 ветвями подвергли химической модификации с целью включения реакционноспособных групп для легкоосуществляемых реакций конъюгации. PEG-пиридилсульфид с 8 ветвями содержал пиридилсульфидную группу, легко реагирующую с тиолатами малых молекул и/или цистеинсодержащих пептидов или белков, приводя к образованию дисульфидной связи между присоединенным биологически активным фрагментом и каркасной структурой на основе PEG с 8 ветвями. Мультимерная конфигурация PEG с 8 ветвями способствовала конъюгации различных пептидов или молекул с каркасной структурой с созданием, таким образом, гетерофункционализированной биомолекулы с несколькими видами активности за счет присоединенных к ней фрагментов. Были созданы гетерофункционализированные флуоресцентные конструкты на основе PEG с 8 ветвями, способные к связыванию эритроцитов *in vitro* (фиг. 4A) и *in vivo* (фиг. 4B). Это связывание являлось специфичным в отношении последовательности пептида ERY1, поскольку конъюгаты, содержащие неспецифический пептид MIS, проявляли связывание с эритроцитами от незначительного до отсутствующего. Связывание *in vivo* было длительным, поскольку флуоресцентный PEG-ERY1-ALEXAFLUOR647 с 8 ветвями выявлялся на циркулирующих эритроцитах спустя 5 ч после внутривенного введения и демонстрировал период полужизни на поверхности клеток, составлявший 2,2 ч (фиг. 5). Для демонстрации индукции толерантности в мышинной модели аутоиммунного диабета создали PEG с 8 ветвями, конъюгированный как с ERY1, так и с антигеном диабета хромогранин А (CrA). Модульная природа каркасной структуры PEG-пиридилсульфид с 8 ветвями позволила производить совместную конъюгацию различных тиолсодержащих молекул с помощью последовательного добавления стехиометрически определенных количеств молекул.

Гибридная молекула может содержать полимер. Полимер может быть разветвленным или линейным. Гибридная молекула может содержать дендример. Как правило, можно применять растворимые гидрофильные биосовместимые полимеры для того, чтобы конъюгат был растворимым и обладал био-

доступностью после введения пациенту. Примерами растворимых полимеров являются поливиниловые спирты, полиэтиленимины и полиэтиленгликоли (термин, включающий полиэтиленоксиды), имеющие молекулярную массу, составляющую по меньшей мере 100, 400 или от 100 до 400000 (при этом подразумеваются все диапазоны и значения в пределах этих четко указанных значений). Растворимость в этом контексте относится к растворимости в воде или физиологическом растворе, составляющей по меньшей мере 1 г/л. Также могут применяться домены биоразлагаемых полимеров, например полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, сополимеров полимолочной и полигликолевой кислот, поликапролактонов, полигидроксимасляной кислоты, сложных полиортоэфиров, полиацеталей, полигидропиранов и полицианоакрилатов.

В некоторых вариантах осуществления получают и вводят в организм ассоциацию полипептид-полимер, например конъюгат, в виде очищенной композиции в фармацевтически приемлемом состоянии или с фармацевтическим наполнителем. Введение может быть, например, системным или происходить в определенном участке ткани или месте трансплантации.

Специалисты в данных областях могут получать гибридные белки с помощью методик, известных в этих областях. Варианты осуществления включают создание гибридных белков, выделение их и введение их в фармацевтически приемлемой форме с другими средствами или без них, например, в комбинации с интерлейкином или TGF- β . Варианты осуществления включают вектор для трансфекции клетки и способы таковой для конструирования, таким образом, клетки с целью создания гибридного белка *in vivo*, при этом клетку трансфицируют *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*, и при этом клетка является частью тканевого имплантата или отличается от него. Следующие заявки на патенты США настоящим включены в данный документ посредством ссылки для всех целей, включая цели создания гибридных белков: 5227293, 5358857, 5885808, 5948639, 5994104, 6512103, 6562347, 6905688, 7175988, 7704943, US 2002/0004037, US 2005/0053579, US 2005/0203022, US 2005/0250936, US 2009/0324538, при этом в случае конфликта контрольным документом является настоящее описание.

Варианты осуществления гибридной молекулы включают, например, гибридную молекулу, которая содержит толерогенный антиген и связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с эритроцитом пациента и, таким образом, связывает антиген эритроцита, где гибридная молекула вводится в количестве, эффективном для выработки иммунотолерантности к веществу, которое содержит толерогенный антиген. Варианты осуществления включают, например, композицию, содержащую связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с эритроцитом, соединенным с носителем, выбранным из группы, включающей полимер, разветвленный полимер и частицу, где носитель соединен с терапевтическим средством. Частицей может быть, например, микрочастица, наночастица, полимерсома, липосома или мицелла. Связывающийся с эритроцитами фрагмент может включать в себя пептид, содержащий по меньшей мере 5 последовательных аминокислотных остатков последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 1 и их консервативные замены, где указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом. Связывающийся с эритроцитами фрагмент может включать в себя антитело, фрагмент антитела, аптамер, scFv или пептидный лиганд. Варианты осуществления гибридной молекулы включают связывающийся с эритроцитами фрагмент и толерогенный антиген, антитело, фрагмент антитела, scFv, лекарственное средство на основе малых молекул, частицу, пептид или аптамер.

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения предлагается гибридная молекула, которая содержит толерогенный антиген и связывающийся с эритроцитами фрагмент, выбранный из белка полосы 3 (CD233), гликофорина В (CD235b), гликофорина С (CD235c) и гликофорина D (CD235d). Гибридная молекула, в частности, применяется при выработке иммунотолерантности. Предпочтительной гибридной молекулой является гибридная молекула, которая содержит толерогенный антиген, выбранный из белка, части белка, белка человека или его части, белка, отличного от белка человека, или его части, гликана, гликана белка, имеющего гликозилирование, отличное от гликозилирования у человека, аутоиммунного антигена человека, белка, являющегося терапевтическим для человека, или его части, а также части пищи человека, белков, для которых характерна недостаточность в связи с генетическим заболеванием, белков с гликозилированием, отличным от гликозилирования у человека, белков, отличных от белков человека, синтетических белков, в естественных условиях не встречающихся у людей, антигенов пищи человека, трансплантационных антигенов человека и аутоиммунных антигенов человека; а также связывающийся с эритроцитами фрагмент, выбранный из белка полосы 3 (CD233), гликофорина В (CD235b), гликофорина С (CD235c), гликофорина D (CD235d).

Связывающиеся с эритроцитами лиганды для улучшения фармакокинетических параметров.

Поскольку многие лекарственные средства системно доставляются в кровеносную систему, решение проблемы эффективной доставки лекарственного средства часто направлено на поддержание лекарственного средства в крови в течение продолжительных периодов времени. Таким образом, в результате разработки терапевтических средств длительного действия (с длительным периодом полужизни), которые остаются биологически доступными в крови в течение продолжительных периодов времени, будет представлено новое поколение лекарственных средств, сконструированных для обеспечения эф-

фективности, безопасности и экономической целесообразности.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают гибридные молекулы на основе связывающегося с эритроцитами пептида и терапевтического средства. Гибридные молекулы из пептидов, которые специфически связываются с эритроцитами, и терапевтического средства или другого вещества обеспечивают увеличение времени циркуляции (периода полужизни в кровотоке *in vivo*) средства/вещества. Это увеличение может представлять собой увеличение периода полужизни в сыворотке, например, от приблизительно 1,5-кратного до 20-кратного, а специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в пределах четко указанных диапазонов, например приблизительно 3-кратное или приблизительно 6-кратное или от приблизительно 3-кратного до приблизительно 6-кратного.

Получение гибридных молекул можно осуществлять, например, путем рекомбинантного добавления пептида или добавления пептида с помощью химической конъюгации к реакционноспособному участку терапевтического средства или соответствующей молекулы или частицы. Поскольку для синтеза большого количества чистых пептидов с различными концевыми реакционноспособными группами можно применять твердофазный синтез пептидов, существует несколько стратегий конъюгации для присоединения пептида к терапевтическому средству. Хотя этот способ функционализации отличается от рекомбинантного способа, применяемого для белков, предполагается, что эффект будет тем же (связывание с эритроцитами, приводящее к увеличению периода полужизни в кровотоке).

Один вариант осуществления настоящего изобретения включает функционализацию терапевтических средств с короткими пептидными лигандами, которые специфически связываются с эритроцитами, как средство улучшения фармакокинетических параметров лекарственных средств. Эта методика увеличения периода полужизни учитывает ключевые параметры разработки лекарственных средств, а именно простоту производства, модульный принцип и способность регулировать эффект увеличения. С помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК белки легко изменяют на уровне аминокислот, чтобы они содержали новые или измененные функциональные группы. Как правило, расчет на применение более коротких доменов пептидов для функционирования является предпочтительным по сравнению с применением более крупных доменов полипептидов по причинам, которые включают простоту производства, правильное сворачивание в функциональный терапевтический белок и минимальные биофизические изменения самого исходного терапевтического средства. Полипептиды, например ERY1, связывающийся с эритроцитами человека лиганд, или антитела, или фрагменты антител можно сконструировать для специфического связывания с эритроцитами и конъюгировать с терапевтическим средством для увеличения биодоступности, например, измеряемой по периоду полужизни средства в кровотоке.

Результаты, описанные в данном документе, предоставляют возможности для создания гибридных молекул с целью улучшения фармакокинетических параметров терапевтических средств, таких как инсулин, ацетат прамлинтида, гормон роста, инсулиноподобный фактор роста 1, эритропоэтин, интерферон типа α -1, интерферон α 2a, интерферон α 2b, интерферон β 1a, интерферон β 1b, интерферон γ -1b, β -глюкоцереброзидаза, аденозиндезаминаза, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин 1, интерлейкин 2, интерлейкин 11, фактор VIIa, фактор VIII, фактор IX, эксенатид, L-аспарагиназа, расбуриказа, рецептор фактора некроза опухоли и энфувиртид.

Попытки других исследователей по созданию пассивных способов улучшения периода полужизни направлены на повышение видимого гидродинамического радиуса лекарственного средства. Аппарат клубочковой фильтрации почек является основным местом в организме, в котором происходит фильтрация компонентов крови. Основным детерминантом фильтрации является гидродинамический радиус молекулы в крови; меньшие молекулы (<80 кДа) отфильтровываются из крови в большей мере, чем более крупные молекулы. Исследователи воспользовались этим обобщенным правилом для модификации лекарственных средств с целью проявления ими большего гидродинамического радиуса и, таким образом, более длительного периода полужизни главным образом посредством химической конъюгации высокомолекулярных водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленгликоль (PEG). Успех этого способа очевиден в связи с тем, что в клинической практике в настоящее время предлагаются многочисленные терапевтические средства на основе пегилированных белков и малых молекул (Pasut and Veronese, 2009; Fishburn, 2008). Будучи эффективными во многих случаях в увеличении периода полужизни в кровотоке, особенно в силу увеличения гидродинамического радиуса имплантата или гибрида (Gao, Liu, et al., 2009), эти способы создают трудности при производстве и поддержании биологической эффекторной функции. Разнородность реакционных смесей для конъюгации может приводить к смешиванию сложных продуктов с различными видами биологической активности главным образом из-за использования химических соединений, не являющихся сайт-специфическими. Для поддержания однородности терапевтического препарата после применения способов тщательной очистки часто следует подробная биохимическая характеристика (Huang, Gough, et al., 2009; Bailon, Palleroni, et al., 2001; Dhalluin, Ross, et al., 2005). Помимо этого, присоединение крупных фрагментов, таких как разветвленные PEG, к реакционноспособным местам белков может привести к снижению аффинности к рецепторам (Fishtmrn, 2008).

В других работах других исследователей предложен терапевтический белок для связывания с аль-

бумином с целью повышения циркуляции лекарственного средства (Dennis, 2002; Walker, Dunlevy, et al., 2010). Учитывая тот же самый общий вышеупомянутый принцип почечной фильтрации, Dennis с коллегами предположили, что повышение видимого размера терапевтического средства с помощью его конструирования для связывания с другим белком в крови (таким как сывороточный альбумин) должно снизить скорость выведения лекарственного средства. Таким образом, лекарственное средство достигает большого молекулярного размера только после введения в кровяное русло. Добавление связывающихся с сывороточным альбумином пептидов, подвергнутых созреванию аффинности, к фрагментам антител повышало их циркуляцию в крови мышей в 24 раза (Dennis, 2002). Будучи эффективным, этот способ осложняется динамикой рециркуляции альбумина с помощью неонатального Fc-рецептора (FcRn) и применением циклических пептидов с ограниченным содержанием цистеина в целях обеспечения функциональных свойств. Walker с коллегами подтвердили результаты, предоставленные Dennis в 2002 г., а именно то, что придание сывороточному альбумину аффинности к белку увеличивает его период полужизни. Способ, описанный Walker с коллегами, включает рекомбинантное добавление крупных фрагментов антител к белковому лекарственному средству, которое может вызвать структурные нарушения, а также осложнения производства. Будучи простыми и эффективными, способы Dennis и Walker осложняются применением сложных циклических или крупных доменов в целях обеспечения функциональных свойств. Хотя пептиды, обнаруженные Dennis с коллегами, проявляли высокую аффинность к альбумину, перед применением они требуют физического ограничения корректно образующейся циклической структуры. Более громоздкий подход, способ гибридизации крупных фрагментов антител по Walker, может не подойти для белков, которые уже свернулись в сложную структуру или характеризуются низким уровнем экспрессии.

Однопочечные антитела.

Вариантом осуществления настоящего изобретения является гибридная молекула на основе scFv и пептида, который специфически связывается с эритроцитом. scFv можно применять в качестве терапевтического средства, а его комбинацию со связывающимся с эритроцитами пептидом можно применять для увеличения его периода полужизни в кровотоке и обеспечения доступа к частям тела. Рекомбинантные антитела и фрагменты рекомбинантных антител перспективны в качестве терапевтических средств в индустрии биопрепаратов (Sheridan, 2010).

Фрагменты антител, представляющие собой однопочечные вариабельные фрагменты (scFv), содержат целый антигенсвязывающий домен IgG полной длины, но в них отсутствуют шарнирные и константные участки фрагментов (Maunard and Georgiou, 2000). Рекомбинантное конструирование scFv включает гибридизацию вариабельного домена тяжелой цепи (V_H) с вариабельным доменом легкой цепи (V_L) с помощью короткого полипептидного линкера, включающего tandemные повторы глицина и серина (например, (GGGGS)₄) (SEQ ID NO: 18). Хотя простота scFv является привлекательной для терапевтических путей применения, их основным недостатком является короткий период полужизни, который они проявляют вследствие их относительно небольшой молекулярной массы в 26-28 кДа (Weisser and Hall, 2009).

Поскольку глицин-сериновый линкер, обычно применяемый в разработке scFv, является нефункциональным по своей природе, а скорее существует в качестве физического мостика для обеспечения правильного сворачивания V_H - V_L , в данном документе тестировали линкерные домены, которые проявляют функцию связывания с эритроцитами в крови. Таким образом, сконструированный scFv может быть многофункциональным и биспецифическим, проявляя аффинность к своему нативному антигену посредством доменов V_H - V_L и аффинность к эритроцитам посредством своего линкерного домена. При связывании с эритроцитами сконструированный scFv будет проявлять более длительный период полужизни в кровотоке, как было показано для другого модельного белка с теми же самыми функциональными свойствами. Фрагмент антитела scFv может иметь линкер, описанный в данном документе, или можно предложить другие линкеры, известные специалистам в данных областях. В альтернативном варианте осуществления предлагается свободная группа цистеина, встроенная в линкерную область scFv, и эта тиоловая группа цистеина применяется для связывания связывающегося с эритроцитами лиганда посредством химической конъюгации.

Разработка конструируемых scFv-фрагментов антител концентрировалась на важности длины линкерного домена, а также на расстоянии до него от связывающегося с эритроцитами пептида. Поскольку вариант дикого типа был разработан и утвержден для связывания антигена с линкером (GGGGS)₄ (SEQ ID NO: 18), последующих мутантов разрабатывали с линкером с минимальной длиной линкера 20 аминокислот. Поскольку линкерный домен может модулировать правильное сворачивание scFv в правильную третичную структуру, были разработаны два мутанта, содержащих ERY1. Мутант REP содержит пептид ERY1 в центре линкерного домена, фланкированный остатками Gly и Ser в соответствующем количестве, необходимом для поддержания исходной длины линкера в 20 аминокислот. В возможном случае, когда гидрофобная природа пептида ERY1 не позволяет выполнить линейное выравнивание, но приводит к кластеризации с образованием более короткого собранного домена, длина линкера REP будет короче и поэтому может препятствовать правильному сворачиванию. По этим причинам был создан мутант INS, содержащий добавленный пептид ERY1 в центре исходного линкерного домена, что удлиняло

линкер до 32 аминокислот. Поскольку пептид ERY1 был обнаружен со свободным N-концом, не было известно, будет ли его присутствие в ограниченной конформации полипептида влиять на связывание с эритроцитами. Для решения вопроса, связанного с этим возможным поведением, был создан вариант scFv посредством химической конъюгации с синтетическим пептидом ERY1, причем N-конец пептида является свободным, а С-конец конъюгирован с scFv.

Таким образом, число связывающихся с эритроцитами пептидов и, следовательно, способность scFv к связыванию с эритроцитами можно стехиометрически регулировать в ходе реакции конъюгации. Соответственно, можно сконструировать scFv, содержащий связывающиеся с эритроцитами пептиды, как показано в данном документе. Варианты осуществления включают scFv, содержащий лиганды, количество которых варьирует в диапазоне от 1 до 20; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных диапазонах, например от 2 до 6.

Варианты осуществления включают scFv, конъюгированный с толерогенным антигеном для создания гибридной молекулы, которая индуцирует толерантность, например, как в примере 6, где подробно описывается формирование толерантности на примере формирования толерантности к OVA, присоединенному к scFv. В примере 6 также подробно описываются материалы и способы создания белковых конструкторов на основе scFv, подвергнутых рекомбинантной гибридизации с эпитопом антигена, подвергаемым иммунному распознаванию. scFv направлен на распознавание эритроцитов. Антигеном является антиген, описанный в данном документе, например толерогенный антиген. Действующие образцы, представленные в данном документе, описывают результаты с помощью мышиных моделей, с использованием scFv TER119 мыши, применяемого в качестве домена антитела в конструктах. TER119 представляет собой антитело, которое связывается с эритроцитами мыши. Домен антитела TER119 можно заменить доменами других антител, например доменами, направленными на эритроциты человека и других животных. Например, домен антитела 10F7 можно применять для создания конструкторов антитело-антиген, способных к связыванию с эритроцитами человека. Дополнительные гибриды на основе scFv TER119 создавали с тремя различными антигенами, как представлено в примере 6, включая иммунодоминантный эпитоп OVA, презентуемый MHC-I, мимотоп 1040-p31 хромогранина А и проинсулин.

В примере 13 описываются другие варианты осуществления созданных scFv, в том числе варианты осуществления для тестирования в животных моделях и варианты осуществления, реактивные для людей. Они включают варианты, относящиеся к белковому уровню: TER119-SIINF EKL, TER119-ChrA и TER119-проинсулин. Также они включают варианты, относящиеся к генетическому уровню: TER119-SIINF EKL, TER119-ChrA, TER119-проинсулин, TER119-уриказу, TER119-InsB9-23, TER119-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 80), TER119-H-2kb, TER119-H-2kd, 10F7-SIINF EKL, 10F7-ChrA, 10F7-проинсулин и 10F7-уриказу.

Связывание эритроцитов с определенными участками, такими как участки сосудистой сети опухоли.

Помимо увеличения периода полужизни лекарственного средства способность сконструированного препарата к связыванию с эритроцитами является применимой в целях селективного связывания с эритроцитами и их локализации в определенном месте в организме. При лечении солидных опухолей можно применять трансартериальную химиоэмболизацию (TACE) для ограничения кровоснабжения опухоли, что, таким образом, препятствует доступу к ней питательных веществ, необходимых для роста. Лечение с помощью TACE включает хирургическое введение полимерных твердых микрочастиц выше источника кровоснабжения опухоли. Поскольку микрочастицы достигают сосудистого ложа опухоли, они оказываются физически захваченными в сети кровеносных сосудов, что, таким образом, создает блокировку кровоснабжения опухоли (Vogl, Naguib, et al., 2009).

Согласно основной идее TACE вариантом осуществления в данном документе является применение аутологических эритроцитов, циркулирующих в крови в качестве естественных микрочастиц для эмболизации опухоли, путем конструирования терапевтического средства, наводящегося на опухоль, содержащего связывающийся с эритроцитами пептид. Таким образом, терапевтическое средство локализуется в сосудистом ложе опухоли и привлекает проходящие эритроциты к связыванию с сосудом, таким образом ограничивая и блокируя поток крови в опухолевой массе. Такое лечение является менее инвазивным, чем классическая TACE: можно просто инъектировать лекарственное средство внутривенно и применять обычные эритроциты, уже находящиеся в крови, в качестве частицы для эмболизации. Термины "связывающийся с опухолью" и "наводящийся на опухоль" относятся к пептиду, который связывается с компонентом, доступным из компартмента-крови сосудистой сети опухоли или на клетках опухоли.

Обнаружение специфических терапевтических средств, наводящихся на опухоли, известно в области исследования рака. Парадигма биологически активного нацеливания на опухоли основана на связывании с белковыми маркерами, специфически экспрессирующимися в окружении опухоли. Они включают, без ограничения, RGD-направленные интегрины, аминокпептидазы А и N, эндосиалин, нуклеолин клеточной поверхности, аннексии-1 клеточной поверхности, рецептор p32/gClq клеточной поверхности, плектин-1 клеточной поверхности, фибронектины EDA и EDB, α -рецептор интерлейкина 11, тенасцин С, эндоглин/CD105, BST-2, галектин-1, VCAM-1, фибрин и рецептор тканевого фактора (Fonsatti, Nicolay, et al., 2010; Dienst, Grunow, et al., 2005; Ruoslahti, Bhatia, et al., 2010; Thijssen, Postel, et al., 2006; Schliemann, Roesli, et al., 2010; Brack, Silacci, et al., 2006; Rybak, Roesli, et al., 2007). Терапевтическое средство, наце-

ленное на любую из этих молекул, может быть вектором для переноса связывающегося с эритроцитами пептида в сосудистую сеть опухоли с вызовом специфической окклюзии.

Вариантом осуществления является первый лиганд, который специфически связывается с эритроцитами, конъюгированный со вторым лигандом, который специфически связывается с раковой клеткой, или сосудистой сетью опухоли, или компонентом сосудистой сети опухоли, таким как белок в субэндотелии (который в опухоли частично подвергается воздействию крови) или белок на поверхности эндотелиальной клетки опухоли. Лиганд может быть частью фармацевтически приемлемой композиции, которую вводят пациенту, например, в кровоток. Лиганды связываются с эритроцитами, и лиганд, наводящийся на опухоль, связывается с участком в или возле опухоли или сосудистой сети опухоли или с раковой клеткой. Эритроциты собираются в целевом участке и блокируют доступ к целевому участку питательных веществ, например, путем эмболизации кровеносного сосуда. С учетом того что эмболизация является механической, определенной на основании физического размера эритроцитов, эмболизация будет мгновенной.

Солидные опухоли сильно зависят от своей системы кровоснабжения, и были разработаны терапевтические средства на основе биомолекул, а также синтетические терапевтические средства для блокирования роста системы кровоснабжения или блокирования потока по системе кровоснабжения. Вариантом осуществления является состав на основе биомолекул или состав на основе биомолекул и наночастиц, который необходимо инъектировать системно для быстрой окклюзии сосудистой сети солидных опухолей в первичной опухоли или в метастазах известной или неизвестной локализации.

Подход с эмболизацией опухоли реализован во многих направлениях, включая применение способов на основе частиц и биомолекул. Частицы из биоматериалов, включая таковые, созданные из поливинилового спирта, имеют диаметр, больший, чем у микрососудистой сети опухоли, например их диаметр составляет 50-500 мкм, и были разработаны для применения в клинической практике при транскатетерной артериальной эмболизации или TACE (Maluccio, Covey, et al., 2008). Параллельный подход включает химиотерапевтические препараты, загруженные внутрь частиц для медленного высвобождения при трансартериальной эмболизации (TACE), применяемой главным образом для лечения гепатоклеточной карциномы (Gadaleta and Ranieri, 2010). В обоих случаях, когда частицы инъектируют в артериальный кровоток, обычно интервенционным радиологом под рентгенографическим контролем, эти частицы могут проникать в сосудистую сеть опухоли и приводить к ее окклюзии, блокируя поток (Maluccio, Covey, et al., 2008). При этих локальных подходах лечению подвергается только опухоль, на которую непосредственно нацелен катетер благодаря своему расположению, а другие опухоли, такие как метастазы известной или неизвестной локализации, остаются нелечеными, поскольку частицы с трудом направляются в сосуды. В последнее время были разработаны подходы с применением биомолекул, например, в которых используются биспецифические антитела, которые распознают как фактор тромбоза, так и маркер сосудистого эндотелия опухоли, отсутствующие в нормальной сосудистой сети. После специфического связывания с сосудистой сетью опухоли антитела накапливаются и вызывают образование кровяных сгустков в сосудах опухоли для их блокирования; этот эффект был индуцирован только тогда, когда антитело направляли в опухоль (Huang, Molema, et al., 1997). Эти подходы с применением биомолекул имеют преимущество нацеливания как на первичные, так и на вторичные опухоли при внутривенных инфузиях в случаях, когда можно выявить специфические характерные признаки сосудов опухоли; однако они имеют недостаток, заключающийся в неспособности к обеспечению мгновенной механической окклюзии в опухоли.

Варианты осуществления настоящего изобретения включают способ эмболизации опухоли пациента, включающий введение композиции пациенту, которая содержит связывающийся с эритроцитами фрагмент, соединенный с нацеливающим фрагментом, в которой нацеливающим фрагментом является антитело, фрагмент антитела или пептид, который направляется к мишени, выбранной из группы, включающей опухоль и микрососудистую сеть опухоли, и в которой связывающийся с эритроцитами фрагмент включает в себя пептид, антитело, фрагмент антитела или аптамер, которые специфически связываются с эритроцитами. Пептидом может являться, например, последовательность, приведенная в данном документе.

Антиген-специфическая иммунологическая толерантность.

Помимо улучшения фармакокинетического поведения терапевтического средства было обнаружено, что аффинность к эритроцитам может применяться в способах создания антиген-специфической толерантности. В примерах изложены ряд действующих и возможных для применения вариантов осуществления. Толерогенез, как показано в данном документе, может приводить к элиминации циркулирующих антител к антигену или уменьшению количества циркулирующих антител к антигену по меньшей мере в 10 раз, т.е. по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 1000 раз или более чем в 10000 раз. Толерогенез может предупредить, излечить заболевание или замедлить его прогрессирование, уменьшить или устранить отторжение трансплантированной ткани или уменьшить или устранить аллергическую реакцию на вещество.

