



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.09.29**

**(21)** Номер заявки  
**201890778**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.09.16**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 38/28** (2006.01)  
**A61K 39/35** (2006.01)

**(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА С УГЛЕВОД-ОПОСРЕДОВАННОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКОЙ**

**(31)** 14/859,292; 15/185,564

**(32)** 2015.09.19; 2016.06.17

**(33)** US

**(43)** 2018.08.31

**(86)** PCT/IB2016/001411

**(87)** WO 2017/046652 2017.03.23

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЭКОЛЬ ПОЛИТЕКНИК ФЕДЕРАЛЬ  
ДЕ ЛОЗАН (CH)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хаббелл Джеффри А., Уилсон Дэвид  
Скотт (CH)**

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

**(56)** S. KONTOS ET AL.: "PNAS Plus: 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, abstract, page e62, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1

WO-A1-2013121296

BARNEY YOO ET AL.: "N -Acetylgalactosamino Dendrons as Clearing Agents to Enhance Liver Targeting of Model Antibody-Fusion Protein", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 24, no. 12, 18 December 2013 (2013-12-18), pages 2088-2103, XP55224623, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc400333m, page 2089, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1, page 2100, right-hand column, paragraph 2, page 2102, left-hand column, paragraph 3

ALLA TRAHTEHERTS ET AL.: "An Internalizing Antibody Specific for the Human Asialoglycoprotein Receptor", HYBRIDOMA, vol. 28, no. 4, 1 August 2009 (2009-08-01), pages

225-233, XP55084704, ISSN: 1554-0014, DOI: 10.1089/hyb.2009.0019, abstract, page 225, left-hand column, paragraph 2, page 230, right-hand column, paragraph 4

XIAORONG ZHAO ET AL.: "Construction and characterization of an anti-asialoglycoprotein receptor single-chain variable-fragment-targeted melittin", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 58, no. 6, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 405-411, XP55084712, ISSN: 0885-4513, DOI: 10.1002/bab.57, page 406, left-hand column, paragraph 1, page 410, right-hand column, paragraph 2

WO-A2-2012083185

WO-A1-2014023709

COULSTOCK E. ET AL.: "Liver-targeting of interferon-alpha with tissue-specific domain antibodies", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 8, no. 2, 1 January 2013 (2013-01-01), pages e57263-1, XP002697904, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0057263 [retrieved on 2013-02-25], abstract

WO-A2-2011086143

SREEMAN K. MAMIDYALA: "Glycomimetic Ligands for the Human Asialoglycoprotein Receptor", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 134, no. 4, 24 January 2012 (2012-01-24), pages 1978-1981, XP55048572, DOI: 10.1021/ja2104679, abstract

MEAGER A. ET AL.: "Anti-cytokine autoantibodies in autoimmunity: preponderance of neutralizing autoantibodies against interferon-alpha, interferon-omega and interleukin-12 in patients with thymoma and/or myasthenia gravis", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 132, no. 1, 1 April 2003 (2003-04-01), pages 128-136, XP002470334, ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1046/J.1365-2249.2003.02113.X, abstract

WO-A2-2015140648

**(57)** Изобретение относится к соединениям для индукции толератности к антигену, который индуцирует нежелательный иммунный ответ, а также к композиции, содержащей раскрытые соединения, и способу лечения нежелательного иммунного ответа на антиген, предусматривающий введение эффективного количества раскрытых соединений млекопитающему, нуждающемуся в лечении.

### Перекрестная ссылка на родственную заявку

Заявка на данное изобретение испрашивает преимущество заявки на патент США № 14/859292, поданной 19 сентября 2015 г., и заявки на патент США № 15/185564, поданной 17 июня 2016 г., каждая под названием "Терапевтические средства с углевод-опосредованной адресной доставкой", полный объем каждой из которых включен в данный документ посредством ссылки.

### Ссылка на перечень последовательностей

Перечень последовательностей, представленный в виде текстового файла ASCII через EFS-Web, включен в данный документ посредством ссылки в соответствии с § 1.52(e) раздела 35 свода законов США. Название текстового файла ASCII для перечня последовательностей представляет собой ANOK001P1WO\_ST25.TXT, датой создания текстового файла ASCII является 14 сентября 2016 г., а размер текстового файла ASCII составляет 47,4 Кб.

### Уровень техники

#### Область техники

Несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытых в данном документе, относятся к фармацевтически приемлемым композициям, которые применимы при лечении отторжения трансплантата, аутоиммунного заболевания, аллергии (например, пищевой аллергии) и иммунного ответа против терапевтического средства.

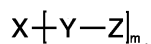
### Описание предшествующего уровня техники

Для индукции толерантности к антигенам, которые вызывают нежелательный иммунный ответ, были использованы различные подходы. В некоторых подходах используется адресная доставка антигенов в определенные клетки. В заявках US 2012/0039989, US 2012/0178139 и WO 2013/121296 описана адресная доставка антигенов в эритроциты, чтобы воспользоваться преимуществом роли эритроцитов в презентации антигена для толеризации.

### Краткое описание

Несмотря на положительные результаты, полученные на сегодняшний день при использовании подходов, состоящих в адресной доставке к клеткам, все еще представляет интерес возможность альтернативных подходов. В частности, несколько вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, относятся к композициям, предусматривающим возможность нацеливания на один или более типов клеток в печени, и, как результат, доставку антигена, к которому требуется толерантность у одного или более типов клеток, являющихся целями для адресной доставки, и, таким образом, индукцию обработки антигена и индукцию иммунной толерантности к антигену. Антиген, как раскрыто более подробно ниже, может содержать терапевтическое средство, белок, фрагмент белка, антигенный имитатор белка или фрагмента белка (например, миметоп). Дополнительные типы антигенов более подробно рассмотрены ниже. Способы и применения таких композиций также предусмотрены в нескольких вариантах осуществления.

В нескольких вариантах осуществления представлено соединение, предусматривающее соединение формулы 1

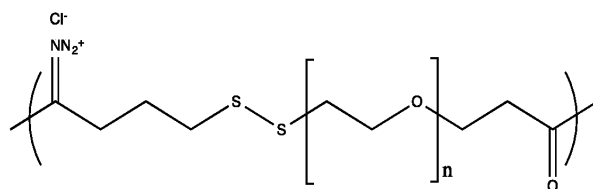


Формула 1

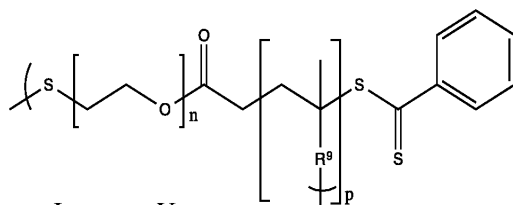
где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

X предусматривает молекулу, содержащую антигенный участок;

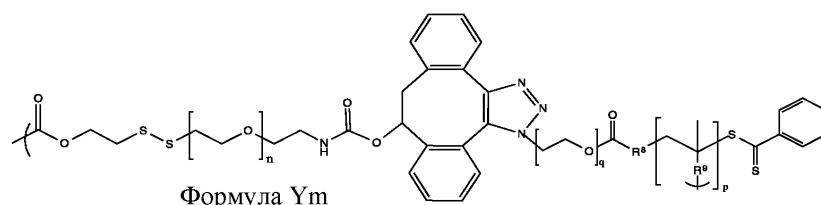
Y представляет собой линкерный компонент с формулой, выбранной из группы, состоящей из:



Формула Ya

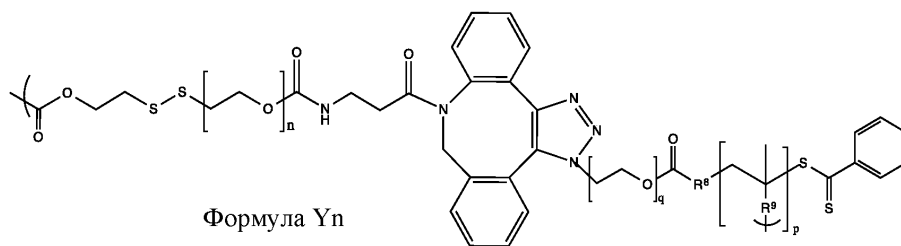


Формула Yc



Формула Ym

и



Формула Yn

где левая скобка "(" обозначает связь с X, правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z;

n представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

p представляет собой целое число от приблизительно 2 до 150;

q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44;

R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

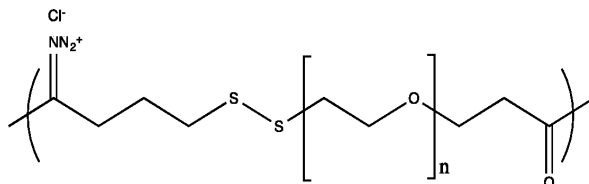
R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень.

В нескольких вариантах осуществления X представляет собой белок или фрагмент белка, содержащие антигенный участок. В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой галактозу, в то время как в некоторых вариантах осуществления Z представляет собой глюкозу. В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой галактозамин, в то время как в некоторых вариантах осуществления Z представляет собой глюкозамин. В нескольких вариантах осуществления альфа-аномер глюкозы или галактозы применяют в композиции. В нескольких вариантах осуществления бета-аномер глюкозы или галактозы применяют в композиции. В нескольких вариантах осуществления применяют смеси альфа- и бета-аномеров, в том числе необязательно смеси глюкозы и галактозы. В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой N-ацетилгалактозамин, в то время как в некоторых вариантах осуществления Z представляет собой N-ацетилглюкозамин. В нескольких вариантах осуществления альфа-аномер глюкозамина или галактозамина применяют в композиции. В нескольких вариантах осуществления альфа-аномер глюкозамина или галактозамина применяют в композиции. В нескольких вариантах осуществления применяют смеси альфа- и бета-аномеров, в том числе необязательно смеси глюкозамина и галактозамина. Подобным образом, в нескольких вариантах осуществления альфа-аномер, бета-аномер или комбинации альфа- и бета-аномеров N-ацетилгалактозамина или N-ацетилглюкозамина. Комбинации любых альфа или бета-аномерных форм сахаров для адресной доставки в печень и любые комбинации сахаров можно использовать в различных вариантах осуществления. В нескольких вариантах осуществления Y предусматривает Y<sub>m</sub> или Y<sub>n</sub>, m составляет от 1 до 5, n составляет от 75 до 85, p составляет от 85

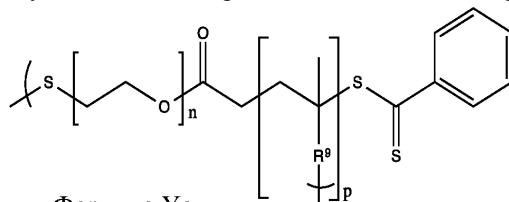
до 95 и q составляет от 2 до 6. В нескольких вариантах осуществления m составляет от 1 до 3, n равняется 79, p равняется 90 и q равняется 4. В нескольких вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из инсулина, проинсулина, препроинсулина, глютена, глиаина, основного белка миелина, гликопротеина олигодендроцитов миелина и протеолипидного белка, фактора VIII, фактора IX, аспарагиназы, уриказы и фрагментов любых из предыдущих. В нескольких вариантах осуществления антиген X не является полноразмерным белком. Например, в нескольких вариантах осуществления антиген не является полноразмерным глиадином, инсулином или проинсулином. В нескольких вариантах осуществления антиген X не является фрагментом белка. В нескольких вариантах осуществления m составляет не больше 3, n составляет не больше 80, p составляет не больше 100 и q составляет не больше 5.

В нескольких вариантах осуществления Y представляет собой линкерный компонент с формулой



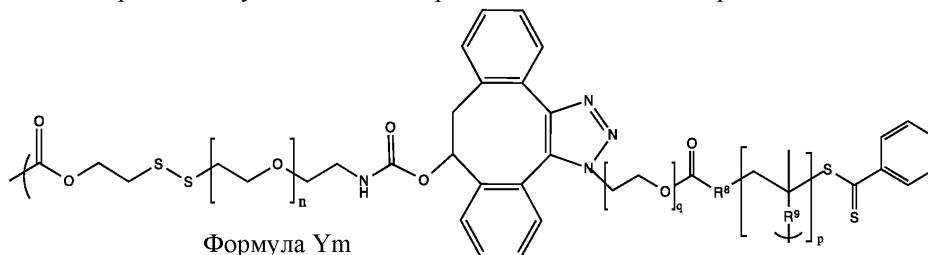
Формула Ya

В нескольких вариантах осуществления Y представляет собой линкерный компонент с формулой



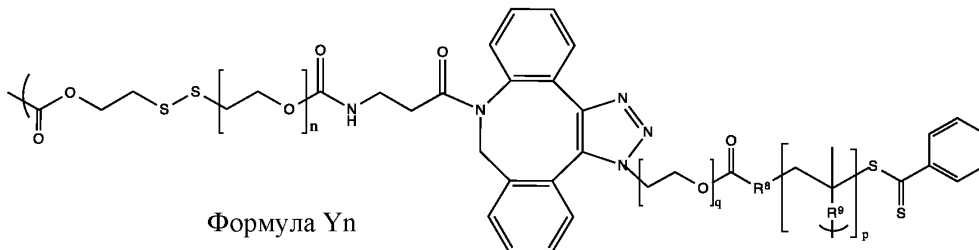
Формула Yc

В нескольких вариантах осуществления Y представляет собой линкерный компонент с формулой



Формула Ym

В нескольких вариантах осуществления Y представляет собой линкерный компонент с формулой



Формула Yn

В некоторых вариантах осуществления могут применяться комбинации линкеров, раскрытых в данном документе, при этом могут использоваться только в качестве комбинаций фрагментов для адресной доставки в печень.

Как обсуждается более подробно ниже, существуют различные антигены, в отношении которых может потребоваться толерантность. Таковые могут включать без ограничений экзогенные антигены, которые приводят к побочному иммунному ответу, когда субъект подвергается действию антигена. В нескольких вариантах осуществления побочный иммунный ответ может быть результатом проглатывания антигена, например, перорально, или назально, или с помощью какого-либо другого пути, связанного со слизистой оболочкой. Эти пути могут быть, например, с пищевыми антигенами. В некоторых вариантах осуществления антиген может целенаправленно вводиться субъекту, например, с введением терапевтической композиции для лечения заболевания или состояния, которыми поражен субъект. Еще в дополнительных вариантах осуществления антиген может быть получен от субъекта, например аутоиммунный антиген. Например, в нескольких вариантах осуществления X предусматривает чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть. В нескольких вариантах осуществления X предусматривает чужеродный пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхожде-

ния или антиген окружающей среды, против которых у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть. В нескольких вариантах осуществления X предусматривает чужеродное терапевтическое средство, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть. В нескольких вариантах осуществления X предусматривает синтетический собственный антиген, против эндогенного варианта которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть.

В нескольких вариантах осуществления более подробно к вышеуказанному предусмотрены соединения, где X представляет собой пищевой антиген. В некоторых таких вариантах осуществления X представляет собой один или более из конарахина (Aga h 1), аллергена II (Aga h 2), агглютинина арахиса, конглютина (Aga h 6), а-лактальбумина (ALA), лактотрансферрина, аллергена Pen a 1 (Pen a 1), аллергена Pen m 2 (Pen m 2), изоформы быстрого тропомиозина, высокомолекулярного глютеина, низкомолекулярного глютеина, альфа-глиаина, гамма-глиаина, омега-глиаина, хордеина, секалина и авенина. Фрагмент любого из этих антигенов и/или мимеотопы любого из этих антигенов также применяют в нескольких вариантах осуществления. В нескольких вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из глютена, высокомолекулярного глютеина, низкомолекулярного глютеина, альфа-глиаина, гамма-глиаина, омега-глиаина, хордеина, секалина и авенина и их фрагментов. В нескольких вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из глютена, высокомолекулярного глютеина, низкомолекулярного глютеина, альфа-глиаина, гамма-глиаина и омега-глиаина и их фрагментов. В нескольких вариантах осуществления X представляет собой глютен или его фрагмент. В нескольких вариантах осуществления X представляет собой глиадин или его фрагмент.

В нескольких вариантах осуществления предусмотрены соединения, где X представляет собой терапевтическое средство. В нескольких вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из фактора VII, фактора IX, аспарагиназы и уриказы и их фрагментов. В нескольких вариантах осуществления X представляет собой терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из фактора VII и фактора IX и их фрагментов. В нескольких вариантах осуществления X представляет собой терапевтическое средство, выбранное из группы, состоящей из фактора VIII или его фрагмента. В нескольких вариантах осуществления, где X представляет собой терапевтическое средство, соединение может применяться при лечении, предупреждении, уменьшении или иным образом облегчении иммунного ответа, развивающегося против терапевтического средства для гемофилии. Как обсуждается в данном документе, мимеотопы любой антигенной части вышеуказанных антигенов могут применяться в нескольких вариантах осуществления.

В нескольких вариантах осуществления X предусматривает аспарагиназу или ее фрагмент. В нескольких вариантах осуществления X предусматривает уриказу или ее фрагмент. В нескольких таких вариантах осуществления соединение может применяться при лечении, предупреждении, уменьшении или иным образом облегчении иммунного ответа, развивающегося против противоопухолевого средства. Как обсуждается в данном документе, мимеотопы любой антигенной части вышеуказанных антигенов могут применяться в нескольких вариантах осуществления.

В нескольких вариантах осуществления X ассоциирован с аутоиммунным заболеванием. Например, в нескольких вариантах осуществления ассоциированное аутоиммунное заболевание является одним или более из диабета I типа, рассеянного склероза, ревматоидного артрита, витилиго, увеита, пузырчатки обыкновенной и нейромиелимита зрительного нерва.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой диабет I типа и X предусматривает инсулин или его фрагмент. В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой диабет I типа и X предусматривает проинсулин или его фрагмент. В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой диабет I типа и X предусматривает препроинсулин или его фрагмент. Как обсуждается в данном документе, мимеотопы любой антигенной части вышеуказанных антигенов могут применяться в нескольких вариантах осуществления. В нескольких вариантах осуществления комбинации этих антигенов можно включать в толерогенное соединение, что может способствовать снижению иммунных ответов на собственные антигены в нескольких точках в ходе метаболического пути инсулина.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз и X предусматривает основной белок миелина или его фрагмент. В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз и X предусматривает гликопротеин олигодендроцитов миелина или его фрагмент. В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз и X предусматривает протеолипидный белок миелина или его фрагмент. Как обсуждается в данном документе, мимеотопы любой антигенной части вышеуказанных антигенов могут применяться в нескольких вариантах осуществления. В нескольких вариантах осуществления комбинации этих антигенов можно включать в толерогенное соединение, что может способствовать снижению иммунных ответов на собственные антигены в нескольких точках в ходе ферментативных метаболических путей, в ходе которых осуществляется контроль над миелинизацией или восстановлением миелина.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой ревматоидный артрит, а X выбран из группы, состоящей из фибриногена, виментина, коллагена II типа, альфа-енолазы и их фрагментов.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой витилиго и X выбран из группы, состоящей из Pmel17, тирозиназы и их фрагментов.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой увеит и X выбран из группы, состоящей из аррестина сетчатки глаза и межфоторецепторного ретинол-связывающего белка (IRBP) и их фрагментов.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой пузырчатку обыкновенную и X выбран из группы, состоящей из десмоглеина 3, 1 и 4, пемфаксина, десмоколлинов, плакоглобина, перплакина, десмоплакинов и ацетилхолинового рецептора и их фрагментов.

В нескольких вариантах осуществления аутоиммунное заболевание представляет собой нейромие-лит зрительного нерва и X представляет собой аквапорин-4 или его фрагмент.

Как обсуждается в данном документе, мимеотопы любой антигенной части вышеуказанных собственных антигенов (или иным образом раскрытых в данном документе) могут применяться в нескольких вариантах осуществления.

В нескольких вариантах осуществления также предусмотрено применение раскрытых выше соединений (или иным образом раскрытых в данном документе) для применения в индукции толерантности к X.

В нескольких вариантах осуществления в данном документе также предусмотрены фармацевтически приемлемые композиции, содержащие раскрытое выше соединение (или иным образом раскрытое в данном документе).

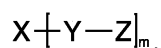
Также предусматривается применение таких композиций для индукции толерантности к X. В нескольких вариантах осуществления фармацевтически приемлемая композиция состоит из или состоит фактически из соединения, где X представляет собой пищевой антиген, терапевтическое средство, собственный антиген или их фрагмент, линкера Y и компонента Z для адресной доставки в печень, выбранного из глюкозы, галактозы, глюкозамина, галактозамина, N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина.

Также в данном документе предусмотрены способы индукции толерантности к антигену, в отношении которого у субъекта может развиваться нежелательный иммунный ответ, предусматривающий введение раскрытых выше соединений (или иным образом раскрытых в данном документе). В нескольких вариантах осуществления соединения вводят до того, как субъект подвергается действию антигена. Однако в нескольких вариантах осуществления соединения вводят после того, как субъект подвергся действию антигена. В нескольких вариантах осуществления введение включает по меньшей мере одно внутривенное введение соединения (например, болюсную дозу после серий необязательных поддерживающих доз).

В нескольких вариантах осуществления предусматривается применение раскрытых выше соединений (или иным образом раскрытых в данном документе) при получении лекарственного препарата для индукции толерантности к антигену, против которого у субъекта развивается нежелательный иммунный ответ, или их толерогенной части.

В нескольких вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, предусмотрены композиции для индукции иммунной толерантности у субъекта, а также способы и применения композиций для ее достижения. В нескольких вариантах осуществления требуется иммунная толерантность, поскольку у субъекта развивается нежелательный иммунный ответ на антиген. В зависимости от варианта осуществления антигеном может быть один или более из различных антигенов, например чужеродный антиген, такой как пищевой антиген, который проглатывается, или антигенная часть терапевтического средства, которое дают субъекту. В дополнительных вариантах осуществления антигеном может быть собственный антиген, который не распознается иммунной системой субъекта (или только распознается как собственный в ограниченной степени) и, следовательно, поддерживается иммунный ответ против него, что приводит к аутоиммунным расстройствам.

В нескольких вариантах осуществления представлена композиция, содержащая соединение формулы 1

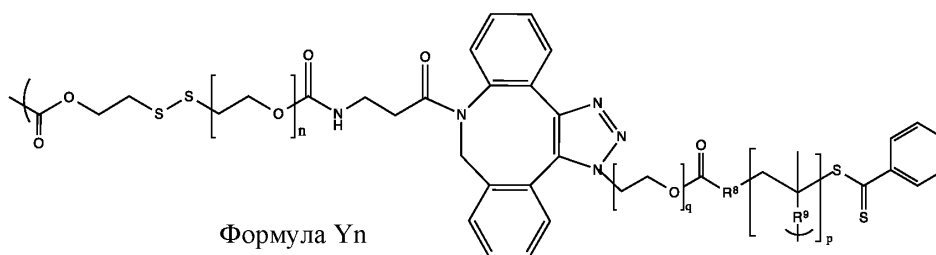


Формула 1

где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

X предусматривает пищевой антиген, терапевтическое средство, собственный антиген, фрагмент любого из таких антигенов или мимеотоп любого из таких антигенов;

Y представляет собой линкерный компонент со следующей формулой:



Формула Yn

где левая скобка "(" обозначает связь с X, правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z;

n представляет собой целое число от приблизительно 70 до 85;

p представляет собой целое число от приблизительно 85 до 95;

q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

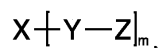
R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий глюкозу или галактозу.

В нескольких вариантах осуществления m составляет от 1 до 3, n равняется 79, p равняется 90 и q равняется 4. В нескольких вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из инсулина, проинсулина, препроинсулина, глютеина, глиаина, основного белка миеллина, гликопротеина олигодендроцитов миеллина и протеолипидного белка, фактора VIII, фактора IX, аспарагиназы, уриказы и фрагментов любых из предыдущих. В нескольких вариантах осуществления композиция предусматривает, состоит из или состоит фактически из антигена X, линкера Y и компонента Z для адресной доставки в печень.

В нескольких вариантах осуществления представлено соединение, предусматривающее соединение формулы 1

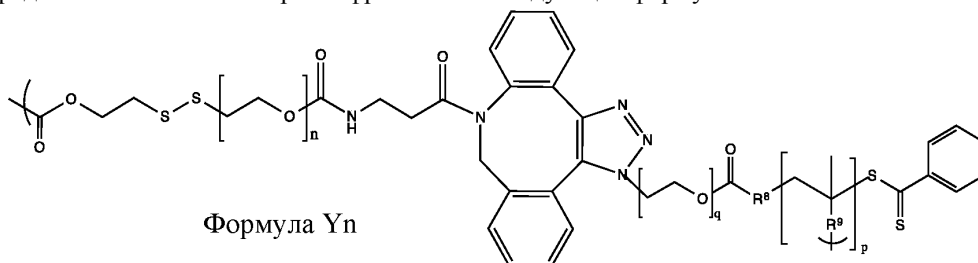


Формула 1

где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

X выбран из группы, состоящей из инсулина, проинсулина, препроинсулина, глютеина, глиаина, основного белка миеллина, гликопротеина олигодендроцитов миеллина и протеолипидного белка, фактора VIII, фактора IX, аспарагиназ, уриказы и фрагментов любых из предыдущих;

Y представляет собой линкерный фрагмент со следующей формулой:



Формула Yn

где левая скобка "(" обозначает связь с X, правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z;

n представляет собой целое число от приблизительно 70 до 85;

p представляет собой целое число от приблизительно 85 до 95;

q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

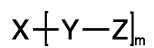
R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий фрагмент сахара.