В примерах 3 и 10-12 подробно описано, как формировали толерантность в мышинных животных моделях, предсказывающих поведение у человека. В примере 3 показано формирование толерантности с

помощью тестового антигена (овальбумина), соединенного с пептидным лигандом, который связывается с поверхностью эритроцита. В примерах 10-12 подтверждаются результаты примера 3 и предлагаются дополнительные действующие образцы, показывающие формирование толерантности с помощью овальбумина, присоединенного к scFv, и аспарагиназы, присоединенной к пептидному лиганду. В примере 12 предложен действующий образец, показывающий формирование толерантности, которая обуславливает реверсию преобладающего иммунного отторжения. Соответственно, варианты осуществления включают молекулу-гибрид для толерогенеза, содержащую аспарагиназу, антигенный фрагмент аспарагиназы или антигенный мимотоп аспарагиназы и связывающийся с эритроцитами фрагмент, при этом связывающийся с эритроцитами фрагмент специфически связывается, например, с гликофоорином А или мишенью, выбранной из группы, включающей белок полосы 3, гликофорин В, гликофорин С или другие члены целевой группы эритроцита. Связывающийся с эритроцитами фрагмент можно, например, выбрать из группы, включающей антитела, фрагменты антител, scFv, пептидные лиганды и аптамеры, и/или из группы, включающей ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141, ERY162, ERY19', ERY59', ERY64', ERY123', ERY141' и ERY162' и их консервативные замены. Эти молекулы-гибриды можно применять профилактически перед первым введением аспарагиназы, в течение курса лечения аспарагиназой и/или после курса лечения аспарагиназой. Эти молекулы-гибриды можно применять перед тем, как будет наблюдаться иммунный ответ на лекарственное средство аспарагиназу, или после того, как будет наблюдаться такой ответ.

В примере 3 описан пептид ERY1, который связывается с эритроцитами мыши. Была создана гибридная молекула на основе ERY1 и тестового антигена, овальбумина (OVA). Гибрид специфически связывался с эритроцитами *in vivo* и не связывался с другими молекулами, включая таковые в крови или сосудистой сети. Наблюдали продолжительный период полужизни в кровотоке. Было замечено, что связывание эритроцита с ERY1-OVA приводит к эффективной перекрестной презентации иммунодоминантного эпитопа OVA, презентуемого МНС I (SIINFEKL), с помощью антигенпрезентирующих клеток (APC) и соответствующего примирования реактивных Т-клеток перекрестно-реагирующим антигеном. ERY1-OVA индуцировал пролиферацию гораздо большего количества аннексин-V CD8 Т-клеток, чем OVA, что свидетельствовало об апоптотическом исходе, который в конечном итоге должен привести к клональной делеции. С помощью достоверной модели стимуляции OT-I с выработкой толерантности (Liu, Iyoda, et al., 2002) (фиг. 2) было показано, что ERY1-OVA предупреждает последующие иммунные ответы на опосредованную вакциной антигенную стимуляцию даже с очень сильным адьювантом бактериального происхождения. Внутривенное введение ERY1-OVA приводило к выраженному сокращению популяций CD8+ Т-клеток OT-I в дренирующих лимфатических узлах (фиг. 2; диапазон отображения данных на фиг. 2b) и селезенке по сравнению с мышами, которым вводили немодифицированный OVA перед антигенной стимуляцией с LPS (фиг. 2c), что указывает на делеционную толерантность. Эта эффективная клональная делеция, проявляемая у мышей, которым вводили ERY1-OVA, подтвердила более ранние наблюдения усиленного примирования CD8 Т-клеток OT-I перекрестно-реагирующим антигеном и также показала, что примирование перекрестно-реагирующим антигеном происходило в отсутствие презентации костимулирующих молекул с помощью APC для активации делеционной толерантности. Внутривенное введение ERY1-OVA приводило к снижению уровней OVA-специфического IgG в сыворотке в 39,8 раз спустя 19 дней после первого введения антигена (фиг. 3) по сравнению с мышами, обработанными OVA. Для дальнейшего подтверждения индукции антиген-специфической иммунной толерантности модель стимуляции OT-I с выработкой толерантности объединяли с моделью опухолевого имплантата, экспрессирующего OVA (фиг. 2), с получением положительных результатов. Результаты, подробно представленные в этом примере, показывают, что связывание ERY1-OVA с эритроцитами индуцирует антиген-специфическую иммунную толерантность. Она проявлялась в ответ на стимуляцию с сильным адьювантом, а также на имплантированные клеточные имплантаты, экспрессирующие ксеноантиген.

Кроме этого, толерантности достигали с помощью функциональной инактивации и делеции реактивных CD8+ Т-клеток в процессе взаимодействия с антигеном, присутствующим на циркулирующих эритроцитах, независимо от непосредственной регуляции CD4 Т-клеток. Эти подробные эксперименты с ERY1, связывающимся с эритроцитами мыши пептидом, предсказывают подобные результаты у людей с применением связывающихся с эритроцитами человека пептидов, некоторые из которых рассматриваются в данном документе. Кроме этого, при показанной эффективности пептидных лигандов подобные результаты можно получить с применением конъюгатов с другими связывающимися с эритроцитами лигандами, например антителами, фрагментами антител или аптамерами, когда эти фрагменты связываются с поверхностной молекулой эритроцита, например одним из поверхностных белков или антигенов, приведенных в данном документе.

В примере 10 дополнительно продемонстрировано формирование толерантности к толерогенному антигену с помощью гибридизации толерогенного антигена с scFv, который связывается с эритроцитом, и получение гибридной молекулы в качестве лекарственного препарата для введения пациенту. В примере 10 продемонстрирована индукция толерантности к иммунодоминантному домену OVA, презентуемому МНС-I, который представляет собой пептид SIINFEKL (SEQ ID NO: 3). Этот антиген гибридизиро-

вали с scFv TER-119, который, как известно, связывается с эритроцитами мыши. Пролiferация CD8 T-клеток OT-I, определенная по разбавлению флуоресцентного средства CFSE, измеренному с помощью проточной цитометрии, значительно усиливалась у мышей, которым вводили TER119-SIINFEKL, по сравнению с теми, кому вводили ERY1-OVA или OVA (фиг. 8), что указывало на то, что связывание с эритроцитами повышало примирование антиген-специфических CD8 T-клеток перекрестно-реагирующим антигеном по сравнению с растворимым антигеном SIINFEKL. Также эти данные демонстрируют, что фрагменты антител, предназначенные для связывания с эритроцитами и представления эпитопов для иммунной системы, подвергаются эффективному процессингу иммунными клетками для примирования антиген-специфических T-клеток перекрестно-реагирующим антигеном. Эти результаты по перекрестной презентации и примированию перекрестно-реагирующим антигеном согласуются с другими исследованиями касательно презентации толерогенных антигенов на MHC-I посредством поглощения APC антигена, выделенного из апоптических клеток (Albert 1998, Green 2009). TER119-SIINFEKL и ERY1-OVA индуцировали пролиферацию гораздо большего количества аннексин-V⁺ и PD-1⁺ OT-I CD8⁺ T-клеток, чем OVA (фиг. 13), что указывало на истощение и апоптический исход, которые приводят к клональной делеции. Этот фенотип пролиферирующих CD8⁺ T-клеток согласуется с другими описанными моделями адаптивного переноса OT-I, в которых регулируемое вовлечение рецептора антиген-специфических T-клеток с помощью APC не приводит к индукции воспалительных ответов (Bursch, Rich, et al., 2009).

Как видно из примера 10, была продемонстрирована способность TER119-SIINFEKL и ERY1-OVA к предупреждению последующих иммунных ответов на опосредованную вакциной антигенную стимуляцию даже при стимуляции с очень сильным адьювантом бактериального происхождения. Таким образом, молекулы-гибриды с scFv или пептидным лигандом для связывания с эритроцитами были эффективными в выработке толерантности.

В примере 11 показано, что возможно индуцировать антиген-специфическую иммунную толерантность по отношению к терапевтическим белкам и белкам с терапевтическим потенциалом. Многие терапевтические белки индуцируют иммунные реакции, что делает их клиническое применение опасным и неэффективным. Аспарагиназа является терапевтическим ферментом микробного происхождения, применяемым для лечения острого лимфобластного лейкоза, однако также индуцирует опасные иммунные ответы, которые исключают ее повторное применение. Применяли мышиную модель. Мышам вводили молекулу-гибрид на основе аспарагиназы и связывающегося с эритроцитами фрагмента (пептида ERY1), и их сравнивали с мышами, обработанными лекарственным средством аспарагиназой для клинического применения. Лекарственное средство аспарагиназа приводило, а молекула-гибрид не приводила к выработке антител; в этом тестировании установили, что уровни антител можно применять в качестве меры толерантности. Позже толерантность подтвердили посредством введения молекулы-гибрида мышам с последующим повторным введением лекарственного средства аспарагиназы для клинического применения и наблюдения отсутствия выраженного ответа с выработкой антител даже после очень интенсивной стимуляции с повторным введением доз лекарственного средства. В противоположность мышам, которые получали лекарственное средство, а не молекулу-гибрид, становились иммунореактивными и до опасной степени гиперчувствительными.

В примере 12 показана возможность иммунной реверсии. Мышей, которые были иммунореактивными в отношении белка, обрабатывали для того, чтобы они стали толерантными к белку. Применяли мышиную модель с аспарагиназой из примера 11. Мышей, которые были иммунореактивными в отношении лекарственного средства аспарагиназы, обрабатывали молекулой-гибридом (связывающую аспарагиназу и эритроцит), и они становились толерантными к лекарственному средству аспарагиназе.

В противоположность, в предыдущих сообщениях указывается, что иммунное отторжение формируется посредством прикрепления антигена к поверхности эритроцита для создания, таким образом, вакцины, а согласно другим сообщениям для создания вакцин применяли антигены, инкапсулированные в эритроциты. Например, если антиген инкапсулирован в эритроцит, то благодаря этому создается вакцина (Muga et al., Vaccine 24: 6129-6139 (2006)). В противном случае антигены, конъюгированные с поверхностью эритроцитов, были иммуногенными и предлагались в качестве вакцины (Chiarantini et al., Vaccine 15(3): 276-280 (1997)). В этих литературных источниках показано, что доставка эритроцитов приближает иммунный ответ практически к уровню ответов, получаемых для нормальных вакцин с адьювантами. Другие исследователи сообщали, что размещение внутри эритроцита является необходимым для индукции толерантности, как указано в заявке на патент WO 2011/051346, в которой также изложен ряд способов, с помощью которых изменяют поверхность эритроцита с целью усиления выведения клетками Купфера в печени. В этой же заявке также изложено связывание антител с поверхностными белками эритроцитов, такими как гликофорин А, но с целью создания иммунных комплексов на эритроците для усиления его выведения клетками Купфера.

Варианты осуществления, изложенные в данном документе, предлагают способ выработки иммуно-толерантности, при этом способ включает введение композиции, содержащей гибридную молекулу, которая содержит толерогенный антиген и связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с эритроцитом пациента и, таким образом, связывает антиген эритроцита, где гибридная

молекула вводится в количестве, эффективном для выработки иммунотолерантности к веществу, которое содержит толерогенный антиген. Эритроцит и пациент могут не подвергаться обработкам, которые вызывают другие изменения эритроцитов, и не подвергаться сшиванию с эритроцитами, химической ковалентной конъюгации, покрыванию и другим изменениям, отличным от специфического связывания с пептидом. Гибридная молекула может содержать или иметь в составе связывающийся с эритроцитами фрагмент, напрямую ковалентно связанный с антигеном. Гибридная молекула может содержать связывающийся с эритроцитами фрагмент, присоединенный к частице, которая присоединена к антигену. Частица может включать в себя микрочастицу, наночастицу, липосому, полимерному или мицеллу. Толерогенный антиген может включать в себя часть терапевтического белка, например, фактора крови, вводимого пациенту, страдающему от отсутствия выработки фактора. Варианты осуществления включают примеры, в которых пациент является человеком и толерогенный антиген является белком человека, недостаточность которого, обусловленную генетическими факторами, испытывает пациент; в которых пациент является человеком и толерогенный антиген содержит часть белка, отличного от белка человека; в которых пациент является человеком, и толерогенный антиген включает в себя часть сконструированного терапевтического белка, в естественных условиях не встречающегося у человека; в которых пациент является человеком, и толерогенный антиген включает в себя часть белка, имеющего гликозилирование, отличное от гликозилирования у человека; в которых толерогенный антиген включает в себя часть белка, характерного для аутоиммунного заболевания человека; в которых толерогенный антиген является антигеном аллогенного трансплантата; в которых толерогенный антиген включает в себя часть вещества, выбранного из группы, включающей пищу человека; и/или в которых связывающийся с эритроцитами фрагмент выбран из группы, включающей пептид, антитело и фрагмент антитела. Варианты осуществления включают материалы и способы для толеризации, в которых связывающийся с эритроцитами фрагмент включает в себя пептид, содержащий по меньшей мере 5 последовательных аминокислотных остатков последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 1 и их консервативные замены, где указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом.

Можно выбрать гибридную молекулу для размещения антигена внутри или снаружи эритроцита. Не привязываясь к конкретному механизму действия представляют следующую теорию. У человека ежедневно становятся апоптотическими (эриптотическими) и выводятся приблизительно 1% эритроцитов, что представляет собой большое количество клеток, и их белки подвергаются процессингу таким образом, чтобы поддерживать толерантность к аутоантигенам эритроцитов. Антиген, сконструированный для связывания с эритроцитами посредством применения пептида ERY1 или связывающегося с эритроцитами человека пептида, связывающегося с эритроцитами одноцепочечного антитела или антитела, связывающегося с эритроцитами аптамера или другого связывающегося с эритроцитами средства, может вызывать такой же толерогенный ответ. С учетом того, что существующий в современном уровне техники способ, разработанный Miller с коллегами (см. ранее), является трудоемким в том плане, что требует сбора и введения в реакцию донорских спленоцитов для повторного введения, данный способ нековалентного связывания с эритроцитами обеспечивает более простую альтернативу. Поскольку взаимодействие ERY1 с эритроцитом, или связывающегося с эритроцитами человека пептида с эритроцитом, или другой аффинной биомолекулы (например, одноцепочечного антитела, антитела или аптамера) происходит спонтанно после введения конъюгата или гибрида на основе антигена *in vivo*, сконструированный антиген легко вводят посредством инъекции, и связывание происходит *in situ*.

В некоторых случаях толерогенный антиген получают из белка терапевтического средства, толерантность к которому является желательной.

Примерами являются белковые лекарственные средства дикого типа, например фактор VIII или фактор IX человека, к которым у пациентов не выработалась центральная толерантность в связи с наблюдаемой у них недостаточностью этих белков; или лекарственные средства на основе белков, отличных от белков человека, применяемые у человека. Другими примерами являются белковые лекарственные средства, подвергнутые гликозилированию с образованием форм, отличных от таковых у человека, по производственным причинам или сконструированные белковые лекарственные средства, например, имеющие ненативные последовательности, которые могут вызывать нежелательный иммунный ответ. Примеры толерогенных антигенов, которые являются сконструированными терапевтическими белками, в естественных условиях не встречающимися у людей, включают белки человека с внедренными мутациями, например мутациями с целью улучшения фармакологических характеристик. Примеры толерогенных антигенов, имеющих гликозилирование, отличное от гликозилирования у человека, включают белки, вырабатываемые в клетках дрожжей и насекомых.

Варианты осуществления включают введение белка при некоторой частоте X или дозе Y, а также введение антигена этого белка при меньшей частоте и/или дозе, например при частоте, не превышающей 0,2X, или дозе, не превышающей 0,2Y; специалисты в данной области сразу поймут, что подразумеваются все диапазоны и значения в четко указанных диапазонах, например 0,01 или 0,05X или какой-либо диапазон между ними.

Варианты осуществления включают выбор толерогенного антигена из белков, которые вводят лю-

ням с недостаточностью этого белка. "С недостаточностью" означает, что у пациента, получающего белок, в естественных условиях не вырабатывается белок в достаточном количестве. Кроме этого, белки могут быть белками, недостаточность которых, обусловленную генетическими факторами, испытывает пациент. Такие белки включают, например, антитромбин III, протеин С, фактор VIII, фактор IX, гормон роста, соматотропин, инсулин, ацетат прамлингида, мекасермин (IGF-1), β -глюкоцереброзидазу, α -алглюкозидазу, ларонидазу (α -L-идуронидазу), идурсурфазу (идуронат-2-сульфатазу), галсульфазу, α -агалзидазу (α -галактозидазу), ингибитор α -1-протеиназы и альбумин. Соответственно, варианты осуществления включают молекулу-гибрид для толерогенеза, содержащую связывающийся с эритроцитами фрагмент и по меньшей мере один антиген, антигенный фрагмент или антигенный мимотоп одного или нескольких из этих белков, при этом связывающийся с эритроцитами фрагмент специфически связывается, например, с гликофорином А или мишенью, выбранной из группы, включающей белок полосы 3, гликофорин В, гликофорин С или другие члены целевой группы эритроцита. Связывающийся с эритроцитами фрагмент можно, например, выбрать из группы, включающей антитела, фрагменты антител, scFv, пептидные лиганды и аптамеры.

Варианты осуществления включают выбор толерогенного антигена из терапевтических антител и антителоподобных молекул, в том числе фрагментов антител и гибридных белков на основе антител и других фрагментов. Они включают антитела, отличные от антител человека (такие как мышинные), химерные антитела и гуманизированные антитела. У людей наблюдались иммунные ответы даже на гуманизированные антитела (Getts, 2010). Соответственно, варианты осуществления включают молекулу-гибрид для толерогенеза, содержащую связывающийся с эритроцитами фрагмент и по меньшей мере один антиген, антигенный фрагмент или антигенный мимотоп одного или нескольких из этих белков, при этом связывающийся с эритроцитами фрагмент специфически связывается, например, с гликофорином А или мишенью, выбранной из группы, включающей белок полосы 3, гликофорин В, гликофорин С или другие члены целевой группы эритроцита. Связывающийся с эритроцитами фрагмент можно, например, выбрать из группы, включающей антитела, фрагменты антител, scFv, пептидные лиганды и аптамеры.

Варианты осуществления включают выбор толерогенного антигена из белков, отличных от белков человека. Примеры таких белков включают аденозиндезаминазу, панкреатическую липазу, панкреатическую амилазу, лактазу, ботулинический токсин типа А, ботулинический токсин типа В, коллагеназу, гиалуронидазу, папаин, L-аспарагиназу, расбуриказу, лепирудин, стрептокиназу, анистреплазу (анизоилированный активаторный комплекс стрептокиназы и плазминогена), антитимоцитарный глобулин, поливалентную иммунную сыворотку с Fab-фрагментами против яда змей семейства ямкоголовых, иммунную сыворотку с Fab-фрагментами против дигоксина, L-аргиназу и L-метионазу.

Варианты осуществления включают выбор толерогенного антигена из антигенов аллогенного трансплантата человека. Примерами этих антигенов являются субъединицы различных белков гаплотипа МНС класса I и МНС класса II и минорные антигены групп крови с одноаминокислотными полиморфизмами, в том числе RhCE, Kell, Kidd, Duffy и Ss.

В некоторых случаях толерогенным антигеном является аутоантиген, на который у пациента развился аутоиммунный ответ или может развиться аутоиммунный ответ. Примерами являются проинсулин (сахарный диабет), коллагены (ревматоидный артрит), основной белок миелина (рассеянный склероз).

Например, сахарный диабет 1 типа (T1D) является аутоиммунным заболеванием, при котором Т-клетки, которые распознают белки островковых клеток, освободились от контроля иммунной регуляции и подают иммунной системе сигналы к разрушению ткани поджелудочной железы. Были обнаружены различные белковые антигены, которые являются мишенями для таких диабетогенных Т-клеток, в том числе, среди прочих, инсулин, GAD65, хромогранин А. При лечении или предупреждении T1D будет полезным индуцировать антиген-специфическую иммунную толерантность по отношению к определенным диабетогенным антигенам для функциональной инактивации или удаления диабетогенных клонов Т-клеток. В примере 14 подробно описано, как с помощью молекулы-гибрида, презентующей мимотоп хромогранина А (ChrA) в качестве толерогенного антигена, успешно сформировали толерогенез к ChrA, на основе данных о Т-клетках, определенных в качестве прогностических в других примерах. Соответственно, варианты осуществления включают молекулу-гибрид для толерогенеза, содержащую хромогранин А, антиген или его антигенную часть или его мимотоп, вместе со связывающимся с эритроцитами фрагментом, при этом связывающийся с эритроцитами фрагмент специфически связывается, например, с гликофорином А или мишенью, выбранной из группы, включающей белок полосы 3, гликофорин В, гликофорин С или другие члены целевой группы эритроцита. Связывающийся с эритроцитами фрагмент, можно, например, выбрать из группы, включающей антитела, фрагменты антител, scFv, пептидные лиганды и аптамеры, и/или из группы, включающей ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141, ERY162, ERY19', ERY59', ERY64', ERY123', ERY141', ERY162' и их консервативные замены.

Соответственно, толерантности и/или задержки начала или прогрессирования аутоиммунных заболеваний можно достичь для различных из многих белков, которые являются аутоиммунными белками человека, каковой термин относится к различным аутоиммунным заболеваниям, при которых белок или белки, вызывающие заболевания, известны или могут быть определены посредством стандартного тес-

тирования.

Варианты осуществления включают тестирование пациента для определения аутоиммунного белка и создание антигена для применения в гибридной молекуле и формирования иммунотолерантности к белку. Варианты осуществления включают антиген или выбор антигена из одного или нескольких из следующих белков. При сахарном диабете I типа были определены несколько главных антигенов: инсулин, проинсулин, препроинсулин, декарбоксилаза-65 глутаминовой кислоты (GAD-65), GAD-67, инсулинома-ассоциированный белок 2 (IA-2) и инсулинома-ассоциированный белок 2β (IA-2β); другие антигены включают ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазу H, Imogen 38, GLIMA 38, хромогранин A, HSP-60, карбоксипептидазу E, периферии, переносчик глюкозы 2, панкреатит-ассоциированный белок, экспрессирующийся в гепатокарциноме, кишечнике и поджелудочной железе, S100β, глиофибриллярный кислый белок, ген регенерации II, панкреатический дуоденальный гомеобокс 1, киназу гена миотонической дистрофии, специфичный для островковых клеток белок, родственный каталитической субъединице глюкозо-6-фосфатазы, и рецепторы 1-5, связанные с G-белком ССТ. При аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, включая тиреоидит Хасимото и болезнь Грейвса, главные антигены включают тиреоглобулин (TG), тиреоидную пероксидазу (TPO) и рецептор тиреотропина (TSHR); другие антигены включают натрий-йодный симпортер (NIS) и мегалин. При тиреоид-ассоциированных офтальмопатии и дермопатии, помимо аутоантигенов щитовидной железы, в том числе TSHR, антигеном является рецептор инсулиноподобного фактора роста 1. При гипопаратиреоидизме главным антигеном является кальций-чувствительный рецептор. При болезни Аддисона главные антигены включают 21-гидроксилазу, 17α-гидроксилазу и фермент, расщепляющий боковую цепь холестерина, P450 (P450_{scc}); другие антигены включают рецептор АСТН, P450_{c21} и P450_{c17}. При синдроме истощения яичников главные антигены включают рецептор FSH и стенолазу. При аутоиммунном гипопизите, или аутоиммунном заболевании гипопиза, главные антигены включают специфичный для гипопиза белковый фактор (PGSF) 1a и 2; другим антигеном является йодтирониндейодиназа 2 типа. При рассеянном склерозе главные антигены включают основной белок миелина, миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин и протеолипидный белок. При ревматоидном артрите главным антигеном является коллаген II типа. При аутоиммунном гастрите главным антигеном является H⁺, K⁺-АТФаза. При пернициозной анемии главным антигеном является внутренний фактор Касла. При целиакии главными антигенами являются тканевая трансглутаминаза и глиадин. При витилиго главными антигенами являются тирозиназа и тирозиназа-родственный белок 1 и 2. При миастении гравис главным антигеном является ацетилхолиновый рецептор. При вульгарной пузырчатке и ее вариантах главными антигенами являются десмоглеин 3, 1 и 4; другие антигены включают пемфаксин, десмоколлин, плакоглобин, перплакин, десмоплакины и ацетилхолиновый рецептор. При буллезном пемфигоиде главные антигены включают BP180 и BP230; другие антигены включают плектин и ламинин 5. При герпетиформном дерматите Дюринга главные антигены включают эндомизид и тканевую трансглутаминазу. При приобретенном буллезном эпидермолизе главным антигеном является коллаген VII типа. При системном склерозе главные антигены включают матриксную металлопротеиназу 1 и 3, коллаген-специфический белок теплового шока 47 типа молекулярного шаперона, фибриллин-1 и рецептор PDGF; другие антигены включают Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jo1, NAG-2, центромерные белки, топоизомеразу I, ядрышковые белки, РНК-полимеразу I, II и III, РМ-Slc, фибриллярин и B23. При смешанном заболевании соединительной ткани главным антигеном является UlsnRNP. При синдроме Шегрена главными антигенами являются ядерные антигены SS-A и SS-B; другие антигены включают фодрин, поли(АДФ-рибоза)полимеразу и топоизомеразу. При системной красной волчанке главные антигены включают ядерные белки, включая SS-A, бокс 1 группы высокой подвижности (HMGB1), нуклеосомы, гистоновые белки и двухпочечную ДНК. При синдроме Гудпасчера главные антигены включают белки клубочковой базальной мембраны, включая коллаген IV типа. При ревматической болезни сердца главным антигеном является сердечный миозин. Другие аутоантигены, выявляемые при аутоиммунном полигландулярном синдроме 1 типа, включают декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, гистидиндекарбоксилазу, декарбоксилазу цистеинсульфиновой кислоты, триптофангидроксилазу, тирозингидроксилазу, фенилаланингидроксилазу, цитохромы P450 печени P4501A2 и 2A6, SOX-9, SOX-10, кальций-чувствительный рецепторный белок и интерфероны 1 типа - интерферон альфа, бета и омега. В примере 15 предложено подробное руководство по толерогенезу для таких белков и, в частности, в качестве примера описывается способ для инсулина.

В некоторых случаях толерогенным антигеном является чужеродный антиген, к которому у пациента развился нежелательный иммунный ответ. Примерами являются пищевые антигены. Варианты осуществления включают тестирование пациента для определения чужеродного антигена, создание гибридной молекулы, которая содержит антиген, и лечение пациента для развития иммунотолерантности к антигену или пище. Предложены примеры такой пищи и/или антигенов. Примерами являются из арахиса - конарахин (Ara h 1), аллерген II (Ara h 2), арахисовый агглютинин, конглоутин (Ara h 6); из яблони: основной аллерген/гомолог белка устойчивости к заболеваниям на 31 кДа (Mal d 2), предшественник белка-переносчика липидов (Mal d 3), основной аллерген Mal d 1.03D (Mal d 1); из молока: α-лактальбумин (ALA), лактотрансферрин; из киви: актинидии (Act c 1, Act d 1), фитоцистатин, тауматинподобный белок

(Act d 2), кивеллин (Act d 5); из горчицы: альбумин 2S (Sin a 1), глобулин 11S (Sin a 2), белок-переносчик липидов (Sin a 3), профилин (Sin a 4); из сельдерея: профилин (Ari g 4), высокомолекулярный гликопротеин (Ari g 5); из креветки: аллерген Pen a 1 (Pen a 1), аллерген Pen m 2 (Pen m 2), быстрая изоформа тропомиозина; из пшеницы и/или других злаковых: высокомолекулярный глютенин, низкомолекулярный глютенин, α - и γ -глиадин, гордеин, секалин, авенин; из клубники: основной аллерген клубники Fra a 1-E (Fra a 1), из банана: профилин (Mus xp 1).

Многие белковые лекарственные средства, которые применяются в медицине и ветеринарии, вызывают иммунные ответы, которые создают риски для пациента и ограничивают эффективность лекарственного средства. Они могут возникнуть с белками человека, которые являются сконструированными, с белками человека, применяемыми у пациентов с врожденной недостаточностью выработки этого белка, и с белками, отличными от белков человека. Было бы предпочтительным производить толеризацию реципиента к этим белковым лекарственным средствам перед начальным введением, и было бы предпочтительным производить толеризацию реципиента к этим белковым лекарственным средствам после начального введения и развития иммунного ответа. У пациентов с аутоиммунитетом известен(известны) аутоантиген(ы), к которому(ым) развивается аутоиммунитет. В этих случаях было бы предпочтительным производить толеризацию субъектов, подверженных риску, до развития аутоиммунитета, и было бы предпочтительным производить толеризацию во время или после появления биомолекулярных индикаторов возникающего аутоиммунитета. Например, при сахарном диабете I типа иммунологические индикаторы аутоиммунитета присутствуют до обширного разрушения β -клеток в поджелудочной железе и начала клинических проявлений заболевания, затрагивающих гомеостаз глюкозы. Было бы предпочтительным производить толеризацию субъекта после выявления этих иммунологических индикаторов до начала клинических проявлений заболевания.

В недавней работе под руководством Miller с коллегами было показано, что при ковалентной конъюгации антигена с аллогенными спленоцитами *ex vivo* формируется антиген-специфическая иммунная толерантность в случае внутривенного введения мышам (Godsel, Wang, et al., 2001; Luo, Pothoven, et al., 2008). Способ включает сбор донорских антигенпрезентирующих клеток селезенки и введение их в химическую реакцию согласно схеме реакции сшивания аминов и карбоновых кислот. Методика оказалась эффективной в индукции антиген-специфической толерантности для мышинных моделей рассеянного склероза (Godsel, Wang, et al., 2001), впервые выявленного сахарного диабета I типа (Fife, Guleria, et al., 2006) и аллогенных трансплантатов островковых клеток (Luo, Pothoven, et al., 2008). Хотя точный механизм, ответственный за толерогенный ответ, неизвестен, предполагается, что основное требование включает презентацию антигена без экспрессии костимулирующих молекул на апоптических клетках, соединенных с антигеном (Miller, Turley, et al., 2007). Также рассмотрели инкапсулирование антигенов внутри теней эритроцитов, обрабатывая эритроциты *ex vivo* и повторно их инъецируя, как представлено в WO 2011/051346.

Введение.

Многие варианты осуществления настоящего изобретения, изложенные в данном документе, описывают композиции, которые можно вводить человеку или другому пациенту-животному. Варианты осуществления настоящего изобретения включают, например, гибридные молекулы, гибридные белки, пептидные лиганды, антитела, scFv, которые распознают антигены на эритроцитах, или в опухолях, или в сосудистой сети опухолей, а также их комбинации. Эти композиции можно получить в виде фармацевтически приемлемых композиций и с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями.

Композиции, которые связываются с эритроцитами, могут это делать специфически. Эта специфичность обеспечивает связывание композиций с эритроцитами *in vivo*, а также альтернативные процессы *ex vivo*. Соответственно, можно осуществлять прямую инъекцию композиции в сосудистую сеть пациента. Альтернативой является инъекция в ткань, например, мышечная, дермальная или подкожная, для последующего контакта и захвата эритроцита. Вариантом осуществления настоящего изобретения является способ индукции толерогенеза у пациента, включающий введение пациенту толеризирующего антигена в ассоциации со связывающимся с эритроцитами фрагментом для присоединения, таким образом, антигена к эритроциту *in vivo*; присоединение *in vivo* можно, таким образом, выполнять без обработки эритроцитов *ex vivo*. Этот способ можно выполнять в случае, когда эритроцит не делали апоптическим в результате выполнения способа. Этот способ можно выполнить так, что в нем будет отсутствовать (он не будет включать) воздействие на эритроциты одного или нескольких из сшивающего средства; сшивающего средства, которое сшивает поверхностные молекулы эритроцита; сшивающего средства, содержащего по меньшей мере две функциональные группы; сшивающего средства, которое образует ковалентную связь с эритроцитом; функциональных групп, которые образуют ковалентную связь с эритроцитом; и антигена и/или антигенного вещества, которые ковалентно связываются с эритроцитом. Способ можно выполнять так, что эритроциты и/или антигены не будут содержать 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC; также EDAC или EDCI) и также могут не вступать в какие-либо реакции с карбодиимидом. Этот способ можно выполнять с аутологичными эритроцитами, и в нем могут не быть задействованы аллоген-

ные эритроциты.

Для выполнения вариантов осуществления, описанных в данном документе, можно применять фармацевтически приемлемые носители или наполнители. Наполнитель означает инертное вещество, применяемое в качестве растворителя или основы для терапевтического средства. Фармацевтически приемлемые носители применяют, как правило, с соединением для того, чтобы создать соединение, пригодное для терапии или в качестве препарата. Как правило, для любого вещества фармацевтически приемлемым носителем является материал, который объединяется с веществом для доставки животному. Могут быть необходимыми или желательными стандартные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.д. В некоторых случаях носитель является существенным для доставки, например, для солубилизации нерастворимого соединения в целях доставки в жидком состоянии; буфер - для контроля pH вещества с целью сохранения его активности или растворитель - для предотвращения потери вещества в сосуде для хранения. В других случаях, однако, носитель применяется для удобства, например, жидкость для более удобного введения. Фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в данном документе, можно синтезировать согласно способам, известным специалистам в данных областях. Таким образом, фармацевтически приемлемые композиции характеризуются высокой степенью очистки с избавлением от загрязнителей, являются биологически совместимыми и нетоксичными, пригодными для введения пациенту. В случае применения воды в качестве носителя вода характеризуется высокой степенью очистки и обработана с избавлением от загрязнителей, например эндотоксинов.

Соединения, описанные в данном документе, обычно вводят в смеси с пригодными фармацевтическими растворителями, наполнителями, сухими разбавителями или носителями (называемые в данном документе фармацевтически приемлемым носителем, или носителем), выбранными подходящим образом с учетом предполагаемой формы или введения и в соответствии с традиционной фармацевтической практикой. Таким образом, доставляемое вещество можно получить в форме, пригодной для перорального, ректального, местного введения, внутривенной инъекции, внутрисуставной инъекции или парентерального введения. Носители включают твердые вещества или жидкости, и тип носителя выбирают с учетом применяемого типа введения. В качестве носителей, например, для пилюлей, можно включить пригодные связующие средства, смазывающие средства, разрыхлители, красители, ароматизаторы, антислеживающие средства и средства, способствующие плавлению. Например, активный компонент можно объединять с нетоксичным фармацевтически приемлемым инертным носителем для перорального введения, таким как лактоза, желатин, агар, крахмал, сахароза, глюкоза, метилцеллюлоза, стеарат магния, фосфат дикальция, сульфат кальция, маннит, сорбит и т.д. Соединения можно вводить перорально в твердых лекарственных формах, таких как капсулы, таблетки и порошки, или жидких лекарственных формах, таких как эликсиры, сиропы и суспензии. Активные соединения также можно вводить парентерально, в виде стерильных жидких лекарственных форм. Также можно применять буферы для достижения физиологического pH или осмолярности.

Примеры

Пример 1. Характеристика молекулярной мишени связывания с эритроцитами мыши.

Результат. Для поиска молекулярной мишени для пептида ERY1 применяли методы аффинной хроматографии с помощью биотинилированного растворимого пептида; этот способ выявил гликофорин А (GYPA) в качестве лиганда ERY1 на мембране эритроцита. При инкубации эритроцитов цельной крови с пептидом ERY1, функционализированным биотином и фотоактивированным сшивающим средством, с пептид-биотиновым комплексом был конъюгирован единственный белок с массой 28 кДа, обнаруженный с помощью вестерн-блоттинга с применением стрептавидина. Лизат реакционной смеси тщательно отмывали и очищали с помощью магнитных гранул, покрытых стрептавидином, для обеспечения отсутствия немеченых белков в оставшемся лизате эритроцитов. Как и предполагалось, пептиду с несоответствием не удалось осуществить конъюгацию ни с одним белком эритроцитов. Пептид с несоответствием, PLLTVGMDLWPW (SEQ ID NO: 2), разработали содержащим те же аминокислотные остатки, что и ERY1, и соответствующим его топографии гидрофобности. Сведения, подтверждающие видимый размер взаимодействующего белка, свидетельствовали о несколько меньших по размеру, однократно проходящих через мембрану белках, выступавших в качестве вероятных лигандов, а именно гликофоринах. Вестерн-блоттинг с применением антител к GYPA тех же самых очищенных образцов, полученных из реакции сшивания, подтвердил, что биотинилированный белок-кандидат представлял собой GYPA.

Колокализацию фага ERY1 с GYPA анализировали с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения. GYPA в естественных условиях экспрессируется и представлен в виде части комплекса, содержащего несколько мембранных белков и белков цитоскелета (Mohandas and Gallagher, 2008). Это визуально проявляется при окрашивании GYPA, в соответствии с которым неоднородное мечение было отмечено на периферии экватора клетки. Мечение фага ERY1 обуславливало окрашивание очень близкой топографии. Высокий коэффициент перекрытия 0,97 в анализе колокализации подтвердил вывод о том, что фаг ERY1 и антитело к GYPA связываются с тем же самым белком. Кластеризацию GYPA также наблюдали в эритроцитах, меченных фагом из библиотеки, однако ни связывание фага, ни колокализация не проявились.

Способ. Пептид ERY1 (H_2N -WMVLPWLPGLDGGSGCRG- $CONH_2$) (SEQ ID NO: 19) и пептид с несоответствием (H_2N -PLLVGMDLWPWGGSGCRG- $CONH_2$) (SEQ ID NO: 20) синтезировали с помощью f-мос-стратегии стандартного твердофазного синтеза на смоле TGR. Пептид отделяли от смолы в растворе 95% трифторуксусной кислоты, 2,5% этандитиола, 2,5% воды и осаждали в охлажденном на льду диэтиловом эфире. Очистку проводили в системе для препаративной ВЭЖХ-МС от Waters с помощью колонки с обращенной фазой C18.

ERY1 и пептид с несоответствием конъюгировали с Mts-Atf-биотином (Thermo Scientific), как предложено изготовителем. Вкратце, пептиды растворяли в PBS/DMF и вводили на ночь в реакцию с 1,05 экв. Mts-atf-биотина при температуре 4°C. После отстаивания реакционной смеси с помощью центрифугирования биотинилированный пептид инкубировали с эритроцитами в PBSA-50 в течение 1 ч при 37°C, клетки отмывали дважды в свежем PBS и облучали УФ-лучами с длиной волны 365 нм при комнатной температуре. Клетки лизировали путем обработки ультразвуком и лизат очищали с помощью магнитных гранул, покрытых стрептавидином (Invitrogen). Элюат выливали на SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF, затем выполняли иммуноблоттинг с помощью стрептавидина-HRP (R&D Systems) или антител к GYPA мыши.

Пример 2. Характеристика связывания с эритроцитами человека.

Результат. Для характеристики выбранных пептидов, которые связывались с эритроцитами человека, бактерии, экспонирующие каждый конкретный пептид, подвергали анализам связывания с многочисленными типами клеток. Шесть (ERY19, ERY59, ERY64, ERY123, ERY141 и ERY162) из семи пептидов специфически связывались с эритроцитами человека по сравнению со связыванием с клетками эпителия человека 293T и клетками эндотелия человека HUVEC. Также пептиды связывались с клетками крови человека групп А и В, но не крови мыши, что указывает на то, что эти пептиды были специфичными для крови человека, но не зависели от общих антигенов групп крови. Пептиды синтезировали с помощью f-мос-стратегии стандартного твердофазного синтеза, конъюгировали с наночастицами и анализировали на предмет связывания с конкретными типами клеток, как указано выше. Связывание с поверхностью эритроцитов изучали с помощью как микроскопии, так и проточной цитометрии.

Пример 3. Индукция антиген-специфической иммунной толерантности посредством нековалентного связывания с эритроцитами антигена, конъюгированного с пептидом ERY1, или антигена, конъюгированного с пептидом, связывающимся с эритроцитами человека.

Для получения эффективного и специфического биофизического связывания антигена с эритроцитами применяли пептид из 12 аминокислот (ERY1), описанный с помощью фагового дисплея, для специфического связывания с гликофоринем А мыши (Kontos and Hubbell, 2010). В этом исследовании модельный антиген OVA применяли у линии трансгенных мышей (OT-I), у которых популяция CD8 T-клеток экспрессирует рецептор T-клеток, специфичный для иммунодоминантного SIINFELK пептида OVA (SEQ ID NO: 3), презентруемого MHC I. Пептид ERY1 химически конъюгировали с OVA для создания варианта OVA (ERY1-OVA), который связывается с эритроцитами мыши с высокой аффинностью и специфичностью (фиг. 1a). С помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения были подтверждены более ранние наблюдения касательно связывания ERY1 (Kontos and Hubbell, 2010), а именно локализация на периферии экватора клеточной мембраны без внутриклеточной транслокации белка, конъюгированного с ERY1. Опосредованное ERY1 связывание с гликофоринем А было специфичным для последовательности, поскольку вариант OVA конъюгировался с пептидом с несоответствием (MIS-OVA), содержащим аминокислоты, идентичные таковым ERY1, однако был скремблирован в первичной последовательности, обнаруживая ничтожно малое связывание (фиг. 1b). OVA, конъюгированный только со сшивающей молекулой, применяемой для конъюгирования с пептидом, не проявлял какой-либо измеримой аффинности по отношению к эритроцитам, что свидетельствовало о том, что связывание ERY1-OVA происходило в результате нековалентного взаимодействия между пептидом ERY1 и гликофоринем А на поверхности эритроцита. Также ERY1-OVA связывался с эритроцитами с высокой аффинностью, демонстрируя подобную антителам константу диссоциации (K_d) $6,2 \pm 1,3$ нМ, определенную с помощью измерений равновесного связывания (фиг. 1c).

Связывание ERY1-OVA с циркулирующими эритроцитами подтверждали *in vivo* после внутривенного введения мышам. Образцы цельной крови, взятые через 30 мин после инъекции 150 мкг OVA или ERY1-OVA, подтверждали специфическую способность ERY1-OVA к связыванию с эритроцитами даже в сложной гетерогенной среде крови и сосудистой сети. ERY1-OVA связывался с эритроцитами (CD45⁺), но не с лейкоцитами (CD45⁺), что было сообразно ассоциации с гликофоринем А. Связывание ERY1-OVA было несмещенным по отношению к апоптическому состоянию эритроцитов при сильном связывании с популяциями как аннексин-V⁺, так и с аннексин-V⁻ CD45⁻. Фармакокинетические исследования конъюгата OVA показали, что связывание ERY1-OVA с эритроцитами *in vivo* было стабильным, при этом демонстрировался период полужизни на поверхности эритроцита 17,2 ч. ERY1-OVA оставался связанным с эритроцитами в течение 72 ч после введения; в течение этого временного промежутка у мыши выводилось примерно 13% эритроцитов (Khandelwal and Saxena, 2006). Количественное определение связанного с эритроцитом ERY1-OVA *in vivo* показало сравнительно высокую нагрузку $0,174 \pm 0,005$ нг

OVA на 10^6 эритроцитов.

Для исключения любых возможных физиологических влияний нагрузки OVA на функцию эритроцитов гематологические параметры характеризовали в различные моменты времени после внутривенного введения ERY1-OVA или OVA. Связывание эритроцитов с ERY1-OVA не вызывало никаких обнаружимых различий в гематокрите, объеме эритроцита или содержании гемоглобина в эритроците по сравнению с введением OVA. Эти результаты показывают, что связывание эритроцитов с антигеном, опосредованное гликофоринем А, не изменяло их гематологических параметров.

Для выявления клеточных мишеней связанного с эритроцитами антигена при введении мышам внутривенно инъецировали белок аллофикиоцианин с сильными флуоресцентными свойствами, конъюгированный с ERY1 (ERY1-аллофикиоцианин) или пептидом MIS (MIS-аллофикиоцианин). Анализ популяций DC селезенки по методу проточной цитометрии через 12 и 36 ч после введения показал увеличенный в 9,4 раза захват ERY1-аллофикиоцианина DC MHCII⁺ CD11b⁻ CD11c⁺ по сравнению с MIS-аллофикиоцианином, при этом наблюдался сходный захват ERY1-аллофикиоцианина и MIS-аллофикиоцианина DC MHCII⁺ CD11b⁺ CD11c⁺. Дополнительно было обнаружено, что MHCII⁺ CD8 α ⁺ CD11c⁺ DC селезенки захватывают ERY1-аллофикиоцианин в 3 раза сильнее, чем MIS-аллофикиоцианин, хотя абсолютная величина была значительно ниже, чем для других популяций DC в селезенке. Такое нацеливание антигена на неактивированные и CD8 α ⁺ CD205⁺ DC селезенки могло усилить толерогенный потенциал связывания с эритроцитами, поскольку эти популяции были в значительной степени вовлечены в толерогенез, активированный апоптическими клетками (Ferguson, Choi, et al., 2011; Yamazaki, Dudziak, et al., 2008). В печени также наблюдалось существенное усиление захвата ERY1-аллофикиоцианина гепатоцитами (CD45⁻ MHCII⁺ CD1d⁻; в 78,4 раза) и звездчатыми клетками печени (CD45⁻ MHCII⁺ CD1d⁺; в 60,6 раз) по сравнению с MIS-аллофикиоцианином; обе популяции описывали в качестве антигенпрезентирующих клеток, которые активируют делеционную толерантность CD8⁺ Т-клеток (Holz, Warren, et al., 2010; Ichikawa, Mucida, et al., 2011; Thomson and Knolle, 2010). Примечательно, что такой захват не наблюдался в DC печени (CD45⁺ CD11c⁺) или клетках Купфера (CD45⁺ MHCII⁺ F4/80⁺), которые функционировали в качестве компонентов ретикулоэндотелиальной системы, оказывающей содействие в выведении эритроцитов и частиц, покрытых комплементом. Повышенный захват связанного с эритроцитами антигена толерогенными DC селезенки и популяциями клеток печени свидетельствует о возможности сложного взаимосвязанного механизма антиген-специфической делеции Т-клеток, активированной взаимодействием нелимфоидных клеток печени и канонических клеток селезенки.

Было замечено, что связывание эритроцитов с ERY1-OVA приводит к эффективной перекрестной презентации иммунодоминантного эпитопа OVA, презентуемого MHC I (SIINFEKL) (SEQ ID NO: 3), с помощью APC и соответствующего примирования реактивных Т-клеток перекрестно-реагирующим антигеном. CD8⁺ Т-клетки OT-I, меченные CFSE (CD45.2⁺), адоптивно переносили мышам CD45.1⁺. Пролиферацию CD8⁺ Т-клеток OT-I измеряли в течение 5 дней после внутривенного введения 10 мкг OVA, 10 мкг ERY1-OVA или 10 мкг нерелевантного связывающегося с эритроцитами антигена, ERY1-глутатион-S-трансферазы (ERY1-GST). Пролиферация CD8⁺ Т-клеток OT-I, определенная по разбавлению флуоресцентного средства CFSE, измеренному с помощью проточной цитометрии, значительно усиливалась у мышей, которым вводили ERY1-OVA, по сравнению с теми, кому вводили OVA, что указывало на то, что связывание с эритроцитами повышало примирование антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток перекрестно-реагирующим антигеном по сравнению с растворимым антигеном. Подобные результаты также были получены при введении дозы антигена 1 мкг, меньшей в 10 раз, что указывало на широкий динамический диапазон эффективности пролиферации CD8⁺ Т-клеток OT-I, индуцированной антигеном, связанным с эритроцитом. Результаты по перекрестной презентации и примированию перекрестно-реагирующим антигеном согласуются с другими исследованиями касательно презентации толерогенных антигенов на MHC I посредством поглощения APC антигена, выделенного из апоптических клеток (Albert, Pearce, et al., 1998; Green, Ferguson, et al., 2009).

Для разграничения между Т-клетками, разведенными до функционального эффекторного фенотипа, и разведенными и подвергнутыми делеции Т-клетками анализировали пролиферирующие CD8⁺ Т-клетки OT-I на связывание с аннексином V как отличительный признак апоптоза, а значит и делеции. ERY1-OVA индуцировал пролиферацию гораздо большего количества аннексии V⁺ CD8⁺ Т-клеток OT-I, чем OVA (фиг. 12d), что свидетельствовало об апоптическом исходе, который в конечном итоге должен привести к делеции. Те же самые CD8⁺ Т-клетки OT-I, пролиферация которых была индуцирована введением ERY1-OVA, проявляли фенотип клеток, испытавших контакт с антигеном в дозах как 1, так и 10 мкг, демонстрируя повышенную экспрессию CD44 и пониженную экспрессию CD62L. Этот фенотип пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток согласуется с другими описанными адоптивными моделями переноса OT-I, при которых регулируемое вовлечение рецептора антиген-специфических Т-клеток с помощью APC не приводит к индукции воспалительных ответов (Bursch, Rich, et al., 2009).

С помощью достоверной модели стимуляции OT-I с выработкой толерантности (Liu, Iyoda, et al., 2002) (фиг. 2a) было показано, что ERY1-OVA предупреждает последующие иммунные ответы на опо-

средованную вакциной антигенную стимуляцию даже с очень сильным адьювантом бактериального происхождения.

С целью толеризации мышам $CD45.1^+$ внутривенно вводили 10 мкг OVA или ERY1-OVA спустя 1 и 6 дней после адоптивного переноса $CD8^+$ Т-клеток OT-I. Спустя 9 дополнительных дней, необходимых для обеспечения возможной делеции перенесенных Т-клеток, мышам-реципиентам подвергали стимуляции с помощью внутрикожной инъекции OVA, вводимого с липополисахаридом (LPS) в качестве адьюванта. Характеристика клеток дренирующих лимфатических узлов и селезенки, а также их воспалительные ответы спустя 4 дня после стимуляции позволили определить, имела ли место делеция на самом деле.

Внутривенное введение ERY1-OVA приводило к выраженному сокращению популяций $CD8^+$ Т-клеток OT-I в дренирующих лимфатических узлах (фиг. 2; диапазон отображения данных на фиг. 2b) и селезенке по сравнению с мышами, которым вводили немодифицированный OVA перед антигенной стимуляцией с LPS (фиг. 2c), что указывает на делеционную толерантность. Дренирующие лимфатические узлы мышей, обработанных ERY1-OVA, содержали более чем в 11 раз меньше $CD8^+$ Т-клеток OT-I по сравнению с таковыми у мышей, обработанных OVA, и в 39 раз меньше, чем у мышей из контрольной группы стимуляции, которые не получали внутривенные инъекции антигена; ответы клеток селезенки были сходными. Эта эффективная клональная делеция, проявляемая у мышей, которым вводили ERY1-OVA, подтвердила более ранние наблюдения усиленного примирования $CD8^+$ Т-клеток OT-I перекрестно-реагирующим антигеном и также показала, что примирование перекрестно-реагирующим антигеном происходило в отсутствие презентации костимулирующих молекул с помощью APC для активации делеционной толерантности.

Для дальнейшей оценки иммунного ответа после антигенной стимуляции характеризовали воспалительную природу резидентных клеток лимфатических узлов и селезенки с помощью экспрессии интерферона γ ($IFN\gamma$) $CD8^+$ Т-клетками OT-I (фиг. 2d). После стимуляции с помощью OVA и LPS лимфатические узлы мышей, ранее обработанных ERY1-OVA, содержали в 53 раза меньше клеток, экспрессирующих $IFN\gamma$, по сравнению с таковыми у мышей из контрольной группы стимуляции (ранее не получавших антиген) и более чем в 19 раз меньше клеток, экспрессирующих $IFN\gamma$, по сравнению с таковыми у мышей, ранее обработанных эквивалентной дозой OVA (фиг. 2e), что показывает важность связывания с эритроцитами в толерогенной защите в ответ на стимуляцию; ответы клеток селезенки были сходными. Также при анализе небольшой популяции $CD8^+$ Т-клеток OT-I, присутствующих в лимфатических узлах и селезенке мышей, ранее обработанных ERY1-OVA, меньший процент клеток экспрессировал $IFN\gamma$, что свидетельствовало о клональной инактивации. Также величина уровней общего $IFN\gamma$, вырабатываемого клетками, выделенными из дренирующих лимфатических узлов при повторной стимуляции с помощью SIINFEKL, была значительно снижена у мышей, ранее обработанных ERY1-OVA (фиг. 2f), при этом уровни $IFN\gamma$ при связывании с эритроцитами снижались в 16 раз по сравнению с таковыми в случае введения OVA и более чем в 115 раз по сравнению с таковыми у представителей контрольной группы стимуляции. Следует отметить, что явление подавления также коррелировало с понижением экспрессии интерлейкина-10 (IL-10), поскольку клетки лимфатических узлов мышей, ранее обработанных ERY1-OVA, экспрессировали на 38 и 50% меньше IL-10 по сравнению с мышами, ранее обработанными OVA, и мышами из контрольной группы активации соответственно (фиг. 2g). С учетом того, что обычно регуляторные $CD4^+$ Т-клетки экспрессировали цитокины в рамках коммуникации APC и Т-клеток для ослабления ответов со стороны Th1 (Darrah, Hegde, et al., 2010; Lee and Kim, 2007), экспрессия IL-10 была обязательной для десенсибилизации в ответ на стимуляцию. Подобное снижение экспрессии IL-10 было вовлечено в толерогенез, опосредованный $CD8^+$ Т-клетками (Fife, Guleria, et al., 2006; Ainaboldi, Roth-Walter, et al., 2009; Saint-Lu, Tourdot, et al., 2009). Связывание с эритроцитами также значительно ослабляло гуморальные иммунные ответы на антиген, поскольку мыши, обработанные ERY1-OVA, проявляли в 100 раз меньшие сывороточные титры антиген-специфического IgG по сравнению с мышами, обработанными растворимым OVA (фиг. 2h). Подобное снижение титра OVA-специфического IgG в результате связывания с эритроцитами наблюдалось у мышей C57BL/6 ($CD45.2^+$), не подвергнутых адоптивному переносу. После двух внутривенных введений 1 мкг OVA или ERY1-OVA с промежутком в 7 дней мышам, обработанным ERY1-OVA, проявляли снижение уровня OVA-специфического IgG в сыворотке в 39,8 раз спустя 19 дней после первого введения антигена (фиг. 3). Это видимое снижение в активации В-клеток после связывания эритроцитов антигеном подтверждает текущие гипотезы относительно невозможности презентации антигенов во время индукции толерантности (Miller, Turley, et al., 2007; Green, Ferguson, et al., 2009; Mueller, 2010).