В нескольких вариантах осуществления m составляет от 1 до 3, n равняется 79, p равняется 90 и q равняется 4. В нескольких вариантах осуществления Z выбрана из группы, состоящей из глюкозы, глюкозамина, галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилглюкозамина.

В нескольких вариантах осуществления могут применяться пропилуглеродные линкеры 2,5-диоксопирролидин-1-ила и/или этилкарбаматные линкеры 2-(этилдисульфанил)этила.

В нескольких вариантах осуществления предусмотрена композиция, содержащая соединение формулы 1

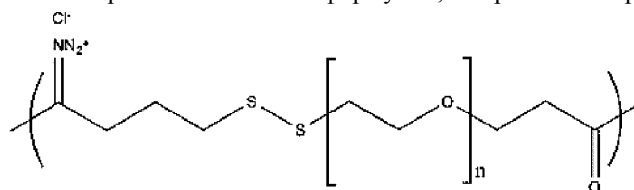


Формула 1

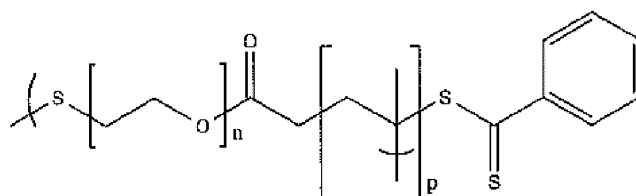
где  $m$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

$X$  предусматривает антиген, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, где антиген представляет собой пищевой антиген, терапевтическое средство, собственный антиген или фрагмент любого из таких антигенов;

$Y$  представляет собой линкерный компонент с формулой, выбранной из группы, состоящей из:

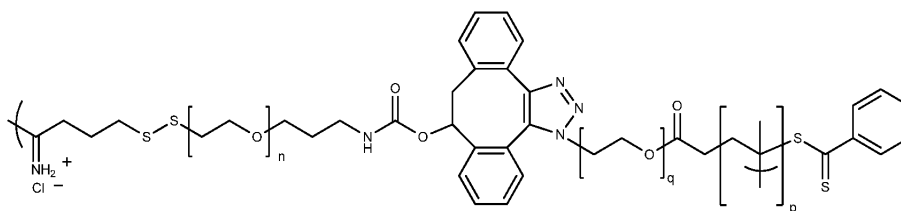


Формула Ya



Формула Yc

и



Формула YL

где левая скобка "(" обозначает связь с  $X$ , правая скобка ")" обозначает связь с  $Z$ , нижняя скобка "└" обозначает связь с  $Z$ ;

$n$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 80;

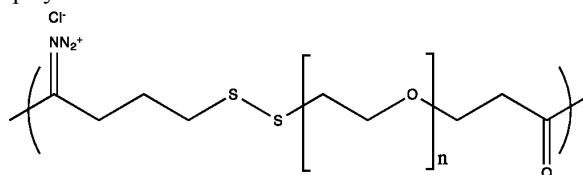
$q$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 4;

$p$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 90;

$R^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$  или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ ;

$Z$  предусматривает один или более компонентов для адресной доставки в печень, которые служат для специфичной адресной доставки в клетки печени, экспрессирующие асиалогликопротеиновые рецепторы.

В нескольких вариантах осуществления композиции  $m$  равняется от 1 до 4,  $Y$  представляет собой линкерный компонент с формулой

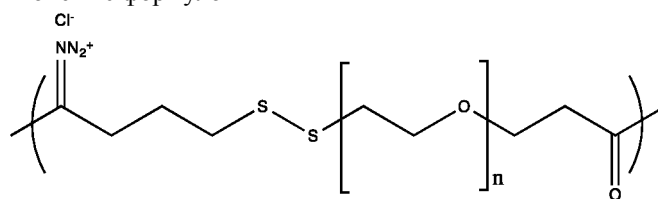


Формула Ya

и  $Z$  предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий одно или более из галактозы, галактозамина или N-ацетилгалактозамина.



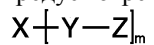
В нескольких вариантах осуществления  $m$  представляет собой целое число от 1 до 4,  $Y$  представляет собой линкерный компонент с формулой



Формула Ya

и  $Z$  предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий одно или более из глюкозы, глюкозамина, или N-ацетилглюкозамина.

В нескольких вариантах осуществления предусмотрены композиции формулы 1



Формула 1

где  $m$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

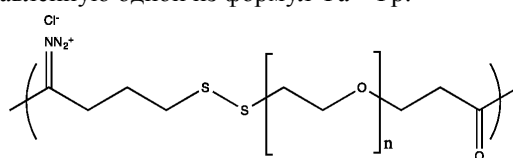
$X$  предусматривает антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть или  $X$  предусматривает антитело, фрагмент антитела или лиганд, которые специфически связывают циркулирующий белок, или пептид, или антитело, при этом циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию;

$Y$  предусматривает линкерный компонент;

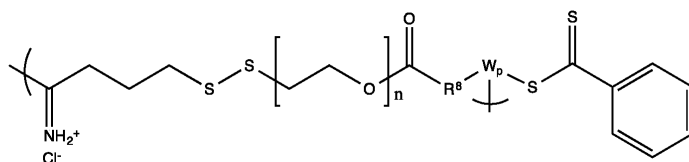
$Z$  предусматривает компонент для адресной доставки в печень.

В нескольких вариантах осуществления  $Z$  предусматривает галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин.

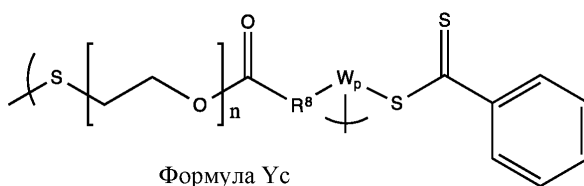
В нескольких вариантах осуществления  $Y$  выбран из N-гидроксисукцинамидильных линкеров, линкеров на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновых линкеров, пиридил-дитиолполи(этиленгликолевых) линкеров, пиридил-дитиольных линкеров, н-нитрофенил-карбонатных линкеров, линкеров на основе сложных эфиров NHS и линкеров на основе сложных эфиров нитрофеноксиполи(этиленгликоля). В некоторых вариантах осуществления  $Y$  предусматривает антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают  $X$ , дисульфанилэтиловый сложный эфир, структуру, представленную одной из формул Ya - Yc:



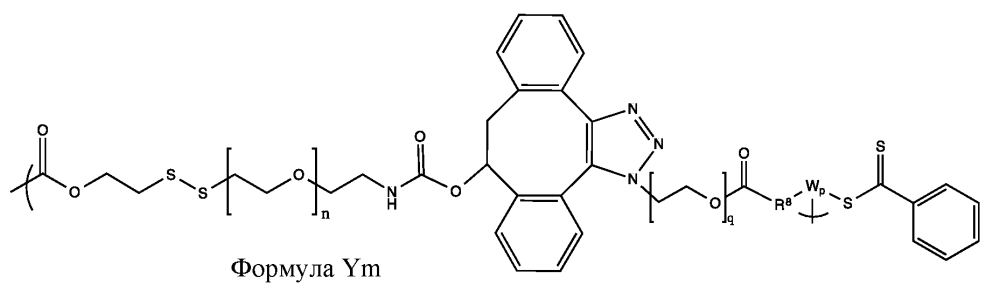
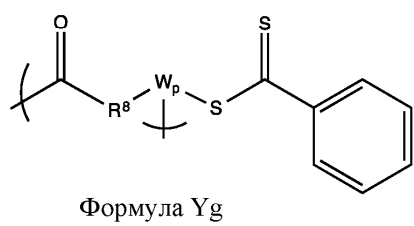
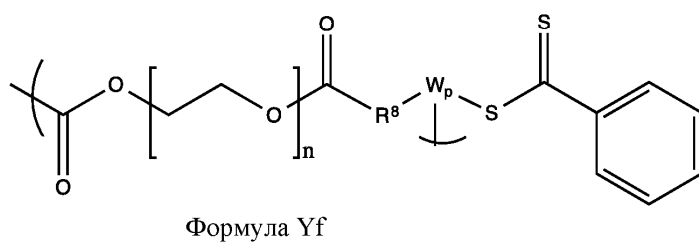
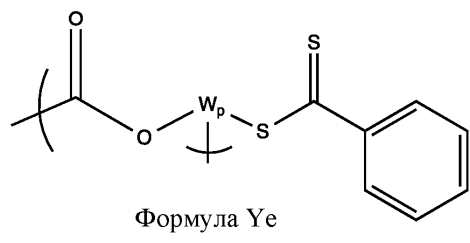
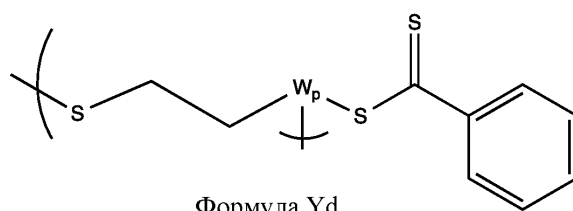
Формула Ya

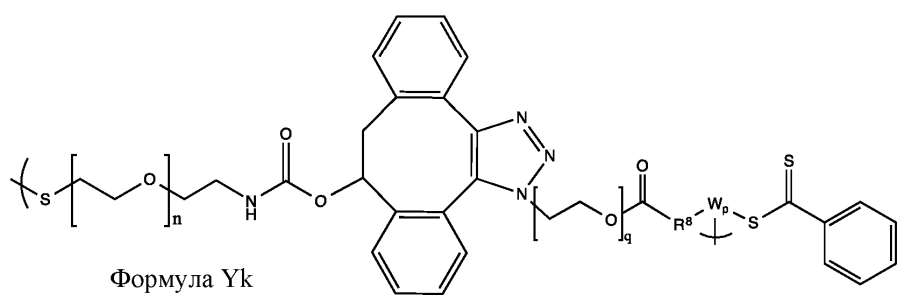
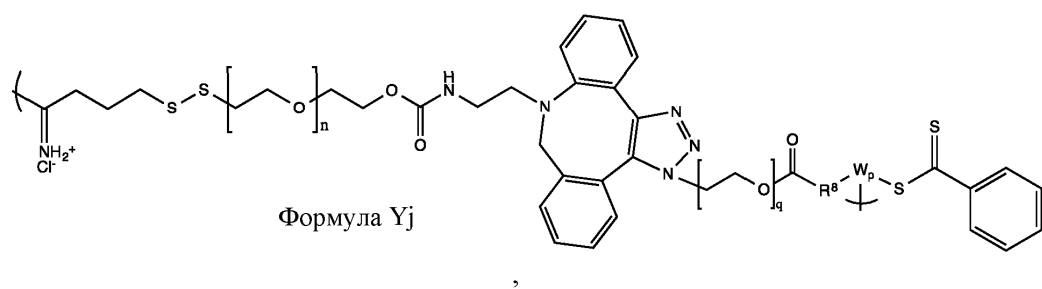
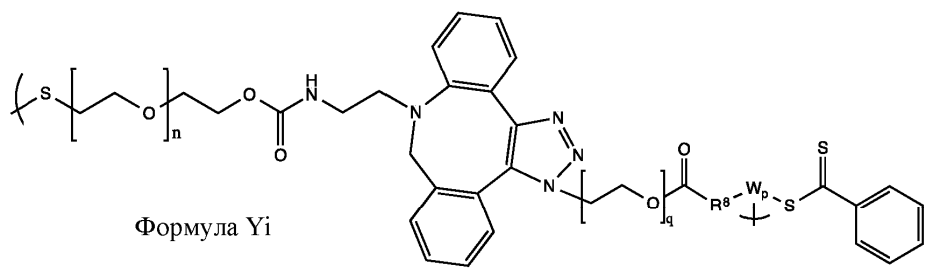
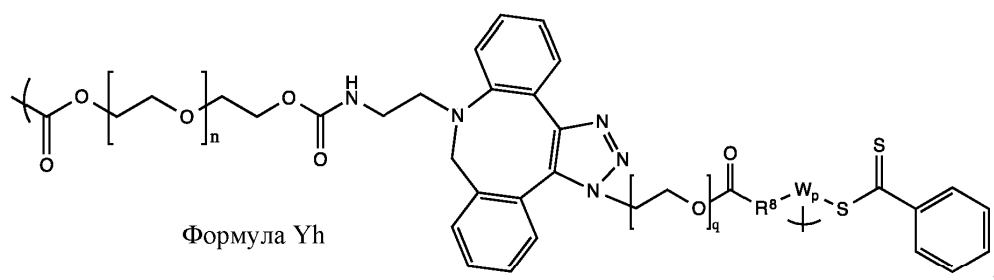


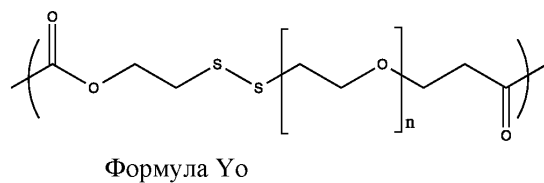
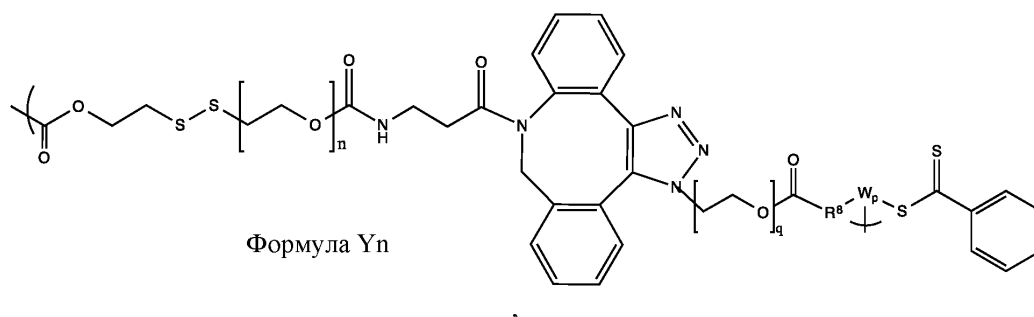
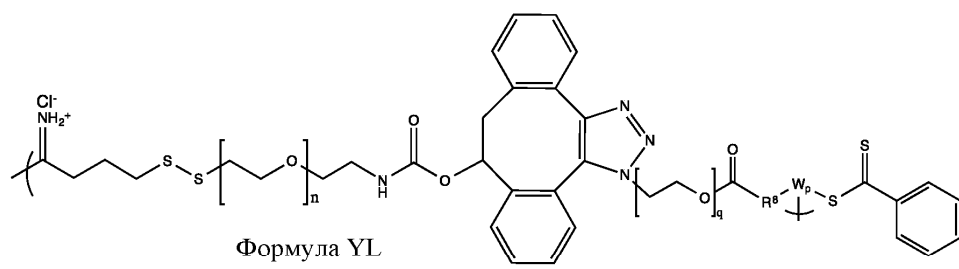
Формула Yb



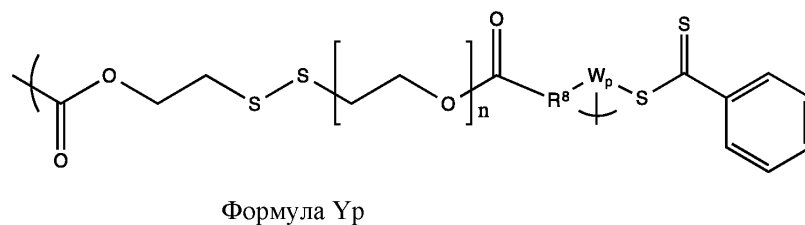
Формула Yc



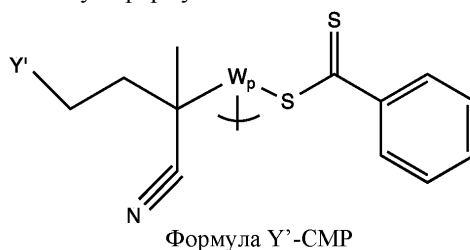




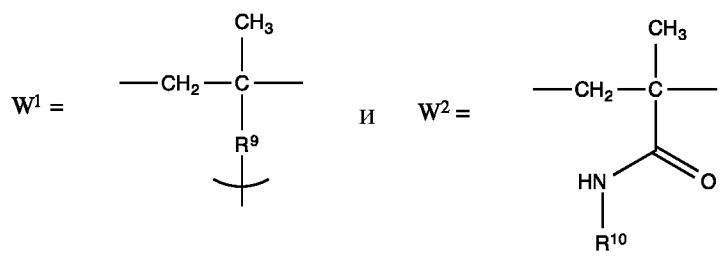
и



или Y имеет часть, представленную формулой Y'-CMP



В таких вариантах осуществления левая скобка "(" обозначает связь между X и Y, правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z, n представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100, q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44, R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-, Y' представляет собой остальную часть Y и W представляет собой полимер одной и той же группы W<sup>1</sup> или W представляет собой сополимер или статистический сополимер одинаковых или различных групп W<sup>1</sup> и W<sup>2</sup>, где



где  $p$  представляет собой целое число от 2 до приблизительно 150;

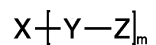
$\text{R}^9$  представляет собой прямую связь,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$  или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ;

$t$  представляет собой целое число от 1 до 5;

$\text{R}^{10}$  представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт.

В одном таком варианте осуществления  $m$  равняется от 1 до 3,  $Y$  представлен формулой  $Y_m$ , где  $\text{R}^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$  и  $W$  представлен блок-сополимером  $W^1$  и  $W^2$ ,  $\text{R}^9$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$ ,  $t$  равняется 1,  $\text{R}^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил и  $Z$  предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий одно или более из галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина, N-ацетилглюкозамина. В нескольких вариантах осуществления  $Z$  представляет собой  $\beta$ -аномер соответствующего сахара.

В нескольких дополнительных вариантах осуществления предусмотрены композиции для индукции толерантности к антигену, на который у субъекта развивается нежелательный иммунный ответ, при этом композиции содержат соединение формулы 1

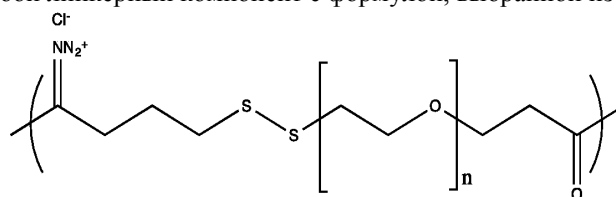


Формула 1

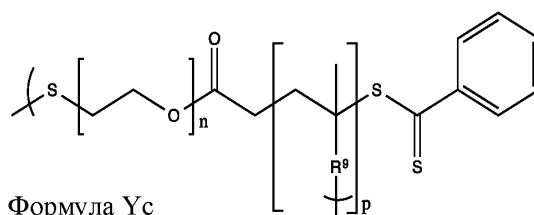
где  $m$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

$X$  предусматривает антиген, к которому у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, где антиген представляет собой пищевой антиген, терапевтическое средство, собственный антиген или фрагмент любого из таких антигенов;

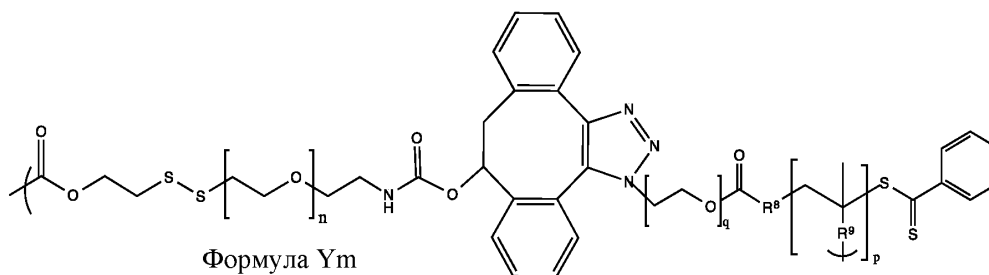
$Y$  представляет собой линкерный компонент с формулой, выбранной из группы, состоящей из:



Формула Ya

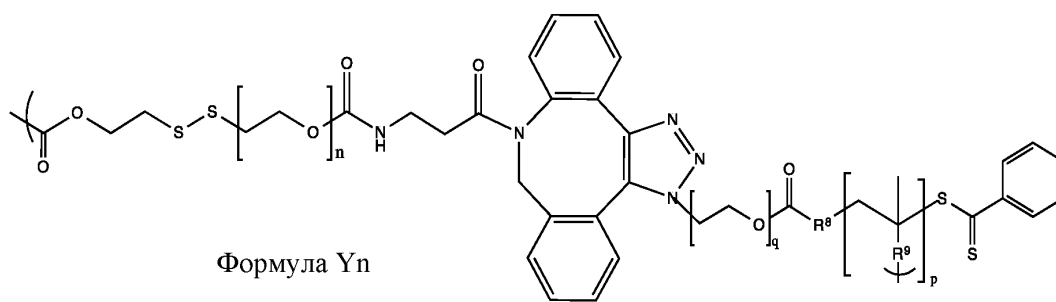


Формула Yc



Формула Ym

и



где левая скобка "(" обозначает связь с X, правая ")" или нижняя "└" скобка и обозначают связь между Y и Z;

n представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

p представляет собой целое число от приблизительно 2 до 150;

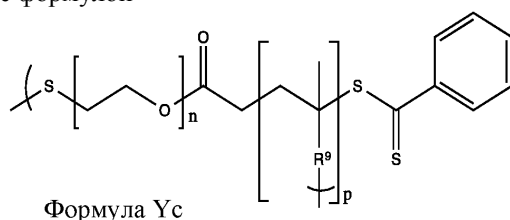
q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44;

R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

В нескольких вариантах осуществления таких композиций m равняется от 1 до 3, Y представляет собой линкерный компонент с формулой



где R<sup>9</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий одно или более из галактозы, галактозамина или N-ацетилгалактозамина.

В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой β-аномер выбранного компонента.

Как рассматривалось выше, в нескольких вариантах осуществления X представляет собой собственный антиген, а нежелательный иммунный ответ представляет собой аутоиммунный ответ.

Различные собственные антигены раскрыты в данном документе, но в нескольких определенных вариантах осуществления X представляет собой гликопротеин олигодендроцитов миелина или протеолипидный белок миелина. В таких вариантах осуществления нежелательный иммунный ответ, испытываемый субъектом, связан с рассеянным склерозом. В дополнительных вариантах осуществления X представляет собой инсулин, проинсулин или препроинсулин, и при этом нежелательный иммунный ответ связан с сахарным диабетом. Следует понимать, что связанное с рассеянным склерозом, сахарным диабетом или другое аутоиммунное заболевание необязательно нуждается в официальном диагнозе такого аутоиммунного состояния, но, скорее, оно может быть ассоциировано с общими симптомами или характеристиками определенного аутоиммунного нарушения.

В дополнительных вариантах осуществления, как обсуждается в данном документе, нежелательный иммунный ответ может индуцироваться против терапевтического средства, такого как белковое лекарственное средство или лекарственное средство, происходящие из не относящихся к человеку и/или не относящихся к млекопитающим видов. Например, в нескольких вариантах осуществления X представляет собой терапевтическое средство, такое как фактор VIII, фактор IX или другое средство для индукции гемостаза. В таких вариантах осуществления нежелательный иммунный ответ направлен против средства, а ассоциированным заболеванием является гемофилия, которая не облегчается (при отсутствии композиции) вследствие аутоиммунного ответа. Однако при введении композиции гемофилия может облегчаться, поскольку композиция способствует индукции толерантности к средству, снижающему ответ на антиген, и обеспечивает возможность сокращения симптомов гемофилии. Еще в дополнительных вариантах осуществления X представляет собой терапевтическое средство, такое как аспарагиназа и уриказа. Как рассматривалось выше, нежелательный иммунный ответ может возникать в результате введения таких средств, как происходящие из не принадлежащих человеку источников. Способность композиций, раскрытых в данном документе, индуцировать толерантность к таким средствам обеспечивает продолжение применения таких средств субъектом, нуждающимся в терапии, в то время как побочные эффекты от иммунной реакции снижаются, уменьшаются, устраняются или иным образом улучшаются.

В нескольких вариантах осуществления X представляет собой пищевой антиген. Известно, что многие пищевые антигены вызывают аллергические реакции при проглатывании, однако в нескольких вариантах осуществления X выбран из группы, состоящей из конарахина (Ara h 1), аллергена II (Ara h 2),

агглютини́на арахиса, конглютина (Ara h 6), а-лактальбумина (ALA), лактотрансферрина, аллергена Pen a 1 (Pen a 1), аллергена Pen m 2 (Pen m 2), изоформы быстрого тропомиозина, высокомолекулярного глюте́нина, низкомолекулярного глюте́нина, альфа-глиа́дина, гамма-глиа́дина, омега-глиа́дина, хордеина, секалина и авени́на. В нескольких вариантах осуществления лечение композициями, раскрытыми в данном документе, где X представляет собой пищевой антиген, обеспечивает возможность субъекту значительно снизить иммунный ответ на антиген, например, многие аллергические реакции на арахис являются настолько тяжелыми, что воздействие арахисовой пыльцы или масла может вызвать анафилаксию. В некоторых вариантах осуществления лечение снижает и/или устраняет ответы на такое случайное воздействие на антиген. В дополнительных вариантах осуществления лечение позволяет субъекту проглатывать пищу, из которой получен антиген, с ограниченным или отсутствующим неблагоприятным иммунным ответом.