Для дальнейшего подтверждения индукции антиген-специфической иммунной толерантности модель стимуляции OT-I с выработкой толерантности объединяли с моделью опухолевого имплантата, экспрессирующего OVA (фиг. 2i). Подобно предыдущему плану эксперимента производили толеризацию мышей с помощью двух внутривенных введений 10 мкг ERY1-OVA или 10 мкг OVA после адоптивного переноса $CD8^+$ Т-клеток OT-I. Выраженную делецию Т-клеток выявили спустя 5 дней после первого введения антигенов, поскольку кровь мышей, которым инъецировали ERY1-OVA, содержала в 2,9 раз

меньше непродлиферирующих (поколение 0) CD8⁺ Т-клеток OT-I (фиг. 2j). Для определения функциональной реактивности пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток OT-I в отсутствие сильного экзогенно вводимого адьюванта клетки тимомы EL-4, экспрессирующие OVA (E.G7-OVA), инъецировали внутривенно в кожу спины мышей через 9 дней после адоптивного переноса. Для оценки толерогенной эффективности связывающегося с эритроцитами антигена мышей-опухоленосителей стимулировали с помощью OVA с адьювантом LPS спустя 6 дней после имплантации опухоли аналогично модели стимуляции с выработкой толерантности по дозе и схеме введения. У мышей, обработанных ERY1-OVA, постоянно наблюдался устойчивый рост опухолей по сравнению с мышами, обработанными OVA, или необработанными контрольными мышами вплоть до 8 дня после имплантации опухоли (фиг. 2к), что подтверждало то, что пролиферация CD8⁺ Т-клеток OT-I, активированная ERY1-OVA, индуцировала функциональную иммунную ареактивность в отношении OVA. То, что размер опухоли приостанавливался с достижением стабильного состояния через 8 дней после имплантации, может свидетельствовать о том, что оставшиеся CD8⁺ Т-клетки OT-I должны были еще подвергнуться выработке делеционной толерантности, активированной ERY1-OVA.

Животные.

Все процедуры с животными ранее были одобрены ветеринарными учреждениями Швейцарии. В исследованиях по связыванию *in vivo* и в качестве носителей опухоли из E.G7-OVA применяли 8-12-недельных самок мышей C57BL/6 (Charles River). Мышей линии C57BL/6-Tg(TcraTcrb) 1100Mjb (OT-I) (Jackson Labs) разводили в условиях вивария EPFL, и самок в возрасте 6-12 недель использовали для выделения спленцитов.

Самок мышей линии B6.SJL-Ptprc^aPepc^b/Boy (CD45.1) (Charles River) в возрасте 8-12 недель применяли в качестве носителей-реципиентов для адоптивного переноса CD8⁺ Т-клеток OT-I и исследований по индукции толерантности.

Разработка и синтез пептидов.

Пептид ERY1 (H₂N-WMVLPWLPGLDGGSGCRG-CONH₂) (SEQ ID NO: 19) и пептид с несоответствием (H₂N-PLLVGMDLWPWGGSGCRG-CONH₂) (SEQ ID NO: 20) синтезировали с помощью f-мос-стратегии стандартного твердофазного синтеза на смоле TGR (Nova Biochem) в автоматизированной системе регулируемой подачи жидкостей (CHEMSPEED). Подчеркнутая последовательность представляет собой последовательность ERY1 из 12 мономеров, ранее описанную с помощью фагового дисплея как участок связывания с гликофоринном А мыши (Kontos and Hubbell, 2010). Область GGSG выполняла роль линкера для цистеинового остатка, применяемого для конъюгации; фланкирующий аргининовый остаток способствовал понижению рКа и, таким образом, увеличению реакционной способности цистеинового остатка (Lutolf, Tirelli, et al., 2001). Пептид отделяли от смолы в течение 3 ч в растворе 95% трифторуксусной кислоты, 2,5% этандитиола, 2,5% воды и осаждали в охлажденном на льду диэтиловом эфире. Очистку проводили в системе для препаративной ВЭЖХ-МС (Waters) с помощью колонки с обращенной фазой C18 (Perspective Biosystems).

Конъюгация ERY1 и антигена.

10 мол. экв. сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC, CAS № 64987-85-5, Thermo Scientific), растворенного в диметилформамиде, вводили в реакцию с 5 мг/мл OVA, не содержащим эндотоксинов (<1 МЕ/мг) (Hyglos GmbH), в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. После обессоливания на спин-колонке для обессоливания ZEBA на 2 мл (Thermo Scientific) добавляли 10 экв. пептида ERY1 или MIS, растворенного в 3М гуанидине-HCl, и предоставляли возможность протекания реакции в течение 2 ч при комнатной температуре. Конъюгат обессоливали с помощью спин-колонки для обессоливания ZEBA на 2 мл, 0,2 мкл фильтровали в стерильных условиях, распределяли в рабочие аликвоты и хранили при -20°C. Концентрацию белка определяли с помощью BCA-анализа (Thermo Scientific). Реализация этой схемы приводила к конъюгации боковой цепи цистеина пептида с боковыми цепями лизина антигена. Глутатион-S-трансферазу (GST) экспрессировали в BL21 *Escherichia coli* и очищали с помощью стандартной аффинной хроматографии с применением глутатиона. Удаление эндотоксина непосредственно на колонке проводили путем тщательного отмывания с помощью Triton-X114 (Sigma Aldrich), и удаление эндотоксина подтверждали с помощью клеток THP-1X Blue (InvivoGen). Ту же самую процедуру реакции применяли для конъюгирования ERY1 с GST. Аллофикоцианин, активированный малеимидом (Innova Biosciences), растворяли в PBS и конъюгировали с ERY1 или MIS, как описано ранее.

Микроскопическое исследование связывания с эритроцитами.

5×10⁵ свежeweделенных эритроцитов мыши подвергали воздействию 100 нМ ERY1-OVA или OVA в PBS, содержащем 10 мг/мл BSA, в течение 1 ч при температуре 37°C. После центрифугирования и отмывания клетки метили антителами козы к гликофорину А мыши (Santa Cruz) в разведении 1:200 и антителами кролика к OVA (AbD SEROTEC) в течение 20 мин на льду. После центрифугирования и отмывания клетки метили антителами ALEXAFLUOR488 к IgG козы в разведении 1:200 (Invitrogen) и антителами AlexaFluor546 к IgG кролика (Invitrogen) в течение 20 мин на льду. После заключительного цикла центрифугирования/отмывания клетки фиксировали с помещением в заливочную среду и визуализиро-

вали с помощью инвертированного конфокального микроскопа Zeiss LSM700 с иммерсионным объективом с увеличением 63×. Анализ изображения проводили в IMAGEJ (NIH) при одинаковой обработке обоих изображений.

Связывание и биораспределение *in vivo*.

150 мкг ERY1-OVA или OVA в 0,9% физиологическом растворе (B. Braun) в объеме 100 мкл инъецировали внутривенно в хвост 8-12-недельным самкам мышей линии C57BL/6, подвергнутых анестезии изофлураном. Во время эксперимента следили за тем, чтобы мыши содержались при температуре 37°C, применяя электрогрелку. В заранее определенные моменты времени из небольшого надреза в хвосте брали 5 мкл крови, разбавляли в 100 раз в 10 мМ ЭДТА в PBS, отмывали трижды с помощью PBS с 10 мкг/мл BSA и анализировали на содержание OVA с помощью проточной цитометрии и ELISA. OVA количественно определяли с помощью сэндвич-ELISA, используя моноклональное антитело мыши к OVA (Sigma) для захвата, поликлональное антитело кролика к OVA (AbD SEROTEC) для детекции, антитело козы к IgG кролика, конъюгированное с HRP (BioRad), для заключительной детекции с последующим применением субстрата TMB (GE Life Sciences). Гематологическую характеристику проводили в системе гематологического анализа ADVIVA 2120 (Siemens). Связанный с эритроцитами ERY1-GST выявляли с помощью инкубации меченых клеток с антителом козы к GST (GE Healthcare Life Sciences) с последующей инкубацией с антителом осла AlexaFluor488 к антигену козы (Invitrogen) и анализировали с помощью проточной цитометрии. Для исследований биораспределения 20 мкг ERY1-APC или MIS-APC инъецировали внутривенно в хвостовую вену 8-10-недельных самок мышей линии C57BL/6, как описано ранее. Мышей умерщвляли в заранее определенные моменты времени и удаляли селезенку, кровь и печень. Каждый орган подвергали расщеплению с помощью коллагеназы D (Roche) и гомогенизировали с получением суспензии отдельных клеток для окрашивания с целью проведения проточной цитометрии.

Адоптивный перенос Т-клеток.

CD8⁺ Т-клетки из селезенки мышей OT-I (CD45.2⁺) выделяли с помощью набора магнитных гранул для отрицательной селекции CD8⁺ (Miltenyi Biotec) согласно инструкциям изготовителя. Свежевыделенные CD8⁺ клетки OT-I ресуспендировали в PBS и метили 1 мкМ карбоксифлуоресцинсукцинимидиловым эфиром (CFSE, Invitrogen) в течение 6 мин при комнатной температуре, а реакцию смесь гасили в течение 1 мин равным объемом IMDM с 10% FBS (Gibco). Перед инъекцией клетки отмывали, подсчитывали и ресуспендировали в чистой IMDM. 3×10⁶ CD8⁺ клеток OT-I, меченных CFSE, инъецировали внутривенно в хвостовую вену мышам-реципиентов CD45.1⁺. Для кратковременных исследований пролиферации 10 мкг ERY1-OVA или OVA в объеме 100 мкл инъецировали спустя 24 ч после адоптивного переноса. Спленоциты собирали спустя 5 дней после введения антигена и окрашивали для анализа с помощью проточной цитометрии.

Модель толерантности и стимуляции OT-I.

3×10⁵ CD8⁺ Т-клеток OT-I, меченных CFSE, инъецировали мышам-реципиентам CD45.1⁺, как описано ранее. Спустя 1 и 6 дней после адоптивного переноса мышам внутривенно вводили 10 мкг ERY1-OVA или OVA в 100 мкл физиологического раствора в хвостовую вену. Спустя 15 дней после адоптивного переноса мышам подвергали стимуляции с помощью 5 мкг OVA и 25 нг ультрачистого LPS *Escherichia coli* (InvivoGen) путем внутрикожного введения 25 мкл в подушечки обеих задних лап (способ Носк, общая доза 10 мкг OVA и 50 нг LPS). Мышей умерщвляли через 4 дня после активации и клетки селезенки и дренирующих лимфатических узлов выделяли для повторной стимуляции. Для анализа внутриклеточного цитокина с помощью проточной цитометрии клетки повторно стимулировали в присутствии 1 мкг/мл OVA или 1 мкг/мл пептида SIINFEKL (SEQ ID NO:3) (Genscript) в течение 3 ч. Добавляли брэфелдин А (Sigma, 5 мкг/мл) и повторную стимуляцию продолжали в течение дополнительных 3 ч перед окрашиванием и анализом с помощью проточной цитометрии. Для измерения выделяемых факторов посредством ELISA клетки повторно стимулировали в присутствии 100 мкг/мл OVA или 1 мкг/мл пептида SIINFEKL (SEQ ID NO: 3) в течение 4 дней. Клетки центрифугировали и среду собирали для ELISA-анализа с помощью наборов Ready-Set-Go для IFN γ и IL-10 (eBiosciences) согласно инструкциям изготовителя. IgG сыворотки, специфичной для OVA, выявляли с помощью инкубации сыворотки мыши в различных разведениях на планшетах, покрытых OVA, с последующей заключительной инкубацией с антителом козы к IgG мыши, конъюгированным с HRP (Southern Biotech).

Модель толерантности OT-I, индуцированной E.G7-OVA.

1×10⁶ CD8⁺ Т-клеток OT-I, меченных CFSE, инъецировали 8-12-недельным самкам мышей линии C57BL/6, как описано ранее. Спустя 1 и 6 дней после адоптивного переноса мышам внутривенно вводили 10 мкг ERY1-OVA или 10 мкг OVA в 100 мкл физиологического раствора в хвостовую вену. Спустя 5 дней после адоптивного переноса забирали кровь для характеристики пролиферации CD8⁺ Т-клеток OT-I с помощью проточной цитометрии. Клетки тимомы EL-4, экспрессирующие OVA (E.G7-OVA, ATCC CRL-2113), культивировали согласно рекомендациям ATCC. Вкратце, клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия, 0,05 мМ β -меркаптоэтанол, 1% пуромидина/стрептомицина (Invitrogen Gibco) и 0,4 мг/мл G418 (PAA Laboratories). Непосредственно перед инъекцией клетки разводили в среде без G418 и ресуспендировали в

HBSS (Gibco) непосредственно после сбора. Спустя 9 дней после адоптивного переноса мышей подвергали анестезии изофлураном, область спины брили, и 1×10^6 клеток E.G7-OVA инъецировали внутривенно между лопатками. Спустя 4 дня после имплантации E.G7-OVA каждые 24 ч измеряли размеры опухоли с помощью цифрового штангенциркуля, объем опухоли рассчитывали по формуле для эллипсоида ($V = (\pi/6) l \cdot w \cdot h$, где V - объем, l - длина, w - ширина и h - высота опухоли). Спустя 15 дней после адоптивного переноса мышей подвергали стимуляции с помощью 5 мкг OVA и 25 нг ультрачистого LPS *Escherichia coli* (InvivoGen) путем внутривенного введения 25 мкл в подушечки обеих передних лап (общая доза 10 мкг OVA и 50 нг LPS).

Антитела и проточная цитометрия.

Для проточной цитометрии применяли следующие антитела к антигенам мыши: Pacific Blue к CD1d, PerCP-Cy5.5 к CD3ε, PE-Cy7 к CD8α, PE-Cy7 к CD11b, Pacific Blue к CD11c, биотинилированное к CD45, Pacific Blue к CD45.2, Pacific Blue к CD45, конъюгированное с APC к IFNγ, APC-eF780 к CD8α, PE-Cy5.5 к CD44, PE к CD62L, PE-Cy7 к CD205, PE к F4/80, FITC к I-A/I-E из МНСII (все от eBioscience), в дополнение к красителю для фиксации живых/мертвых клеток (Invitrogen), набору для мечения аннексина-V-Cy5 (BioVision), стрептавидину Pacific Orange (Invitrogen) и антителу к OVA-FITC (Abeam). Образцы анализировали на проточном цитометре CyAn ADP (Beckman Coulter). Сначала клетки отмывали с помощью PBS, окрашивали в течение 20 мин на льду красителем для живых/мертвых клеток, блокировали в течение 20 мин на льду в гибридной среде 24G2, подвергали поверхностному окрашиванию в течение 20 мин на льду, фиксировали в 2% параформальдегиде в течение 20 мин на льду, подвергали внутривенному окрашиванию в присутствии 0,5% сапонина в течение 45 мин на льду с последующей заключительной отмывкой перед анализом. Для окрашивания апоптических клеток за 5 мин до анализа добавляли аннексина-V-Cy5. Для окрашивания CD45 клетки окрашивали стрептавидином Pacific Orange в течение 20 мин на льду, отмывали и анализировали.

Применение с частицами.

Пептид ERY1 также применяли для толерогенеза в форме наночастиц, с которыми были конъюгированы как пептид ERY1, так и толерогенный антиген.

Для образования конъюгатов ERY1 с полимерной наночастицей, которая также конъюгирована с пептидным или белковым антигеном, стехиометрические количества каждого компонента можно добавлять последовательно с целью контроля преобразований в ходе конъюгации. Для образования наночастицы, конъюгированной как с OVA, так и с ERY1 или с пептидом с несоответствием, пептиды сначала растворяли в водном 3М гуанидине-HCl, и 0,5 экв. добавляли к наночастицам, содержащим пиридилсульфидную тиол-реактивную группу. Измерение абсорбции проводили при 343 нм для наблюдения за преобразованиями в ходе реакции, поскольку в ходе реакции образуются неактивные пиридин-2-тионовые соединения с высокой абсорбцией при этой длине волны. Через 2 ч в условиях комнатной температуры абсорбция при 343 нм стабилизировалась, и OVA растворяли в водном 3М гуанидине-HCl, добавляли к раствору наночастиц в 2-кратном молярном избытке. Через 2 ч в условиях комнатной температуры абсорбция при 343 нм снова стабилизировалась до более высокого значения, и в растворе рассчитывали концентрации как пептида, так и OVA. Бифункционализированные наночастицы очищали от непрореагировавших компонентов с помощью фильтрации в геле на колонке, наполненной сефарозой CL6B. Каждые 0,5 мл фракции анализировали на наличие белка и/или пептида с помощью флуорескамина, размер наночастиц оценивали с помощью динамического светорассеяния (DLS).

В случае, если антиген не содержит никаких свободных тиоловых групп для вступления в такую реакцию, их можно вводить с помощью технологий рекомбинантной ДНК для создания мутанта, который можно было бы затем экспрессировать и очищать рекомбинантным путем. Альтернативно, можно выполнять сшивание амина и карбоновой кислоты между наночастицей и антигеном с помощью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC).

Для образования конъюгатов ERY1 с полимерной мицеллой, которая также конъюгирована с пептидным или белковым антигеном, следует применять подобные реакции, описанные для полимерных наночастиц. Мицеллу следует создавать таким образом, чтобы она содержала функциональные группы, желательные для соответствующей схемы конъюгации. Учитывая, что наночастицы и мицеллы можно синтезировать так, что они будут содержать множество различных функциональных химических групп, имеются различные возможные схемы конъюгации для применения в создании комплекса наночастицы/мицелла-антиген-ERY1.

Пример 4. Разработка антител и фрагментов антител, которые связываются с эритроцитами мыши и/или человека.

Для индукции антиген-специфической иммунной толерантности в качестве другого способа нековалентного связывания эритроцитов также можно применять связывающееся с эритроцитами антитело. Антитела, проявляющие высокую аффинность к поверхностным белкам эритроцитов, можно выделять с помощью скрининга библиотек антител с помощью известных в данной области платформ дисплеев, включая, но без ограничения, бактериофаговый дисплей, дрожжевой дисплей и поверхностный дисплей *E. coli*. При обнаружении нового связывающегося с эритроцитами антитела можно выполнить биохими-

ческую характеристику связывания, подобную той, которая была проведена для пептида ERY1. Для создания мутантов с повышенной аффинностью с улучшенными характеристиками связывания проводят созревание аффинности для фрагментов антител, у которых при начальном скрининге библиотеки была обнаружена способность к связыванию с эритроцитами. С помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, таких как ПЦР с внесением ошибок и сайт-направленный мутагенез, создают новую библиотеку из родительской связывающей последовательности. Библиотека фрагментов антител, подвергнутых созреванию аффинности, представляется в дальнейшем с помощью известных в данной области платформ дисплеев, как описано ранее для других фрагментов антител с усиленной аффинностью к эритроцитам по сравнению с родительской связывающей последовательностью.

Созревание аффинности также выполняют для существующих антител, которые связываются с эритроцитами мыши или эритроцитами человека. Моноклональное антитело клона TER-119 крысы (Kina et al., Вг. J. Haematol, 2000) связывается с эритроцитами мыши в еще не полностью изученном сайте, в то же время его специфичность привела к его широкому применению при удалении эритроцитов из гетерогенных популяций клеток. Для обнаружения новых антител с повышенной аффинностью к эритроцитам мыши созревание аффинности проводят с антителом TER-119 в качестве антитела полной длины либо фрагмента антитела, такого как scFv. Моноклональное антитело клона 10F7 мыши (Langlois et al., J. Immunol, 1984) связывается с гликофорином А человека на поверхности клетки - эритроцита человека. Для обнаружения новых антител с повышенной аффинностью к эритроцитам человека созревание аффинности проводят с антителом 10F7 в качестве антитела полной длины либо фрагмента антитела, такого как scFv.

Для определения первичной последовательности антитела TER-119 была клонирована выделенная кДНК, специфичная для антитела, из гибридомы TER-119 в плазмиду с созданием возможности простого секвенирования фрагментов гена. В способе ПЦР-амплификации генов антитела применяли определенный набор праймеров, который способствует амплификации многочисленных варибельных доменов генных сегментов (Krebber et al., 1997; Reddy et al., 2010).

Последовательность ДНК доменов антитела позволила определить варибельные участки тяжелой и легкой цепей антитела IgG TER-119. Для конструирования варианта scFv IgG TER-119 применяли сборочную ПЦР с целью создания гена, кодирующего фрагмент, содержащий варибельный участок тяжелой цепи TER-119 с расположенным за ним линкером (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄ (SEQ ID NO: 18), за которым располагается варибельный участок легкой цепи TER-119.

Для создания комплементарной ДНК (кДНК) клона выполняли стандартную ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) на мРНК, выделенной из гибридного клона TER-119 с помощью системы синтеза первой цепи Superscript III (Invitrogen). Затем проводили ПЦР с помощью следующего набора праймеров для специфической амплификации последовательностей ДНК, соответствующих варибельным участкам тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи антитела.

Название праймера	Последовательность праймера (от 5' к 3')	SEQ ID NO
VL-FOR1	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C	SEQ ID NO:21
VL-FOR2	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C	SEQ ID NO:22
VL-FOR3	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C	SEQ ID NO:23
VL-FOR4	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C	SEQ ID NO:24
VL-FOR5	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C	SEQ ID NO:25
VL-FOR6	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C	SEQ ID NO:26
VL-FOR7	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C	SEQ ID NO:27
VL-FOR8	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C	SEQ ID NO:28

035931

VL-FOR9	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C	SEQ ID NO:29
VL-FOR10	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C	SEQ ID NO:30
VL-FOR11	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART C	SEQ ID NO:31
VL-FOR12	AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C	SEQ ID NO:32
VL-FOR13	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C	SEQ ID NO:33
VL-FOR14	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A	SEQ ID NO:34
VL-FOR15	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC AGWT	SEQ ID NO:35
VL-FOR16	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C	SEQ ID NO:36
VL-FOR17	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C	SEQ ID NO:37
VL-FOR18	AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG AATC	SEQ ID NO:38
VL-REV1	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTG ATT TCC AGC TTG G	SEQ ID NO:39
VL-REV2	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT TCC AGC TTG G	SEQ ID NO:40
VL-REV3	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT TCC AAC TTT G	SEQ ID NO:41
VL-REV4	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTC AGC TCC AGC TTG G	SEQ ID NO:42
VL-REV5	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA GTG AGT TTG G	SEQ ID NO:43
VL-REV6	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA GTG ACC TTG G	SEQ ID NO:44
VH-FOR1	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC	SEQ ID NO:45
VH-FOR2	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	SEQ ID NO:46
VH-FOR3	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT GCA GCT GAA GSA STC	SEQ ID NO:47
VH-FOR4	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC	SEQ ID NO:48
VH-FOR5	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC	SEQ ID NO:49
VH-FOR6	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC	SEQ ID NO:50
VH-FOR7	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC	SEQ ID NO:51
VH-FOR8	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA S ST GGT GGA ATC	SEQ ID NO:52
VH-FOR9	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC	SEQ ID NO:53
VH-FOR10	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC	SEQ ID NO:54
VH-FOR11	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC	SEQ ID NO:55
VH-FOR12	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC	SEQ ID NO:56
VH-FOR13	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC	SEQ ID NO:57
VH-FOR14	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC	SEQ ID NO:58
VH-FOR15	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC	SEQ ID NO:59
VH-FOR16	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG	SEQ ID NO:60
VH-FOR17	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC	SEQ ID NO:61
VH-FOR18	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC	SEQ ID NO:62
VH-FOR19	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC	SEQ ID NO:63
VH-REV1	CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAA ACG GTG ACC GTG GT	SEQ ID NO:64
VH-REV2	CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACT GTG AGA GTG GT	SEQ ID NO:65
VH-REV3	CCC TTG AAG CTT GCT GCA GAG ACA GTG ACC AGA GT	SEQ ID NO:66
VH-REV4	CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG GT	SEQ ID NO:67

Затем амплифицированные гены VH и VL расщепляли с помощью рестрикционных эндонуклеаз (NcoI и NotI для VL, NdeI и HindIII для VH), фрагменты гена очищали после электрофореза в агарозном геле с помощью стандартного набора (Zymo Research, Ориндж, Калифорния, США) и лигировали в клонирующую плазмиду pMAZ360. Плазмиду, содержащую ген VH или VL, секвенировали и с помощью сборочной ПЦР конструировали новый ген для создания последовательности, кодирующей scFv TER-119

```
5'-GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGGGG
GTCTCTGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCACT
GGATGAATTGGGTCCGGCAGGCTCCCGAAAGACCATGGAGTGGATTG
GAGATATTAGACCTGATGGCAGTGACACAAACTATGCACCATCTGTGAG
GAATAGATTACAAATCTCCAGAGACAATGCCAGGAGCATCCTGTACCTG
CAGATGAGCAATATGAGATCTGATTACACAGCCACTTATTACTGTGTTA
GAGACTCACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAAC
CTCAGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGT
CTGGCGGCGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATGACGCA
GTCTCCTTCAGTCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACT
GCAAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAAACTGGTATCAGCAAAA
GCTTGGAGAAGCTCCCAAAGTCTGATATATAATACAAACAATTTGCAA
ACGGGCATCCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTC
CACTCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCCACATATTTCTGCT
TTCAGCATTATACTTGGCCACGTTTGGAGGTGGGACCAAGCTGGAATC
AAACGTACT-3' (SEQ ID NO:69)
```

которая кодирует VH-участок клона TER-119 на N-конце транслированного белка с расположенным за ним линкерным доменом (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄ (SEQ ID NO: 18), за которым располагается VL-участок клона TER-119 на C-конце транслированного белка. Ген scFv TER-119 конструировали путем амплификации кДНК TER-119 с помощью праймеров SK07 и SK08, специфичных для VH-участка, и SK09 и S10, специфичных для VL-участка.

Название праймера	Последовательность праймера (от 5' к 3')	SEQ ID NO
SK07	ACT CGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC GGA GGT GAA GCT GCA GGA GTC	SEQ ID NO:70
SK08	GGA GCC GCC GCC GCC AGA ACC ACC ACC ACC AGA ACC ACC ACC ACC GGC TGA GGA GAC AGT GAC TG	SEQ ID NO:71
SK09	GGC GGC GGC GGC TCC GGT GGT GGT GGA TCC GAC ATT CAG ATG ACG CAG TC	SEQ ID NO:72
SK10	GAC TAC TAG GCC CCC GAG GCC AGT ACG TTT GAT TTC CAG CT	SEQ ID NO:73

Каждый полностью сформированный продукт в виде гена scFv расщепляли с помощью SfiI и XhoI (NEB, Ипсуич, Массачусетс, США) и лигировали в те же самые сайты в плазмиде для экспрессии у млекопитающих pSecTagA (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США).