В нескольких вариантах осуществления введение композиции субъекту приводит к большей степени пролиферации антигенспецифичных Т-клеток по сравнению с пролиферацией антигенспецифичных Т-клеток, полученных в результате введения антигена отдельно. В таких вариантах осуществления пролиферация антигенспецифичных Т-клеток указывает на то, что доставка антигена (с помощью композиции) в комплекс молекулярной обработки, которое обрабатывает антигены как собственные/не собственные, усиливается по сравнению с введением антигена отдельно. Другими словами, в таких вариантах осуществления адресная доставка является эффективной. Еще в дополнительных вариантах осуществления введение композиций, раскрытых в данном документе, приводит к большей экспрессии маркеров истощения или маркеров апоптоза на антигенспецифичных Т-клетках по сравнению с экспрессией маркеров истощения или маркеров апоптоза на антигенспецифичных Т-клетках, полученных при введении антигена отдельно. Этот результат указывает на специфическое уменьшение активности Т-клеток, направленных против представляющего интерес антигена, и/или делению Т-клеток, направленных против представляющего интерес антигена. В нескольких вариантах осуществления такие молекулярные признаки индукции толерантности являются предшественниками симптомов уменьшения или облегчения иммунного ответа, которые субъект ранее испытывал при подвергании действию антигена.

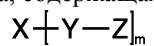
В нескольких вариантах осуществления Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень, который представляет собой углевод. В нескольких вариантах осуществления углевод является короткоцепочечным углеводом. В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой сахар. В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин. В нескольких вариантах осуществления индукция иммунной толерантности выше при использовании глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина в отношении Z. Еще в дополнительных вариантах осуществления усилители индукции иммунной толерантности можно обеспечить, если компонентом для адресной доставки в печень является сахар, и сахар находится в  $\beta$ -аномерной конфигурации. В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные с Y по своим C1, C2 или C6.

Также в данном документе предусмотрены способы индукции толерантности к антигену, которые при отдельном введении (например, без раскрытых в настоящем изобретении композиций) приведут к неблагоприятному иммунному ответу. Такие способы в зависимости от вариантов осуществления обуславливают введение либо до, либо после воздействия на антиген. В нескольких вариантах осуществления введение перед воздействием обеспечивает профилактический эффект, который в нескольких вариантах осуществления в основном предотвращается или значительно снижается при иммунном ответе. Введение композиций может осуществляться с помощью различных способов, в том числе без ограничений внутривенного, внутримышечного, перорального, трансдермального или другого пути введения. Введение может быть ежедневным, еженедельным, несколько раз в день или по необходимости (например, перед запланированным воздействием).

Также в данном документе предусмотрено применение композиций, раскрытых в данном документе, для лечения нежелательных иммунных ответов после воздействия антигеном. Как обсуждается в данном документе, такое применение может осуществляться с профилактическими эффектами и/или для снижения симптомов от предшествующего воздействия антигенами (или перед неблагоприятными иммунными эффектами, такими как таковые в аутоиммунных условиях). Например, в данном документе предусмотрено применение композиций в соответствии с формулой 1 для лечения нежелательных побочных эффектов при воздействии терапевтического антигена, воздействии пищевого антигена или неблагоприятных эффектов от иммунного ответа против собственного антигена. Композиции, раскрытые в данном документе, являются подходящими для введения субъекту в соответствии с таким применением, например пероральным, IV, IM или другим подходящим путем. Применение композиций, раскрытых в данном документе, в нескольких вариантах осуществления неожиданно приводит к уменьшению, устранению или облегчению неблагоприятных иммунных ответов на представляющие интерес антигены.

Дополнительные композиции и способы их применения предусмотрены в данном документе. Например, в нескольких вариантах осуществления предусмотрена фармацевтически приемлемая композиция для индукции толерантности к терапевтическому белку у субъекта, имеющего недостаток в выработ-

ке функциональных аналогов нативного белка, содержащая соединение формулы 1



Формула 1

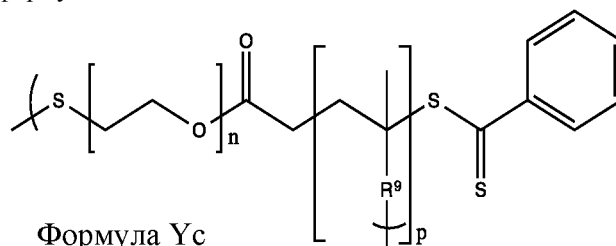
где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

X предусматривает антигенный белок или фрагмент белка;

Y представляет собой линкерный компонент с формулой, выбранной из группы, состоящей из формулы Ya, формулы Yc, формулы Ym, формулы Yn, где левая скобка "(" обозначают связь с X, правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z; n представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100; p представляет собой целое число от приблизительно 2 до 150; q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44; R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-; R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

В нескольких вариантах осуществления композиции m равняется от 1 до 3, Y представляет собой линкерный компонент с формулой:



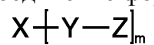
Формула Yc

где R<sup>9</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)-;

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий одно или более из глюкозы, глюкозамина, N-ацетилглюкозамина, галактозы, галактозамина или N-ацетилгалактозамина.

В нескольких вариантах осуществления галактоза, галактозамин или N-ацетилгалактозамин представляют собой β-аномеры. В нескольких вариантах осуществления применяют комбинации галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина.

Также в данном документе предусмотрена фармацевтически приемлемая композиция для индукции толерантности к терапевтическому белку у субъекта, имеющего недостаток в выработке функциональных аналогов нативного белка, содержащая соединение формулы 1

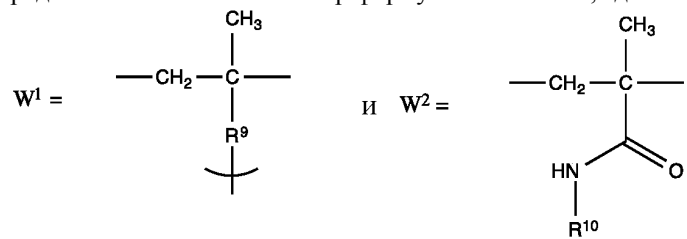


Формула 1

где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 10;

X предусматривает антигенный белок или фрагмент белка;

Y представляет собой линкерный компонент с формулой, выбранной из группы, состоящей из формулы Ya, формулы Yc, формулы Ym или формулы Yn, где левая скобка "(" обозначает связь с X, правая скобка ")" обозначает связь с Z, нижняя скобка "└" обозначает связь с Z, n представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 80, q представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 4, p представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 90, R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-, W представляет собой полимер группы формулы W<sup>1</sup> или W<sup>2</sup> или W представляет собой сополимер формулы W<sup>1</sup> или W<sup>2</sup>, где



где R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-NH-C(O)-;

t представляет собой целое число от 1 до 5;

R<sup>10</sup> представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт;

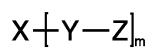
Z предусматривает глюкозу, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин, галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.



В нескольких вариантах осуществления галактоза, галактозамин или N-ацетилгалактозамин представляют собой β-аномеры. В нескольких вариантах осуществления применяют комбинации галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина. В нескольких вариантах осуществления композиции m равняется от 1 до 3, Y представлен формулой Ym, где R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)- и W представлен блок-сополимером W<sup>1</sup> и W<sup>2</sup>, где R<sup>9</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-NH-C(O)-, t равняется 1, R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил и Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень, содержащий одно или более из глюкозы, глюкозамина, N-ацетилглюкозамина, галактозы, галактозамина или N-ацетилгалактозамина. В нескольких вариантах осуществления галактоза, галактозамин или N-ацетилгалактозамин представляют собой β-аномеры. В нескольких вариантах осуществления применяют комбинации галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина.

В нескольких вариантах осуществления X предусматривает антигенный участок основного белка миелина, гликопротеина олигодендроцитов миелина и протеолипидного белка миелина. В дополнительных вариантах осуществления X предусматривает антигенный участок фактора VIII, фактора IX, инсулина, уриказы, PAL или аспарагиназы. В дополнительных вариантах осуществления X предусматривает чужеродный антиген, такой как конарахин (Ara h 1), аллерген II (Ara h 2), агглютинин арахиса, конглоутин (Ara h 6), α-лактальбумин (ALA), лакотрансферрин, аллерген Pen a 1 (Pen a 1), аллерген Pen m 2 (Pen m 2), изоформу быстрого тропомиозина, высокомолекулярный глютенин, низкомолекулярный глютенин, альфа-глиадин, гамма-глиадин, омега-глиадин, хордеин, секалин и авенин.

Дополнительно в данном документе предусмотрены композиции, содержащие соединение формулы 1



Формула 1

где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

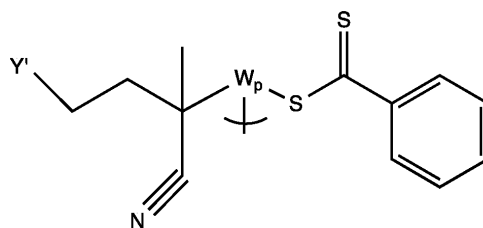
X предусматривает антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть или X предусматривает антитело, фрагмент антитела или лиганд, которые специфически связывают циркулирующий белок, или пептид, или антитело, при этом циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию;

Y предусматривает линкерный компонент;

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень.

В нескольких вариантах осуществления Z представляет собой галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин. Комбинации галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина также могут использоваться в нескольких вариантах осуществления. Дополнительно в нескольких вариантах осуществления галактоза, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкоза, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин необязательно представляют собой β-аномер. В нескольких вариантах осуществления Z конъюгирован с Y по своим C1, C2 или C6.

В нескольких вариантах осуществления Y выбран из N-гидроксисукцинамидильных линкеров, линкеров на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновых линкеров, пиридил-дитиолполи(этиленгликолевых) линкеров, пиридил-дитиольных линкеров, н-нитрофенил-карбонатных линкеров, линкеров на основе сложных эфиров NHS и линкеров на основе сложных эфиров нитрофеноксиполи(этиленгликоля). В нескольких вариантах осуществления Y предусматривает антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают X, дисульфанилэтиловый сложный эфир, структуру, представленную одной из формул Ya - Yp, или Y имеет часть, представленную формулой Y'-CMP



Формула Y'-CMP

где левая скобка "(" обозначает связь между X и Y, правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z;

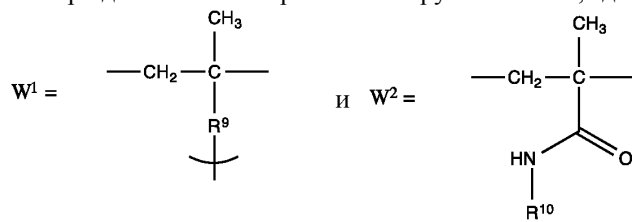
p представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44;

$R^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$  или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ ;

$Y'$  представляет собой остальную часть  $Y$ ;

$W$  представляет собой полимер одной и той же группы  $W^1$  или  $W$  представляет собой сополимер или статистический сополимер одинаковых или различных групп  $W^1$  и  $W^2$ , где



где  $p$  представляет собой целое число от 2 до приблизительно 150;

$R^9$  представляет собой прямую связь,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ;

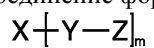
$t$  представляет собой целое число от 1 до 5;

$R^{10}$  представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт.

В некоторых таких вариантах осуществления  $p$  равняется приблизительно 40-80,  $p$  равняется приблизительно 10-100,  $q$  равняется приблизительно 3-20,  $R^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ , где  $R^9$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $Z$  представляет собой глюкозу, галактозу, N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по своему C1, и где  $W$  представляет собой сополимер,  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил. В некоторых вариантах осуществления  $Y$  предусматривает формулу  $Y_a$ , формулу  $Y_b$ , формулу  $Y_c$ , формулу  $Y_f$ , формулу  $Y_g$ , формулу  $Y_h$ , формулу  $Y_i$ , формулу  $Y_k$ , формулу  $Y_m$  или формулу  $Y_n$ . В некоторых вариантах осуществления  $Y$  предусматривает формулу  $Y_a$ , формулу  $Y_b$ , формулу  $Y_c$ , формулу  $Y_m$  или формулу  $Y_n$ . Еще в дополнительных вариантах осуществления  $Y$  предусматривает формулу  $Y_a$ , формулу  $Y_b$ , формулу  $Y_c$ , формулу  $Y_m$  или формулу  $Y_n$ .

В нескольких вариантах осуществления  $X$  предусматривает чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ; чужеродный пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген окружающей среды, против которых у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, чужеродное терапевтическое средство, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или синтетический собственный антиген, против эндогенного варианта которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенная часть. Конкретные примеры различных антигенов раскрыты в данном документе.

Также в данном документе предусмотрены способы лечения нежелательного иммунного ответа против антигена путем введения млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества композиции, предусматривающей соединение формулы 1



Формула 1

где  $m$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

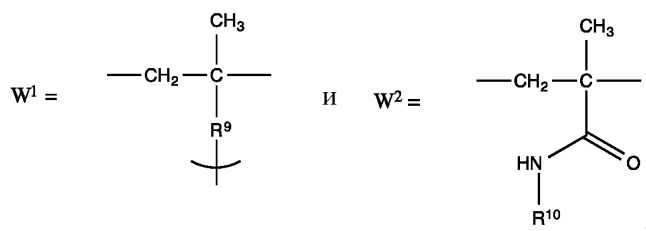
$X$  предусматривает антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть или  $X$  предусматривает антитело, фрагмент антитела или лиганд, которые специфически связывают циркулирующий белок, или пептид, или антитело, при этом циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию;

$Y$  предусматривает линкерный компонент;

$Z$  предусматривает гликозилированный компонент для адресной доставки в печень.

В нескольких таких вариантах осуществления  $X$  предусматривает антиген, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть и  $Y$  предусматривает антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают  $X$ , дисульфанилэтиловый сложный эфир, структуру, представленную одной из формул  $Y_a - Y_r$ , или  $Y$  имеет часть, представленную формулой  $Y'-\text{CMP}$ , где левая скобка "(" обозначает связь между  $X$  и  $Y$ , правая ")" или нижняя "┐" скобки обозначают связь между  $Y$  и  $Z$ ,  $n$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100,  $q$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44,  $R^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$  или

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ ,  $Y'$  представляет остальную часть  $Y$  и  $W$  представляет собой полимер одной и той же группы  $W^1$  или  $W$  представляет собой сополимер или статистический сополимер одинаковых или различных групп  $W^1$  и  $W^2$ , где



где  $p$  представляет собой целое число от 2 до приблизительно 150;

$R^9$  представляет собой прямую связь,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ;

$t$  представляет собой целое число от 1 до 5;

$R^{10}$  представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт.

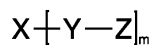
В нескольких таких вариантах осуществления способа лечения  $X$  предусматривает антитело, фрагмент антитела или лиганд, и композицию вводят для клиренса циркулирующего белка, или пептида, или антитела, которые специфически связываются с  $X$ , при этом циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию.

Еще в дополнительных вариантах осуществления  $X$  предусматривает антитело, фрагмент антитела или лиганд, и композицию вводят в количестве, эффективном для снижения концентрации антител, которые причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию, в крови пациента по меньшей мере на 50% вес./вес., как измерено в момент времени от приблизительно 12 до приблизительно 48 ч после введения.

В нескольких таких вариантах осуществления лечения композиция вводится для толеризации пациента в отношении антигенного компонента  $X$ .

В нескольких вариантах осуществления  $X$  предусматривает чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ; чужеродный пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген окружающей среды, против которых у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, чужеродное терапевтическое средство, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или синтетический собственный антиген, против эндогенного варианта которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть.

В нескольких вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, предусмотрена композиция, содержащая соединение формулы 1:



Формула 1

где  $m$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

$X$  предусматривает антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть или  $X$  предусматривает антитело, фрагмент антитела или лиганд, которые специфически связывают циркулирующий белок, или пептид, или антитело, где циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию;

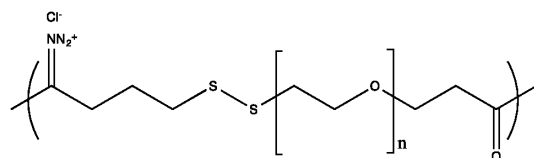
$Y$  предусматривает линкерный компонент;

$Z$  предусматривает компонент для адресной доставки в печень.

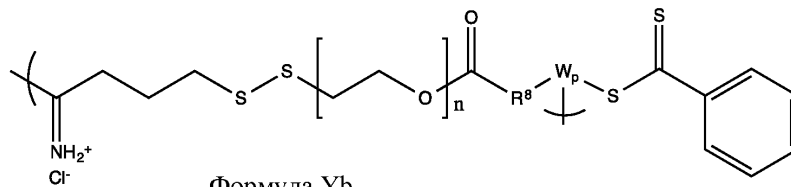
$Z$  также может предусматривать галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин, например, конъюгированные с  $Y$  по своим C1, C2 или C6. N-Ацетилглюкозамин и глюкоза связываются с различными рецепторами лектина, как N-ацетилгалактозамин и галактоза. В примерах ниже экспериментальные данные (и полное раскрытие настоящей заявки) указывают, что отбор  $Z$  в виде N-ацетилглюкозамина приводит к повышенному уровню ответов регуляторных Т-клеток по сравнению с таковыми, полученными с помощью N-ацетилгалактозамина. В нескольких вариантах осуществления это приводит к нежданно повышенной индукции иммунной толерантности и/или клиренсу антигенов из крови субъекта.

$Y$  может быть выбран из N-гидроксисукцинамидильных линкеров, линкеров на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновых линкеров, пиридил-дитиол-поли(этиленгликолевых) линкеров, пиридил-дитиольных линкеров, н-нитрофенил-карбонатных линкеров, линкеров на основе сложных эфиров NHS и линкеров на основе сложных эфиров нитрофенокси-поли(этиленгликоля).

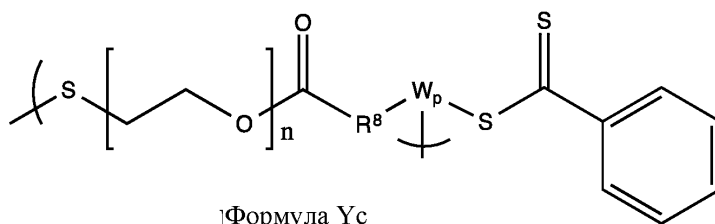
$Y$  также может предусматривать антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают  $X$ ; дисульфанилэтиловый сложный эфир; структуру, представленную одной из формул  $Y_a - Y_p$ :