Для созревания аффинности scFv 10F7, который связывается с гликофорином А человека, соответствующий ген синтезировали коммерческим путем и получали из DNA2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США) в виде следующей последовательности:

```
5'-GTATTACTCGCGCCAGCCGGCCATGGCGGCGCAGGTGAAACT
GCAGCAGAGCGGCGCGGAAGTGGTGAACCGGCGCGAGCGTGAAACTG
AGCTGCAAAGCGAGCGGCTATACCTTTAACAGCTATTTATGCATTGGATG
AAACAGCGCCCGGTGCAGGGCCTGGAATGGATTGGCATGATTCGCCGAA
CGGCGGCACCACCGATTATAACGAAAAATTTAAAAACAAAGCGACCTGA
CCGTGGATAAAAGCAGCAACACCGCGTATATGCAGCTGAACAGCCTGACC
```

```

AGCGGCGATAGCGCGGTGATTATTGCGCGCGCTGGGAAGGCAGCTATTA
TGCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGCGGGC
GCGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGATATTGA
ACTGACCCAGAGCCCGGCGATTATGAGCGCGACCCCTGGGGCAAAAAGTG
ACCATGACCTGCCGCGCGAGCAACGTGAAATATATGTATTGGTATCA
GCAGAAAAGCGGGCGAGCCCGAAACTGTGGATTTATTATACCAGCAACC
TGGCGAGCGGGCGTGCCGGGCCGCTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAG
STATAGCCTGACCATTAGCAGCGTGGAAGCGGAAGATGCGGGCAGCTATT
ATTGCCAGCAGTTTACCAGCAGCCCGTATACCTTTGGCGGGCGCACAAA
CTGGAATTAACGCGCGGGCGGGCCCTCGGGGGCCGAGGGCGGGCGGTT
CT-3' (SEQ ID NO:74).

```

Подобное созревание аффинности с помощью методик рекомбинантной ДНК, описанное ранее для TER-119, выполняли для гена 10F7 с целью получения библиотеки мутантов, обеспечивающей возможность скрининга для выявления усиленного связывания с эритроцитами человека.

Пример 5. Индукция антиген-специфической иммунной толерантности посредством нековалентного связывания антигена, конъюгированного с антителом, с эритроцитами.

Антитело можно конъюгировать с антигеном с помощью стандартных реакций сшивания, как указано в примере 3 и в других местах в данном документе. Очищенный конъюгат антитело-антиген будет проявлять индукцию толерантности к антигену в стандартных мышинных моделях сахарного диабета 1 типа, рассеянного склероза, трансплантации островковых клеток и в случае модельного антигена OVA.

Для демонстрации индукции толерантности к OVA конъюгат OVA-антитело или конъюгат OVA-наночастица-антитело можно вводить мышам внутривенным или внесосудистым путем. Через заранее определенное число дней после введения мышей необходимо умертвить, а лимфатические узлы, селезенку и кровь собрать для анализа. Спленциты и клетки, полученные из лимфатических узлов, высевают и повторно стимулируют в течение 3 дней *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFEKL, посредством ELISA у них измеряют снижение экспрессии IFN γ , IL-17a, IL-2 и IL-4 и повышение экспрессии TGF- β 1, которые являются достоверными признаками толерантности. Внутриклеточное окрашивание IFN γ , IL-17a, IL-2 и IL-4 выполняют с помощью проточной цитометрии спленцитов и клеток, полученных из лимфатических узлов, спустя 6 ч после повторной стимуляции *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFEKL. Также проточную цитометрию применяют для характеристики профилей экспрессии CD4, CD8 и регуляторных Т-клеток из клеток, выделенных из лимфатических узлов, селезенки и крови. Дополнительно у мышей берут образцы крови в различные моменты времени для измерения гуморального ответа на антиген OVA с выработкой антител. Для определения того, является ли системная толерантность установившейся, выполняют другой эксперимент повторной стимуляции *ex vivo*. Мышам вводят конъюгат OVA-антитело или конъюгат OVA-антитело-наночастица, как описано ранее, OVA повторно вводят спустя 9 дней с адьювантом (липополисахаридом, полным адьювантом Фрейнда, квасцами и др.), и реактивность спленцитов в отношении антигена OVA оценивают посредством ELISA и/или проточной цитометрии, как описано ранее. Состав на основе конъюгата OVA-антитело и/или конъюгата OVA-антитело-наночастица сделает спленциты нереактивными в отношении второй активации с помощью OVA и адьюванта, что является одним из способов демонстрации эффективного установления системной толерантности. После начального введения составов на основе конъюгата OVA-антитело и/или конъюгата OVA-антитело-наночастица можно проводить подобные эксперименты по стимуляции *in vivo* с трансгенными клеточными линиями в качестве дальнейшей демонстрации толерантности, такие как адоптивный перенос Т-клеток OT-I, подобные исследования, подробно описанным в примере 3. Для демонстрации иммунной толерантности в мышинных моделях аутоиммунитета или деиммунизации терапевтических молекул можно создавать аналогичные конъюгаты антител для соответствующих антигенов, как было описано в данном документе для OVA.

Пример 6. Индукция антиген-специфической иммунной толерантности посредством нековалентного связывания антигена, гибридного с одноцепочечным антителом, с эритроцитами.

Можно применять одноцепочечные фрагменты антител (scFv) в качестве участников нековалентного связывания с эритроцитами. ScFv, проявляющие высокую аффинность к поверхностным белкам эритроцитов, можно выделять путем скрининга библиотек scFv с помощью известных в данной области платформ дисплеев. При обнаружении нового связывающегося с эритроцитами фрагмента антитела необходимо выполнить биохимическую характеристику связывания, подобную той, которая была проведена для пептида ERY1. Поскольку scFv имеет одну полипептидную цепь, его будут гибридинизировать с антигеном сайт-специфическим рекомбинантным путем с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК. В зависимости от природы партнера гибридинизации для антигена scFv гибридинизируют с N- или C-концом антигена с созданием бифункциональных белковых соединений. В случае, если последовательность узнавания пептида главного комплекса гистосовместимости (МНС) известна антигену, пептид также включают в линкерный домен scFv, создавая, таким образом, новый бифункциональный конструктор

антитело/антиген, содержащий нативные концы scFv.

Для демонстрации индукции толерантности к OVA конъюгат OVA-scFv или конъюгат OVA-наночастица-scFv можно вводить мышам внутривенным или внесосудистым путем. Через заранее определенное число дней после введения мышам необходимо умертвить, а лимфатические узлы, селезенку и кровь необходимо собрать для анализа. Спленоциты и клетки, полученные из лимфатических узлов, необходимо высеять и повторно стимулировать в течение 3 дней *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFEKL (SEQ ID NO: 3), и с помощью, например, ELISA необходимо измерить у них снижение экспрессии IFN γ , IL-17a, IL-2 и IL-4 и повышение экспрессии TGF- β 1, которые являются достоверными признаками толерантности. Внутриклеточное окрашивание IFN γ , IL-17a, IL-2 и IL-4 выполняют с помощью проточной цитометрии спленоцитов и клеток, полученных из лимфатических узлов, спустя 6 ч после повторной стимуляции *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFEKL (SEQ ID NO: 3). Также проточную цитометрию можно применять для характеристики профилей экспрессии CD4, CD8 и регуляторных Т-клеток из клеток, выделенных из лимфатических узлов, селезенки и крови. Дополнительно у мышам берут образцы крови в различные моменты времени для измерения гуморального ответа на антиген OVA с выработкой антител. Для определения того, является ли системная толерантность установившейся, выполняют другой эксперимент повторной стимуляции *ex vivo*. Мышам вводят конъюгат OVA-scFv или конъюгат OVA-наночастица-scFv, как описано ранее, OVA повторно вводят спустя 9 дней с адьювантом (липополисахаридом, полным адьювантом Фрейнда, квасцами и др.), и реактивность спленоцитов в отношении антигена OVA оценивают посредством ELISA и/или проточной цитометрии, как описано ранее. Состав на основе конъюгата OVA-scFv и/или конъюгата OVA-scFv-наночастица сделает спленоциты неактивными в отношении второй активации с помощью OVA и адьюванта, что демонстрирует, таким образом, эффективное установление системной толерантности. После начального введения составов на основе конъюгата OVA-scFv и/или конъюгата OVA-scFv-наночастица можно проводить подобные эксперименты по активации *in vivo* с трансгенными клеточными линиями для демонстрации толерантности, такие как адоптивный перенос Т-клеток OT-I, подобные исследованиям, подробно описанным в примере 3. Для демонстрации иммунной толерантности в мышинных моделях аутоиммунитета или деиммунизации терапевтических молекул можно создавать аналогичные гибридные молекулы на основе scFv для соответствующих антигенов, как было описано в данном документе для OVA.

Для создания конструкта на основе антитела, который как связывается с эритроцитами мыши, так и представляет иммунодоминантный эпитоп OVA, презентуемый MHC-I (SGLEQLESIIINFEKL) (SEQ ID NO: 75), применяют стандартные методики рекомбинантной ДНК. С помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами впервые был создан фрагмент ДНК, который кодировал 3'-концевой домен, в том числе пептид SGLEQLESIIINFEKL (SEQ ID NO: 75), перекрывающийся с 5'-доменом, комплементарным 3'-концу последовательности TER119. Этот фрагмент ДНК применяли в качестве обратного праймера наряду с комплементарным прямым 5'-праймером в стандартной ПЦР для создания целого фрагмента ДНК, кодирующего TER119-SGLEQLESIIINFEKL (SEQ ID NO: 75)

```
5'-GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGAACCTGGGGGG
TCTCTGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCACTGG
ATGAATTGGGTCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTGGAG
ATATTAGACCTGATGGCAGTGACACAACTATGCACCATCTGTGAGGAAT
AGATTCACAATCTCCAGAGACAATGCCAGGAGCATCTGTACCTGCAGAT
GAGCAATATGAGATCTGATTACACAGCCACTTATTACTGTGTTAGAGACT
CACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTC
ACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGCGG
CGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATGACGCAGTCTCCTT
CAGTCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACTGCAAAGCA
AGTCAGAATATTAACAAGTAACTGGTATCAGCAAAAGCTTGGAG
AAGTCCCAAAGTCTGATATATAATAACAATAATTCGAAACGGGCAT
CCCATCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACACTACCA
TCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCCACATATTTCTGCTTCAGCATT
ATACTTGGCCACGTTTGGAGGTGGGACCAAGCTGGAATCAAACGTAC
TCATCATCACCATCATCACGGTGGCGGTTCTGGCCTGGAGCAGCTGGAGT
CTATTATTAATTCGAAAAACTG-3' (SEQ ID NO:76)
```

Подчеркнутая последовательность обозначает генный сегмент, кодирующий SGLEQLESIIINFEKL. Для рекомбинантной экспрессии фрагмент ДНК включали в вектор экспрессии у млекопитающих и прокариот.

Для создания конструкта на основе антитела, который связывается с эритроцитами мыши и представляет мимотоп 1040-p31 хромогранина А (YVRPLWVRME) (SEQ ID NO: 77), применяют стандартные методики рекомбинантной ДНК. С помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами был создан фраг-

мент ДНК, который кодировал 3'-концевой домен, в том числе пептид YVRPLWVRME (SEQ ID NO: 77), перекрывающийся с 5'-доменом, комплементарным 3'-концу последовательности TER119. Этот фрагмент ДНК применяли в качестве праймера наряду с комплементарным прямым 5'-праймером в стандартной ПЦР для создания целого фрагмента ДНК, кодирующего TER119-YVRPLWVRME

5'-AGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGAGGAGGCTGGTGCAACCTGGGG
GGTCTCTGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCAC
TGGATGAATTGGGTCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTG
GGGATATTAGACCTGATGGCAGTGACACAAACTATGCACCATCTGTGAG
GAATAGATTCACAATCTCCAGAGACAATACCAGGAGCATCCTGTACCTG
CAGATGGGCAATATGAGATCTGATTACACAGCCACTTATTACTGTGTTAG
AGACTCACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAACC
TCAGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTC
TGGCGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATGACGCAG
TCTCCTTCAGTCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACTG
CAAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAAACCGGTATCAGCAAAAAG
CTTGGAGAAGCTCCCAAAGTCTGGTATATAATAACAACAATTTGCAAAC
GGGCATCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGCACAGATTCACAC
TCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCCACATATTTCTGCTTTC
AGCATTATACTTGGCCACGTTTGGAGGTGTGACCAAGCTGGAAATCAA
ACGTAATCATCATCACCATCATCACGGTGGCGGTTATGTTCAGACCTCTGT
GGGTCAAGTGGAA-3' (SEQ ID NO:78)

Подчеркнутая последовательность обозначает генный сегмент, кодирующий мимотоп хромогранина А (1040-р31) (YVRPLWVRME) (SEQ ID NO: 77). Для рекомбинантной экспрессии фрагмент ДНК включали в вектор экспрессии у млекопитающих и прокариот.

Для создания конструкта на основе антитела, который связывается с эритроцитами мыши и представляет проинсулин мыши, главный аутоантиген сахарного диабета у мышей NOD, применяли стандартные методики рекомбинантной ДНК. С помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами впервые был создан фрагмент ДНК, который кодировал 3'-концевой домен, в том числе целый белок проинсулин, перекрывающийся с 5'-доменом, комплементарным 3'-концу последовательности TER119. Этот фрагмент ДНК применяли в качестве праймера наряду с комплементарным прямым 5'-праймером в стандартной ПЦР для создания целого фрагмента ДНК, кодирующего TER119-проинсулин

5'-GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGAGGAGGCTGGTGCAACCTGGGGG
GTCTCTGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCACCTTCAGGGACCACT
GGATGAATTGGGTCCGGCAGGCTCCCGGAAAGACCATGGAGTGGATTGG
AGATATTAGACCTGATGGCAGTGACACAAACTATGCACCATCTGTGAGG
AATAGATTCACAATCTCCAGAGACAATGCCAGGAGCATCCTGTACCTGC
AGATGAGCAATATGAGATCTGATTACACAGCCACTTATTACTGTGTTAGA
GACTCACCTACCCGGGCTGGGCTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAACCTC
AGTCACTGTCTCCTCAGCCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTCTG
GCGGCGGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGACATTCAGATGACGCAGTC
TCCTTCAGTCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACTGCA
AAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAAACTGGTATCAGCAAAAAGCT
TGGAGAAGCTCCCAAAGTCTGATATATAATAACAACAATTTGCAAACG
GGCATCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTCACACT
CACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCCACATATTTCTGCTCTC
AGCATTATACTTGGCCACGTTTGTATGGTGGGACCAAGCTGGAAATCAA
ACGTAATCATCATCACCATCATCACGGTGGCGGTTTTGTGAAACAGCATC
TGTCGGTCCGCATCTGGTGGAAAGCGCTGTATCTGGTGTGCGGCGAACGT
GGCTTTTTTATACCCCGAAAAGCCGTCGTGAAGTGGAAAGATCCCGAGGT
GGAACAGCTGGAAGTGGGCGGCAGCCCGGTGATCTGCAGACCCTGGCC
CTGGAAGTGGCGCTCAGAAACGTGGCATTGTGGATCAGTGTGCACCA
GCATTTGCAGCCTGTATCAGCTGGAAAACATTTACAAC-3' (SEQ ID NO:79).

Подчеркнутая последовательность обозначает генный сегмент конструкта, кодирующий проинсулин. Для рекомбинантной экспрессии фрагмент ДНК включали в вектор экспрессии у млекопитающих и прокариот.

Пример 7. Синтез разветвленных полимеров, содержащих связывающиеся с эритроцитами лиганды и другие функциональные группы.

Для синтеза PEG-тиоацетата с 8 ветвями PEG-OH с 8 ветвями (Nektar) растворяли в толуоле и вводили в реакцию на 18 ч с 10 экв. триэтиламина (Sigma Aldrich, CAS № 121-44-8) и 10 экв. метансульфонилхлорида (Sigma Aldrich, CAS № 124-63-0) при комнатной температуре под аргоном. Остаток отфильтровывали, и фильтрат концентрировали при пониженном давлении, растворяли в диметилформамиде (DMF), добавляли 10 экв. тиоацетата калия (Sigma Aldrich, CAS № 10387-40-3). Спустя 18 ч нахождения при комнатной температуре фильтрат концентрировали под пониженным давлением и осаждали в диэтиловом эфире. Осадок отфильтровывали и высушивали при пониженном давлении с получением конечного продукта.

Для синтеза PEG-пиридилдисульфида с 8 ветвями PEG-тиоацетат с 8 ветвями растворяли в диметилформамиде (DMF), и с него удаляли защитные группы с помощью 1,05 экв. метоксида натрия (Sigma Aldrich, CAS № 124-41-4) в течение 1 ч при комнатной температуре под аргоном в сосуде Шленка. Для восстановления незащищенных тиоловых групп до тиолатных к раствору добавляли 2 экв. гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP, Thermo Scientific, CAS № 51805-45-9) и 2 экв. дистиллированной воды. Спустя 2 ч нахождения при комнатной температуре добавляли 12 экв. 2,2'-дитиодипиридина (алдритиол-2, Sigma Aldrich, CAS № 2127-03-9), раствор взбалтывали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем реакцию смесь диализировали против 5 л дистиллированной воды в диализной трубке MWCO на 3500 Да в течение 48 ч, во время которых дистиллированную воду заменяли 4 раза. Нагрузку пиридилсульфида на PEG с 8 ветвями определяли количественно по восстановлению в 25 мМ TCEP в 100 мМ HEPES, pH 8,0, спектры в УФ- и видимой области измеряли при 343 нм для отслеживания присутствия пиридин-2-тионової уходящей группы.

Для синтеза PEG-пиридилсульфид-ALEXAFLUOR647 с 8 ветвями PEG-тиоацетат с 8 ветвями растворяли в DMF и с него удаляли защитные группы с помощью 1,05 экв. метоксида натрия (Sigma Aldrich, CAS № 124-41-4) в течение 1 ч при комнатной температуре под аргоном в сосуде Шленка. Для восстановления незащищенных тиоловых групп до тиолатных к раствору добавляли 2 экв. гидрохлорида трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP, Thermo Scientific, CAS № 51805-45-9) и равный объем 100 мМ HEPES, pH 8,0. Спустя 2 ч нахождения при комнатной температуре к раствору добавляли 0,125 экв. (эквивалентно 1 ветви из 8) AlexaFluor647-C2-малеимида (Invitrogen). Спустя 2 ч нахождения при комнатной температуре добавляли 12 экв. 2,2'-дитиодипиридина (алдритиол-2, Sigma Aldrich, CAS № 2127-03-9), раствор взбалтывали при комнатной температуре в течение 24 ч. Затем реакцию смесь диализировали против 5 л дистиллированной воды в диализной трубке MWCO на 3500 Да в течение 48 ч, во время которых дистиллированную воду заменяли 4 раза. Нагрузку пиридилсульфида на PEG с 8 ветвями определяли количественно по восстановлению в 25 мМ TCEP в 100 мМ HEPES, pH 8,0, спектры в УФ- и видимой области измеряли при 343 нм для отслеживания присутствия пиридин-2-тионової уходящей группы.

Тиолсодержащие пептиды конъюгировали с PEG-пиридилсульфидом с 8 ветвями путем добавления стехиометрических количеств пептида, растворенного в водном 3М гуанидине-HCl (Sigma Aldrich, CAS № 50-01-10), к водному раствору PEG-пиридилсульфида с 8 ветвями при комнатной температуре. Преобразования в ходе реакции отслеживали путем измерения спектров в УФ- и видимой области при 343 нм для количественного определения присутствия пиридин-2-тионової уходящей группы. При необходимости конъюгации более одной молекулы с PEG-пиридилсульфидом с 8 ветвями процедуру реакции повторяли с новой молекулой в том же сосуде. Сразу после завершения конъюгации реакцию смесь обессоливали на колонке для обессоливания ZEBASPIN (Thermo Scientific) и очищенный продукт хранили в соответствующих стерильных условиях.

Индукцию толерантности к OVA можно было продемонстрировать для конъюгата PEG с 8 ветвями-ERY/MIS-SIINFELK (SIINFELK: SEQ ID NO: 3) посредством его введения мышам внутривенным или внесосудистым путем. Этот тест также должен свидетельствовать об индукции толерантности у людей с помощью лигандов, специфичных для человека. При такой демонстрации через заранее определенное число дней после введения мышей следовало умертвить, а лимфатические узлы, селезенку и кровь собрать для анализа. Спленциты и клетки, полученные из лимфатических узлов, высевают и повторно стимулируют в течение 3 дней *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFELK (SEQ ID NO: 3) и посредством ELISA у них измеряют снижение экспрессии IFN γ , IL-17a, IL-2 и IL-4 и повышение экспрессии TGF- β 1, которые являются достоверными признаками толерантности. Внутриклеточное окрашивание IL-17a, IL-2 и IL-4 выполняют с помощью проточной цитометрии на спленцитах и клетках, полученных из лимфатических узлов, спустя 6 ч после повторной стимуляции *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFELK (SEQ ID NO: 3). Также проточную цитометрию применяют для характеристики профилей экспрессии CD4, CD8 и регуляторных Т-клеток из клеток, выделенных из лимфатических узлов, селезенки и крови. Дополнительно у мышей берут образцы крови в различные моменты времени для измерения гуморального ответа на антиген OVA с выработкой антител. Для определения того, является ли системная толерантность установившейся, выполняют другой эксперимент повторной стимуляции *ex vivo*

in vivo. Мышам вводят конъюгат PEG с 8 ветвями-ERY1/MIS-SIINFELK (SIINFELK: SEQ ID NO: 3), как описано ранее, OVA повторно вводят спустя 9 дней с адьювантом (липолисахаридом, полным адьювантом Фрейнда, квасцами и др.), реактивность спленоцитов в отношении антигена OVA оценивают посредством ELISA и/или проточной цитометрии, как описано ранее. Конъюгат PEG с 8 ветвями-ERY1-SIINFELK (SIINFELK: SEQ ID NO: 3) сделает спленоциты нереактивными в отношении второй активации с помощью OVA и адьюванта, что является способом иллюстрации эффективного установления системной толерантности. После начального введения составов на основе конъюгата PEG с 8 ветвями-ERY1/MIS-SIINFELK (SIINFELK: SEQ ID NO: 3) можно проводить подобные эксперименты по активации *in vivo* с трансгенными клеточными линиями для дополнительной демонстрации толерантности, такие как адоптивный перенос Т-клеток OT-I, подобные исследованиям, подробно описанным в примере 3. Для демонстрации иммунной толерантности в мышинных моделях аутоиммунитета или деиммунизации терапевтических молекул можно создавать аналогичные конструкторы на основе PEG с 8 ветвями для соответствующих антигенов, как было описано в данном документе для SIINFELK (SEQ ID NO: 3).

Пример 8. Индукция антиген-специфической иммунной толерантности посредством нековалентного связывания антигена, конъюгированного с аптамером, с эритроцитами.

Можно осуществлять способы с применением других биоаффинных реагентов, отличных от антител, для измерения их способности к индукции иммунной толерантности посредством нековалентного связывания с эритроцитами. Другие белковые аффинные фрагменты, такие как сконструированные белки с анкириновыми повторами (DARPin) (Steiner, Forrer, et al., 2008), сконструированные белки с повторами armadillo (Parmeggiani, Pellarin, et al., 2008), домены фибронектина (Hackel, Kapila, et al., 2008) и аффинные каркасные структуры типа "цистиновых узлов" (ноттинов) (Silverman, Levin, et al., 2009), подвергали скринингу для выявления тех, которые проявляли аффинность связывания с эритроцитами.

Скрининг библиотек для обнаружения аптамеров ДНК/РНК, обладающих высокой аффинностью к эритроцитам, проводят с помощью общепризнанного способа систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) (Archemix, Кембридж, Массачусетс, США) (Sampson, 2003). С момента обнаружения новых последовательностей ДНК/РНК, которые связываются с эритроцитами с высокой аффинностью, их синтезируют химическим путем содержащими дополнительную химическую реакционноспособную группу на 3'- или 5'-конце для конъюгации с антигеном и/или полимерной мицеллой/наночастицей. Для создания одного биоконъюгата, содержащего связывающийся с эритроцитами аптамер и антиген или комплекс антиген-наночастица, аптамер, синтезированный химическим путем, содержит, например, реакционноспособную группу NH₂, которую конъюгируют посредством стратегии конъюгации посредством EDC/NHS с группами COOH, присутствующими в наночастице или антигене или комплексе наночастица-антиген. Испытывали различные методики химической конъюгации путем изменения ортогональных реакционноспособных групп и схем конъюгации для каждого из аптамера, антигена и/или комплекса антиген-наночастица.

Для демонстрации индукции толерантности к OVA конъюгат OVA-аптамер или конъюгат OVA-наночастица-аптамер вводят мышам внутривенным или внесосудистым путем. Через заранее определенное число дней после введения мышей умерщвляют, а лимфатические узлы, селезенку и кровь собирают для анализа. Спленоциты и клетки, полученные из лимфатических узлов, высевают и повторно стимулируют в течение 3 дней *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFELK (SEQ ID NO: 3), посредством ELISA у них измеряют снижение экспрессии IFN γ , IL-17a, IL-2 и IL-4 и повышение экспрессии TGF- β 1, которые являются достоверными признаками толерантности. Внутриклеточное окрашивание IL-17a, IL-2 и IL-4 выполняют с помощью проточной цитометрии на спленоцитах и клетках, полученных из лимфатических узлов, спустя 6 ч после повторной стимуляции *ex vivo* с помощью OVA и/или пептида SIINFELK (SEQ ID NO: 3). Также проточную цитометрию применяют для характеристики профилей экспрессии CD4, CD8 и регуляторных Т-клеток из клеток, выделенных из лимфатических узлов, селезенки и крови. Дополнительно у мышей берут образцы крови в различные моменты времени для измерения гуморального ответа на антиген OVA с выработкой антител. Для определения того, является ли системная толерантность установившейся, выполняют другой эксперимент повторной стимуляции *ex vivo*. Мышам вводят конъюгат OVA-антитело или конъюгат OVA-антитело-наночастица, как описано ранее, OVA повторно вводят спустя 9 дней с адьювантом (липолисахаридом, полным адьювантом Фрейнда, квасцами и др.), реактивность спленоцитов в отношении антигена OVA оценивают посредством ELISA и/или проточной цитометрии, как описано ранее. Предполагается, что составы на основе конъюгата OVA-антитело и/или конъюгата OVA-антитело-наночастица сделают спленоциты нереактивными в отношении второй активации с помощью OVA и адьюванта, что демонстрирует, таким образом, эффективное установление системной толерантности. После начального введения составов на основе конъюгата OVA-аптамер и/или конъюгата OVA-аптамер-наночастица можно проводить подобные эксперименты по активации *in vivo* с трансгенными клеточными линиями для демонстрации толерантности, такие как адоптивный перенос Т-клеток OT-I, подобные исследованиям, подробно описанным в примере 3. Для демонстрации иммунной толерантности в мышинных моделях аутоиммунитета или деиммунизации терапевтических молекул создают аналогичные конструкторы на основе аптамеров для соответствующих антигенов, как было описано в данном документе для OVA.