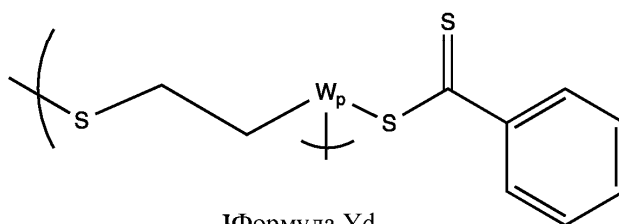
Формула Ya



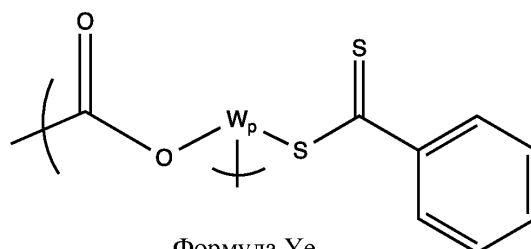
Формула Yb



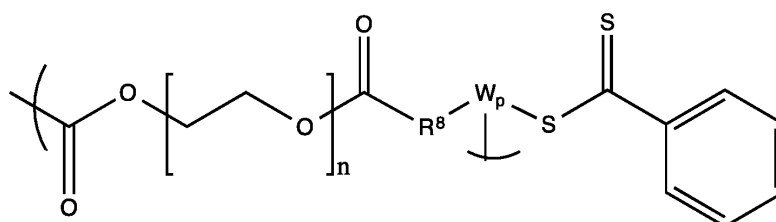
Формула Yc



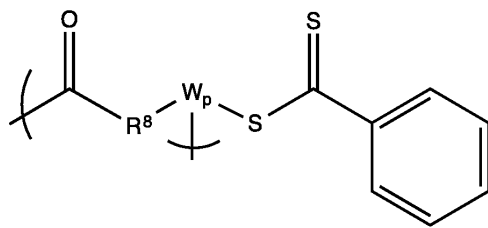
Формула Yd



Формула Ye

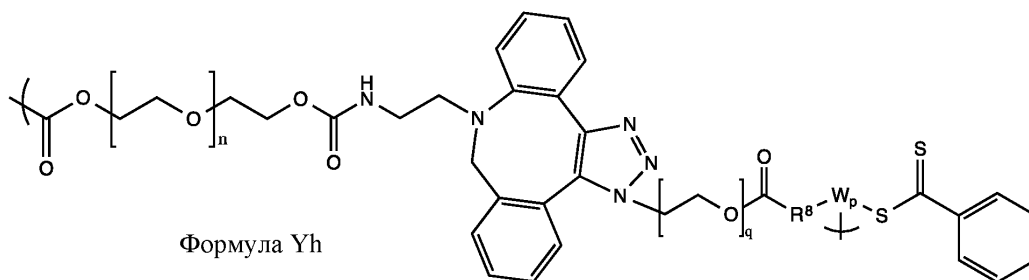


Формула Yf



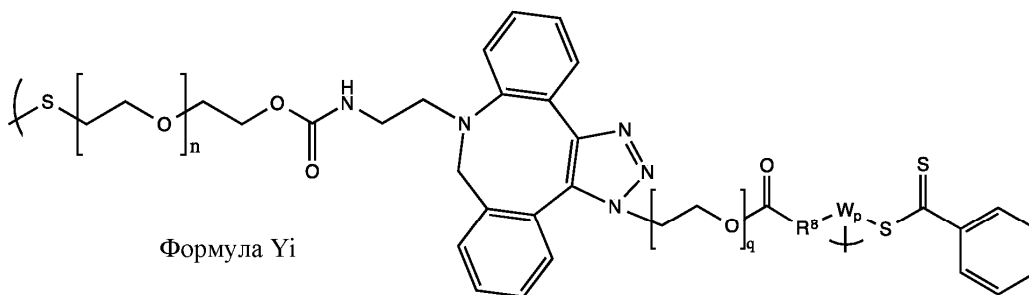
Формула Yg

,



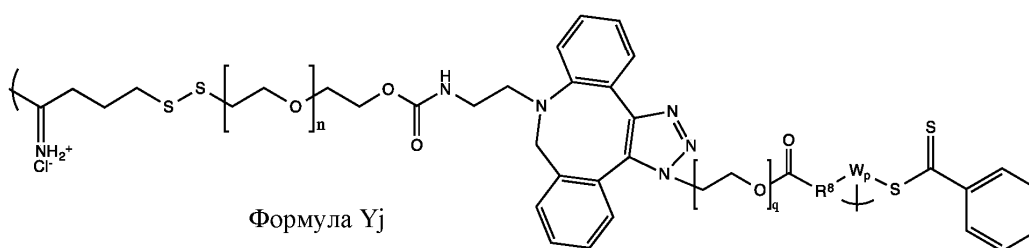
Формула Yh

,



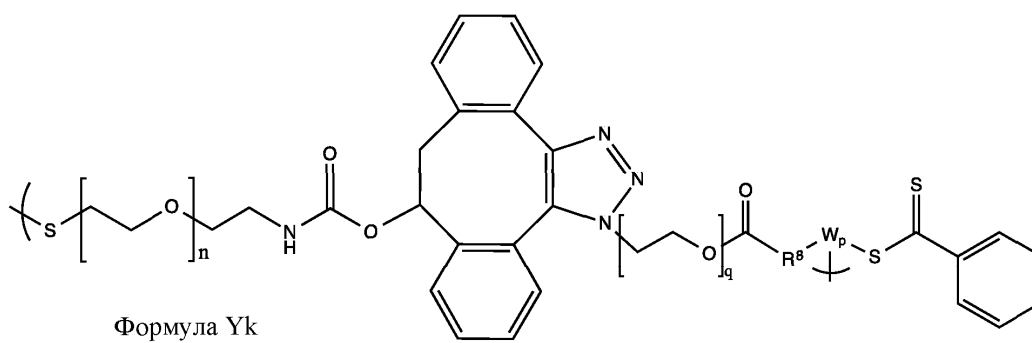
Формула Yi

,

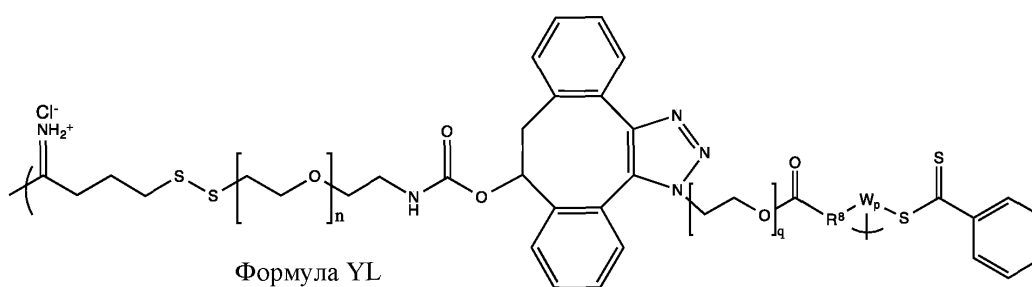


Формула Yj

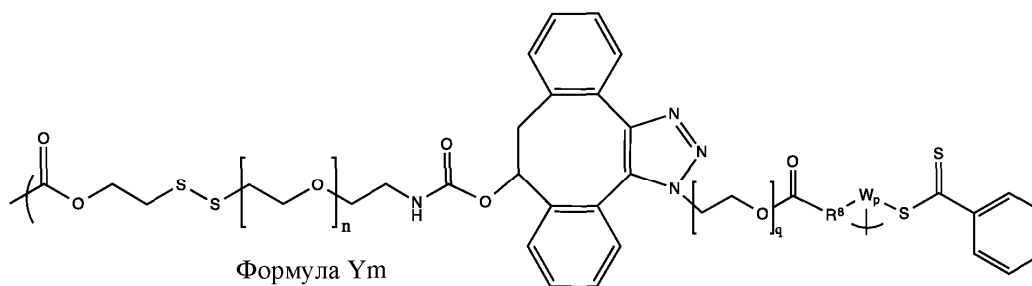
,



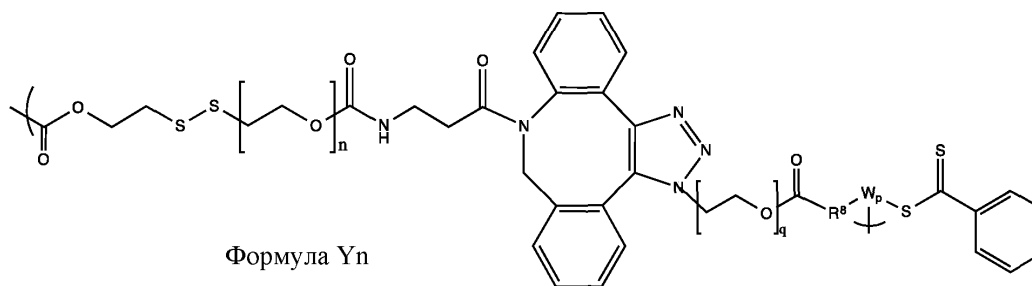
,

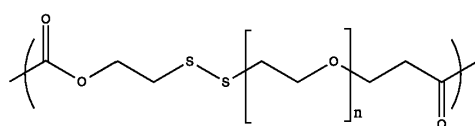


,

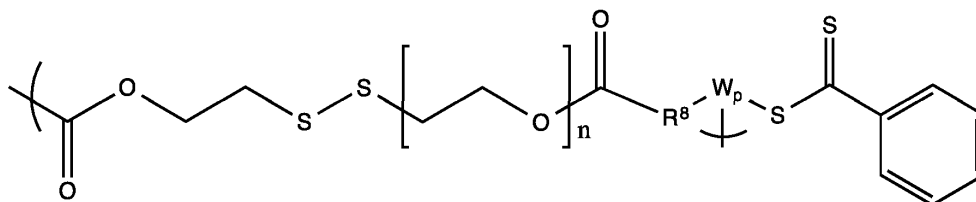


,

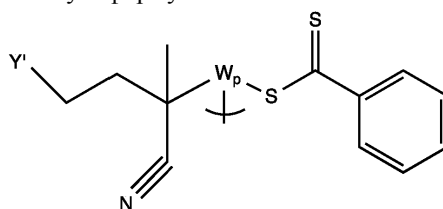


Формула Y<sub>0</sub>

и

Формула Y<sub>p</sub>

или Y имеет часть, представленную формулой Y'-CMP



Формула Y'-CMP

где левая скобка "(" обозначает связь между X и Y; правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z;

n представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100;

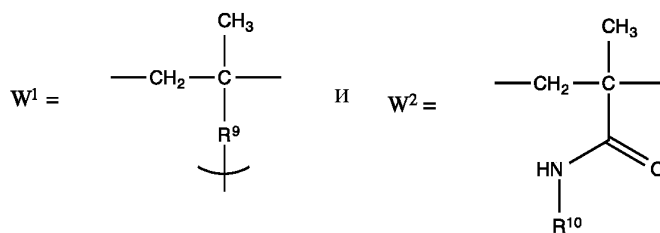
q представляет собой целое число от приблизительно 1 до 44;

R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

Y' представляет остальную часть Y (например, HS-PEG);

W представляет собой полимер одной и той же группы W<sup>1</sup>, или W

представляет собой сополимер (предпочтительно статистический сополимер) одинаковых или различных групп W<sup>1</sup> и W<sup>2</sup>, где



где p представляет собой целое число от 2 до приблизительно 150;

R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-C(O)- (т.е. этилацетамидную группу или "EtAcN") или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>-NH-C(O)- (т.е. пегилированную этилацетамидную группу или "Et-PEG<sub>t</sub>-AcN");

t представляет собой целое число от 1 до 5, (в частности, от 1 до 3 и более конкретно 1 или 2);

R<sup>10</sup> представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт.

В некоторых вариантах осуществления R<sup>10</sup> представляет собой C<sub>f</sub>-алкил или C<sub>f</sub>-алкил-OH<sub>g</sub>, где f независимо представляет собой целое число от 0 до 10 и g независимо представляет собой целое число от 0 до 10. В некоторых вариантах осуществления R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

В нескольких вариантах осуществления предпочтительными являются конкретные линкеры. Например, в нескольких вариантах осуществления линкеры в соответствии с Y<sub>m</sub> дают неожиданно эффективные контрольные точки толерантности. В дополнительных вариантах осуществления линкеры согласно формуле Y<sub>p</sub> дают неожиданно эффективные контрольные точки толерантности. Еще в дополнительных вариантах осуществления состав F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-p<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) достигает особенно эффективных контрольных точек, связанных с толерантностью. В нескольких вариантах осуществления комбинации таких линкеров приводят к синергическим эффектам и еще более неожиданному повышению индукции иммунной толерантности.

В другом аспекте вышеуказанного  $n$  равняется приблизительно 40-80,  $p$  равняется приблизительно 10-100,  $q$  равняется приблизительно 3-20,  $R^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$  и, когда  $R^9$  представляет собой  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $Z$  представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по своему C1.

Еще в одном аспекте вышеуказанного  $Y$  предусматривает формулу  $Y_a$ , формулу  $Y_b$ , формулу  $Y_h$ , формулу  $Y_i$ , формулу  $Y_k$ , формулу  $Y_m$  или формулу  $Y_n$ , в частности, формулу  $Y_a$ , формулу  $Y_b$ , формулу  $Y_m$  или формулу  $Y_n$ .

Кроме того,  $X$  может предусматривать чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ; чужеродный пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген окружающей среды, против которых у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ; чужеродное терапевтическое средство, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ; или синтетический собственный антиген, против эндогенного варианта которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенная часть.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения нежелательного иммунного ответа против антигена путем введения млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества композиции, предусматривающей соединение формулы 1, как раскрыто в данном документе. В некоторых таких способах композицию можно вводить для клиренса циркулирующего белка, или пептида, или антитела, которые специфически связываются с антигенным компонентом  $X$ , при этом циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию. Композицию можно вводить в количестве, эффективном для уменьшения концентрации антител, которые причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию, в крови пациента по меньшей мере на 50% вес./вес., как измерено в момент времени от приблизительно 12 до приблизительно 48 ч после введения. Композицию можно вводить для толеризации пациента в отношении антигенного компонента  $X$ .

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1A-D представляют собой серии графиков, на которых изображено дифференциальное клеточное поглощение конъюгатов галактозы.

A: изображено, что F1aA-PE- $m_4-n_{80}$  (Gal-PE) предпочтительно адресно доставляет PE в синусоидальные эндотелиальные клетки (LSEC) печени.

B: изображено, что F1aA-PE- $m_4-n_{80}$  (Gal-PE) предпочтительно адресно доставляет PE в клетки Купфера (KC) в печени.

C: изображено, что F1aA-PE- $m_4-n_{80}$  (Gal-PE) предпочтительно адресно доставляет PE в гепатоциты.

D: изображено, что F1aA-PE- $m_4-n_{80}$  (Gal-PE) предпочтительно адресно доставляет PE в антиген-презентирующие клетки (APC) печени. \*  $P < 0,05$ .

Фиг. 2 представляет собой график, на котором показана пролиферация OTI  $\text{CD8}^+$  Т-клеток у мышей, обработанных с помощью F1aA-OVA- $m_4-n_{80}$  (Gal-OVA), OVA или физиологического раствора (т.е. без обработки), с большей толерантностью, замеченной в группе, обработанной Gal-OVA.

Фиг. 3A, B представляют собой серии графиков, изображающих данные, связанные с экспрессией маркеров на Т-клетках.

A: представлена процентная доля OT-I  $\text{CD8}^+$  Т-клеток, экспрессирующих PD-1 ("PD1<sup>+</sup>") в поколениях пролиферирующих Т-клеток, обработанных с помощью физиологического раствора, OVA или F1aA-OVA- $m_4-n_{80}$  (GAL-OVA), с наибольшим уровнем PD-1 в группе, обработанной gal-OVA.

B: представлена процентная доля OT-I  $\text{CD8}^+$  Т-клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин (окрашенный "аннексин V<sup>+</sup>") в поколениях пролиферирующих Т-клеток, обработанных с помощью физиологического раствора, OVA или F1aA-OVA- $m_4-n_{80}$  (GAL-OVA), с наибольшим уровнем аннексина-V<sup>+</sup> в группе, обработанной gal-OVA.

Фиг. 4 представляет собой график, на котором показано, что конъюгат галактозы [F1aA-OVA- $m_4-n_{80}$  (Gal-OVA)] снижает иммуногенность OVA, как определено с помощью титров OVA-специфичного антитела (показано в  $\log^{-1}$  титра Ab).

На фиг. 5 показано, что введение F1aA-OVA- $m_4-n_{80}$  (Gal-OVA) в повторных дозах в течение продолжительного времени способно истощать OVA-специфические антитела из сыворотки крови мышей.

На фиг. 6A-F изображены данные, связанные с ограничением OVA-специфичного иммунного ответа.

A: показан иммунный ответ у мышей, подвергнутых стимуляции с помощью OVA и LPS.

B: показан иммунный ответ у мышей, обработанных с помощью OVA.

C: показан иммунный ответ у мышей без обработки.

D и E (соответственно): показано, что F1aA-OVA- $m_4-n_{80}$  (mGal-OVA; 6D) и F1b-OVA- $m_1-n_{44}-p_{34}$  (pGal-OVA; 6E) способны ослаблять OVA-специфичный иммунный ответ в дренирующих лимфатических узлах после внутрикожной стимуляции с помощью OVA и адьюванта LPS.



F: получена из первичной заявки и не составляет часть настоящего изобретения.

На фиг. 7A, B показаны характеристики F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>44</sub>-p<sub>34</sub>.

A: показаны осциллограммы эксклюзионной HPLC F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> (незакрашенные треугольники), F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>44</sub>-p<sub>34</sub> (закрашенные кружки) и неконъюгированный OVA (сплошная линия). Сдвиг влево отражает увеличение молекулярной массы.

B: показан полиакриламидный гель, демонстрирующий увеличение молекулярной массы после конъюгации OVA: (1) неконъюгированный OVA, (2) F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> и (3) F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>44</sub>-p<sub>34</sub>.

На фиг. 8A, B изображены данные, связанные с уменьшением антигенспецифичного иммунного ответа после введения F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный OVA-p(Glu-HPMA)] и показан в виде закрашенных кружков] или F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный OVA-p(Gal-HPMA)] и показан в виде закрашенных ромбов].

A: изображено проточно-цитометрическое обнаружение популяций OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток (CD3e<sup>+</sup>/CD8a<sup>+</sup>/CD45.2<sup>+</sup>), количественно определяемое по дренирующим лимфатическим узлам (пахового и подколенного) через 4 дня после стимуляции антигеном у мышей CD45.1<sup>+</sup>. Значительное уменьшение уровня OT-I CD8<sup>+</sup> Т-клеток определяли после введения OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA).

B: изображено проточно-цитометрическое обнаружение популяций OTII CD4<sup>+</sup> Т-клеток (CD3e<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD45.2<sup>+</sup>), количественно определяемое по дренирующим лимфатическим узлам (пахового и подколенного) через 4 дня после стимуляции антигеном у мышей CD45.1<sup>+</sup>. Значительное уменьшение уровня OT-II CD4<sup>+</sup> Т-клеток определяли после введения OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA).

\* P<0,05, \*\* P<0,01; # P<0,05, ## P<0,01 (под # представлена статистическая значимость по сравнению с животными без обработки).

На фиг. 9A, B изображены данные, связанные с повышением антигенспецифичных регуляторных Т-клеток в лимфатических узлах и селезенке мышей после антигенной стимуляции.

A: изображено проточно-цитометрическое обнаружение F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный OVA-p(Glu-HPMA)] и показан в виде закрашенных кружков] и F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный OVA-p(Gal-HPMA)] и показан в виде закрашенных ромбов], индуцирующих повышение регуляторных OTII Т-клеток (CD3e<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>), собранных из лимфатических узлов через 4 дня после антигенной стимуляции у мышей CD45.1<sup>+</sup>.

B: показан соответствующий анализ на селезенке мышей, обработанных с помощью OVA-p(Glu-HPMA) или OVA-p(Gal-HPMA), по сравнению с животными, обработанными с помощью OVA или физиологического раствора (т.е. стимуляция). \* P<0,05, \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001, # P<0,01, ## P<0,01, ### P<0,001 (под # представлена статистическая значимость по сравнению с животными без обработки).

На фиг. 10 изображены данные проточной цитометрии, связанные со снижением процентной доли антигенспецифичных эффекторных клеток (IFNγ<sup>+</sup> OTI CD8<sup>+</sup> Т-клетки (CD3e<sup>+</sup> CD8a<sup>+</sup> CD45.2<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup>), через 4 дня после антигенной стимуляции у мышей CD45.1<sup>+</sup>. Мышей обрабатывали с помощью конъюгатов F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный OVA-p(Glu-HPMA)] и показан в виде закрашенных кружков] или F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный OVA-p(Gal-HPMA)] и показан в виде закрашенных ромбов], полученных при значительно меньшем количестве IFNγ<sup>+</sup> OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток после антигенной стимуляции по сравнению с мышами, обработанными с помощью OVA или физиологического раствора (т.е. стимуляция) \* P<0,01, \*\* P<0,01; ## P<0,01 (под # представлена статистическая значимость по сравнению с животными без обработки).

На фиг. 11A, B изображены данные, связанные с делецией Т-клеток и регуляцией в модели адаптивного переноса OTII, в которой клетки OTII (CD4<sup>+</sup> Т-клетки от мыши с CD45.2<sup>+</sup>) подвергали адаптивному переносу в реципиента CD45.1<sup>+</sup>, которого обрабатывали с помощью F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal-HPMA)"] или F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu-HPMA)"], или OVA, не связанным с полимером ["OVA"], для индукции Т-регуляторных ответов и предотвращения последующих реакций на антигенное воздействие, опосредованное вакциной. Как 3×10<sup>5</sup> клеток OTI, меченных CFSE, так и 3×10<sup>5</sup> клеток OTII, меченных CFSE, подвергали адаптивному переносу в мышей с CD45.1<sup>+</sup> (n=8 мышей на группу) в день 0. В дни 1, 4 и 7 вводили толерогенные дозы или контрольные дозы. В одной схеме приема лекарств OVA предусмотрен в дозе, составляющей 2,5 мкг в день 1; 2,5 мкг в день 4 и 16 мкг в день 7. В другой OVA предусмотрен в дозе, составляющей 7 мкг в день 1; 7 мкг в день 4 и 7 мкг в день 7, для такой же общей дозы. Подобным образом каждую из pGal-OVA и pGlu-OVA вводили в разные группы при таких же дозировках, составляющих 2,5 мкг в день 1; 2,5 мкг в день 4 и 16 мкг в день 7 или 7 мкг в день 1; 7 мкг в день 4 и 7 мкг в день 7, при этом все дозы основаны на эквивалентной дозе OVA. В конечной группе физиологический раствор вводили в те же дни. Затем в день 14 мышам-реципиентам подвергали стимуляции с помощью OVA (10 мкг) с адъювантом липополисахаридом (50 нг) путем внутри-

кожной инъекции. Определение характеристик дренирующих лимфатических узлов осуществляли в день 19 с обеспечением возможности определения, действительно ли имела место делеция или нет, и действительно ли регуляторные Т-клетки подвергались индукции адаптивно перенесенных клеток.

А: показано количество клеток ОТИ, присутствующих после осуществления стимуляции.

В: показана частота клеток FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (маркеры регуляторных Т-клеток).

\* и # обозначают P<0,05, \*\* и ## обозначают P<0,01, и ### обозначает P<0,001.

На фиг. 12А, В изображены данные, связанные с делецией Т-клеток и регуляцией в модели адаптивного переноса ОТИ, в которой ОТИ-клетки (CD8<sup>+</sup> Т-клетки от мыши CD45.2<sup>+</sup>) подвергали адаптивному переносу в реципиента CD45.1<sup>+</sup>, которого обрабатывали с помощью F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-СМР-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NacGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal-HPMA)"] или F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-СМР-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NacGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu-HPMA)"], или ОВА, не связанным с полимером ["OVA"], для индукции Т-регуляторных ответов и предотвращения последующих реакций на антигенное воздействие, опосредованное вакциной. Как 3×10<sup>5</sup> клеток ОТИ, меченных CFSE, так и 3×10<sup>5</sup> клеток ОТИ, меченных CFSE, подвергали адаптивному переносу в мышей с CD45.1<sup>+</sup> (n=8 мышей на группу) в день 0. В дни 1, 4 и 7 вводили толерогенные дозы или контрольные дозы. В одной схеме приема лекарств ОВА предусмотрен в дозе, составляющей 2,5 мкг в день 1; 2,5 мкг в день 4 и 16 мкг в день 7. В другой ОВА предусмотрен в дозе, составляющей 7 мкг в день 1; 7 мкг в день 4 и 7 мкг в день 7, для такой же общей дозы. Подобным образом каждую из pGal-OVA и pGlu-OVA вводили в разные группы при таких же дозировках, составляющих 2,5 мкг в день 1; 2,5 мкг в день 4 и 16 мкг в день 7 или 7 мкг в день 1; 7 мкг в день 4 и 7 мкг в день 7, при этом все дозы основаны на эквивалентной дозе ОВА. В конечной группе физиологический раствор вводили в те же дни. Затем в день 14 мышей-реципиентов подвергали стимуляции с помощью ОВА (10 мкг) с адъювантом липополисахаридом (50 нг) путем внутрикожной инъекции. Определение характеристик дренирующих лимфатических узлов осуществляли на день 19 с обеспечением возможности определения, действительно ли имела место делеция или нет и действительно ли Т-клетки отвечали на повторное воздействие антигеном, несмотря на экспрессию их цитокинов.

А: показано количество ОТИ-клеток, присутствующих после осуществления стимуляции.

В: показана частота клеток, экспрессирующих IFN $\gamma$  (его недостаток указывает на анергию).

\* и # обозначает P<0,05, \*\* и ## обозначает P<0,01.

На фиг. 13 изображены данные, связанные с уровнями глюкозы в крови. Мышей обрабатывали с помощью конъюгатов F1m'-P31-m<sub>1-3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-СМР-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NacGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный P31-p(Glu-HPMA)], F1m'-P31-m<sub>1-3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-СМР-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NacGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) [меченный P31-p(Gal-HPMA)] (или физиологического раствора). Животные, получающие P31-p(Glu-HPMA) или P31-p(Gal-HPMA), сохраняли нормальный уровень глюкозы в крови в течение 42 дней, в то время как у животных, обработанных с помощью P31 или физиологического раствора, быстро развивалась гипергликемия на протяжении 5-10 дней, демонстрируя, что конъюгаты, раскрытые в данном документе, защищают мышей от аутоиммунного диабета, индуцированного Т-клетками.

На фиг. 14 изображены данные, связанные с возникновением спонтанного диабета у мышей с диабетом без ожирения (NOD). Мыши, обработанные с помощью F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-СМР-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NacGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), показаны в виде заполненных квадратов. Мыши, обработанные с помощью F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-СМР-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NacGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), показаны в виде заполненных треугольников. Мыши, обработанные с помощью физиологического раствора, показаны в виде закрашенных ромбов. Обработка животных с помощью соединений формулы 1 снижала частоту возникновения диабета у NOD-мышей по сравнению с животными, обработанными с помощью физиологического раствора.

На фиг. 15А, 15В изображены данные, связанные с биораспределением модельного антигена ОВА, связанного с синтетическими гликополимерами, демонстрирующие поглощение в печени, в то же время ограничивая поглощение в селезенке.

А: Флуоресцентный сигнал перфузируемой печени, взятой у животных, обработанных с помощью ОВА (1) или ОВА, конъюгированным с различными гликополимерами (2-5).

В: Флуоресцентные изображения селезенки, взятой у животных, обработанных с помощью ОВА (1) или ОВА, конъюгированным с различными гликополимерами (2-5).

Ниже представлены составы: 1. ОВА, 2. ОВА-p(Gal $\beta$ -HPMA), 3. ОВА-p(Gal-HPMA), 4. ОВА-p(Glu $\beta$ -HPMA), 5. ОВА-p(Glu-HPMA).

На фиг. 16А-Е изображены данные, связанные с экспериментами, сравнивающими линкерные компоненты. Синтезировали конъюгаты ОВА-p(Gal-HPMA), ОВА-p(Glu-HPMA), ОВА-p(Gal $\beta$ -HPMA) и ОВА-p(Glu $\beta$ -HPMA) и осуществляли тестирование в отношении их способности индуцировать антиген-специфичную Т-клеточную анергию и устранять популяцию Т-клеток, отвечающих за долговременную память.

А: схематически показана схема лечения в течение 7-дневного эксперимента.

В: показано, что процентные доли пролиферирующих ОТИ Т-клеток в селезенке анализируют с помощью разведения CFSE.

С: показаны процентные доли аннексии  $V^+$  ОТИ Т-клеток в селезенке животных, обработанных с помощью конъюгатов ОВА-гликополимер или свободного ОВА.

Д: показаны процентные доли PD-1<sup>+</sup> ОТИ-клеток в селезенке.

Е: показаны процентные доли Т-клеток памяти в популяции ОТИ, где Т-клетки памяти определяли как CD62L<sup>+</sup> и CD44<sup>+</sup>.

Г: показаны процентные доли ОТИ-клеток, экспрессирующих CD127. Особо следует отметить неожиданное повышение эффективности композиций, использующих глюкозу или галактозу в  $\beta$ -конформации, по сравнению с  $\alpha$ -конформацией.

\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ ; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  и ###  $P < 0,001$  (под # представлена статистическая значимость по сравнению с животными, обработанными только с помощью ОВА).

На фиг. 17 изображены данные, связанные с развитием симптомов диабета в группах без обработки, контрольной и экспериментальной группах.

На фиг. 18 изображены различные группы лечения и хронологическая шкала эксперимента, используемая в эксперименте, связанном с оценкой индукции продолжительной толерантности в перенесенных Т-клетках.

На фиг. 19А, В изображены данные, связанные с композицией Т-клеток в лимфатическом узле.

А: изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ-клетки (как процентная доля от всех клеток CD8<sup>+</sup>) в различных группах лечения.

В: изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ-клетки (как процентная доля от всех клеток CD4<sup>+</sup>) в различных группах лечения.

На фиг. 20 изображены различные группы лечения и хронологическая шкала эксперимента, используемая в эксперименте, связанном с оценкой индукции продолжительной толерантности в эндогенных Т-клетках.

На фиг. 21А, В изображены данные, связанные с композицией Т-клеток в лимфатическом узле.

А: изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ-клетки (как процентная доля от всех клеток CD8<sup>+</sup>) в различных группах лечения.

В: изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ-клетки (как процентная доля от всех клеток CD4<sup>+</sup>) в различных группах лечения.

На фиг. 22 изображен план эксперимента, используемый для оценки способности композиций, раскрытых в данном документе, снижать гуморальную иммунную реакцию с профилактической целью.

На фиг. 23 изображены экспериментальные данные, связанные с количеством антител к аспарагиназе у мышей в различных группах лечения.

На фиг. 24А, В изображен план эксперимента и композиция, применяемая для оценки толерантности к гликопротеину олигодендроцитов миелина (MOG).

А: показано экспериментальный протокол, используемый при иммунизации донорных мышей и обработке мышей-реципиентов.

В: показан один пример толерогенной композиции в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе.

На фиг. 25А, В изображены экспериментальные данные, связанные с индукцией толерантности против MOG, с применением первой концентрации толерогенной композиции.

А: изображены данные, связанные с замедлением возникновения заболевания в различных группах лечения.

В: изображены данные, связанные с уменьшением потери веса в различных группах лечения.

На фиг. 26А, В изображены экспериментальные данные, связанные с индукцией толерантности против MOG, с применением дополнительной концентрации толерогенной композиции.

А: изображены данные, связанные с замедлением возникновения заболевания в различных группах лечения.

В: изображены данные, связанные с уменьшением потери веса в различных группах лечения.

На фиг. 27А-Е изображены экспериментальные данные, связанные с биораспределением композиций pGal и pGlu в бета-конформации.

А: изображена адресная доставка ОВА с помощью различных конъюгатов к LSEC в печени.

В: изображена адресная доставка ОВА с помощью различных конъюгатов в клетки Купфера в печени.

С: изображена адресная доставка ОВА с помощью различных конъюгатов в клетки CD11c<sup>+</sup> в печени.

Д: изображена адресная доставка ОВА с помощью различных конъюгатов в гепатоциты в печени.

Е: изображена адресная доставка ОВА с помощью различных конъюгатов в звездчатые клетки в печени.

### Подробное описание

Известно два асиалогликопротеиновых рецептора ("ASGPR"), которые экспрессируются на гепатоцитах и синусоидальных эндотелиоцитах печени (или "LSEC"). Другие галактозные/галактозаминовые/N-ацетилгалактозаминовые рецепторы можно обнаружить в различных формах на множестве типов клеток [например, дендритных клетках, гепатоцитах, LSEC и клетках Купфера]. В то время как молекулярные и клеточные мишени глюкозы, глюкозамина и N-ацетилглюкозамина могут отличаться от таковых соответствующих изомеров галактозы, было обнаружено, что соответствующие соединения формулы 1, где Z представляет собой гликозилированный компонент, в некоторых случаях являются сравнительно эффективными, в то время как в некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, они неожиданно эффективны. Дендритные клетки считаются "профессиональными антиген-презентирующими клетками", поскольку их первичной функцией является презентация антигенов иммунной системе для выработки иммунных ответов. Известно, что некоторые клетки в пределах печени способны презентировать антигены, но более известно, что печень вовлечена в толерогенез. Понимается, что печень является толерогенным органом. Например, в случаях множественной трансплантации органов, если печень является одним из трансплантируемых органов, зарегистрирована сниженная частота возникновения отторжения. Упоминания о LSEC появились в литературе относительно недавно; вследствие этого их роль в толерогенезе и/или сдерживании воспалительных иммунных ответов еще не является широко подтвержденной или хорошо понимаемой. Однако становится ясным, что они также могут играть значительную роль в индукции антигенспецифичной толерантности.

Одним из отличительных признаков поверхности эритроцита является ее гликозилирование, т.е. наличие значительного количества гликозилированных белков. Действительно, гликофорины (например, гликофорин А) были использованы как мишени для связывания эритроцитов. Гликофорины представляют собой белки с множеством ковалентно присоединенных сахарных цепей, на конце которых расположена сиаловая кислота. По мере того как эритроцит стареет и становится готовым к клиренсу, терминальная сиаловая кислота его гликофоринов обычно утрачивается, оставляя на свободном конце N-ацетилгалактозамин. N-ацетилгалактозамин представляет собой лиганд, который селективно воспринимается ASGPR, ассоциированным с клетками печени, что приводит к связыванию N-ацетилгалактозамин-содержащих веществ клетками печени и их последующему поглощению и переработке в печени.

До настоящего момента специалистам в данной области было понятно, что гликозилирования терапевтического средства таким образом, который приводит к адресной доставке в печень, следует избегать, поскольку клиренс при первом прохождении через печень приводит к снижению периода полужизни терапевтического средства в кровотоке. К тому же, некоторые моноклональные антитела необходимо специфически гликозилировать по ASN297 для оптимального связывания с их Fc-рецепторами. На настоящий момент было обнаружено и раскрыто в данном документе, что можно применять галактозилирование и гликозилирование таким образом, чтобы индуцировать толерогенез.

В нескольких вариантах настоящего изобретения представлены определенные терапевтические композиции, которые служат для адресной доставки в печень (и для поглощения ею), в частности в гепатоциты, LSEC, клетки Купфера и/или звездчатые клетки, более конкретно в гепатоциты и/или LSEC, и еще более конкретно для специфического связывания ASGPR. Адресная доставка в печень способствует двум механизмам лечения: толеризации и клиренсу. При толеризации используется роль печени в элиминации апоптотических клеток и переработке их белков для распознавания иммунной системой в качестве "своих", а также роль печени в отборе периферических белков для иммунологической толерантности. При клиренсе используется роль печени в очистке крови путем быстрого удаления и разрушения токсинов, полипептидов и т.п. Адресная доставка этих композиций в печень осуществляется с помощью галактозилированного компонента (например, галактозы, галактозамина и N-ацетилгалактозамина, в частности конъюгированных на C1, C2 или C6, хотя некоторые варианты осуществления включают конъюгирование с другим или любым углеродом в молекуле), с помощью галактозилированного компонента (например, глюкозы, глюкозамина и N-ацетилглюкозамина, в частности конъюгированных на C1, C2 или C6, хотя некоторые варианты осуществления включают конъюгирование с другим или любым углеродом в молекуле) или посредством десилирования полипептида, для которого требуется такая адресная доставка в печень. Галактозилированный или гликозилированный компонент может быть химически конъюгирован или рекомбинантно слит с антигеном, при этом десилирование экспонирует галактозоподобный компонент на полипептиде антигена. Антиген может быть эндогенным (собственный антиген) или экзогенным (чужеродный антиген), в том числе без ограничений: чужеродным антигеном трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ (например, отторжение трансплантата), чужеродным пищевым антигеном, антигеном животного происхождения, антигеном растительного происхождения или антигеном окружающей среды, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, аллергия или гиперчувствительность), терапевтическим средством, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, гиперчувствительность и/или сниженная терапевтическая активность), собственным антигеном, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, ауто-

иммунное заболевание), или его толерогенной частью (например, фрагментом или эпитопом); причем эти композиции применимы для индукции толеризации в отношении антигена. В качестве альтернативы галактозилированный или другой компонент для адресной доставки в печень может быть конъюгирован с антителом, фрагментом антитела или лигандом, которые специфически связывают циркулирующий белок, или пептид, или антитело, где циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание и/или аллергию (как рассматривалось выше); причем эти композиции применимы для элиминации циркулирующего белка, пептида или антитела. Соответственно, композиции по настоящему изобретению можно применять для лечения нежелательного иммунного ответа, например, отторжения трансплантата, иммунного ответа против терапевтического средства, аутоиммунного заболевания и/или аллергии, в зависимости от варианта осуществления. Также представлены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество композиции по настоящему изобретению, смешанной по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым наполнителем. В другом аспекте, в настоящем раскрытии представлены способы лечения нежелательного иммунного ответа, такого как отторжение трансплантата, ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание или аллергия.

### Определения

Как используется в описании настоящего изобретения, следующие слова и фразы в целом предполагают значения, указанные ниже, кроме тех случаев, когда контекст, в котором они используются, указывает на иное.

Формы единственного числа включают ссылку на формы множественного числа, кроме тех случаев, когда контекст четко указывает на иное.

Подразумевается, что термин "приблизительно" при использовании в сочетании с числовым значением охватывает числовые значения в пределах диапазона, как правило, с нижним пределом, который, например, на 5-10% меньше указанного числового значения, и с верхним пределом, который, например, на 5-10% больше указанного числового значения. Также включены любые значения в раскрытом диапазоне, включая перечисленные контрольные точки.

Как используется в данном документе, "антиген" представляет собой любое вещество, которое служит в качестве мишени для рецепторов при адаптивном иммунном ответе, таких как Т-клеточный рецептор, рецептор для молекулы главного комплекса гистосовместимости I и II класса, В-клеточный рецептор или антитело. В некоторых вариантах осуществления антиген может образовываться в пределах организма (например, "собственный", "ауто" или "эндогенный"). В дополнительных вариантах осуществления антиген может образовываться вне организма ("не-собственный", "чужеродный" или "экзогенный") и поступать, например, путем вдыхания, проглатывания, инъекции или трансплантации, трансдермально и т.д. В некоторых вариантах осуществления экзогенный антиген может быть биохимически модифицирован в организме. Чужеродные антигены включают без ограничений пищевые антигены, антигены животного происхождения, антигены растительного происхождения, антигены окружающей среды, терапевтические средства, а также антигены, которые присутствуют на аллогенном трансплантате.

"Антигенсвязывающая молекула", как используется в данном документе, относится к молекулам, в частности к белкам, таким как молекулы иммуноглобулина, которые содержат вариабельные области антитела, обеспечивающие связывание (специфичное связывание в некоторых вариантах осуществления) с эпитопом. Вариабельная область антитела может присутствовать, например, в полном антителе, фрагменте антитела и рекомбинантном производном антитела или фрагмента антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела (или "связывающая часть"), как используется в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связывать последовательность-мишень. Антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельные области антитела, включают (без ограничений) области "Fv", "Fab" и "F(ab')<sub>2</sub>", "однодоменные антитела (sdAb)", "нанотела", "одноцепочечные Fv (scFv)" фрагменты, "тандемные scFv" (V<sub>H</sub>A-V<sub>L</sub>A-V<sub>H</sub>B-V<sub>L</sub>B), "диатела", "триатела" или "тритела", "одноцепочечные диатела (scDb)" и "биспецифичные фрагменты, связывающие Т-клетки (BiTE)".

Как используется в данном документе "химическая модификация" относится к изменению химической структуры одной или более встречающихся в природе аминокислот полипептида. Такие модификации можно проводить на боковой цепи или конце, например, изменение amino-конца или карбокси-конца. В некоторых вариантах осуществления модификации применимы для получения химических групп, которые с целью удобства можно применять для соединения полипептидов с другими материалами или для присоединения терапевтического средства.

Термин "содержащий", который является синонимом терминов "включающий", "содержащий в составе" или "характеризующийся", является охватывающим или неограничивающим и не исключает дополнительные, не изложенные элементы или стадии способа. Фраза "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, которые не были определены. Фраза "состоящий фактически из" ограничивает объем описанного объекта до указанных материалов или стадий и тех, которые не существенно влияют на его основные и новые характеристики. Понятно, что также предусмотрены все варианты осу-

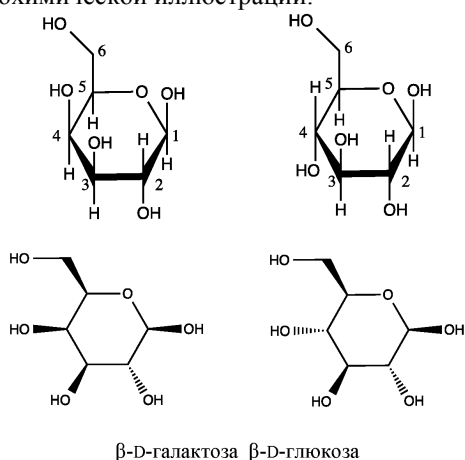
ществления, описанные в данном документе выражением "содержащий", иным образом аналоги вариантов осуществления, описанные терминами "состоящий из" и/или "состоящий фактически из". При использовании в формуле изобретения каждая переходная фраза толкуется отдельно и в подходящем дозволённом и действительном контексте (например, "содержащий" рассматривается скорее как неограничивающая фраза, тогда как "состоящий из" является в большей мере исключающей и "состоящий фактически из" является оптимальным вариантом).

"Консервативные изменения" в целом можно производить в аминокислотной последовательности без изменения активности. Эти изменения называются "консервативными заменами" или мутациями; т.е. аминокислоту, принадлежащую к группе аминокислот с определенным размером или характеристиками, можно заменить на другую аминокислоту. Заместителей для аминокислотной последовательности можно выбирать из других представителей 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. Как ожидается, такие замены не влияют существенно на среднюю молекулярную массу, определяемую с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, или изоэлектрическую точку. Консервативные замены также включают замену оптических изомеров в последовательностях на другие оптические изомеры, в частности D аминокислот на L аминокислоты вместо одного или более остатков последовательности. Кроме того, все аминокислоты в последовательности могут подвергаться замене D-изомера на L-изомер. Типичные консервативные замены включают без ограничений Lys на Arg и наоборот с сохранением положительного заряда; Glu на Asp и наоборот с сохранением отрицательного заряда; Ser на Thr, чтобы сохранить свободную группу -OH; и Gln на Asn с сохранением свободной группы -NH<sub>2</sub>. Еще одним типом консервативной замены является случай, когда вводятся аминокислоты с необходимой химической активностью, чтобы получить реакционно способные участки для химических реакций конъюгации, если возникает необходимость в получении химических производных. Такие аминокислоты включают без ограничений Cys (для вставки сульфгидрильной группы), Lys (для вставки первичного амина), Asp и Glu (для вставки группы карбоновой кислоты) или специализированные неканонические аминокислоты, содержащие кетоновые, азидные, алкиновые, алкеновые и тетразиновые боковые цепи. Консервативные замены или добавления аминокислот, несущих свободных свободные группы -NH<sub>2</sub> или -SH, могут быть особенно эффективными для химической конъюгации с линкерами и галактозилированными компонентами формулы 1. Кроме того, точковые мутации, делеции и вставки в полипептидных последовательностях или соответствующих последовательностях нуклеиновой кислоты в некоторых случаях могут производиться без потери функции полипептида или фрагмента нуклеиновой кислоты. Замены могут включать, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более остатков (в том числе любое количество замен между перечисленными). В варианте, который можно применять согласно настоящему изобретению, может присутствовать суммарно до 200 (например, до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200, в том числе любое количество между перечисленными) изменений в аминокислотной последовательности (например, замен, вставок, делеций, N-терминальных усечений и/или C-терминальных усечений). В нескольких вариантах осуществления количество изменений выше 200. Дополнительно в нескольких вариантах осуществления варианты включают полипептидные последовательности или соответствующие последовательности нуклеиновой кислоты, которые проявляют степень функциональной эквивалентности со ссылкой (например, немодифицированная или нативная последовательность). В нескольких вариантах осуществления варианты проявляют приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% функциональную эквивалентность к немодифицированной или нативной эталонной последовательности (и любую степень функциональной эквивалентности между перечисленными). Для аминокислотных остатков, описываемых в данном документе, используют либо однобуквенное обозначение аминокислоты, либо трехбуквенное сокращение в соответствии со стандартной номенклатурой полипептидов, J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559. Все последовательности из аминокислотных остатков представлены в данном документе формулами в ориентации справа-налево, что соответствует обычному направлению от amino-конца до карбокси-конца.

Термины "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относятся к такому количеству композиции по настоящему изобретению, которое является достаточным для осуществления лечения, определяемого ниже, при введении млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении. Это количество будет варьировать в зависимости от субъекта и болезненного состояния, подлежащего лечению, веса и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, выбора конкретной композиции по настоящему изобретению, схемы приема, которой необходимо следовать, продолжительности введения, способа введения и т.п., все из которых может без труда определить обычный специалист в данной области.

"Эпитоп", также известный как антигенная детерминанта, представляет собой сегмент макромолекулы, например белка, который распознается адаптивной иммунной системой, например, антителами, В-клетками, главным комплексом гистосовместимости I и II класса или Т-клетками. Эпитоп представляет собой именно ту часть или сегмент макромолекулы, которые способны связываться с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В данном контексте термин "связывающий", в частности, относится к специфичному связыванию. В контексте нескольких вариантов осуществления настоящего изобретения предпочтительно, что термин "эпитоп" относится к сегменту белка или полипротеина, который распознается иммунной системой.

Термин "галактоза" относится к моносахаридному сахару, который существует как в форме открытой цепи, так и в циклической форме с D- и L-изомерами. В циклической форме существуют два аномера, а именно, альфа и бета. В альфа-форме спиртовая группа C1 находится в аксиальном положении, в то время как в бета-форме спиртовая группа C1 находится в экваториальном положении. В частности, "галактоза" относится к циклической шестичленной пиранозе, более конкретно к D-изомеру и еще более конкретно к альфа-D-форме ( $\alpha$ -D-галактопиранозе), официальное название которых (2R,3R,4S,5R,6R)-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2,3,4,5-тетраол. Глюкоза представляет собой эпитер галактозы; при этом официальное название представляет собой (2R,3R,4S,5S,6R)-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2,3,4,5-тетраол. Показаны структура и нумерация галактозы и глюкозы, обеспечивающие два неограничивающих примера стереохимической иллюстрации:



Термин "галактозилированный компонент" относится к определенному типу компонента для адресной доставки в печень. Галактозилированные компоненты включают без ограничений остаток галактозы, галактозамина и/или N-ацетилгалактозамина. "Гликозилированный компонент" относится к другому определенному типу компонентов для адресной доставки в печень и включает без ограничения глюкозу, глюкозамин и/или N-ацетилглюкозамин.

Термин "компонент для адресной доставки в печень" относится к компонентам, обладающим способностью направлять, к примеру, полипептид в печень. Печень содержит различные типы клеток, в том числе без ограничений гепатоциты, синусоидальные эндотелиальные клетки, клетки Купфера, звездчатые клетки и/или дендритные клетки. Как правило, компонент для адресной доставки в печень направляет полипептид в одну или более из этих клеток. На поверхности соответствующих клеток печени присутствуют рецепторы, которые распознают и специфически связывают компонент для адресной доставки в печень. Адресную доставку в печень можно обеспечить посредством химической конъюгации антигена или лиганда с галактозилированным или гликозилированным компонентом, десилирования антигена или лиганда для экспонирования нижележащих галактозильных или гликозильных компонентов или специфичного связывания эндогенного антитела с антигеном или лигандом, при этом антиген или лиганд являются десилированными для экспонирования галактозильных или гликозильных компонентов, конъюгированных с галактозильным или гликозильным компонентами. Встречающиеся в природе десилированные белки не охватываются объемом определенных вариантов осуществления настоящего изобретения.

"Числовые значения" и "диапазоны", представленные для различных заместителей, предназначены для того, чтобы охватить все целые числа в пределах изложенного диапазона. Например, при определении n как целого числа, описывающего совокупность, включающую от приблизительно 1 до 100, в частности, от приблизительно 8 до 90 и более конкретно от приблизительно 40 до 80 групп этиленгликоля, где совокупность, как правило, охватывает целое число, указанное как  $n \pm$  приблизительно 10% (или в случае меньших целых чисел от 1 до приблизительно 25,  $\pm 3$ ), следует понимать, что n может быть целым числом от приблизительно 1 до 100 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95, 99, 100, 105 или 110 или любые между перечисленными, включая контрольные точки диапазона) и что описанная совокупность охватывает диапазоны, такие как 1-4, 2-4, 2-6, 3-8, 7-13, 6-14, 18-23, 26-30, 42-50, 46-57, 60-

78, 85-90, 90-110 и 107-113 групп этиленгликоля. Следует понимать, что комбинированные термины "приблизительно" и " $\pm 10\%$ " или " $\pm 3$ " раскрывают и обеспечивают конкретную поддержку эквивалентных диапазонов во всех случаях их применения.

Термин "необязательный" или "необязательно" означает, что описанное после него событие или условие может происходить или может не происходить, и, таким образом, описание включает случаи, когда указанное событие или условие происходит, и случаи, когда оно не происходит.

Пептид, который специфически связывает определенную мишень, называется "лигандом" для этой мишени.

"Полипептид" является термином, который относится к цепи из аминокислотных остатков, вне зависимости от посттрансляционной модификации (например, фосфорилирования или гликозилирования), и/или образования комплексов с дополнительными полипептидами, и/или синтеза в комплексы из множества субъединиц с нуклеиновыми кислотами, и/или углеводами, или другими молекулами. Протеогликаны вследствие этого также называются в данном документе полипептидами. Длинный полипептид (имеющий более приблизительно 50 аминокислот) называется "белком". Короткий полипептид (имеющий менее приблизительно 50 аминокислот) называется "пептидом". В зависимости от размера, аминокислотного состава и трехмерной структуры определенные полипептиды могут называться "антигенсвязывающей молекулой", "антителом", "фрагментом антитела" или "лигандом". Полипептиды можно получать с помощью целого ряда способов, многие из которых хорошо известны из уровня техники. Например, полипептиды можно получать путем экстракции (например, из выделенных клеток), путем экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, или путем химического синтеза. Полипептиды можно получать, например, с помощью рекомбинантной технологии и векторов экспрессии, кодирующих полипептид, которые вводят в клетки-хозяева (например, путем трансформации или трансфекции) для экспрессии кодируемого полипептида.

Как используется в данном документе, "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый наполнитель" включают любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т.п. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какая-либо традиционная среда или средство несовместимы с активным ингредиентом, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты можно также включать в композиции.

Термин "очищенный", как используется в данном документе со ссылкой на полипептид, относится к полипептиду, который был химически синтезирован и, таким образом, фактически не загрязнен другими полипептидами или который был отделен или выделен из большинства других клеточных компонентов, которые его обычно сопровождают (например, других клеточных белков, полинуклеотидов или клеточных компонентов). Примером очищенного полипептида является полипептид, у которого по меньшей мере 70% вещества по сухому весу не содержит белков и встречающихся в природе органических молекул, с которыми он обычно ассоциирован. Таким образом, препарат очищенного полипептида может содержать, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 99% вещества полипептида по сухому весу. Полипептиды также можно конструировать таким образом, чтобы они содержали последовательность метки (например, полигистидиновой метки, тус-метки, FLAG®-метки или другой аффинной метки), которая облегчает очистку или окрашивание (например, захват на аффинной матрице, визуализация под микроскопом). Таким образом, очищенная композиция, которая содержит полипептид, относится к очищенному полипептиду, если не указано иное. Термин "выделенный" означает, что полипептиды или нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению находятся не в своей естественной среде. Выделенные продукты по настоящему изобретению, таким образом, могут содержаться в надосадочной жидкости культуры, быть частично обогащенными, полученными из гетерологичных источников, клонированными в вектор или составленными в композицию с носителем и т.д.

Термин "статистический сополимер" относится к продукту последовательной полимеризации двух или более мономеров в примеси, где вероятность нахождения данной мономерной единицы на любом данном участке в полимерной цепи не зависит от природы соседних единиц в этом положении (распределение Бернулли). Таким образом, когда переменная группа, обозначенная как  $W_p$ , представляет статистический сополимер, цепь может включать любую последовательность от 2 вплоть до приблизительно 150 групп  $W^1$  и  $W^2$ , таких как  $-W^1-W^2-W^1-W^2-$ ;  $-W^2-W^1-W^2-W^1-$ ;  $-W^1-W^1-W^1-W^2-$ ;  $-W^1-W^1-W^2-W^2-$ ;  $-W^1-W^2-W^2-W^1-$ ;  $-W^1-W^2-W^1-W^2-W^2-W^1-W^2-W^1-$ ;  $-W^1-W^1-W^2-W^2-W^1-W^2-W^2-W^1-$ ; и  $W^2-W^2-W^1-W^2-W^1-W^1-W^1-W^2-W^2-W^1-W^2-W^2-W^1$ ; до бесконечности, где Z присоединяется к различным группам  $W^1$  и сами по себе группы  $W^1$  и  $W^2$  могут быть одинаковыми или различными.

Термин "идентичность последовательности" используется в отношении сравнений полипептидных последовательностей (или нуклеиновых кислот). Данное выражение, в частности, относится к процентной доле идентичности последовательности, например по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%,



по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% относительно соответствующего эталонного полипептида или относительно соответствующего эталонного полинуклеотида. В частности, рассматриваемый полипептид и эталонный полипептид проявляют указанную идентичность последовательности на протяжении непрерывного отрезка из 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот или на протяжении полной длины эталонного полипептида.

"Специфичное связывание", как и термин, широко используемый в биологических областях, относится к молекуле, которая связывается с мишенью с относительно высоким сродством по сравнению с тканями, не являющимися мишенями, и обычно подразумевает множество нековалентных взаимодействий, таких как электростатические взаимодействия, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, водородные связи и т.п. Взаимодействия специфичного связывания характеризуют связывание антитело-антиген, связывание фермент-субстрат и определенные взаимодействия белок-рецептор; несмотря на то, что время от времени такие молекулы могут связывать ткани, не относящиеся к их специфичным мишеням, степень такого нецелевого связывания является несущественной, при этом пары связывания с высоким сродством все еще могут соответствовать определению специфичного связывания.

Термин "лечение" или "осуществление лечения" означает любое лечение заболевания или расстройства у млекопитающего, в том числе:

предотвращение или защиту от заболевания или расстройства, что означает, что клинические симптомы не развиваются;

замедление заболевания или расстройства, что означает остановку или подавление развития клинических симптомов; и/или

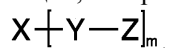
ослабление заболевания или расстройства, что означает, что наблюдается обратное развитие клинических симптомов.