Пример 9. Характеристика связывания с эритроцитами человека.

Для характеристики выбранных пептидов из бактериального дисплея, которые связывались с эритроцитами человека в условиях отсутствия представления клетками, пептиды синтезировали химическим путем и конъюгировали с флуоресцентным белком аллофиикоцианином (APC). Подобным образом характеризовали способность к связыванию с эритроцитами каждого пептида в растворимой форме, т.е. в виде белкового конъюгата. Как показано на фиг. 6, пептиды ERY64, ERY123 и ERY141 связывались с эритроцитами человека в виде конъюгатов с APC.

Способ конъюгации APC с пептидами.

Пептиды заказывали и синтезировали под заказ посредством стандартного твердофазного синтеза по f-мос-стратегии в Polypeptide Group (Страсбург, Франция). 10 экв. пептида, растворенного в 3М гуанидине-HCl, добавляли к 2 мг/мл APC, активированного малеимидом (InnovaBiosciences, Кэмбридж, Великобритания) в PBS. После 4 ч инкубации при температуре 4°C реакцию смесь обессоливали колонке для обессоливания ZEBА на 2 мл (Thermo Scientific) и хранили при температуре 4°C.

Количественное определение связывания с эритроцитами посредством способа проточной цитометрии.

Свежевыделенную кровь человека разводили в 100 раз в PBS с добавлением 20 мг/мл BSA. 5×10^5 эритроцитов добавляли к 150 мкл 1 мкМ конъюгата APC-пептид и инкубировали при температуре 37°C в течение 45 мин. Клетки тщательно отмывали в PBS + 20 мг/мл BSA и анализировали для выявления флуоресценции APC на проточном цитометре CyAn ADP (Beckman Coulter).

Пример 10. Индукция антиген-специфической иммунной толерантности посредством связывания антигена, гибридизированного с одноцепочечным антителом, с эритроцитами.

Была создана рекомбинантная гибридная молекула на основе scFv и SIINFEKL, иммунодоминантного домена OVA, презентуемого MHC-I. Полученный scFv (называемый в данном документе TER119-SIINFEKL) связывался с эритроцитами мыши, как показано с помощью проточной цитометрии на фиг. 7.

Поскольку в данном документе уже было показано, что эту толерантность индуцировал ERY1-OVA, он считается пригодной системой для характеристики иммунных событий. Было установлено, что связывание эритроцита с ERY1-OVA приводило к эффективной перекрестной презентации иммунодоминантного эпитопа OVA (SIINFEKL), презентуемого MHC-I, с помощью антигенпрезентирующих клеток (APC) и соответствующему примированию реактивных Т-клеток перекрестно-реагирующим антигеном. $CD8^+$ Т-клетки OT-I ($CD45.2^+$), меченные CFSE, адоптивно переносили мышам $CD45.1^+$, затем измеряли пролиферацию $CD8^+$ Т-клеток OT-I в течение 5 дней после внутривенного введения 10 мкг OVA, 10 мкг ERY1-OVA, эквивалентной дозы TER119-SIINFEKL или эквивалентной дозы SIINFEKL. Пролиферация $CD8^+$ Т-клеток OT-I, определенная по разбавлению флуоресцентного средства CFSE, измеренному с помощью проточной цитометрии, значительно усиливалась у мышей, которым вводили TER119-SIINFEKL, по сравнению с теми, кому вводили ERY1-OVA или OVA (фиг. 8), что указывало на то, что связывание с эритроцитами повышало примирование антиген-специфических $CD8^+$ Т-клеток перекрестно-реагирующим антигеном по сравнению с растворимым антигеном SIINFEKL.

Для разграничения между Т-клетками, разведенными до функционального эффекторного фенотипа, и разведенными и подвергнутыми делеции Т-клетками анализировали пролиферирующие $CD8^+$ Т-клетки OT-I на связывание с аннексином V, как отличительный признак апоптоза, а значит, и делеции, а также маркер истощения и запрограммированной гибели-1 (PD-1). TER119-SIINFEKL и ERY1-OVA индуцировали пролиферацию гораздо большего количества аннексии- V^+ и PD-1 $^+$ $CD8^+$ Т-клеток OT-I, чем OVA (фиг. 9).

С помощью достоверной модели стимуляции OT-I с выработкой толерантности (Liu, Iyoda, et al., 2002) была показана способность TER119-SIINFEKL и ERY1-OVA к предупреждению последующих иммунных ответов на опосредованную вакциной антигенную стимуляцию, даже если в стимуляции участвует очень сильный адъювант бактериального происхождения. С целью толеризации мышам $CD45.1^+$ внутривенно вводили 10 мкг OVA или ERY1-OVA или эквивалентную дозу ER119-SIINFEKL спустя 1 и 6 дней после адоптивного переноса $CD8^+$ Т-клеток OT-I. Спустя 9 дополнительных дней, необходимых для обеспечения возможной делеции перенесенных Т-клеток, мышам-реципиентам подвергали стимуляции с помощью внутрикожной инъекции OVA, вводимого с липополисахаридом (LPS) в качестве адъюванта. Характеристика клеток дренирующих лимфатических узлов и селезенки, а также их воспалительные ответы спустя 4 дня после стимуляции позволили провести определение в отношении того, имела ли место делеция на самом деле или нет.

Внутривенное введение TER119-SIINFEKL или ERY1-OVA приводило к выраженному сокращению популяций $CD8^+$ Т-клеток OT-I в дренирующих лимфатических узлах и селезенке по сравнению с мышами, которым вводили немодифицированный OVA перед антигенной стимуляцией с LPS, что указывает на делеционную толерантность. Дренирующие лимфатические узлы мышам, обработанных ERY1-OVA, содержали более чем в 11 раз меньше $CD8^+$ Т-клеток OT-I по сравнению с таковыми у мышам, обработанных OVA, и в 39 раз меньше, чем у мышам из контрольной группы стимуляции, которые

не получали внутривенные инъекции антигена; ответы клеток селезенки были сходными. Дренирующие лимфатические узлы мышей, обработанных TER119-SIINFЕKL, содержали более чем в 13 раз меньше CD8⁺ Т-клеток OT-I по сравнению с таковыми у мышей, обработанных OVA, и более чем в 42 раза меньше, чем у мышей из контрольной группы стимуляции, которые не получали внутривенные инъекции антигена; ответы клеток селезенки были сходными. Эта эффективная клональная делеция, проявляемая у мышей, которым вводили TER119-SIINFЕKL или ERY1-OVA, подтвердила более ранние наблюдения усиленного примирования CD8⁺ Т-клеток OT-I перекрестно-реагирующим антигеном (фиг. 8) и также показала, что примирование перекрестно-реагирующим антигеном происходило в отсутствие презентации костимулирующих молекул с помощью APC для активации делеционной толерантности.

Для дальнейшей оценки иммунного ответа после антигенной стимуляции характеризовали воспалительную природу резидентных клеток лимфатических узлов и селезенки с помощью экспрессии интерферона γ (IFN γ) CD8 Т-клетками OT-I (фиг. 10). После стимуляции с помощью OVA и LPS лимфатические узлы мышей, ранее обработанных ERY1-OVA, содержали в 10 раз меньше клеток, экспрессирующих IFN γ , по сравнению с таковыми у мышей из контрольной группы стимуляции (ранее не получавших антиген) и более чем в 4 раза меньше клеток, экспрессирующих IFN γ , по сравнению с таковыми у мышей, ранее обработанных эквивалентной дозой OVA. После стимуляции с помощью OVA и LPS лимфатические узлы мышей, ранее обработанных TER119-SIINFЕKL, содержали в 33 раза меньше клеток, экспрессирующих IFN γ , по сравнению с таковыми у мышей из контрольной группы стимуляции (ранее не получавших антиген) и более чем в 14 раз меньше клеток, экспрессирующих IFN γ , по сравнению с таковыми у мышей, ранее обработанных эквивалентной дозой OVA, что показывает важность связывания с эритроцитами в толерогенной защите в ответ на стимуляцию; ответы клеток селезенки были сходными.

Способы применения животных.

Все процедуры с животными ранее были одобрены ветеринарными учреждениями Швейцарии. Мышей линии C57BL/6-Tg(TcraTcrb) 1100Mjb (OT-I) (Jackson Labs) разводили в условиях вивария EPFL, и самок в возрасте 6-12 недель использовали для выделения спленоцитов. Самок мышей линии B6.SJL-Ptprc^aРepc^b/Boy (CD45.1) (Charles River) в возрасте 8-12 недель применяли в качестве носителей-реципиентов для адоптивного переноса CD8⁺ Т-клеток OT-I и исследований по индукции толерантности.

Способы разработки и синтеза пептидов.

Пептид ERY1 (H₂N-WMVLPWLPGLDGGSGCRG-CONH₂) (SEQ ID NO:128) синтезировали с помощью f-мос-стратегии стандартного твердофазного синтеза на смоле TGR (Nova Biochem) в автоматизированной системе регулируемой подачи жидкостей (Chemspeed). Подчеркнутой последовательностью является последовательность ERY1 из 12 мономеров, ранее описанная с помощью фагового дисплея как участок связывания с гликофоринном А мыши (Kontos and Hubbell, 2010). Область GGSG выполняла роль линкера для цистеинового остатка, применяемого для конъюгации; фланкирующий аргининовый остаток способствовал понижению рКа и, таким образом, увеличению реакционной способности цистеинового остатка (Lutolf, Tirelli, et al., 2001). Пептид отделяли от смолы в течение 3 ч в растворе 95% трифторуксусной кислоты, 2,5% этандитиола, 2,5% воды и осаждали в охлажденном на льду диэтиловом эфире. Очистку проводили в системе для препаративной ВЭЖХ-МС (Waters) с помощью колонки с обращенной фазой C18 (Perspective Biosystems).

Способы конъюгации ERY1 и антигена.

10 мол. экв. сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC, CAS № 64987-85-5, Thermo Scientific), растворенного в диметилформамиде, вводили в реакцию с 5 мг/мл OVA, не содержащим эндотоксинов (<1 МЕ/мг) (Hyglos GmbH), в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. После обессоливания на спин-колонке для обессоливания ZЕВА на 2 мл (Thermo Scientific) добавляли 10 экв. пептида ERY1, растворенного в 3М гуанидине-НСl, и предоставляли возможность протекания реакции в течение 2 ч при комнатной температуре. Конъюгат обессоливали с помощью спин-колонки для обессоливания ZЕВА на 2 мл, 0,2 мкл фильтровали в стерильных условиях, распределяли в рабочие аликвоты и хранили при температуре -20°C. Концентрацию белка определяли с помощью ВСА-анализа (Thermo Scientific). Реализация этой схемы приводила к конъюгации боковой цепи цистеина пептида с боковыми цепями лизина антигена.

Способы адоптивного переноса Т-клеток.

CD8⁺ Т-клетки из селезенки мышей OT-I (CD45.2⁺) выделяли с помощью набора магнитных гранул для отрицательной селекции CD8 (Miltenyi Biotec) согласно инструкциям изготовителя. Свежевыделенные CD8⁺ клетки OT-I ресуспендировали в PBS и метили 1 мкМ карбоксифлуоресцинсукцинимидиловым эфиром (CFSE, Invitrogen) в течение 6 мин при комнатной температуре, а реакционную смесь гасили в течение 1 мин равным объемом IMDM с 10% FBS (Gibco). Перед инъекцией клетки отмывали, подсчитывали и ресуспендировали в чистой IMDM. 3×10⁶ CD8⁺ клеток OT-I, меченных CFSE, инъецировали внутривенно в хвостовую вену мышей-реципиентов CD45.1⁺. Для кратковременных исследований пролиферации 10 мкг ERY1-OVA или OVA или эквивалентную дозу TER119-SIINFЕKL в объеме 100 мкл инъецировали спустя 24 ч после адоптивного переноса. Спленоциты собирали спустя 5 дней после введения антигена и окрашивали для анализа с помощью проточной цитометрии.

Способы применения модели толерантности и стимуляции OT-I.

3×10^5 CD8⁺ Т-клеток OT-I, меченных CFSE, инъецировали мышам-реципиентам CD45.1⁺, как описано ранее. Спустя 1 и 6 дней после адоптивного переноса мышам внутривенно вводили 10 мкг ERY1-OVA или OVA или эквивалентную дозу TER119-SIINFEKL в 100 мкл физиологического раствора в хвостовую вену. Спустя 15 дней после адоптивного переноса мышей подвергали стимуляции с помощью 5 мкг OVA и 25 нг ультрачистого LPS *Escherichia coli* (InvivoGen) путем внутрикожного введения 25 мкл в подушечки обеих задних лап (способ Нокк, общая доза 10 мкг OVA и 50 нг LPS). Мышей умерщвляли через 4 дня после активации, клетки селезенки и дренирующих лимфатических узлов выделяли для повторной стимуляции. Для анализа внутриклеточного цитокина с помощью проточной цитометрии клетки повторно стимулировали в присутствии 1 мг/мл OVA или 1 мкг/мл пептида SIINFEKL (Genscript) в течение 3 ч. Добавляли брэфелдин А (Sigma, 5 мкг/мл), и повторную стимуляцию продолжали в течение дополнительных 3 ч перед окрашиванием и анализом с помощью проточной цитометрии.

Антитела и способы проточной цитометрии.

Для проточной цитометрии применяли следующие антитела к антигенам мыши: Pacific Blue к CD1d, PerCP-Cy5.5 к CD3ε, PE-Cy7 к CD8α, Pacific Blue к CD45.2, конъюгированное с APC к IFNγ, APC-eF780 к CD8α (все от eBioscience), в дополнение к красителю для фиксации живых/мертвых клеток (Invitrogen) и набору для мечения аннексина-V-Cy5 (BioVision). Образцы анализировали на проточном питеметре CyAn ADP (Beckman Coulter). Сначала клетки отмывали с помощью PBS, окрашивали в течение 20 мин на льду красителем для живых/мертвых клеток, блокировали в течение 20 мин на льду в гибридной среде 24G2, подвергали поверхностному окрашиванию в течение 20 мин на льду, фиксировали в 2% параформальдегиде в течение 20 мин на льду, подвергали внутриклеточному окрашиванию в присутствии 0,5% сапонина в течение 45 мин на льду с последующей заключительной отмывкой перед анализом. Для окрашивания апоптических клеток за 5 мин до анализа добавляли аннексина-V-Cy5.

Пример 11. Формирование антиген-специфической иммунной толерантности к терапевтическим белкам посредством молекулы-гибрида, содержащей связывающийся с эритроцитами пептид и конъюгированный антиген.

Вариант аспарагиназы, связывающийся с эритроцитом (ERY1-ASNase), создавали с помощью конъюгации с пептидом ERY1 мыши, специфичным для эритроцитов (Kontos and Hubbell, 2010). Для определения иммуногенности аспарагиназы, связывающейся с эритроцитами, по сравнению с аспарагиназой дикого типа было проведено исследование для оценки двух режимов, а именно применение режима с 2 дозами и 6 дозами конъюгата ERY (ERY1-ASNase) или нативной формы (аспарагиназа медак, Medac GmbH; которую также применяли в качестве исходного материала для создания конъюгата ERY1-ASNase). В каждом режиме 15 мкг ERY1-ASNase или ASNase вводили внутривенно каждые 2 дня, кровь забирали каждые 7 дней.

После воздействия терапевтических доз измеряли титры антител в различные моменты времени вплоть до 21 дня после заключительной инъекции. Результат явно указывал на значительное снижение иммуногенности в процессе конъюгации эритроцитов при полном отсутствии антител, наблюдаемых в сериях в режиме с 2 дозами и в режиме с 6 дозами (фиг. 11). В отличие от этого, нативная аспарагиназа дикого типа (применяемая в настоящее время в клинической практике в препарате аспарагиназа медак) индуцировала выраженный иммунитет даже после прохождения режима с 2 дозами.

Для определения того, индуцировала ли связывающаяся с эритроцитами аспарагиназа истинную иммунную толерантность к аспарагиназе дикого типа, было проведено профилактическое исследование. Мышей, которым ранее вводили аспарагиназу дикого типа для клинического применения, подвергали стимуляции с помощью дополнительной дозы после начала выработки гуморального иммунитета. После повторного введения белка уровни антител повышались или оставались высокими; это характерно для опасной клинической ситуации гиперчувствительности и шоковых реакций по отношению к терапевтическому средству. Мыши, ранее обработанные аспарагиназой, конъюгированной с ERY1, не смогли индуцировать эффективный ответ с выработкой антител даже после шести стимуляций аспарагиназой дикого типа. Мыши, подвергнутые толеризации аспарагиназой, связывающейся с эритроцитами, вырабатывали в среднем примерно в 6000 раз меньше антител к аспарагиназе дикого типа для клинического применения.

Способ конъюгации ERY1 и ASNase.

10 мол. экв. сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC, CAS № 64987-85-5, Thermo Scientific), растворенного в диметилформамиде, вводили в реакцию с 5 мг/мл аспарагиназой медак в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. После обессоливания на спин-колонке для обессоливания ZEBA на 2 мл (Thermo Scientific) добавляли 2,5 экв. пептида ERY1, растворенного в 3М гуанидине-HCl, и предоставляли возможность протекания реакции в течение 2 ч при комнатной температуре. Конъюгат обессоливали с помощью спин-колонки для обессоливания ZEBA на 2 мл, 0,2 мкл фильтровали в стерильных условиях, распределяли в рабочие аликвоты и хранили при температуре -20°C. Концентрацию белка определяли с помощью BCA-анализа (Thermo Scientific). Реализация этой схемы приводила к конъюгации боковой цепи цистеина пептида с боковыми цепями лизина белка.

Способ определения связывания с помощью проточной цитометрии.

Свежевыделенную кровь человека разбавляли в 100 раз в PBS с добавлением 20 мг/мл BSA. К 100 нМ аспарагиназы добавляли примерно 500000 эритроцитов и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После отмывания клетки инкубировали с антителами козы к аспарагиназе (Abnova) в течение 30 мин на льду. После второго цикла отмывания клетки инкубировали с антителом к IgG козы, конъюгированным с ALEXAFLUOR488 (Invitrogen), в течение 20 мин на льду. После заключительного отмывания клетки анализировали на проточном питометре для выявления аспарагиназы, связанной с эритроцитами.

Способ введения аспарагиназы.

Желаемые дозы ERY1-ASNase или ASNase получали в стерильном 0,9% физиологическом растворе, и 100 мкл раствора инъецировали в хвостовую вену подвергнутых анестезии мышей линии C57BL/6. Кровь забирали в предварительно определенные моменты времени через прокол щеки или надрезы на хвосте.

Способ определения антител к аспарагиназе в сыворотке.

Сыворотку, взятую в экспериментальных группах, подвергали последовательному разведению в PBS и инкубировали в течение 2 ч при RT в планшетах для ELISA, покрытых ASNase. В качестве детекторного антитела применяли антитело к IgG мыши, конъюгированное с HRP (Southern Biotech).

Пример 12. Иммунная реверсия для формирования толерантности после иммунной реакции.

В клинической практике в случае, если у пациента уже индуцирован иммунитет (подтвержденный присутствием антител к лекарственному средству) к терапевтическому белку или к белку, представляющему интерес, желательной является реверсия иммунного ответа на лекарственное средство с обеспечением, таким образом, возможности дальнейшего применения терапевтического средства. Также клинически доступный микробный фермент аспарагиназу применяли в этом примере для демонстрации индукции толерантности к терапевтическому белку у мышей с предсуществующим иммунитетом к аспарагиназе. Вариант аспарагиназы, связывающийся с эритроцитами (ERY1-ASNase), создавали с помощью конъюгации с пептидом ERY1 мыши, специфичным для эритроцитов.

Для определения того, могла ли связывающаяся с эритроцитами аспарагиназа вызвать реверсию иммунного ответа на аспарагиназу для клинического применения, было проведено перекрестное исследование. Мышам внутривенно вводили несколько доз аспарагиназы дикого типа с интервалами в два дня.

Спустя 21 день после введения в сыворотке выявляли высокие уровни антител к аспарагиназе. Затем иммунизированных мышей подвергали терапевтической обработке связывающейся с эритроцитами аспарагиназой в режимах с различными дозами. В обоих режимах дозирования аспарагиназа, конъюгированная с ERY, снижала уровни антител примерно в 10 раз, таким образом, вызывая реверсию предсуществующего гуморального иммунитета.

Способ конъюгации ERY1 и ASNase.

10 мол. экв. сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилата (SMCC, CAS № 64987-85-5, Thermo Scientific), растворенного в диметилформамиде, вводили в реакцию с 5 мг/мл аспарагиназой медак в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре. После обессоливания на спин-колонке для обессоливания ZEBA на 2 мл (Thermo Scientific) добавляли 2,5 экв. пептида ERY1, растворенного в 3М гуанидине-HCl, и предоставляли возможность протекания реакции в течение 2 ч при комнатной температуре. Конъюгат обессоливали с помощью спин-колонки для обессоливания ZEBA на 2 мл, 0,2 мкл фильтровали в стерильных условиях, распределяли в рабочие аликвоты и хранили при температуре -20°C. Концентрацию белка определяли с помощью BCA-анализа (Thermo Scientific). Реализация этой схемы приводила к конъюгации боковой цепи цистеина пептида с боковыми цепями лизина белка.

Способ определения связывания с помощью проточной цитометрии.

Свежевыделенную кровь человека разбавляли в 100 раз в PBS с добавлением 20 мг/мл BSA. К 100 нМ аспарагиназы добавляли примерно 500000 эритроцитов и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После отмывания клетки инкубировали с антителами козы к аспарагиназе (Abnova) в течение 30 мин на льду. После второго цикла отмывания клетки инкубировали с антителом к IgG козы, конъюгированным с ALEXAFLUOR488 (Invitrogen), в течение 20 мин на льду. После заключительного отмывания клетки анализировали на проточном питометре для выявления аспарагиназы, связанной с эритроцитами.

Способ введения аспарагиназы.

Желаемые дозы ERY1-ASNase или ASNase получали в стерильном 0,9% физиологическом растворе и 100 мкл раствора инъецировали в хвостовую вену подвергнутых анестезии мышей линии C57BL/6. Кровь забирали в предварительно определенные моменты времени через прокол щеки или надрезы на хвосте.

Способ определения антител к аспарагиназе в сыворотке.

Сыворотку, взятую в экспериментальных группах, подвергали последовательному разведению в PBS и инкубировали в течение 2 ч при RT в планшетах для ELISA, покрытых ASNase. В качестве детекторного антитела применяли антитело к IgG мыши, конъюгированное с HRP (Southern Biotech).

Пример 13. Разработка антител и фрагментов антител, которые связываются с эритроцитами мыши и/или человека.

Было создано несколько конструкторов на основе связывающихся с эритроцитами антигенов. Они включают таковые, относящиеся к белковому уровню: TER119-SIINFEKL, TER119-ChrA и TER119-проинсулин. Также они включают таковые, относящиеся к генетическому уровню: TER119-SIINFEKL, TER119-ChrA, TER119-проинсулин, TER119-уриказу, TER119-InsB9-23, TER119-ISQAVHAAHAEINEAGR (SEQ ID NO: 80), TER119-H-2kb, TER119-H-2kd, 10F7-SIINFEKL, 10F7-ChrA, 10F7-проинсулин и 10F7-уриказу.

Способы.

мРНК из гибридного клона TER-119 получали в подарок от проф. Shozo Izui из Университета Женевы, Швейцария. Для создания комплементарной ДНК (кДНК) клона выполняли стандартную ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) с помощью системы синтеза первой цепи SUPERSCRIPT III (Invitrogen). Затем проводили ПЦР с помощью следующего набора праймеров для специфической амплификации последовательностей ДНК, соответствующих переменным участкам тяжелой (VH) и легкой (VL) цепи антитела.

Название праймера	Последовательность праймера (от 5' к 3')	SEQ ID NO
VL-FOR1	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C	SEQ ID NO:81
VL-FOR2	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C	SEQ ID NO:82
VL-FOR3	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C	SEQ ID NO:83
VL-FOR4	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C	SEQ ID NO:84
VL-FOR5	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C	SEQ ID NO:85
VL-FOR6	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C	SEQ ID NO:86
VL-FOR7	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C	SEQ ID NO:87
VL-FOR8	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C	SEQ ID NO:88
VL-FOR9	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C	SEQ ID NO:89
VL-FOR10	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C	SEQ ID NO:90
VL-FOR11	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART C	SEQ ID NO:91
VL-FOR12	AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C	SEQ ID NO:92
VL-FOR13	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C	SEQ ID NO:93
VL-FOR14	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A	SEQ ID NO:94
VL-FOR15	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T	SEQ ID NO:95
VL-FOR16	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C	SEQ ID NO:96

035931

VL-FOR17	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C	SEQ ID NO:97
VL-FOR18	AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C	SEQ ID NO:98
VL-REV1	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTG ATT TCC AGC TTG G	SEQ ID NO:99
VL-REV2	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT TCC AGC TTG G	SEQ ID NO:100
VL-REV3	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTT ATT TCC AAC TTT G	SEQ ID NO:101
VL-REV4	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CGT TTC AGC TCC AGC TTG G	SEQ ID NO:102
VL-REV5	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA GTC AGT TTG G	SEQ ID NO:103
VL-REV6	GAT GGT GCG GCC GCA GTA CCT AGG ACA GTG ACC TTG G	SEQ ID NO:104
VH-FOR1	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC	SEQ ID NO:105
VH-FOR2	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	SEQ ID NO:106
VH-FOR3	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT GCA GCT GAA GSA STC	SEQ ID NO:107
VH-FOR4	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC	SEQ ID NO:108
VH-FOR5	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC	SEQ ID NO:109
VH-FOR6	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC	SEQ ID NO:110
VH-FOR7	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC	SEQ ID NO:111
VH-FOR8	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC	SEQ ID NO:112
VH-FOR9	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC	SEQ ID NO:113
VH-FOR10	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC	SEQ ID NO:114
VH-FOR11	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC	SEQ ID NO:115
VH-FOR12	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC	SEQ ID NO:116
VH-FOR13	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC	SEQ ID NO:117
VH-FOR14	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC	SEQ ID NO:118
VH-FOR15	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC	SEQ ID NO:119
VH-FOR16	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG	SEQ ID NO:120
VH-FOR17	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC	SEQ ID NO:121
VH-FOR18	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC	SEQ ID NO:122
VH-FOR19	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC	SEQ ID NO:123
VH-REV1	CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAA ACG GTG ACC GTG GT	SEQ ID NO:124
VH-REV2	CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACT GTG AGA GTG GT	SEQ ID NO:125
VH-REV3	CCC TTG AAG CTT GCT GCA GAG ACA GTG ACC AGA GT	SEQ ID NO:126
VH-REV4	CCC TTG AAG CTT GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG GT	SEQ ID NO:127

Затем амплифицированные гены VH и VL расщепляли с помощью рестрикционных эндонуклеаз (NcoI и NotI для VL, NdeI и HindIII для VH), фрагменты гена очищали после электрофореза в агарозном геле с помощью стандартного набора (Zymo Research, Ориндж, Калифорния, США) и лигировали в клонирующую плазмиду pMAZ360. Затем клонирующую плазмиду секвенировали для определения последовательности ДНК генов VH и VL TER119.