Термин "нежелательный иммунный ответ" относится к реакции иммунной системы субъекта, которая в данной ситуации не является желательной. Реакция иммунной системы является нежелательной, если такая реакция не приводит к предупреждению, уменьшению интенсивности или излечению заболевания или расстройства, но вместо этого вызывает, усиливает или ухудшает или иным образом ассоциирована с индукцией или ухудшением расстройства или заболевания. Как правило, реакция иммунной системы вызывает, усиливает или ухудшает заболевание, если она направлена против ненадлежащей мишени. К примеру, нежелательный иммунный ответ включает без ограничений отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, а также аллергию или гиперчувствительность.

Термин "вариант" следует понимать как белок (или нуклеиновую кислоту), который в сравнении с белком, от которого он происходит, отличается одним или более изменениями в его длине, последовательности или структуре. Полипептид, из которого происходит вариант белка, также известен как исходный полипептид или полинуклеотид. Термин "вариант" включает "фрагменты" или "производные" исходной молекулы. Как правило, "фрагменты" меньше по длине или размеру, чем исходная молекула, тогда как у "производных" имеется одно или более различий в их последовательности или структуре в сравнении с исходной молекулой. Также охвачены модифицированные молекулы, такие как без ограничений посттрансляционно модифицированные белки (например, гликозилированные, фосфорилированные, убиквитинированные, пальмитоилированные или протеолитически расщепленные белки) и модифицированные нуклеиновые кислоты, такие как метилированная ДНК. Также смеси различных молекул, такие как без ограничений гибриды РНК-ДНК, охвачены термином "вариант". Следует понимать, что встречающиеся в природе и искусственно созданные варианты охвачены термином "вариант", как используется в данном документе. Кроме того, варианты, которые можно применять согласно настоящему изобретению, могут быть получены из гомологов, ортологов или паралогов исходной молекулы или из искусственно сконструированного варианта при условии, что вариант проявляет по меньшей мере одну биологическую активность исходной молекулы, например является функционально активным. Вариант может характеризоваться определенной степенью идентичности последовательности с исходным полипептидом, из которого он происходит. Точнее говоря, в контексте настоящего изобретения вариант белка может проявлять по меньшей мере 80% идентичности последовательности с его исходным полипептидом. Предпочтительно идентичность последовательности вариантов белка определена на протяжении непрерывного отрезка из 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более аминокислот. Как рассматривалось выше, в нескольких вариантах осуществления варианты проявляют приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% функциональную эквивалентность к немодифицированной или нативной эталонной последовательности (и любую степень функциональной эквивалентности между перечисленными).

Композиции.

Один аспект настоящего изобретения относится к композициям, фармацевтическим составам и способам лечения с использованием таких композиций, которые представлены формулой 1



Формула 1

где m представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100, в частности от приблизительно 1 до 20 и наиболее предпочтительно от 1 до приблизительно 10;

X представляет собой антигенный компонент, в частности чужеродный антиген или собственный антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или толерогенную часть (например, фрагмент или эпитоп) такого антигенного компонента;

Y представляет собой линкерный компонент, или прямую связь, или антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают X; и

Z представляет собой компонент для адресной доставки в печень, в частности галактозилированный или гликозилированный компонент.

Значение m в формуле 1 будет зависеть от природы X в том смысле, что каждый антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд будут иметь индивидуальное количество и плотность сайтов (преимущественно N-концевые амины, остатки лизина и остатки цистеина), с которыми могут быть связаны линкерный, галактозилированный компонент или гликозилированный компонент. Антигены с ограниченным количеством таких сайтов можно дериватизировать, например, на N- или C-конце посредством добавления остатков лизина или цистеина (необязательно через расщепляемый линкер, в частности линкер с сайтом расщепления для иммунопротеасомы). Как правило, предпочтительным является обеспечение адекватной степени галактозилирования/гликозилирования в композициях формулы 1 так, чтобы облегчить поглощение клетками печени. В фармацевтических составах и способах по настоящему изобретению могут использоваться смеси из композиций формулы 1, соответственно несущих различные компоненты X (например, несколько эпитопов, ассоциированных с определенным нежелательным иммунным ответом).

Композиции формулы 1 включают подклассы, в которых X представляет собой чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ (например, отторжение трансплантата), чужеродный пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген окружающей среды, против которых у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, аллергия или гиперчувствительность), чужеродное терапевтическое средство, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, гиперчувствительность и/или сниженная терапевтическая активность), или собственный антиген, против которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, аутоиммунное заболевание); где Y представляет собой линкер формулы  $Y_a - Y_r$  и/или где Z представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин, как проиллюстрировано формулами 1a - 1p, как описано ниже со ссылкой на схемы реакций.

В дополнительных вариантах осуществления в композициях формулы 1 X может представлять собой антитело, фрагмент антитела или лиганд, которые специфически связывают циркулирующий белок, или пептид, или антитело, где циркулирующий белок, или пептид, или антитело причинно обуславливают отторжение трансплантата, иммунный ответ против терапевтического средства, аутоиммунное заболевание, гиперчувствительность и/или аллергию.

Антигены.

Антиген, используемый в качестве X в композициях формулы 1, может представлять собой белок или пептид, например антиген может представлять собой полное или частичное терапевтическое средство, белок трансплантата полной длины или его пептид, аутоантиген полной длины или его пептид, аллерген полной длины или его пептид, и/или нуклеиновую кислоту, или миметик вышеупомянутого антигена. Перечень любого конкретного антигена в категории или ассоциации с каким-либо конкретным заболеванием или реакцией не исключает, что этот антиген считается частью другой категории или связан с другим заболеванием или реакцией.

Антигены, которые используются при осуществлении настоящего изобретения на практике, могут представлять собой одно или более из следующего.

Терапевтические средства, которые представляют собой белки, пептиды, антитела и антитело-подобные молекулы, в том числе фрагменты антител и слитые белки с антителами и фрагментами антител. К ним относятся белки человека, белки, не принадлежащие человеку (например, мыши), и не-природные (т.е. сконструированные) белки, антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и связывающие каркасы, не относящиеся к антителам, такие как фибронектины, белки DARPIn, ноттины и т.п.

Антигены аллогенных трансплантатов человека, против которых у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ.

Собственные антигены, которые вызывают нежелательный аутоиммунный ответ. Специалистам в данной области будет понятно, что в то время как собственные антигены являются антигенами эндогенного происхождения у пациента с аутоиммунным заболеванием полипептиды, используемые в композициях по настоящему изобретению, как правило, синтезированные экзогенно (в отличие от тех, которые очищают и концентрируют из источника происхождения).

Чужеродные антигены, такие как пищевые антигены, антигены животного происхождения, антигены растительного происхождения и антигены окружающей среды, против которых у пациента вырабатывается нежелательный иммунный ответ. Специалистам в данной области будет понятно, что в то время как терапевтический белок также может рассматриваться как чужеродный антиген из-за его экзогенного происхождения, в целях ясности в описании настоящего изобретения такие терапевтические средства описаны в качестве отдельной группы. Аналогично антиген растительного происхождения или антиген животного происхождения может употребляться в пищу и считаться пищевым антигеном, а антиген окружающей среды может происходить из растения. Все они, однако, представляют собой чужеродные антигены. С целью упрощения не будет предпринято никаких попыток описать характерные признаки и определить все такие потенциально перекрывающиеся группы, поскольку специалисты в данной области могут определить антигены, которые можно использовать в композициях по настоящему изобретению, в частности в свете подробного описания и примеров.

Антиген может представлять собой полный белок, часть полного белка, пептид и т.п. и может быть дериватизированным (как обсуждалось выше) для присоединения к линкеру и/или галактозилированному компоненту, может представлять собой вариант и/или может содержать консервативные замены, в частности поддерживающие идентичность последовательности, и/или может быть десилированным.

В вариантах осуществления, где антиген представляет собой терапевтический белок, пептид, анти тело или анти тело-подобную молекулу, специфичные антигены могут быть выбраны из абатацепта, абциксимаба, адалимумаба, аденозиндезаминазы, адо-трастузумаб-энтанзина, агалсидазы-альфа, агалсидазы-бета, альдеслейкина, алглюцеразы, алглюкозидазы-альфа, ингибитора  $\alpha$ -1-протеиназы, анакинры, анистреплазы (анизотирированный активаторный комплекс плазминогена и стрептокиназы), антитромбина III, антитимоцитарного глобулина, атеплазы, бевацизумаба, бивалирудина, ботулинического токсина типа А, ботулинического токсина типа В, С1-ингибитора эстеразы, канакинумаба, карбоксипептидазы G2 (глюкарпидазы и вораксазы), цертолизумаб-пегола, цетуксимаба, коллагеназы, иммунного Fab к Crotalidae, дарбэпоэтина- $\alpha$ , деносумаба, иммунного Fab к дигоксину, дорназы-альфа, экулизумаба, этанерцепта, фактора VIIa, фактора VIII, фактора IX, фактора XI, фактора XIII, фибриногена, филграстима, галсульфазы, голимумаба, гистрелин ацетата, гиалуронидазы, идурсульфазы, имиглюцеразы, инфликсимаба, инсулина [в том числе рекомбинантного человеческого инсулина ("гНу-инсулин") и бычьего инсулина], интерферона- $\alpha$ 2a, интерферона- $\alpha$ 2b, интерферона- $\beta$ 1a, интерферона- $\beta$ 1b, интерферона- $\gamma$ 1b, ипилимумаба, L-аргиназы, L-аспарагиназы, L-метионазы, лактазы, ларонидазы, лепирудина/гирудина, меказермина, меказермин-ринфабата, метоксинатализумаба, октреотида, офатумумаба, опрелвекина, панкреатической амилазы, панкреатической липазы, папаина, PEG-аспарагиназы, PEG-доксорубицина HCl, PEG-эпоэтина- $\beta$ , пэгфилграстима, PEG-интерферона- $\alpha$ 2a, PEG-интерферона- $\alpha$ 2b, пеглотиказы, пегвисоманта, фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), белка C, расбуриказы (уриказы), сакрозидазы, кальцитонина лососевых, сарграмостима, стрептокиназы, тенектеплазы, терипаратида, тоцилизумаба (атлизумаба), трастузумаба, альфа-интерферона типа 1, устекинумаба, vW-фактора. Терапевтический белок можно получать из природных источников (например, концентрировать и очищать) или синтезировать, например, рекомбинантным способом, и он включает терапевтические препараты-анти тела, которые, как правило, представляют собой моноклональные IgG или их фрагменты или слитые конструкции.

Конкретный терапевтический белок, пептид, анти тело или анти тело-подобные молекулы включают абциксимаб, адалимумаб, агалсидазу-альфа, агалсидазу-бета, альдеслейкин, алглюкозидазу-альфа, фактор VIII, фактор IX, инфликсимаб, инсулин (в том числе гНу-инсулин), L-аспарагиназу, ларонидазу, натализумаб, октреотид, фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL) или расбуриказу (уриказу) и обычно моноклональные анти тела IgG в их различных форматах.

Другая конкретная группа включает кровоостанавливающие средства (фактор VIII и IX), инсулин (в том числе гНу-инсулин) и терапевтическую уриказу, не принадлежащую человеку, PAL и аспарагиназу.

Нежелательный иммунный ответ в гематологии и трансплантации включают аутоиммунную апластическую анемию, отторжение трансплантата (в целом) и болезнь "трансплантат против хозяина" (отторжение трансплантата костного мозга). В вариантах осуществления, в которых антиген представляет собой антиген аллогенного трансплантата человека, специфичные последовательности могут быть выбраны из субъединиц белков различных гаплотипов MHC класса I и MHC класса II (например, отличающиеся у донора/реципиента, идентифицированные при проверке тканевой перекрестной совместимости) и одноаминокислотных полиморфизмов на антигенах минорных групп крови, в том числе RhCE, Kell, Kidd, Duffy и Ss. Такие композиции можно получать индивидуально для данной пары донор/реципиент.

В вариантах осуществления, в которых антиген представляет собой собственный антиген, специфичные антигены (и аутоиммунное заболевание, с которым они ассоциированы) могут быть выбраны из следующего.

При диабете 1 типа были идентифицированы несколько основных антигенов: инсулин, проинсулин, препроинсулин, глутаматдекарбоксилаза-65 (GAD-65 или глутаматдекарбоксилаза 2), GAD-67, глюкозо-6-фосфатаза 2 (IGRP или белок, родственный каталитической субъединице островок-специфичной глюкозо-6-фосфатазы), ассоциированный с инсулиновой белок 2 (IA-2) и ассоциированный с инсулиновой белок 2β (IA-2β); другие антигены включают ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазу H, имоген 38, GLIMA 38, хромогранин-A, HSP-60, карбоксипептидазу E, периферин, переносчик глюкозы 2, ассоциированный с гепатокарциномой-кишечником-поджелудочной железой/панкреатический белок, S100β, фибриллярный кислый белок глии, регенерирующий ген II, панкреатический дуоденальный гомеобокс 1, протеинкиназу миотонической дистрофии, белок, родственный каталитической субъединице островок-специфичной глюкозо-6-фосфатазы, и SST рецепторы 1-5, сопряженные с G-белком. Следует отметить, что инсулин является примером антигена, который может быть охарактеризован как собственный антиген, так и терапевтический белковый антиген. Например, гHu-инсулин и бычий инсулин являются терапевтическими белковыми антигенами (то есть субъектами нежелательной иммунной атаки), в то время как эндогенный человеческий инсулин является собственным антигеном (то есть субъектом нежелательной иммунной атаки). Поскольку эндогенный человеческий инсулин не доступен для использования в фармацевтической композиции, в композициях определенных вариантов осуществления настоящего изобретения используют рекомбинантную форму.

Человеческий инсулин, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P01308):

MALWMRLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY  
LVCGERGFFY TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPL  
ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN (SEQ ID NO:1).

GAD-65, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT Q05329):

MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGI  
GNKLCALLYG DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPC  
SCSKVDVNYA FLHATDLLPA CDGERPTLAF LQDVMNILLQ  
YVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA DQPQNLEIL  
MHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTA  
NTNMFTYEIA PVFVLEYYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFS  
PGGAISNMYA MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH  
SHFSLKKGAA ALGIGTDSVI LIKCDERGKM IPSDLERRIL  
EAKQKGFVPF LVSATAGTTV YGAFDPLLAV ADICKKYKIW  
MHVDAAWGGG LLMSRKHKWK LSGVERANSV  
TWNPHKMMGV PLQCSALLVR EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD  
KHVDLSYDTG DKALQCGRHV DVFKLWLMWR AKGTTGFEAH  
VDKCLELAEY LYNIIKNREG YEMVFDGKPQ HTNVCFWYIP  
PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA PVIKARMMEY GTTMVSYQPL  
GDKVNFFRMV ISNPAATHQD IDFLIEEIER LGQDL (SEQ ID  
NO:2).

IGRP, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT QN9QR9):

MDFLHRNGVLIIQHLQKDYRAYYTFLNFMSNVGDPRNIFFIYFPL  
CFQFNQTVGKMIWVA VIGDWLNLIFKWILFGHRPYWWVQETQ  
IYPNHSSPCLEQFPTTCETGPGSPSGHAMGASCVWYVMVTAALS  
HTVCGMDKFSITLHRLTWSFLWSVFWLIQISVCISRVFIATHFPHQ  
VILGVIGGMLV AEA FEHTPGIQTASLGTYLKTNLFLFLFAVG FYL  
LLRVLNIDLLWSVPIAKKWCANPDWIHIDTTPFAGLVRNLGVLF  
LGFAINSEMFLLSRGGNNTLSFRLLCALTSITLQLYHFLQIPT  
HEEHLFYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLMKQSGKKSQ (SEQ  
ID NO:3).

При аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, в том числе тиреоидите Хашимото и болезни Грейвса, основные антигены включают тиреоглобулин (TG), тиреоидную пероксидазу (ТРО) и рецептор тиреотропина (TSHR); другие антигены включают симпортер натрия-йода (NIS) и мегалин. При ассоциированной с щитовидной железой офтальмопатии и дермопатии в дополнение к аутоантигенам щитовидной железы, в том числе TSHR, антигеном является рецептор 1 инсулиноподобного фактора роста. При гипопаратиреозе основным антигеном является кальций-чувствительный рецептор.

При болезни Аддисона основные антигены включают 21-гидроксилазу, 17 $\alpha$ -гидроксилазу и фермент расщепления боковой цепи P450 (P450<sub>sc</sub>); другие антигены включают АСТН-рецептор, P450<sub>c21</sub> и P450<sub>c17</sub>.

При преждевременном угасании функции яичников основные антигены включают FSH-рецептор и  $\alpha$ -енолазу.

При аутоиммунном гипопизите или аутоиммунном заболевании гипофиза основные антигены включают гипофиз-специфичный белковый фактор (PGSF) 1a и 2; другой антиген представляет собой иодотиронин деиодиназу 2 типа.

При рассеянном склерозе основные антигены включают основной белок миелина ("MBP"), гликопротеин олигодендроцитов миелина ("MOG") и протеолипидный белок миелина ("PLP").

MBP, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P02686):

```
MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNE
VFGEADANQNGTSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGS
RPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSESDELQTIQEDSAATSESLDV
MASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGR
FFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSPLQKSHGRTQDENPV
VHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGRA
SDYKSAHKGFKGVD AQGTL SKIFKLGGDRSRSGSPMARR (SEQ
ID NO:4).
```

MOG, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT Q16653):

```
MASLSRPSLPSCCLCSFLLLLLVSSSYAGQFRVIGPRHPRALVG
DEVELPCRISP GK NATGMEVGWYRPPFSRVVHL YRNGKDQDGD
QAP EYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRFSD EGGFTCFFRDHSY
QEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQ
YRLRGKLRAEIEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALI
ICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF (SEQ ID NO:5).
```

PLP, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P60201):

```
MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTE
KLIETYFSKNYQDY EYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEG
FYTTGAVRQIFGDYKTTICGKLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHS
LERVCHCLGKWLGHDPDKFVGITYALT VVWLLVFACSAVPVYIYF
NTWTTCQSI AFPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVC GS
NLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLTFMIAATYNFAV
LKLMGRGTFK (SEQ ID NO:6).
```

Пептиды/эпитопы, применимые в композициях по настоящему изобретению для лечения рассеянного склероза, включают некоторые или все из следующих последовательностей, индивидуально в композициях формулы 1 или вместе в смеси из композиций формулы 1:

MBP13-32: KYLATASTMDHARHGFLPRH (SEQ ID NO:7);

MBP83-99: ENPWHFFKNIVTPRTP (SEQ ID NO:8);

MBP111-129: LSRFSWGAEGQRPFGYGG (SEQ ID NO:9);

MBP146-170: AQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:10);

MOG1-20: GQFRVIGPRHPIRALVGDEV (SEQ ID NO:11);

MOG35-55: MEVGWYRPPFSRWHLRNGK (SEQ ID NO:12); и

PLP139-154: HCLGKWLGHDPKFVGI (SEQ ID NO:13).

При ревматоидном артрите основные антигены включают коллаген II, иммуноглобулин-связывающий белок, участок кристаллизующегося фрагмента иммуноглобулина G, двухцепочечную ДНК и природные и цитруллинированные формы белков, вовлеченных в патологию ревматоидного артрита, в том числе фибрин/фибриноген, виментин, коллаген I и II, а также альфа-енолазу.

При аутоиммунном гастрите основной антиген представляет собой  $H^+$ ,  $K^+$ -АТФазу.

При пернициозной анемии основной антиген представляет собой внутренний фактор.

При целиакии основные антигены представляют собой тканевую трансглутаминазу и природные и деамидированные формы глютена или глютенотипических белков, таких как альфа-, гамма- и омега-глиадин, глютеинин, хордеин, секалин и авенин. Специалистам в данной области будет понятно, что, например, что хотя основным антигеном целиакии является альфа-глиадин, альфа-глиадин становится более иммуногенным в организме вследствие деамидирования тканевой глутаминазой, которая превращает глутамины альфа-глиадина в глутаминовую кислоту. Таким образом, в то время как альфа-глиадин изначально представляет собой чужеродный пищевой антиген, как только он был модифицирован в организме с превращением в более иммуногенный, его можно характеризовать как собственный антиген.

При витилиго основной антиген представляет собой тирозиназу и родственную тирозиназу белок 1 и 2.

MART1, антиген меланомы 1, распознаваемый Т-клетками, мелан-А, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT Q16655):

MPREDAHFYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGVLLIGC  
WYCRRRNGYRALMDKSLHVGTCALTRRCPEGFDHRDSKVSL  
QEKNCPEVVPNAPPAYEKLAEQSPPPYSP (SEQ ID NO:14).

Тирозиназа, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P14679):

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDR  
SPCGQLSGRGSCQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRT  
CQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCTERRLLVRNIFDLSAPEKD  
KFFAYLTLAKHTISSDYVIPGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFV  
WMHYVSMALLGGSEIWRDIDFAHEAPFLPWHRFLLRWEQ  
EIQKLTGDNFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNLS  
PASFFSWQIVCSRLEEYNHQSCLNGTPEGPLRRNPGNHDKSRT  
PRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFASPLTGIA  
DASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFFVDSIFEQ  
WLRRHRPLQEVYPEANAPIGHNRRESYMPFIPLYRNGDFFISSKD  
LGYDYSYLQSDPDSPQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAV  
LTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEEKQPLMEKEDYHSLYQSHL  
(SEQ ID NO:15).

Белок PMEL меланоцитов, gp100, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P40967):

MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPNRQDWLGVSRLRTKA  
 WNRQLYPEWTEAQRDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSI  
 ALNFPQSQKVLDPGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETDDAC  
 IFPDGGPCPSGWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGT  
 GRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRYSVPLAHSSAFTITDQVPFSVS  
 VSQRLALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEDLSYTWDF  
 GDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVP  
 TTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSTTSVQ  
 VPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEA  
 TGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGP  
 DAS  
 SIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYSFSVTLD  
 IVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQ  
 PPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAV  
 VSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVMAVVLASLIYRRRLMKQ  
 DFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV (SEQ ID  
 NO:16).

При миастении основной антиген представляет собой ацетилхолиновый рецептор.

При обыкновенной пузырчатке и вариантах основные антигены представляют собой десмоглеин 3, 1 и 4; другие антигены включают пемфаксин, десмоколлин, плакоглобин, перплакин, десмоплакины и ацетилхолиновый рецептор.

При буллезном пемфигоиде основные антигены включают BP180 и BP230; другие антигены включают плектин и ламинин 5.

При герпетиформном дерматите Дюринга основные антигены включают эндомизий и тканевую трансглутаминазу.

При приобретенном буллезном эпидермолизе основной антиген представляет собой коллаген VII.

При системной склеродермии основные антигены включают матриксную металлопротеиназу 1 и 3, коллаген-специфичный молекулярный шаперон-белок теплового шока 47, фибриллин-1 и PDGF-рецептор; другие антигены включают Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jo1, NAG-2, белки центромеры, топоизомеразу I, белки ядрышка, РНК-полимеразу I, II и III, PM-Slc, фибрилларин и B23.

При смешанной болезни соединительной ткани основной антиген представляет собой U1snRNP.

При синдроме Шегрена основные антигены представляют собой ядерные антигены SS-A и SS-B; другие антигены включают фодрин, поли(АДФ-рибоза)полимеразу и топоизомеразу, мускариновые рецепторы и Fc-гамма-рецептор IIIb.

При системной красной волчанке основные антигены включают ядерные белки, в том числе "антиген Смит", SS-A, бокс 1 группы высокой подвижности (HMGB1), нуклеосомы, гистоновые белки и двухцепочечную ДНК (против которых синтезируются аутоантитела при патологическом процессе).

При синдроме Гудпасчера основные антигены включают белки клубочковой базальной мембраны, в том числе коллаген IV.

При ревматической болезни сердца основной антиген представляет собой сердечный миозин.

При аутоиммунном полиэндокринном синдроме 1 типа антигены включают декарбоксилазу ароматических L-аминокислот, гистидин декарбоксилазу, декарбоксилазу цистеин-сульфиновой кислоты, триптофан-гидроксилазу, тирозин-гидроксилазу, фенилаланин-гидроксилазу, печеночные цитохромы P450 P4501A2 и 2A6, SOX-9, SOX-10, кальций-чувствительный рецепторный белок и интерфероны 1 типа, интерферон альфа, бета и омега.

При нейромиеелите зрительного нерва основной антиген представляет собой AQP4.

Аквапорин-4, в том числе экзогенно полученная форма, применимая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P55087):

MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKA VTAEF  
 LAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMLVLSLCFGLSIATMVQC  
 F  
 GHISGGHINPAVTVMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILY  
 LVTPPSVVGGLGVTMVGHNLTAGHGLLVELITFQLVFTIFASCD  
 SKRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMG  
 NWENHWIYWVGPIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKA  
 AQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKG  
 KDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:17).

При увеите основные антигены включают S-антиген сетчатки или "S-аррестин" и межфоторецеп-

торный ретинол-связывающий белок (IRBP) или ретинол-связывающий белок 3.

S-аррестин, в том числе экзогенно полученная форма, применимая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P10523):

MAASGKTSKS EPNHVIFKKI SRDKSVTIYL GNRDYIDHVS  
 QVQPDGVVL VDPDLVKGKK VYVTLTCAFR YGQEDIDVIG  
 LTFRRDLYFS RVQVYPPVGA ASTPTKLQES LLKKLGSNTY  
 PFLLTFPDYL PCSVMLQPAP QDSGKSCGVD FEVKAFATDS  
 TDAEEDKIPK KSSVRLIRK VQHAPLEMGP QPRAEAAWQF  
 FMSDKPLHLA VSLNKEIYFH GEPIPVTVTV TNNTEKTVKK  
 IKAFVEQVAN VVLYSSDYVY KPVAMEEAQE KVPNNSTLTK  
 TLTLPLLAN NRERRGIALD GKIKHEDTNL ASSTIIEGI  
 DRTVLGILVS YQIKVKLTVS GFLGELTSSE VATEVPFRLM  
 HPQPEDPAKE SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAEEGKRDK  
 NDVDE (SEQ ID NO:18).

IRBP, в том числе экзогенно полученная форма, применимая в композициях по настоящему изобретению, имеет следующую последовательность (UNIPROT P10745):

MMREWVLLMSVLLCGLAGPHTLFPQSL VLDMAKVLLDNYCFPE  
 NLLGMQEAIIQQAISHEILSISDPQTLASVLTAGVQSSLNDPRLVI  
 SYEPSTPEPPPQVPALTSLEEELAWLQRGLRHEVLEGNVGYLR  
 VDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDLRHCTGGQ  
 VSGIPYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGA  
 DKDVVVLTSQTRGVAEDIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLR  
 KLRIGESDFFFTVPVSRSLGPLGGGSQTWEGSGVLPVCGTPAEQA  
 LEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLDYYTLVDRVPTLLQHLAS  
 MDFSTVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSWPAP  
 DAAAE DSPGVAPELPEDEAIRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFD  
 SFADASVLGVLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRHNPGGPSSAV  
 PLLLSYFQGPEAGPVHLFTTYDRRTNITQEHFISHMELPGPRYSTQ  
 RGVYLLTSHRTATAAEFAFLMQSLGWATLVGEITAGNLLHTRT  
 VPLLDTPESLALTVPVLTIDNHGEAWLGGGVVPAIVLAEEAL  
 DKAQEVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGQTSALLRA  
 KLAQGAYRTAVDLESASQLTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVV  
 EEAPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEVLPQGLGYLRFDAMAELET  
 VKAVGPQLVRLVWQQLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIPLLCSYF  
 FEAEPQHLYSVFDRATSKVTEVWTLPPVAGQRYGSHKDLYILM  
 SHTSGSAAEFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSSPL  
 YASMPTQMAMSATTGKAWDLAGVEPDITVPMSEALSIAQDIVAL  
 RAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAKMATKLSGLQSRYSRVT  
 SEVALAEILGADLQMLSGDPLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIPSP  
 EVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMMFGDGELLTQVSRLLVEHI  
 WKKIMHTDAMIIDMRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSR  
 PDDSVSELWTHAQVVGERYGSKSMVILTSSVTTAGTAEFTYIM  
 KRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDNLYLTIPTARSVGASD  
 GSSWEGVGVTPIHVVPAAEEALARAKEMLQHNQLRVKRSPGLQD  
 HL (SEQ ID NO:19).

В вариантах осуществления, в которых антиген представляет собой чужеродный антиген, против которого может развиваться нежелательный иммунный ответ, такой как пищевые антигены, специфичные антигены могут происходить:

из арахиса: конарахин (Ara h 1), аллерген II (Ara h 2), агглютинин арахиса, конглютин (Ara h 6); ко-нарахин, например, имеет последовательность, обозначенную как UNIPROT Q6PSU6;

из яблока: 31 кДа основной аллерген/гомолог белка устойчивости к заболеванию (Mal d 2), предшественник белка-переносчика липидов (Mal d 3), основной аллерген Mal d 1.03D (Mal d 1);



из молока: а-лактальбумин (ALA), лактотрансферрин;  
из киви: актинидии (Act c 1, Act d 1), фитоцистатин, тауматин-подобный белок (Act d 2), кивеллин (Act d 5);  
из яичных белков: овомукоид, овальбумин, овотрансферрин и лизоцим;  
из яичных желтков: ливетин, аповитиллин и восветин;  
из горчицы: 2S альбумин (Sin a 1), 1 IS глобулин (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 креветок: аллерген Pen a 1 (Pen 1), аллерген Pen m 2 (Pen m 2), изоформа быстрого тропомиозина;  
из пшеницы и/или других хлебных злаков: высокомолекулярный глютенин, низкомолекулярный глютенин, альфа-, гамма- и омега-глиадин, хордеин, секалин и/или авенин;  
пептиды/эпитопы, применимые в композициях по настоящему изобретению для лечения целиакии, включают некоторые или все из следующих последовательностей, индивидуально в композициях формулы 1 или вместе в смеси из композиций формулы 1:  
соответствующий DQ-2, альфа-глиадин "33-мерный" нативный:  
LQLQPFPPQLPYRQPLPYRQPLPYRQPLPYRQPF (SEQ ID NO:20)  
соответствующий DQ-2, альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный:  
LQLQPFPPQLPYRQPLPYRQPLPYRQPLPYRQPF (SEQ ID NO:21)  
соответствующий DQ-8, альфа-глиадин:  
QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:22)  
соответствующий DQ-8, омега-глиадин (пшеница, U5UA46):  
QPFPPQPEQPFPPW (SEQ ID NO:23)  
из клубники: основной аллерген клубники Fra 1-E (Fra 1); и  
из бананов: профилин (Mus xp 1).

В вариантах осуществления, в которых антиген представляет собой чужеродный антиген, против которого развивается нежелательный иммунный ответ, такой как антигены животного происхождения, антигены растительного происхождения и антигены окружающей среды, специфичными антигенами могут являться, например, антигены, происходящие от кошек, мышей, собак, лошадей, пчел, из пыли, от деревьев и золотарника, в том числе следующие белки или пептиды, происходящие из:

сорных растений (в том числе аллергены амброзии amb 1, 2, 3, 5 и 6 и Amb t 5; амаранта, Che 2 и 5; и аллергены других сорняков Par j 1, 2 и 3 и Par o 1);

трав (в том числе главные аллергены Cyp d 1, 7 и 12; Dac g 1, 2 и 5; Hol I 1.01203; Lol p 1, 2, 3, 5 и 11; Mer 1; Pha 1; Poa p 1 и 5);

пыльцы амброзии и других сорных растений (в том числе щавеля курчавого, мари белой, амаранта, подорожника, щавеля малого и полыни), трав (в том числе бермудской, джонсоновой травы, мятлика лугового, ежи сборной, душистого колоска и тимopheевки луговой) и деревьев (в том числе катальпы, вяза, гикори, маслины, пекана, платана и грецкого ореха);

пыли (в том числе основные аллергены из видов *Dermatophagoides pteronyssinus*, такие как Der p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 20, 21 и 23; из видов *Dermatophagoides farinae*, такие как Der f 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 22 и 24; из видов *Blomia tropicalis* такие как Bio t 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19 и 21; а также аллергены Eur m 2 из *Euroglyphus maynei*, Tyr p 13 из *Tyrophagus putrescentiae* и аллергены Bla g 1, 2 и 4; Per 1, 3 и 7 из таракана);

домашних животных (в том числе кошек, собак, грызунов и сельскохозяйственных животных; главные аллергены кошек включают Fel d 1-8, IgA кошки, BLa g 2 и кошачий альбумин; главные аллергены собак включают Can f 1-6 и собачий альбумин);

пчелиного яда, в том числе основные аллергены Api m 1-12; и

грибов, в том числе аллергены, которые происходят из видов *Aspergillus* и *Penicillium*, а также видов *Alternaria alternata*, *Davidiella tassiana* и *Trichophyton rubrum*.

Как будет понятно специалистам в данной области, пациента можно протестировать для идентификации антигена, против которого развился нежелательный иммунный ответ, и на основе этого антигена можно разработать белок, пептид и т.п. и включить в качестве X в композицию по настоящему изобретению.

Силированные антигены, антитела, фрагменты антител.

Ниже приведены неограничивающие примеры антигенов, антител, фрагментов антител с силированием, которое можно удалить, чтобы оставить гликозилирование для специфичной адресной доставки к ASGPR: фолликулостимулирующий гормон (FSH), человеческий хорионический гонадотропин (HCG), лютеинизирующий гормон (LH), остеопонтин, тиреотропный гормон (TSH), агалсидаза-альфа, агалсидаза-бета (FABRAZYME®; Genzyme), эпозтин-альфа и эпозтин-бета, фоллитропин-альфа (GONAL-F®; Merck/Serono) и фоллитропин-бета (FOLLISTIM®; Schering-Plough), связывающий белок 6 инсулинопо-

добного фактора роста (IGFBP-6), лутропин-альфа (LUVERIS®; Merck/Serono), трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ , антитромбин (ATryn®/TROMBATE-III®; Genzyme/Talecris Biotherapeutics), тиреотропин-альфа (THYROGEN®; Genzyme), ленограстим, сарграмостим (LEUKINE®; Genzyme), интерлейкин-3, проурокиназа, лимфотоксин, ингибитор C1-эстеразы (Berinert®; CSL), IgG-подобные антитела, интерферон-бета, фактор свертывания крови VIIa (NOVOSEVEN®; Novo Nordisk), фактор свертывания крови VIII (мороктоког-альфа), фактор свертывания крови IX (нонаког-альфа) (BENEFIX®; Wyeth) и слитый белок p55 рецептора некроза опухолей. (См.: Byrne et al., *Drug Discovery Today*, Vol. 12, No. 7/8, pages 319-326, Apr. 2007 и Sola et al., *BioDrugs*. 2010; 24(1):9-21). Фармацевтически релевантные белки, которые ранее были подвергнуты гипергликозилированию и могут быть подвергнуты десилированию для адресной доставки в гепатоцит-ASGPR, включают интерферон-альфа и гамма, лютеинизирующий гормон, фрагменты антител Fv, аспарагиназу, холинэстеразу, дарбэпоэтин-альфа (AraNESP®; Amgen), тромбopoэтин, лептин, FSH, IFN- $\alpha 2$ , сывороточный альбумин и корифоллитропин-альфа.

Белки с гликанами, которые обычно не содержат на концах сиаловые кислоты, в том числе белки, полученные в бактериях или дрожжах (такие как аргиназа, некоторые инсулины и уриказа), не будут подвергаться десилированию.

Специалистам в данной области будет понятно, что публично доступные ссылки, такие как UNIPROT, раскрывают наличие и расположение сайтов для десилирования на большинстве, если не всех антигенах, антителах, фрагментах антител и лигандах, представляющих интерес.

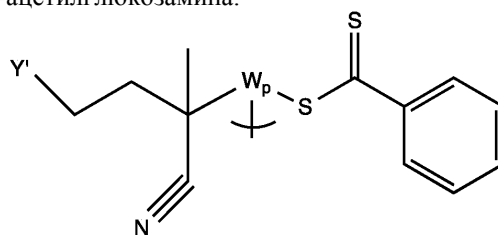
Антитела и пептидные лиганды.

В вариантах осуществления, в которых используется антитело, фрагмент антитела или лиганд, такие компоненты выбирают, чтобы они специфически связали целевой циркулирующий белок, или пептид, или антитело, что приводит к поглощению печенью циркулирующего целевого компонента, возможно в виде аддукта с компонентом для адресной доставки, что в конце концов приводит к клиренсу и инактивации циркулирующего целевого компонента. Например, печень-нацеленный фактор VIII будет связываться и выводить циркулирующие антитела к фактору VIII. Методики идентификации таких компонентов будут знакомы специалистам в данной области.

Линкеры.

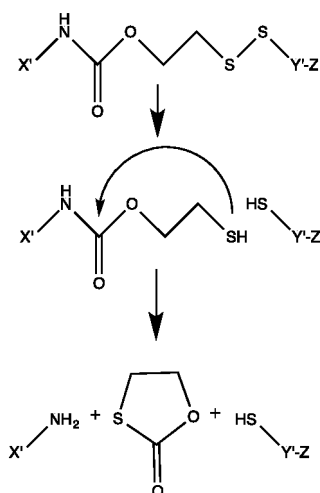
Линкеры, используемые в композициях по настоящему изобретению ("Y" в формуле 1), могут включать N-гидроксисукцинамидильные линкеры, линкеры на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновые линкеры, пиридил-дитиол-поли(этиленгликолевые) линкеры, пиридил-дитиольные линкеры, н-нитрофенил-карбонатные линкеры, линкеры на основе сложных эфиров NHS, линкеры на основе сложных эфиров нитрофенокси-поли(этиленгликоля) и т. п.

Одна конкретная группа линкеров включает линкеры формулы Y'-CMP, приведенной ниже (где Y' обозначает остальную часть линкера, а R<sup>9</sup> и Z являются такими, как определено). Более конкретно, в группе линкеров, включающих формулу Y'-CMP, в некоторых вариантах осуществления заместитель R<sup>9</sup> представляет собой этилацетамидную группу, и, еще более конкретно, этилацетамид конъюгирован с C1 N-ацетилгалактозамина или N-ацетилглюкозамина.



Формула Y'-CMP

Дитиол-содержащие линкеры, в частности дисульфанилэтил-карбамат-содержащие линкеры (называемые с включением свободного амина X, иначе называемые "дисульфанилэтиловый сложный эфир" без включения свободного амина X), являются особенно предпочтительными в композициях по настоящему изобретению, так как обладают способностью расщеплять и высвобождать антиген в его первоначальной форме после попадания внутрь клетки, например, как проиллюстрировано ниже (где Y' обозначает остальную часть линкера, а X' и Z являются такими, как определено).



В частности, применительно к линкерам, показанным ниже в виде формулы  $Y_a$  - формулы  $Y_r$ :

левая скобка "(" (обозначает связь между X и Y;

правая ")" или нижняя "└" скобки обозначают связь между Y и Z;

n представляет собой целое число, представляющее совокупность, включающую от приблизительно 1 до 100, в частности от приблизительно 8 до 90 (например, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95), более конкретно, от приблизительно 40 до 80 (например, 39, 40, 43, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 55, 57, 60, 62, 65, 66, 68, 70, 73, 75, 78, 80 или 81) групп этиленгликоля, где совокупность обычно охватывает целое число, определенное как  $n \pm 10\%$ ;

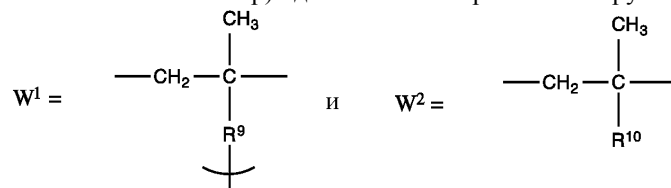
p представляет собой целое число, представляющее совокупность, включающую от приблизительно 2 до 150, в частности от приблизительно 20 до 100 (например, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или 105) и, более конкретно, от приблизительно 30 до 40 (например, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44), где совокупность обычно охватывает целое число, определенное как  $p \pm 10\%$ ;

q представляет собой целое число, представляющее совокупность, включающую от приблизительно 1 до 44, в частности от приблизительно 3 до 20 (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22) и, более конкретно, от приблизительно 4 до 12 (например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13), где совокупность обычно охватывает целое число, определенное как  $q \pm 10\%$ ; и

$R^8$  представляет собой  $-\text{CH}_2-$  ("метил") или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$  ("1-пиано-1-метилпропил" или "CMP");

$Y'$  представляет остальную часть Y (например, HS-PEG);

W представляет собой полимер одной и той же группы  $W^1$  или W представляет собой сополимер (предпочтительно статистический сополимер) одинаковых или различных групп  $W^1$  и  $W^2$ , где



где p представляет собой целое число от 2 до приблизительно 150;

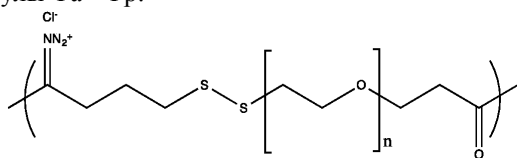
$R^9$  представляет собой прямую связь,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  (т.е. этилацетамидную группу или "EtAcN") или  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_t-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$  (т.е. пегилированную этилацетамидную группу или "Et-PEG<sub>t</sub>-AcN");

t представляет собой целое число от 1 до 5 (в частности, от 1 до 3 и, более конкретно, 1 или 2); и

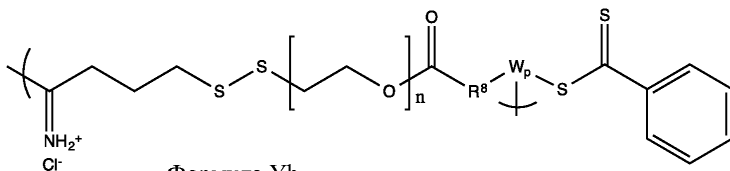
$R^{10}$  представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт, в частности N-(2-гидроксипропил)метилакриламид; и

Z (не показан) представляет собой галактозу, глюкозу, галактозамин, глюкозамин, N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин.

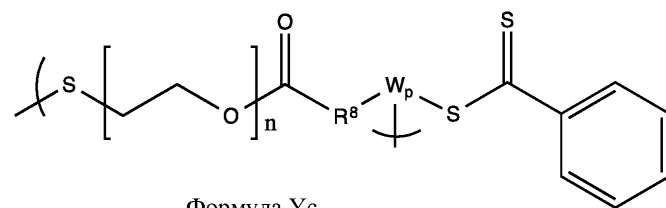
формулы Ya - Yr:



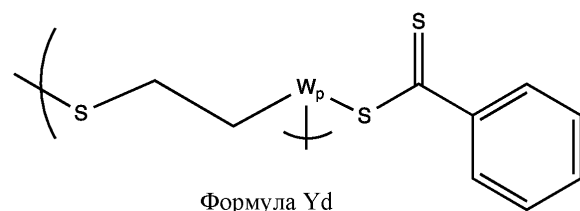
Формула Ya



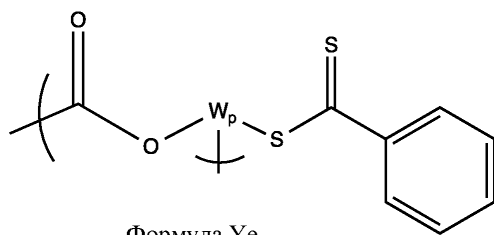
Формула Yb



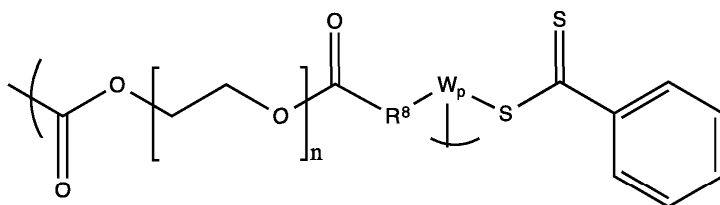
Формула Yc



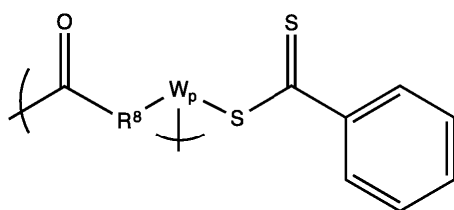
Формула Yd



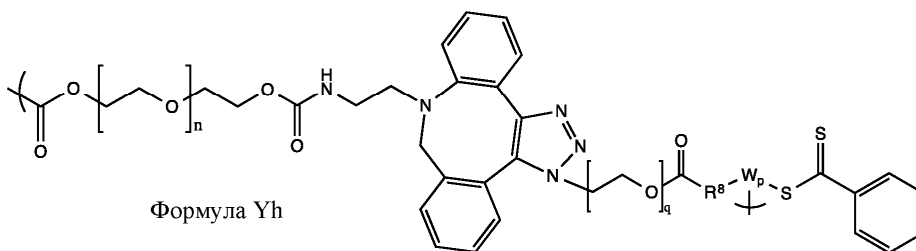
Формула Ye



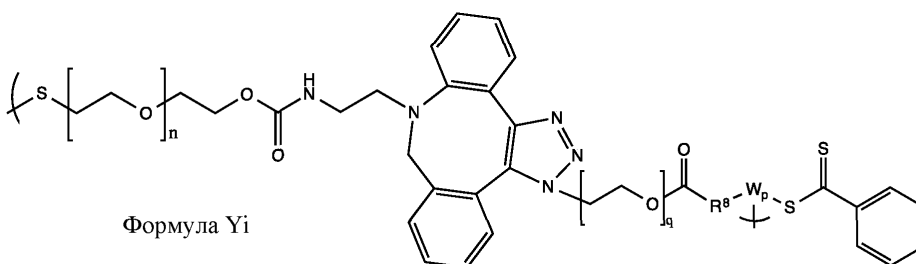
Формула Yf



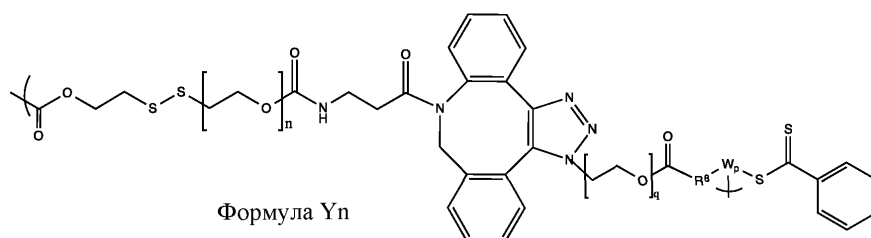
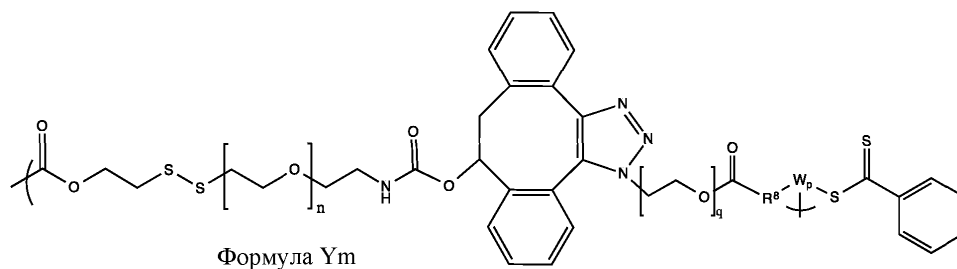
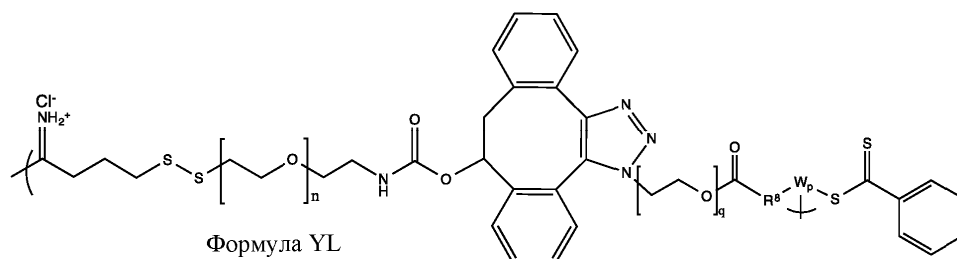
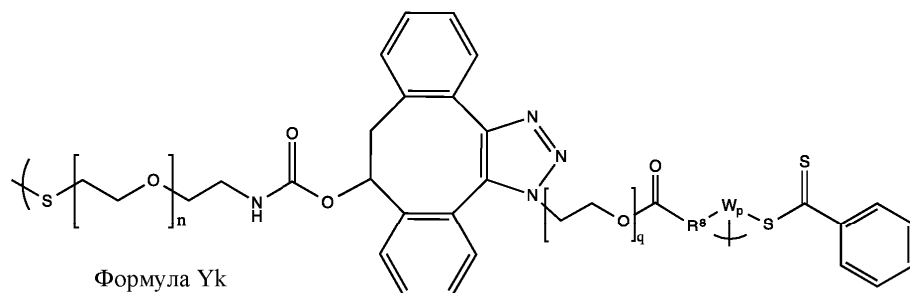
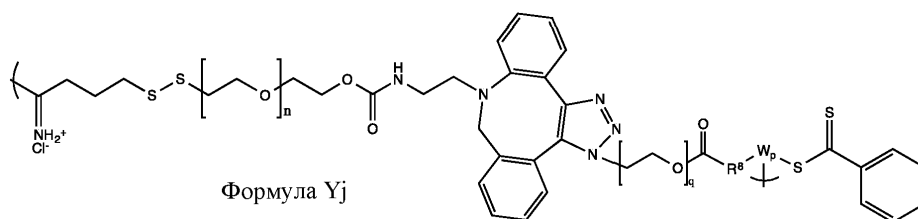
Формула Yg



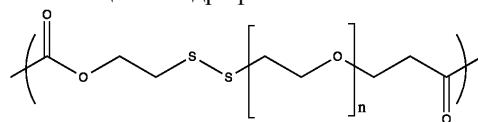
Формула Yh



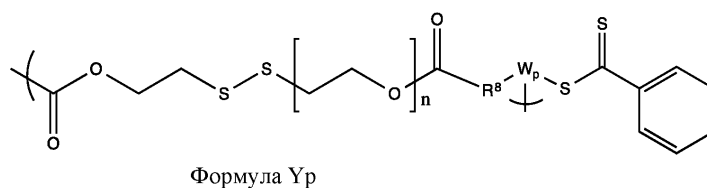
Формула Yi



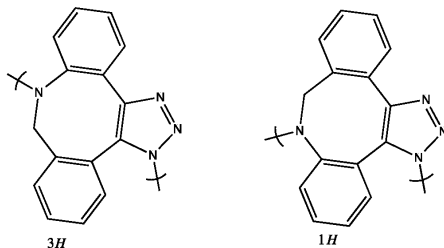
(Линкеры формулы Yn можно синтезировать через определенные предшественники, которые делают Yn особенно подходящим для конъюгации с гидрофобными антигенами).