ДНК-конструкты, соответствующие конъюгатам TER119-антиген и 10F7-антиген, разрабатывали и синтезировали коммерческим путем и получали из DNA2.0 (Менло-Парк, Калифорния, США).

Каждый полностью сформированный ген scFv расщепляли с помощью SfiI и XhoI (NEB, Ипсуич, Массачусетс, США) и лигировали в те же самые сайты в плазмиде для экспрессии у млекопитающих pSecTagA (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США).

Пример 14. Индукция толерантности к диабетогенным антигенам с помощью связывающихся с эритроцитами антигенов диабета.

Пептидный мимотоп хромогранина А (обозначаемый 1040-p31 или ChrA) сконструировали связывающимся с эритроцитами мыши путем рекомбинантной гибридизации пептида с scFv TER119, специфичным для эритроцитов. Полученный scFv, обозначаемый в данном документе TER119-ChrA, прочно связывался с эритроцитами мыши (данные не показаны). Для изучения поведения Т-клеток по отношению к вариантам антигена хромогранина А применяли трансгенную мышь линии NODBDC2.5, которая содержит специфические Т-клетки для распознавания антигена хромогранина А. Для определения того, подвергался ли процессингу и был ли представлен TER119-ChrA молекулами главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС-II) в достаточной степени для примирования Т-клеток BDC2.5, антиген добавляли в систему совместной культуры дендритных клеток селезенки BDC2.5 и CD4⁺ Т-клеток. Как показано на фиг. 12, TER119-ChrA подвергался эффективному процессингу, и соответствующий антигенный домен был представлен молекулами МНС-II для примирования антиген-специфической пролиферации трансгенных CD4⁺ Т-клеток BDC2.5 *in vitro*, которая является необходимой для формирования толерантности Т-клеток *in vivo*.

Для определения последствий связывания эритроцитов с аутоантигеном при пролиферации CD4⁺ клеток *in vivo* проводили аналогичное исследование пролиферации с применением CD4⁺ Т-клеток BDC2.5, меченных флуоресцентной молекулой CFSE. После адоптивного переноса меченых CD4⁺ Т-клеток BDC2.5 мышам NOD, ранее не использовавшимся в подобном исследовании, внутривенно вводили 10 мкг TER119-ChrA или эквивалентную дозу свободного растворимого пептида 1040-p31. Как показано на фиг. 13, мыши, обработанные TER119-ChrA, содержали гораздо меньше непролиферирующих CD4⁺ Т-клеток BDC2.5 в лимфатических узлах селезенки и поджелудочной железы (pLN) по сравнению с мышами, обработанными растворимым пептидом 1040-p31. Эти данные показывают, что связывающийся с эритроцитами антиген активирует эффективные антиген-специфическую передачу сигналов CD4⁺ Т-клеткам и их примирование способом, функционально отличающимся от такового в случае растворимого антигена, подобным описанному авторами изобретения во всесторонних исследованиях делеционной толерантности CD8⁺ Т-клеток. Такое выраженное системное (селезенка) и локальное (лимфатический узел поджелудочной железы) уменьшение количества диабетогенных Т-клеток является четким положительным свидетельством благоприятного результата контроля начала заболевания.

Пример 15. Индукция толерантности к инсулину.

Как уже показано в данном документе (например, см. пример 14), толерантность можно сформировать по отношению к различным антигенам. В данном примере описывается, как можно сформировать толерантность к инсулину. Для индукции толерантности к инсулину, который является другим антигеном островковых клеток, распознаваемым диабетогенными Т-клетками, инсулин сконструировали связывающимся с эритроцитами мыши путем рекомбинантной гибридизации с scFv TER119, специфичным для эритроцитов мыши. Полученный scFv, обозначаемый в данном документе как TER119-проинсулин, применяли в традиционной мышинной модели спонтанного начала T1D, а именно на мышях NOD/ShiLt. Мышей NOD/ShiLt спонтанно подвергали опосредованному клетками иммунной системы разрушению инсулинпродуцирующей ткани поджелудочной железы, индуцируя, таким образом, гипергликемию и начало клинических проявлений заболевания. Аналогично, для формирования толерантности к инсулину у людей можно применять инсулин человека и факторы, связывающиеся с эритроцитами человека.

Для демонстрации толерантности в этой устойчивой мышинной модели спонтанного аутоиммунного заболевания молодым мышам (в возрасте ~3 недель) необходимо вводить TER119-проинсулин в различные временные интервалы и в различных дозах с целью функциональной инактивации и/или делеции инсулин-реактивных Т-клеток. Для оценки гипергликемии и начала клинических проявлений заболевания контролируют уровни глюкозы у обработанных мышей. TER119-проинсулин также применяют в терапевтическом режиме с целью индукции ремиссии заболевания. В таком исследовании TER119-проинсулин вводят мышам с впервые выявленной гипергликемией в различных дозах и при различных временных интервалах, и уровни глюкозы контролируют для оценки снижения интенсивности гипергликемии и восстановления гомеостаза, что демонстрирует, таким образом, ремиссию начальных клинических проявлений T1D.

Пример 16. Формирование толерантности к клеточным имплантатам и трансплантатам с помощью

связывающихся с эритроцитами молекул МНС.

В качестве примера предложен способ формирования толерантности к имплантатам. Разработаны молекулы МНС, связывающиеся с эритроцитами, путем химической конъюгации пептидов, связывающихся с эритроцитами, с растворимыми доменами МНС. Альтернативно, молекула МНС может экспрессироваться рекомбинантным путем в виде гибрида с scFv, специфичным для эритроцитов.

Для демонстрации толерантности к молекулам МНС путем связывания с эритроцитами проводят исследования на мышинных моделях клеточных имплантатов, таких как опухолевые имплантаты, кожные имплантаты, трансплантаты островковых клеток и трансплантаты гемопоэтических клеток. В каждом исследовании мыш-носитель подвергают толеризации к молекулам класса МНС донора путем введения молекул МНС, связывающихся с эритроцитами, до или во время процедуры имплантации. Приживление имплантата контролируют с помощью способов, пригодных для каждого исследования; т.е. измерения роста опухоли в опухолевых имплантатах, контроля некроза или роста тканей в кожном трансплантате, контроля массы островковых клеток и гликемии в трансплантатах островковых клеток и характеристики химеризма в трансплантатах гемопоэтических клеток.

Дополнительное раскрытие

Вариантом осуществления является способ выработки иммунотолерантности, при этом способ включает введение композиции, содержащей гибридную молекулу, которая содержит толерогенный антиген и связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с эритроцитами пациента и соединяется, таким образом, с антигеном эритроцита, где гибридная молекула вводится в количестве, эффективном для выработки иммунотолерантности к веществу, которое содержит толерогенный антиген. Вариантом осуществления является способ, в котором гибридная молекула содержит по меньшей мере один связывающийся с эритроцитами фрагмент, непосредственно ковалентно связанный с антигеном, например гибридный белок, содержащий этот фрагмент и антиген. Вариантом осуществления является способ, где гибридная молекула содержит по меньшей мере один связывающийся с эритроцитами фрагмент, присоединенный к частице, которая присоединена к антигену или содержит его, например, где частица выбрана из группы, включающей микрочастицу, наночастицу, липосому, полимерному и мицеллу. Вариантом осуществления является случай, в котором толерогенный антиген содержит часть терапевтического белка, например, белок содержит фактор VIII или фактор IX. Вариантом осуществления является случай, в котором толерогенный антиген содержит часть белка, отличного от белка человека. Вариантом осуществления является случай, в котором белок включает в себя аденозиндезаминазу, L-аспарагиназу, расбуриказу, антитимоцитарный глобулин, L-аргиназу и L-метионазу. Вариантом осуществления является способ, в котором пациентом является человек, а толерогенный антиген содержит часть белка, не встречающегося в природе. Вариантом осуществления является случай, в котором пациентом является человек, а толерогенный антиген содержит гликан белка, имеющего гликозилирование, отличное от гликозилирования у человека. Вариантом осуществления является случай, в котором толерогенный антиген содержит по меньшей мере часть трансплантационного антигена человека. Вариантом осуществления является случай, в котором толерогенный антиген содержит часть белка, характерного для аутоиммунного заболевания человека, например, выбранного из группы, включающей препроинсулин, проинсулин, инсулин, GAD65, GAD67, IA-2, IA-2 β , тиреоглобулин, тиреоидную пероксидазу, рецептор тиреотропина, основной белок миелина, миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин, протеолипидный белок, коллаген II, коллаген IV, ацетилхолиновый рецептор, матриксный металлопротеин 1 и 3, белок теплового шока 47 типа молекулярного шаперона, фибриллин-1, α -рецептор PDGF, β -рецептор PDGF и ядерный белок SS-A. Вариантом осуществления является случай, в котором толерогенный антиген представляет собой часть пищи человека, например, выбран из группы, включающей конарахин (Ara h 1), аллерген II (Ara h 2), арахисовый агглютинин (Ara h 6); α -лактальбумин (ALA), лактотрансферрин, глютен, низкомолекулярный глютен, α - и γ -глиадин, гордеин, секалин и авенин. Вариантом осуществления является случай, в котором связывающийся с эритроцитами фрагмент выбран из группы, включающей пептидный лиганд, антитело, фрагмент антитела и однопочечный антигенсвязывающий домен (scFv). Вариантом осуществления является случай, в котором связывающийся с эритроцитами фрагмент включает в себя антитело, фрагмент антитела или scFv, полученные из гибридома, которая вырабатывает антитело к эритроциту, при этом гибридома выбрана из группы, включающей BRIC 4, BRIC 5, BRIC 6, BRIC 10, BRIC 14, BRIC 18, BRIC 39, BRIC 66, BRIC 68, BRIC 69, BRIC 87, BRIC 108, BRIC 110, BRIC 111, BRIC 125, BRIC 126, BRIC 128, BRIC 145, BRIC 155, BRIC 157, BRIC 163, BRIC 170, BRIC 198, BRIC 203, BRIC 216, BRIC 220, BRIC 221, BRIC 222, BRIC 229, BRIC 230, BRIC 231, BRIC 235, BRIC 256, BRAC 17, BRAC 18, BGRL 1, BGRL 2, BGRL 11, BGRL 100, BRAD 3, BIRMA D6, BIRMA D10, BIRMA K3, BIRMA K3, 84B; 6A7; COE или KZ1. Вариантом осуществления является случай, в котором связывающийся с эритроцитами фрагмент специфически связывается с биомолекулой, выбранной из группы, включающей белок полосы 3 (CD233), аквапорин-1, Glut-1, антиген Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, гликофорин A, гликофорин B (CD235b), гликофорин C (CD235c), гликофорин D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARci (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), глобозид, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2

(CD99), EMMPRIN/нейротелин (CD 147), JMH, гликозилтрансферазу, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, стоматин, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 и антиген H (CD173). Толерогенный антиген может содержать мимотоп.

Вариантом осуществления является случай, в котором scFv включает в себя некоторую часть или весь 10F7, например один или несколько фрагментов легкой цепи 10F7 и/или тяжелой цепи 10F7 и/или вариант легкой цепи 10F7 и/или тяжелой цепи 10F7 с более высокой аффинностью. Вариантом осуществления является способ, в котором связывающийся с эритроцитами фрагмент включает в себя пептидный лиганд, содержащий по меньшей мере 5 последовательных аминокислотных остатков последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 1 и их консервативные замены, где указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом.

Вариантом осуществления является композиция, содержащая гибридную молекулу, которая содержит толерогенный антиген и связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с эритроцитом пациента и, таким образом, связывает антиген с эритроцитом. Примером является случай, в котором связывающийся с эритроцитами фрагмент ковалентно связывается с антигеном. Другим примером является случай, в котором гибридная молекула содержит связывающийся с эритроцитами фрагмент, прикрепленный к частице, которая прикреплена к антигену, например, к микрочастице, наночастице, липосоме, полимерсое или мицелле. Примерами толерогенного антигена являются: часть терапевтического белка, часть белка, отличного от белка человека, часть белка, в естественных условиях не встречающегося у человека (включая полную часть, т.е. весь белок), гликан белка, имеющего гликозилирование, отличное от гликозилирования у человека, часть аутоиммунного антигена человека, часть пищи человека. Вариантом осуществления является композиция, в которой связывающийся с эритроцитами фрагмент выбран из группы, включающей пептидный лиганд, антитело, фрагмент антитела и одноцепочечный антигенсвязывающий домен (scFv), например весь 10F7 или его часть. Связывающийся с эритроцитами фрагмент может включать в себя пептидный лиганд, содержащий по меньшей мере 5 последовательных аминокислотных остатков последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 1 и их консервативные замены, где указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом. Связывающийся с эритроцитами фрагмент может включать в себя пептидный лиганд, который имеет константу диссоциации от приблизительно 10 мкМ до 0,1 нМ, определенную с помощью измерений равновесного связывания между пептидом и эритроцитами. Вариантом осуществления является случай, в котором связывающийся с эритроцитами фрагмент включает в себя антитело, фрагмент антитела или scFv, полученные из гибридомы, которая вырабатывает антитело к эритроциту, при этом гибридома выбрана из группы, включающей BRIC 4, BRIC 5, BRIC 6, BRIC 10, BRIC 14, BRIC 18, BRIC 39, BRIC 66, BRIC 68, BRIC 69, BRIC 87, BRIC 108, BRIC 110, BRIC 111, BRIC 125, BRIC 126, BRIC 128, BRIC 145, BRIC 155, BRIC 157, BRIC 163, BRIC 170, BRIC 198, BRIC 203, BRIC 216, BRIC 220, BRIC 221, BRIC 222, BRIC 229, BRIC 230, BRIC 231, BRIC 235, BRIC 256, BRAC 17, BRAC 18, BGRL 1, BGRL 2, BGRL 11, BGRL 100, BRAD 3, BIRMA D6, BIRMA D10, BIRMA K3, BIRMA K3, 84B; 6A7; COE или KZ1. Вариантом осуществления является случай, при котором связывающийся с эритроцитами фрагмент специфически связывается с биомолекулой, выбранной из группы, включающей белок полосы 3 (CD233), аквапорин-1, Glut-1, антиген Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, гликофорин А, гликофорин В (CD235b), гликофорин С (CD235c), гликофорин D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARci (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), глобозид, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/нейротелин (CD 147), JMH, гликозилтрансферазу, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, стоматин, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 и антиген H (CD173). Толерогенный антиген может содержать мимотоп.

Толерогенные композиции можно применять для лечения патологического состояния, например патологического состояния, выбранного из группы, включающей отторжение трансплантата, аутоиммунное заболевание, пищевую аллергию и иммунный ответ на терапевтическое средство.

Вариантом осуществления является фармацевтически приемлемая композиция для применения при иммунной реверсии иммунного ответа на вещество, содержащее молекулу-гибрид, которая содержит связывающийся с эритроцитами фрагмент и антиген вещества. Композиция может содержать толерогенный антиген, выбранный, например, из группы, включающей белок, часть белка, белок человека или его часть, белок, отличный от белка человека, или его часть, гликан, гликан белка, имеющего гликозилирование, отличное от гликозилирования у человека, аутоиммунный антиген человека, белок, являющийся терапевтическим для человека, или его часть и часть пищи человека. Композиция может содержать толерогенный антиген, выбранный, например, из группы, включающей белки, для которых характерна недостаточность в связи с генетическим заболеванием, белки с гликозилированием, отличным от гликозилирования у человека, белки, отличные от белков человека, синтетические белки, в естественных условиях не встречающиеся у людей, антигены пищи человека, трансплантационные антигены человека и аутоиммунные антигены человека. Можно предложить связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с биомолекулой, выбранной из группы, включающей белок полосы 3 (CD233),

аквапорин-1, Glut-1, антиген Kidd, RhAg/Rh50 (CD241), Rh (CD240), Rh30CE (CD240CE), Rh30D (CD240D), Kx, гликофорин А, гликофорин В (CD235b), гликофорин С (CD235c), гликофорин D (CD235d), Kell (CD238), Duffy/DARCI (CD234), CR1 (CD35), DAF (CD55), глобозид, CD44, ICAM-4 (CD242), Lu/B-CAM (CD239), XG1/XG2 (CD99), EMMPRIN/нейротелин (CD 147), JMH, гликозилтрансферазу, Cartwright, Dombrock, C4A/CAB, Scianna, MER2, стоматин, BA-1 (CD24), GPIV (CD36), CD108, CD139 и антиген H (CD173). Связывающийся с эритроцитами фрагмент можно выбрать из группы, включающей пептидный лиганд, антитело, фрагмент антитела и одноцепочечный антигенсвязывающий домен (scFv). Связывающийся с эритроцитами фрагмент можно получить так, чтобы он содержал антитело, фрагмент антитела или scFv, полученные из гибридомы, которая вырабатывает антитело к эритроциту, при этом гибридома выбрана из группы, включающей BRIC 4, BRIC 5, BRIC 6, BRIC 10, BRIC 14, BRIC 18, BRIC 39, BRIC 66, BRIC 68, BRIC 69, BRIC 87, BRIC 108, BRIC 110, BRIC 111, BRIC 125, BRIC 126, BRIC 128, BRIC 145, BRIC 155, BRIC 157, BRIC 163, BRIC 170, BRIC 198, BRIC 203, BRIC 216, BRIC 220, BRIC 221, BRIC 222, BRIC 229, BRIC 230, BRIC 231, BRIC 235, BRIC 256, BRAC 17, BRAC 19, BGRL 1, BGRL 2, BGRL 11, BGRL 100, BRAD 3, BIRMA D6, BIRMA D10, BIRMA K3, BIRMA K3, 84B; 6A7; COE или KZ1.

Варианты осуществления включают молекулу-гибрид, содержащую связывающийся с эритроцитами фрагмент и антиген аспарагиназы. Как видно из многочисленных раскрытий связывающихся с эритроцитами фрагментов, существует множество их возможных вариантов, в том числе scFv, который связывается с эритроцитом человека, или пептидный связывающий лиганд, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и их консервативные замены, где указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом. Такую композицию, содержащую молекулу-гибрид, можно применять для индукции толерантности к аспарагиназе.

Варианты осуществления включают молекулу-гибрид, содержащую связывающийся с эритроцитами фрагмент и антиген хромогранина А. Антиген может являться мимотопом или некоторой частью молекулы хромогранина А или всей таковой. Как видно из многочисленных раскрытий связывающихся с эритроцитами фрагментов, существует множество их возможных вариантов, в том числе scFv, который связывается с эритроцитом человека, или пептидный связывающий лиганд, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и их консервативные замены, где указанная последовательность специфически связывается с эритроцитом. Такую композицию, содержащую молекулу-гибрид, можно применять для индукции толерантности к хромогранину А и/или для предупреждения сахарного диабета или снижения темпов прогрессирования заболевания, являющегося сахарным диабетом.

Другим примером является композиция, содержащая связывающийся с эритроцитами фрагмент, который специфически связывается с эритроцитом, соединенный с частицей, выбранной из группы, состоящей из синтетического полимера, разветвленного синтетического полимера и частицы. Частица может быть, например, микрочастицей, наночастицей, липосомой, полимерсомой и мицеллой. Композиция может дополнительно содержать толерогенный антиген, терапевтическое средство или лиганд, наводящий на опухоль.

Вариантом осуществления является одноцепочечный антигенсвязывающий домен (scFv), содержащий пептидный лиганд, который специфически связывается с эритроцитом. Пептид можно присоединять к scFv или располагать в линкерной части. Можно включать один или несколько пептидных лигандов.

Все заявки на патенты, патенты и публикации, упомянутые в данном документе, настоящим включены в данный документ посредством ссылки для всех целей; в случае конфликта контрольным документом является настоящее описание.

Список литературы

1. Pasut G & Veronese FM (2009) "PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: an overview." *Adv Drug Deliv Rev* 61(13):1177-1188.
2. Fishburn CS (2008) "The pharmacology of PEGylation: balancing PD with PK to generate novel therapeutics." *J Pharm Sci* 97(10):4167-4183.
3. Gao W, Liu W, Mackay JA, Zalutsky MR, Toone EJ, & Chilkoti A (2009) "In situ growth of a stoichiometric PEG-like conjugate at a protein's N-terminus with significantly improved pharmacokinetics." *Proc Natl Acad Sci USA* 106(36):15231-15236.
4. Huang L, Gough PC, & Defelippis MR (2009) "Characterization of poly(ethyleneglycol) and PEGylated products by LC/MS with postcolumn addition of amines." *Anal Chem* 81(2):567-577.
5. Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, Spence CL, Fung WJ, Porter JE, Ehrlich GK, Pan W, Xu ZX, Modi MW, Farid A, Berthold W, & Graves M (2001) "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C." *Bioconjug Chem* 12(2): 195-202.
6. Dhalluin C, Ross A, Leuthold LA, Foser S, Gsell B, Müller F, & Senn H (2005) "Structural and biophysical characterization of the 40 kDa PEG-interferon-alpha2a and its individual positional isomers." *Bioconjug Chem* 16(3):504-517.
7. Dennis M (2002) "Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 277(38):35035-35043.
8. Walker A, Dunlevy G, Rycroft D, Topley P, Holt LJ, Herbert T, Davies M, Cook F, Holmes S, Jespers L, & Herring C (2010) "Anti-serum albumin domain antibodies in the development of highly potent, efficacious and long-acting interferon." *Protein Engineering Design and Selection*.

9. Hall SS, Mitragotri S, & Daugherty PS (2007) "Identification of peptide ligands facilitating nanoparticle attachment to erythrocytes." *Biotechnol Prog* 23(3):749-754.
10. Godsel LM, Wang K, Schodin BA, Leon JS, Miller SD, & Engman DM (2001) "Prevention of autoimmune myocarditis through the induction of antigen-specific peripheral immune tolerance." *Circulation* 103(12): 1709-1714.
11. Luo X, Pothoven KL, McCarthy D, DeGutes M, Martin A, Getts DR, Xia G, He J, Zhang X, Kaufman DB, & Miller SD (2008) "ECDI-fixed allogeneic splenocytes induce donor-specific tolerance for long-term survival of islet transplants via two distinct mechanisms." *Proc Natl Acad Sci USA* 105(38):14527-14532.
12. Fife BT, Guleria I, Gubbels Bupp M, Eagar T, Tang Q, Bour-Jordan H, Yagita H, Azuma M, Sayegh MH, & Bluestone JA (2006) "Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by the PD-1-PD-L1 pathway." *J Exp Med* 203(12):2737-2747.
13. Miller SD, Turley DM, & Podojil JR (2007) "Antigen-specific tolerance strategies for the prevention and treatment of autoimmune disease." *Nat Rev Immunol* 7(9):665-677.
14. Maluccio MA, Covey AM, Porat LB, Schubert J, Brody LA, Sofocleous CT, Getrajdman GI, Jamagin W, Dematteo R, Blumgart LH, Fong Y, & Brown KT (2008) "Transcatheter arterial embolization with only particles for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma." *J Vase Interv Radiol* 19(6):862-869.
15. Gadaleta CD & Ranieri G (2010) "Trans-arterial chemoembolization as a therapy for liver tumours: New clinical developments and suggestions for combination with angiogenesis inhibitors." *Crit Rev Oncol Hematol*.
16. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, & Thorpe PE (1997) "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature." *Science* 275(5299):547-550.
17. Sheridan C (2010) "Fresh from the biologic pipeline-2009." *Nat Biotechnol*

28(4):307-310.

18. Maynard J & Georgiou G (2000) "Antibody engineering." *Annual review of biomedical engineering* 2:339-376.
19. Weisser NE & Hall JC (2009) "Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics." *Biotechnol Adv* 27(4):502-520.
20. Moghimi SM & Szebeni J (2003) "Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties." *Prog Lipid Res* 42(6):463-478.
21. Vogl TJ, Naguib NN, Nour-Eldin NE, Rao P, Emami AH, Zangos S, Nabil M, & Abdelkader A (2009) "Review on transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: palliative, combined, neoadjuvant, bridging, and symptomatic indications." *Eur J Radiol* 72(3):505-516.
22. Fonsatti E, Nicolay HJ, Altomonte M, Covre A, & Maio M (2010) "Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours." *Cardiovasc Res* 86(1):12-19.
23. Dienst A, Grunow A, Unruh M, Rabausch B, Nör JE, Fries JW, & Gottstein C (2005) "Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1-targeted recombinant fusion proteins." *CancerSpectrum Knowledge Environment* 97(10):733-747.
24. Ruoslahti E, Bhatia SN, & Sailor MJ (2010) "Targeting of drugs and nanoparticles to tumors." *J Cell Biol* 188(6):759-768.
25. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, Bakkers J, Mayo KH, Poirier F, & Griffioen AW (2006) "Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy." *Proc Natl Acad Sci USA* 103(43):15975-15980.
26. Schliemann C, Roesli C, Kamada H, Borgia B, Fugmann T, Klapper W, & Neri

- D (2010) "In vivo biotinylation of the vasculature in B-cell lymphoma identifies BST-2 as a target for antibody-based therapy." *Blood* 115(3):736-744.
27. Brack SS, Silacci M, Birchler M, & Neri D (2006) "Tumor-targeting properties of novel antibodies specific to the large isoform of tenascin-C." *Clin Cancer Res* 12(10):3200-3208.
28. Rybak J, Roesli C, Kaspar M, Villa A, & Neri D (2007) "The extra-domain A of fibronectin is a vascular marker of solid tumors and metastases." *Cancer Res* 67(22):10948-10957.
29. Mohandas N & Gallagher PG (2008) "Red cell membrane: past, present, and future." *Blood* 112(10):3939-3948.
30. Rice JJ & Daugherty PS (2008) "Directed evolution of a biterminal bacterial display scaffold enhances the display of diverse peptides." *Protein Eng Des Sel* 21(7):435-442.
31. Dane KY, Chan LA, Rice JJ, & Daugherty PS (2006) "Isolation of cell specific peptide ligands using fluorescent bacterial display libraries." *J Immunol Methods* 309(1-2): 120-129.
32. van der Vlies AJ, O'Neil CP, Hasegawa U, Hammond N, & Hubbell JA (2010) "Synthesis of pyridyldisulfide-functionalized nanoparticles for conjugating thiol-containing small molecules, peptides, and proteins." *Bioconjug Chem* 21(4):653-662.
33. O'Neil CP, van der Vlies AJ, Velluto D, Wandrey C, Demurtas D, Dubochet J, & Hubbell JA (2009) "Extracellular matrix binding mixed micelles for drug delivery applications." *J Control Release* 137(2): 146-151.
34. Velluto D, Demurtas D, & Hubbell JA (2008) "PEG-b-PPS diblock copolymer aggregates for hydrophobic drug solubilization and release: cyclosporin A as an example." *Mol Pharm* 5(4):632-642.
35. Reddy ST, Rehor A, Schmoekel HG, Hubbell JA, & Swartz MA (2006) "In

vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylenesulfide) nanoparticles." *J Control Release* 112(1):26-34.

36. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, & Hubbell JA (2007) "Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines." *Nat Biotechnol* 25(10):1159-1164.

37. Kontos S & Hubbell JA (2010) "Improving protein pharmacokinetics by engineering erythrocyte affinity." *Mol. Pharmaceutics* 7(6):2141-2147.

38. Khandelwal S & Saxena RK (2006) "Assessment of survival of aging erythrocyte in circulation and attendant changes in size and CD147 expression by a novel two step biotinylation method." *Exp Gerontol* 41(9):855-861.

39. Ferguson TA, Choi J, & Green DR (2011) "Armed response: how dying cells influence T-cell functions." *Immunol Rev* 241(1):77-88.

40. Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC, & Steinman RM (2008) "CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells." *Journal of immunology (Baltimore, MD:1950)* 181(10):6923-6933.

41. Holz LE, Warren A, Le Couteur DG, Bowen DG, & Bertolino P (2010) "CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes." *Journal of Autoimmunity* 34(1): 15-22.

42. Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, Kronenberg M, & Cheroutre H (2011) "Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders." *Journal of immunology (Baltimore, MD: 1950)* 186(10):5549-5555.

43. Thomson AW & Knolle PA (2010) "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment." *Nat Rev Immunol* 10(11):753-766.

44. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, & Bhardwaj N (1998) "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via

alphavbeta5 and CD36, and cross- present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* 188(7):1359-1368.

45. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, & Kroemer G (2009) "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nat Rev Immunol* 9(5):353-363.

46. Bursch LS, Rich BE, & Hogquist KA (2009) "Langerhans cells are not required for the CD8 T cell response to epidermal self-antigens." *J Immunol* 182(8):4657-4664.

47. Liu K, Iyoda T, Saternus M, Kimura Y, Inaba K, & Steinman RM (2002) "Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ." *J Exp Med* 196(8):1091-1097.

48. Darrah PA, Hegde ST, Patel DT, Lindsay RWB, Chen L, Roederer M, & Seder RA (2010) "IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform." *J Exp Med* 207(7):1421-1433.

49. Lee MS & Kim Y-J (2007) "Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk." *Am. Rev. Biochem.* 76:447-480.

50. Arnaboldi PM, Roth-Walter F, & Mayer L (2009) "Suppression of Th1 and Th17, but not Th2, responses in a CD8(+) T cell-mediated model of oral tolerance." *Mucosal Immunol* 2(5):427-438.

51. Saint-Lu N, Tourdot S, Razafindratsita A, Mascarell L, Berjont N, Chabre H, Louise A, Van Overtvelt L, & Moingeon P (2009) "Targeting the allergen to oral dendritic cells with mucoadhesive chitosan particles enhances tolerance induction." *Allergy* 64(7):1003-1013.

52. Mueller DL (2010) "Mechanisms maintaining peripheral tolerance." *Nat Immunol* 11(1):21-27.

53. Lutolf MP, Tirelli N, Cerritelli S, Cavalli L, & Hubbell JA (2001) "Systematic modulation of Michael-type reactivity of thiols through the use of charged amino

acids." *Bioconjug Chem* 12(6): 1051-1056.

54. Steiner D, Forrer P, & Pluckthun A (2008) "Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display." *Journal of Molecular Biology* 382(5):1211-1227.

55. Parmeggiani F, Pellarm R, Larsen AP, Varadamsetty G, Stumpp M, Zerbe O, Caflisch A, & Pluckthun A (2008) "Designed armadillo repeat proteins as general peptide-binding scaffolds: consensus design and computational optimization of the hydrophobic core." *Journal of Molecular Biology* 376(5): 1282-1304.

56. Hackel BJ, Kapila A, & Wittrup KD (2008) "Picomolar affinity fibronectin domains engineered utilizing loop length diversity, recursive mutagenesis, and loop shuffling." *J Mol Biol* 381(5): 1238-1252.

57. Silverman AP, Levin AM, Lahti JL, & Cochran JR (2009) "Engineered cystine-knot peptides that bind alpha(v)beta(3) integrin with antibody-like affinities." *Journal of Molecular Biology* 385(4):1064-1075.

58. Keefe AD, Pai S, & Ellington A (2010) "Aptamers as therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* 9(7):537-550.

59. Rockey WM, Huang L, Kloepping KC, Baumhover NJ, Giangrande PH, & Schultz MK (2011) "Synthesis and radiolabeling of chelator-RNA aptamer bioconjugates with copper-64 for targeted molecular imaging." *Bioorg Med Chem* 19(13):4080-4090.

60. Savla R, Taratula O, Garbuzenko O, & Minko T (2011) "Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer." *J Control Release* 153(1):16-22.

61. Sampson T (2003) "Aptamers and SELEX: the technology." *World Patent Information* (25): 123-129.

62. Getts DR, Getts MT, McCarthy DP, Chastain EML, & Miller SD (2010). "Have

we overestimated the benefit of human(ized) antibodies?" mAbs 2(6):682-694.

63. Chan AC, Carter J (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nature Publishing Group 10:301-316.

64. Getts DR, Getts MT, McCarthy DP, Chastain EML, Miller SD (2010) Have we overestimated the benefit of human(ized) antibodies? MAbs 2:682-694.

65. Jiskoot W, van Schie RMF, Carstens MG, Schellekens H (2009) Immunological risk of injectable drug delivery systems. Pharm Res 26:1303-1314.

66. Wang J et al. (2008) Neutralizing antibodies to therapeutic enzymes: considerations for testing, prevention and treatment. Nat Biotechnol 26:901-908.

67. Cartron JP, Colin Y (2001) Structural and functional diversity of blood group antigens. Transfus Clin Biol 8:163-199.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, включающая

связывающийся с эритроцитами фрагмент, представляющий собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент одноцепочечного антигенсвязывающего домена (scFv), который специфически связывается с Band3, гликофорином А, гликофорином В, гликофорином С или гликофорином D на эритроците человека *in situ* в крови,

и толерогенный антиген, представляющий собой антиген, вызывающий у субъекта нежелательный иммунный ответ,

причем композиция способна индуцировать (i) пролиферацию CD8⁺ Т-клеток, имеющих фенотип апоптотического или истощенного исхода, (ii) делецию CD4 и/или CD8⁺ Т-клеток, специфических для толерогенного антигена, и (iii) регуляторные клеточные фенотипы.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что антитело, его фрагмент и фрагмент scFv подвергнуты созреванию аффинности.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент получен из гибридомы.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент получен из клона 10F7.

5. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что толерогенный антиген представляет собой трансплантационный антиген, антиген пищи, терапевтическое средство, аутоантиген, фрагмент любого из таких антигенов или их мимотоп.

6. Фармацевтическая композиция, включающая связывающийся с эритроцитами фрагмент, представляющий собой пептидный лиганд, который специфически связывается с Band3, гликофорином А, гликофорином В, гликофорином С или гликофорином D на эритроците человека *in situ* в крови, и толерогенный антиген, представляющий собой трансплантационный антиген, антиген пищи, терапевтическое средство, аутоантиген, фрагмент любого из таких антигенов или их мимотоп, вызывающий нежелательный иммунный ответ.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент содержит пептидный лиганд, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17.

8. Фармацевтическая композиция по п.1 или 6, отличающаяся тем, что толерогенный антиген содержит

аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из инсулина, проинсулина, препроинсулина, декарбоксилаза-65 глутаминовой кислоты (GAD-65), GAD-67, инсулинома-ассоциированного белка 2 (IA-2), инсулинома-ассоциированного белка 2β (IA-2β), ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазы H, Imogen 38, GLIMA 38, хромогранина А, HSP-60, карбоксипептидазы E, периферина, переносчика глюкозы 2, панкреатит-ассоциированного белка, экспрессирующегося в гепатокарциноме, кишечнике и поджелудочной железе, S100β, глиофибрилярного кислого белка, гена регенерации II, панкреатического дуоденального гомеобокса 1, киназы гена миотонической дистрофии, специфичного для островковых клеток белка, родственного каталитической субъединице глюкозо-6-фосфатазы, и рецепторов 1-5, связанных с G-белком ССТ;

аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из основного белка миелина, миелинового олигодендроцитарного гликопротеина и протеолипидного белка;

антиген пищи, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из конарахина (Ara h 1), аллергена II (Ara h 2), арахисового агглютинина, конглютина (Ara h 6), α -лактальбумина (ALA), лакотрансферрина, аллергена Pen a 1 (Pen a 1), аллергена Pen m 2 (Pen m 2), быстрой изоформы тропомиозина, глиадина, высокомолекулярного глютенина, низкомолекулярного глютенина, α - и γ -глиадина, гордеина, овалбумина, секлаина и авенина;

трансплантационный антиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из белков МНС класса I, белков МНС класса II, минорных антигенов групп крови, RhCE, Kell, Kidd, Duffy и Ss; или

терапевтическое средство, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из фактора VIII, фактора IX, аспарагиназы и уриказы, фрагмента любого из таких антигенов или мимотопа любого из таких антигенов.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит линкер, и при этом указанный линкер представляет собой пептид, линейный или разветвленный полимер, ковалентную связь или ионную связь.

10. Фармацевтическая композиция по п.9, отличающаяся тем, что указанный линкер представляет собой разветвленный полимер, который повышает аффинность связывания с эритроцитом вследствие эффектов avidности, и при этом указанный разветвленный полимер необязательно конъюгирован с более чем одним связывающимся с эритроцитами фрагментом.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент, указанный линкер и указанный толерогенный антиген рекомбинантно гибридизированы или химически конъюгированы.

12. Применение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции по пп.1-11 для лечения нежелательного иммунного ответа.

13. Применение по п.12, где указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент содержит антитело, фрагмент антитела или фрагмент scFv, который специфически связывается с гликофорином А.

14. Применение по п.12, где указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент получен из клона 10F7.

15. Применение по п.12, где указанный толерогенный антиген представляет собой трансплантационный антиген, антиген пищи, терапевтическое средство, аутоантиген, фрагмент любого из таких антигенов или мимотоп любого из таких антигенов.

16. Применение по п.12, где указанная композиция дополнительно содержит линкер, при этом указанный линкер представляет собой пептид, линейный или разветвленный полимер, ковалентную связь, ионную связь, аптамер, нуклеиновую кислоту или частицу, и при этом указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент, указанный линкер и указанный толерогенный антиген необязательно рекомбинантно гибридизированы или химически конъюгированы.

17. Применение по любому из пп.12-16, где указанная композиция вводится субъекту перед нежелательным иммунным ответом на антиген.

18. Применение по любому из пп.12-17, где нежелательный иммунный ответ связан с заболеванием, выбранным из группы сахарный диабет 1 типа; рассеянный склероз; ревматоидный артрит; целиакия; витилиго; вульгарная пузырчатка и ее варианты; буллезный пемфигоид; гемофилия и рак.

19. Применение по любому из пп.12-17, где толерогенный антиген содержит аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из инсулина, проинсулина, препроинсулина, декарбоксилаза-65 глутаминовой кислоты (GAD-65), GAD-67, инсулинома-ассоциированного белка 2 (IA-2), инсулинома-ассоциированного белка 2 β (IA-2 β), ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазы H, Imogen 38, GLIMA 38, хромогранина А, HSP-60, карбоксипептидазы E, периферина, переносчика глюкозы 2, панкреатит-ассоциированного белка, экспрессирующегося в гепатокарциноме, кишечнике и поджелудочной железе, S100 β , глиофибрилярного кислого белка, гена регенерации II, панкреатического дуоденального гомеобокса 1, киназы гена миотонической дистрофии, специфичного для островковых клеток белка, родственного каталитической субъединице глюкозо-6-фосфатазы, и рецепторов 1-5, связанных с G-белком ССТ;

аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из основного белка миелина, миелинового олигодендроцитарного гликопротеина и протеолипидного белка; или

коллаген II, его фрагмент или его мимотоп;

тканевую трансглутаминазу, ее фрагмент или ее мимотоп;

аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из тирозиназы и тирозиназа-родственного белка 1 и 2;

аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из десмоглеина 3, десмоглеина 1, десмоглеина 4, пемфаксина, десмоколлинов, плакоглобина, перплакина, десмоплакинов и ацетилхолинового рецептора;

аутоантиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из BP180, BP230, плектина и ламинина 5;

антиген пищи, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из конарахина (Ara h 1), аллергена II (Ara h 2), арахисового агглютинина, конглютина (Ara h 6), α -лактальбумина (ALA), лакотрансферрина, аллергена Pen a 1 (Pen a 1), аллергена Pen m 2 (Pen m 2), быстрой изоформы тропомиозина, глиадина, высокомолекулярного глютенина, низкомолекулярного глютенина, α - и γ -глиадина, гордеина, овалбумина, секлаина и авенина;

трансплантационный антиген, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из белков МНС класса I, белков МНС класса II, минорных антигенов групп крови, RhCE, Kell, Kidd, Duffy и Ss; или

терапевтическое средство, его фрагмент или его мимотоп, выбранный из группы, состоящей из фактора VIII, фактора IX, аспарагиназы и уриказы.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающийся с эритроцитами фрагмент и толерогенный антиген, которые рекомбинантно гибридизированы или химически конъюгированы, отличающаяся тем, что

указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент представляет собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент одноцепочечного антигенсвязывающего домена (scFv), который специфически связывается с Band3, гликофоорином А, гликофоорином В, гликофоорином С или гликофоорином D на эритроците человека *in situ* в крови,

указанный толерогенный антиген представляет собой антиген, при воздействии которого у субъектов развивается нежелательный иммунный ответ; и

при этом толерогенный антиген представляет собой трансплантационный антиген, антиген пищи, терапевтическое средство, аутоантиген или фрагмент любого из таких антигенов.

21. Фармацевтическая композиция по п.20, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент представляет собой фрагмент антитела или scFv, который специфически связывается с гликофоорином А на эритроците человека *in situ* в крови.

22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.20, 21, отличающаяся тем, что антиген пищи выбран из группы глиадина, α -глиадина, γ -глиадина, фрагмента таких антигенов или мимотопа любого из таких антигенов.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп.20, 21, отличающаяся тем, что аутоантиген выбран из группы инсулина, проинсулина, препроинсулина, декарбоксилаза-65 глутаминовой кислоты (GAD-65), GAD-67, специфичного для островковых клеток белка, родственного каталитической субъединице глюкозо-6-фосфатазы, фрагмента таких антигенов и мимотопа любого из таких антигенов.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп.20, 21, отличающаяся тем, что аутоантиген выбран из группы основного белка миелина, миелинового олигодендрокитарного гликопротеина и протеолипидного белка, фрагмента таких антигенов и мимотопа любого из таких антигенов.

25. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.20-24 для производства лекарственного средства для лечения нежелательного иммунного ответа.

26. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 22-24 для производства лекарственного средства для лечения целиакии, для лечения сахарного диабета I типа или для лечения рассеянного склероза.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая связывающийся с эритроцитами фрагмент, представляющий собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент scFv, который специфически связывается с гликофоорином А человека, и толерогенный антиген, представляющий собой антиген пищи, терапевтическое средство или аутоантиген.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент представляет собой фрагмент антитела.

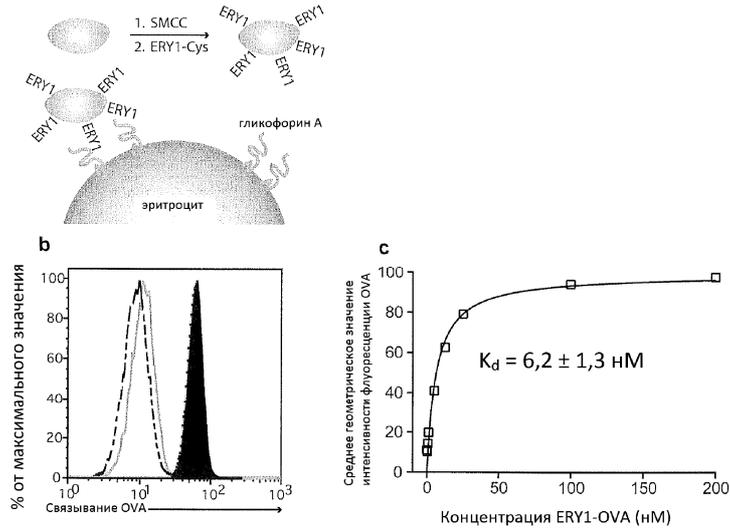
29. Фармацевтическая композиция по любому из пп.27, 28, отличающаяся тем, что указанный связывающийся с эритроцитами фрагмент гибридизирован, необязательно посредством линкера, с N- или C-концом толерогенного антигена.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.27-29, отличающаяся тем, что антиген пищи выбран из группы глиадина, α -глиадина, γ -глиадина, фрагмента таких антигенов или мимотопа любого из таких антигенов.

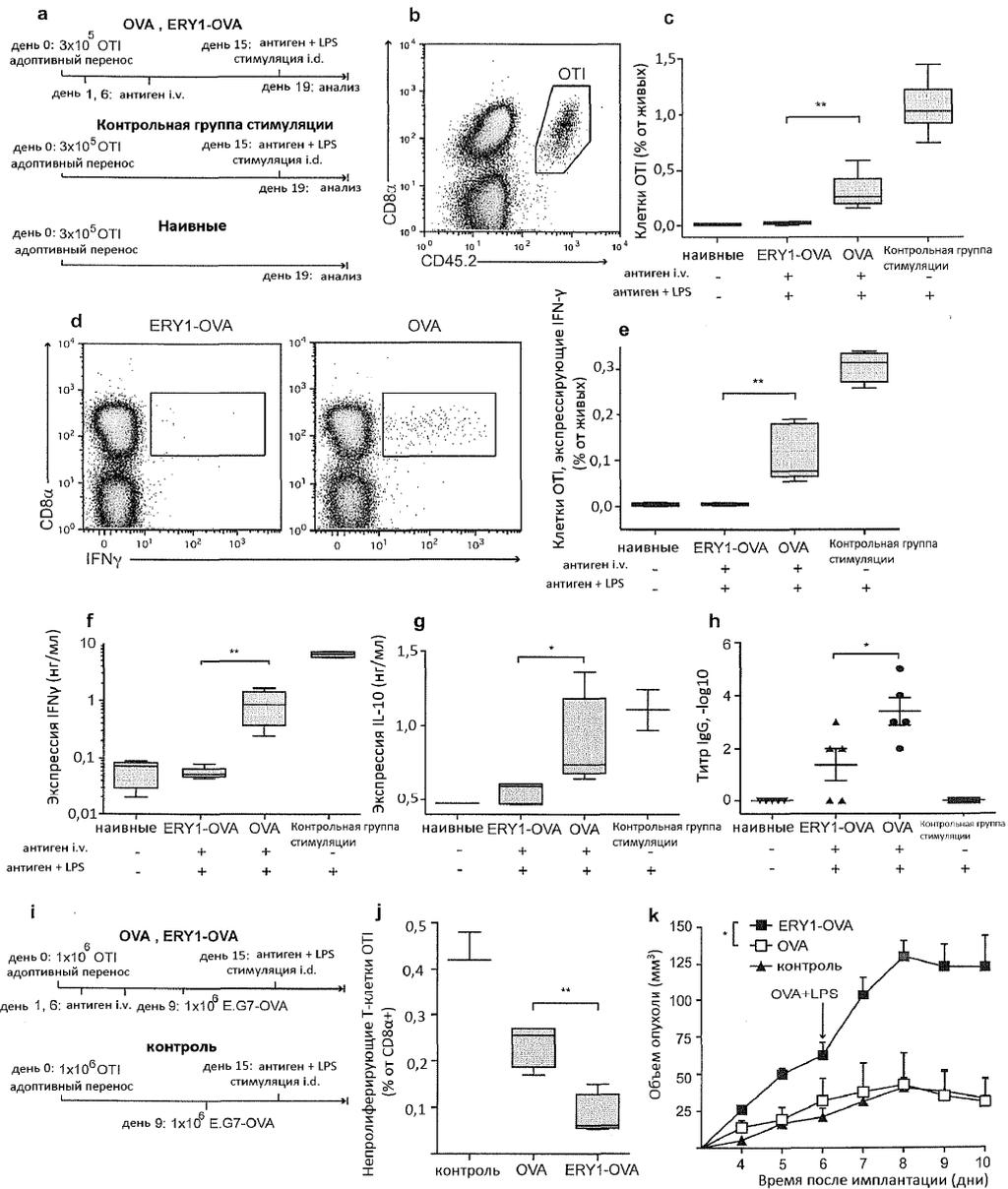
31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.27-29, отличающаяся тем, что аутоантиген выбран из группы инсулина, проинсулина, препроинсулина, декарбоксилаза-65 глутаминовой кислоты (GAD-65), GAD-67, специфичного для островковых клеток белка, родственного каталитической субъединице глюкозо-6-фосфатазы, фрагмента таких антигенов и мимотопа любого из таких антигенов.

32. Применение фармацевтической композиции по любому из пп. 27-31 для производства лекарственного средства для лечения нежелательного иммунного ответа.

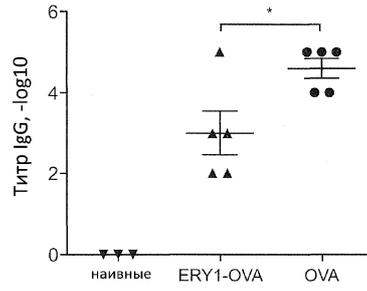
33. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.30, 31 для производства лекарственного средства для лечения целиакии или для лечения сахарного диабета I типа.



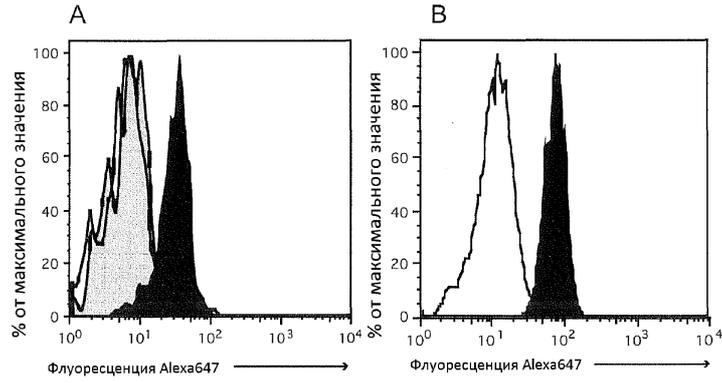
Фиг. 1



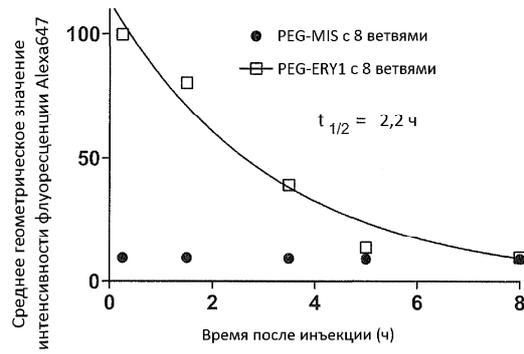
Фиг. 2



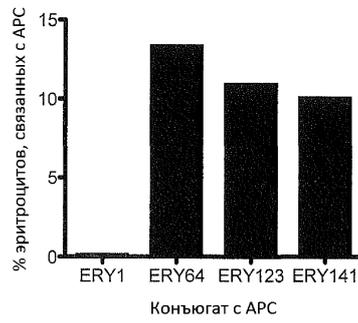
Фиг. 3



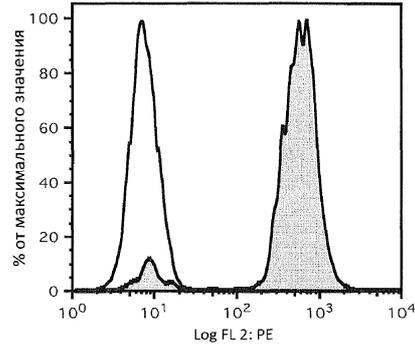
Фиг. 4



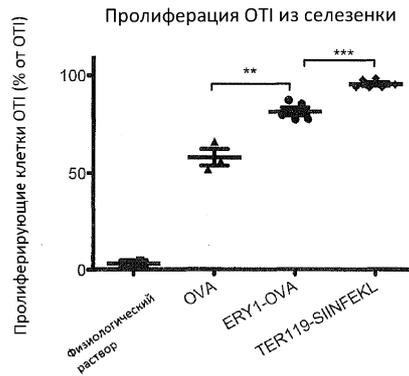
Фиг. 5



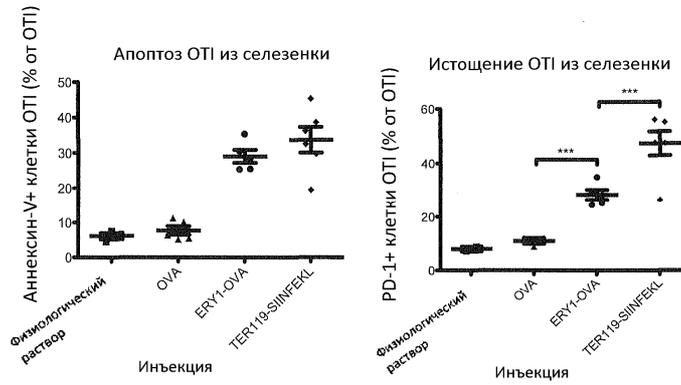
Фиг. 6



Фиг. 7



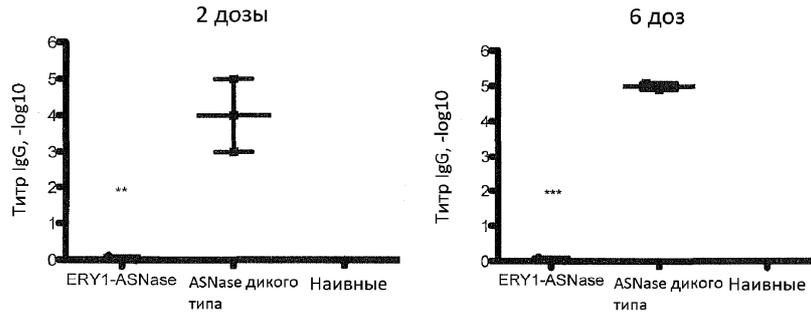
Фиг. 8



Фиг. 9



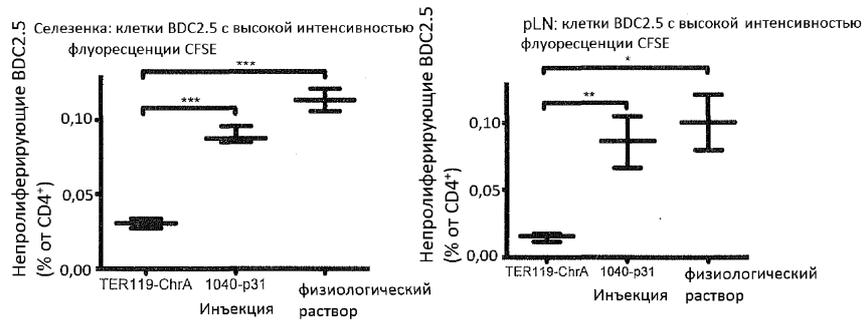
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13