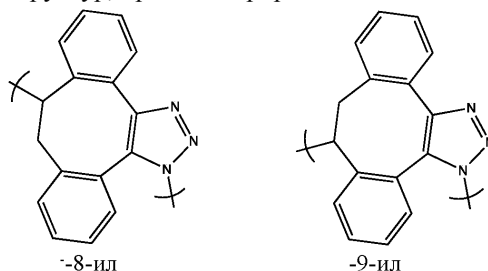
и



Линкеры, приведенные выше в виде формул Yh - Yn, синтезируют как изомеры, которые используют без разделения. Например, линкеры формул Yh, Yi, Yj и Yn будут представлять собой смесь из 8,9-дигидро-1Н-дibenzo[b,f][1,2,3]триазоло[4,5-d]азоцин-8-ильных и 8,9-дигидро-3Н-дibenzo[b,f][1,2,3]триазоло[4,5-d]азоцин-8-ильных структур, проиллюстрированных ниже:



Линкеры формул Yk, YL и Ym будут представлять собой смесь из 8,9-дигидро-1Н-дibenzo[3,4:7,8]циклоокта[1,2-d][1,2,3]триазол-8-ильных и 8,9-дигидро-1Н-дibenzo[3,4:7,8]циклоокта[1,2-d][1,2,3]триазол-9-ильных структур, проиллюстрированных ниже:



Присутствие таких изомерных смесей не ухудшает функциональность композиций, в которых использованы такие линкеры.

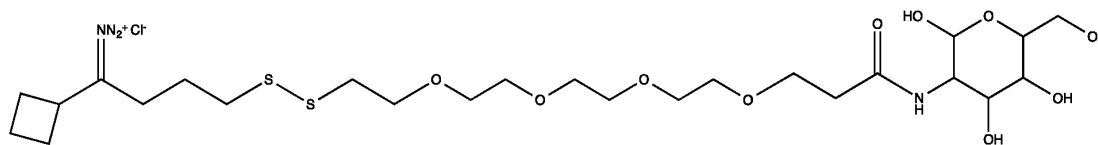
Компоненты для адресной доставки в печень.

Галактозилированные компоненты, используемые в композициях по настоящему изобретению, служат для адресной доставки композиций в клетки печени (например, специфически связывающие гепатоциты) и могут быть выбраны из галактозы, галактозамина или N-ацетилгалактозамина. Галактозилированные компоненты, используемые в композициях по настоящему изобретению, служат для адресной доставки композиций в клетки печени (например, специфически связывающие гепатоциты или LSEC) и могут быть выбраны из глюкозы, глюкозамина или N-ацетилглюкозамина. Сообщалось, что сродство к ASGPR можно сохранять при модификации одной из двух сторон C3/C4-диольного якоря галактозы (Mamidyala, Sreeman K., et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1978-1981), следовательно, точки конъюгации, применяемые в нескольких вариантах осуществления, расположены, в частности, на C1, C2 и C6.

Конкретные компоненты для адресной доставки в печень включают галактозу или глюкозу, конъюгированные по C1 или C6, галактозамин или глюкозамин, конъюгированные по C2, и N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C6. Другие конкретные компоненты для адресной доставки в печень включают N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C2, более конкретно, конъюгированные с линкером, несущим заместитель R<sup>9</sup>, который представляет собой CH<sub>2</sub>. Третьи компоненты для адресной доставки в печень включают галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин или глюкозу, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1, более конкретно, конъюгированные с линкером, несущим заместитель R<sup>9</sup>, который представляет собой этилацетамидную группу.

Номенклатура.

Композиции формулы 1 можно называть с применением комбинации IUPAC и тривиальных названий. Например, соединение, соответствующее формуле 1, где X представляет собой циклобутильный компонент (показан вместо антигена в качестве иллюстрации), Y представляет собой формулу Ya, m равняется 1, n равняется 4 и Z представляет собой N-ацетилгалактозамин-2-ил или N-ацетилглюкозамин-2-ил:

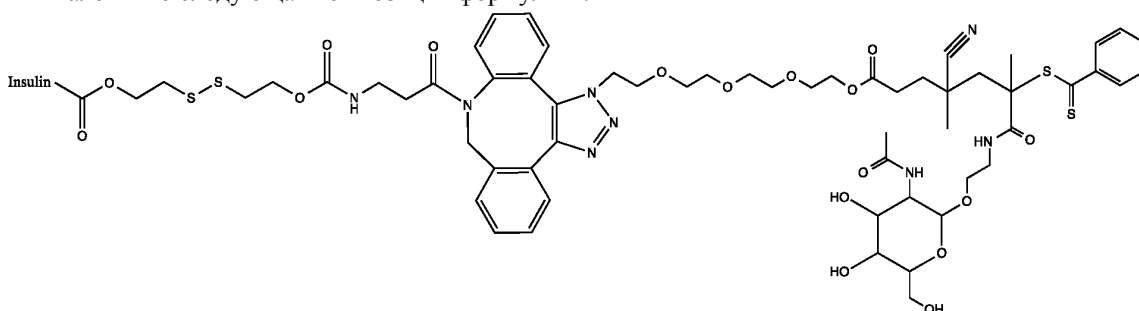


может быть названо (Z)-(21-циклобутил-1-оксо-1-((2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)амино)-4,7,10,13-тетраокса-16,17-дитагеникозан-21-илиден)триаз-1-ин-2-ия хлорид, так соответствующая композиция по настоящему изобретению, где X представляет собой тканевую трансглутаминазу, может быть названа (Z)-(21-(тканевая трансглутаминаза)-1-оксо-1-((2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)амино)-4,7,10,13-тетраокса-16,17-дитагеникозан-21-

илиден)триаз-1-ин-2-ия хлорид. Соответствующая композиция по настоящему изобретению, где X' представляет собой тканевую транслугтаминазу, m равняется 2, n равняется 4, а Z' представляет собой N-ацетилгалактозамин-2-ил или N-ацетилглюкозамин-2-ил, может быть названа (3Z)-((тканевая транслугтаминаза)-1,3-диил-бис-(1-оксо-1-((2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-3-ил)амино)-4,7,10,13-тетраокса-16,17-дигидро-21-ил-21-илиден))-бис-(триаз-1-ин-2-ия) хлорид.

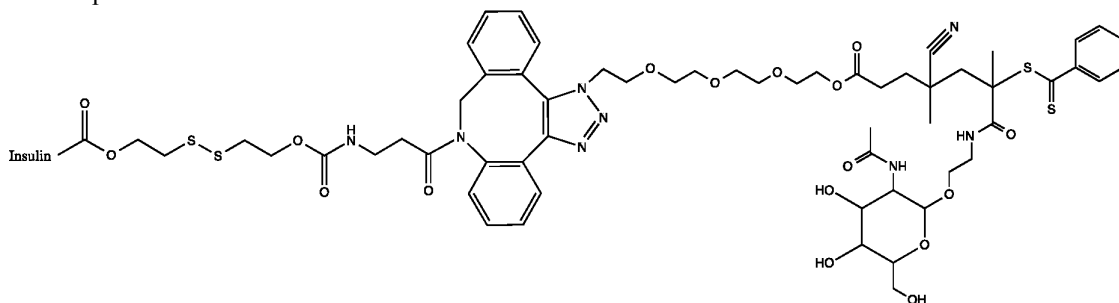
С целью упрощения композиции формулы 1 могут быть названы с применением альтернативной системы присвоения имен путем ссылки на X и соответствие одной из формул 1a - 1p (как проиллюстрировано в схемах реакций) с последующим повторением целых чисел для переменных m, n, p и/или q, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup> и идентификацией галактозилированного компонента и положения, по которому он конъюгирован. В некоторых вариантах осуществления соединения, где W представляет собой сополимер, обозначаются буквой "группы Y", за которой следует "штрих" (например, F1c'), и включают число и идентификатор сомономеров. Согласно этой системе композиция формулы 1a, где X представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 4 и Z представляет собой N-ацетилгалактозамин-2-ил, может быть названа "F1a-OVA-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-2NacGAL". Соответствующая композиция формулы 1a, где X представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 4 и Z представляет собой ацетилгалактозамин-2-ил, может быть названа "F1a-OVA-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-2NacGLU".

Аналогично следующая композиция формулы 1:



может быть названа "2-((2-(((3-(3-(22-((3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-16-пиано-16,18-диметил-13,19-диоксо-18-((фенилкарбонотиоил)тио)-3,6,9,12-тетраокса-20-азадокосил)-3,9-дигидро-8H-добензо[b,f][1,2,3]триазоло[4,5-d]азоцин-8-ил)-3-оксопропил)карбамоил)окси)этил)дисульфанил)этил инсулина карбоксилат".

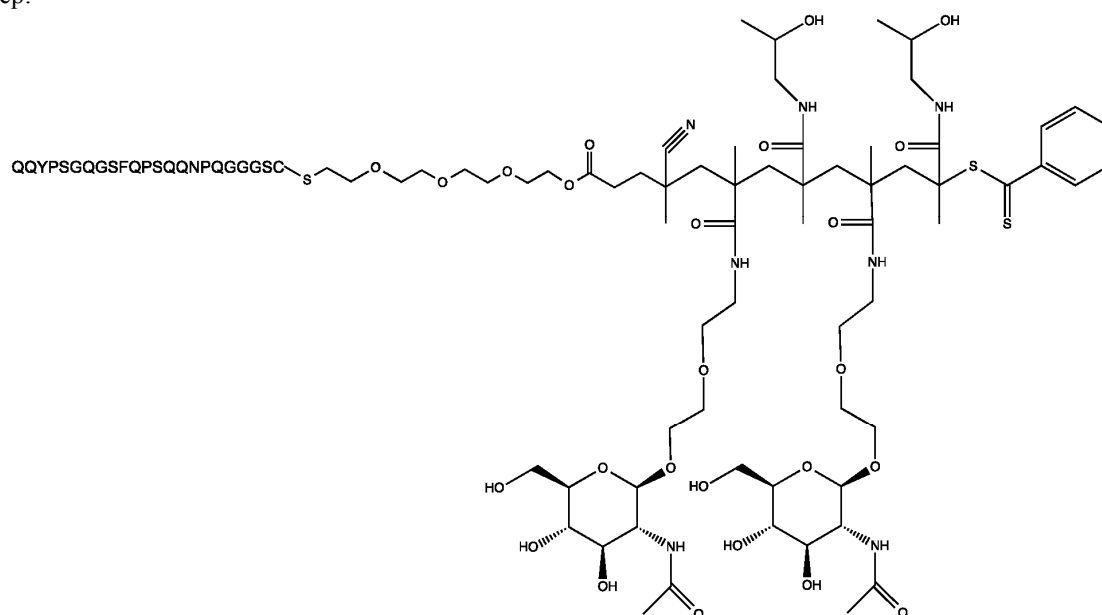
Изомер:



может быть назван "2-((2-(((3-(1-(22-((3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)-16-циано-16,18-диметил-13,19-диоксо-18-((фенилкарбонотиоил)тио)-3,6,9,12-тетраокса-20-азадокосил)-**1,9-дигидро**-8H-добензо[b,f][1,2,3]триазоло[4,5-d]азоцин-8-ил)-3-оксопропил)карбамоил)окси)этил)дисульфанил)этил инсулина карбоксилат" (выделения жирным шрифтом добавлены для удобства в идентификации различия между официальными названиями). Путем использования системы присвоения имен, принятой для настоящего изобретения, оба изомера можно называть "F1n-инсулин-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>1</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-EtAcN-1NacGAL" (или "F1n-инсулин-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>1</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-EtAcN-1NacGLU" в связи с тем, что для сахарного кольца не показана стереохимия), где CMP обозначает, что R<sup>8</sup> представляет собой 1-пиано-1-метилпропил, EtAcN обозначает, что R<sup>9</sup> представляет собой этилацетамид, а 1NacGAL обозначает, что Z" представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C1. Отсутствие аббревиатуры EtAcN перед обозначением Z будет означать, что R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь.



Следующая композиция формулы 1 служит примером соединений, где W представляет собой сополимер:

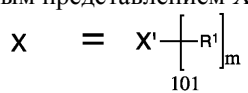


и может быть названа 2-(2-(2-(2-(QQYPSGQGSFQPSQQNPQGGGSC-сульфанил)этоксид)этоксид)-этоксид)этил-6,10-бис-(((2-(2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-ацетамидо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил)окси)этоксид)этил)карбамоил)-4-циано-13-((2-гидроксипропил)амино)-8-((2-гидроксипропил)карбамоил)-4,6,8,10,12-пентаметил-13-оксо-12-((фенилкарбонотиоил)тио)тридеканоат. Путем использования системы присвоения имен, принятой для настоящего изобретения, оба изомера можно называть "F1c'-соответствующий DQ8, альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>2</sub>-HPMA<sub>2</sub>)".

Получение композиций по настоящему изобретению.

Композиции формулы 1 можно получать, например, путем внесения поправок в процедуры, описанные в Zhu, L., et al., *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 2119-2127. Синтез определенных композиций формулы 1 также описан ниже со ссылкой на схемы реакций 1-14. Другие подходы для синтеза будут очевидны для специалистов в данной области.

Формула 101 является альтернативным представлением X



где R<sup>1</sup> представляет собой свободный поверхностный амина (-NH<sub>2</sub>) или тиольный (-SH) компонент, расположенный в трехмерной структуре X' так, чтобы быть доступным для конъюгации с линкером; и

X' представляет собой остальную часть X, за исключением обозначенной свободной(ых) амино-группы(аминогрупп) [X" используется в схемах реакций для обозначения остальной части X, за исключением свободной(ых) тиольной(ых) группы(групп)].

В зависимости от индивидуального состава X, в нем будет по меньшей мере одна (N-концевой амин) и может быть несколько R<sup>1</sup>-групп (преимущественно из остатков лизина или остатков цистеина, которые не вовлечены в образование дисульфидных связей), как представлено с помощью m, которое представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100, более типично 1 или от приблизительно 4 до 20 и наиболее типично от 1 до приблизительно 10.

Переменные, используемые в схемах реакций, являются такими, как определено выше, и дополнительно включают следующие, которые следует понимать как имеющие данные значения при отсутствии конкретного указания, обратного в отношении конкретной схемы или стадии реакции.

$R^2$  представляет собой ОН или защитную группу;

$R^3$  представляет собой  $OH$ ,  $NH_2$ ,  $NHAc$ , защитную группу или  $NH$ -защитную группу;

$R^4$  представляет собой ОН или защитную группу;

$R^5$  представляет собой ОН или защитную группу;

$R^6$  представляет собой ОН или защитную группу;

Z' представляет собой галактозу или глюкозу, конъюгированные по C1 или C6, галактозамин или глюкозамин, конъюгированные по C2, или N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C6;

$R^8$  представляет собой  $-CH_2-$  или  $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$ ;

$R^9$  представляет собой прямую связь и  $Z''$  представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгиро-

ванный по C2; или

R<sup>9</sup> представляет собой этилацетамид или пегилированную этилацетамидную группу и Z" представляет собой галактозу, глюкозу, галактозамин, глюкозамин, N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1.

Параметры реакции синтеза.

Термины "растворитель", "инертный органический растворитель" или "инертный растворитель" означают растворитель, инертный при условиях реакции, описанной в связи с ним [в том числе, например, бензол, толуол, ацетонитрил, тетрагидрофуран ("THF"), диметилформамид ("DMF"), хлороформ, метилхлорид (или дихлорметан), диэтиловый эфир, метанол, пиридин и т.п.]. Если не указано иное, растворители, применяемые в реакциях по настоящему изобретению, представляют собой инертные органические растворители.

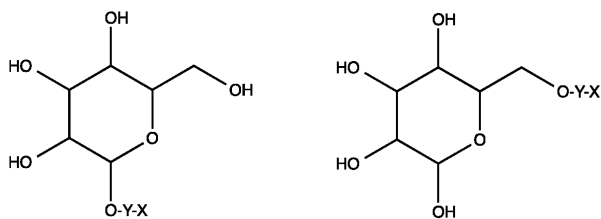
Термин "q.s." означает добавление количества, достаточного для достижения заявленной цели, например доведение раствора до необходимого объема (т.е. 100%).

Выделение и очистку соединений и промежуточных продуктов, описанных в данном документе, при необходимости можно осуществлять с помощью любой подходящей методики разделения или очистки, такой как, например, фильтрация, экстракция, кристаллизация, колоночная хроматография, тонкослойная хроматография или толстослойная хроматография, центробежная эксклюзионная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, перекристаллизация, сублимация, быстрая жидкостная хроматография белков, гель-электрофорез, диализ или комбинация данных методик. Конкретные иллюстрации подходящих методик разделения и выделения могут быть доступны путем ссылки на нижеследующие примеры. Однако, конечно же, можно применять также другие эквивалентные методики разделения или выделения.

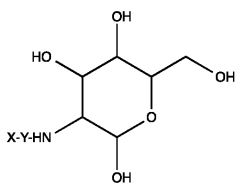
Если не указано иное (в том числе в примерах), все реакции проводят при стандартном атмосферном давлении (приблизительно 1 атм) и температуре окружающей среды (или комнатной) (приблизительно 20°C), при pH приблизительно 7,0-8,0.

Определение характеристик продуктов реакции можно проводить с помощью обычных средств, например протонного и углеродного ЯМР, масс-спектрометрии, эксклюзионной хроматографии, инфракрасной спектроскопии, гель-электрофореза.

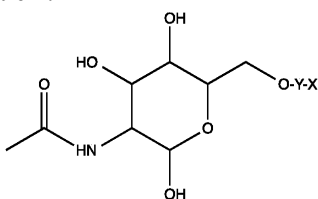
На схеме реакции 1 проиллюстрировано получение композиций формулы 1, где Z может представлять собой галактозу, глюкозу, галактозамин, глюкозамин, N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин. В связи с этим и как определено выше, Z', используемый в схеме реакции 1, охватывает галактозу или глюкозу, конъюгированные по C1 и C6 и соответствующие следующим структурам согласно формуле 1:



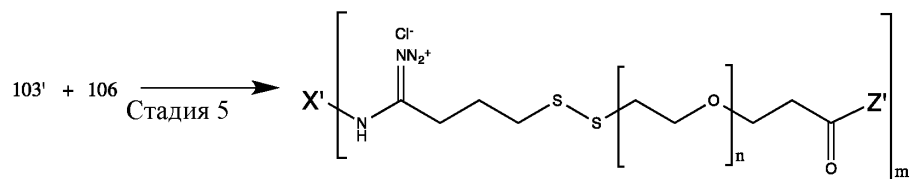
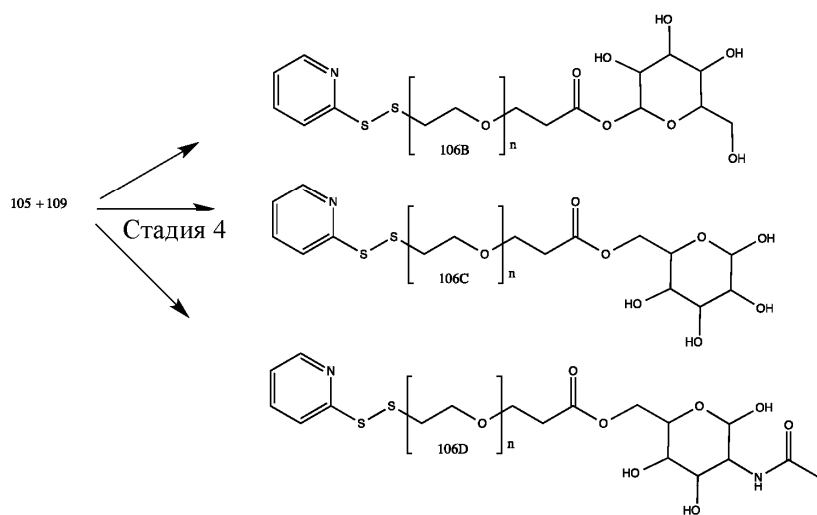
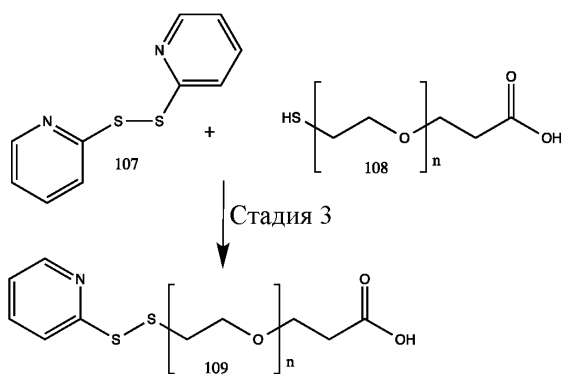
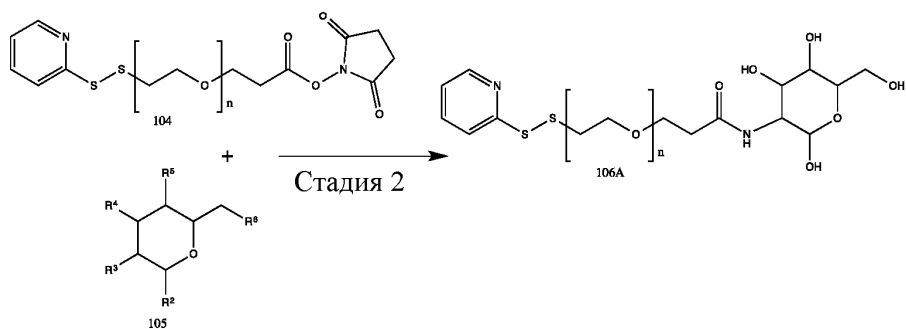
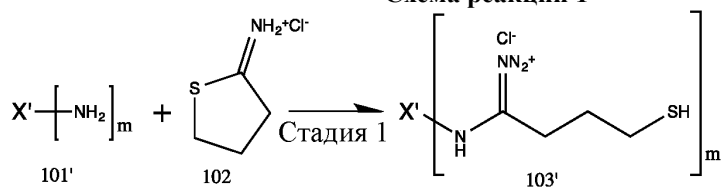
галактозамин или глюкозамин, конъюгированные по C2 и соответствующие следующей структуре согласно формуле 1:



и N-ацетилгалактозамин или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C6 и соответствующие следующей структуре согласно формуле 1:

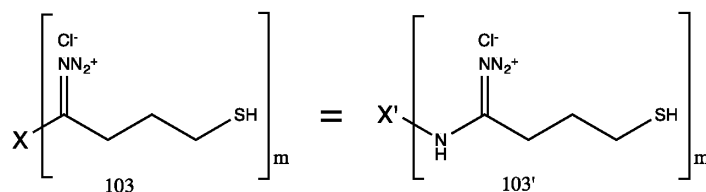


## Схема реакции 1



Формула 1a

Как проиллюстрировано выше на схеме реакции 1, стадия 1, поверхностная(ые) тиольная(ые) группа(ы) может(гут) быть получена(ы) на антигене, антителе, фрагменте антитела или лиганде со свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) (формула 101') путем осуществления контакта с реагентом Траута (формула 102) при pH приблизительно 8,0 в течение приблизительно 1 ч с получением формулы 103', при этом не прореагировавший реагент Траута удаляют, например, с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии. Две показанные ниже структуры иллюстрируют продукт схемы реакции 1, стадия 1, соответственно, показывающий свободную(ые) поверхностную(ые) аминогруппу(ы), изначально находящуюся(иеся) на X (т.е. формула 103', где X' представляет собой остальную часть X, за исключением обозначенных свободных поверхностных аминогрупп), и исключающий свободную(ые) поверхностную(ые) аминогруппу(ы) (т.е. формула 103). Это соответствует проиллюстрированному отличию между X и формулой 101. Такого условного обозначения придерживались в последующих схемах реакций.



На схеме реакции 1, стадия 2, сложный эфир пиридил-дителиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 104) приводят в контакт с галактозамином или глюкозамином (формула 105, где R<sup>3</sup> представляет собой NH<sub>2</sub>, а R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой OH) в условиях перемешивания при pH приблизительно 8 в течение 1 ч с получением соответствующего пиридил-дителиол-поли(этиленгликоль)-сахара формулы 106A, который может использоваться без дополнительной очистки.

На схеме реакции 1, стадия 3, 4,4'-дителиодипиридин (формула 107) приводят в контакт с тиол-поли(этиленгликоль)пропановой кислотой (формула 108) с получением соответствующей пиридил-дителиол-поли(этиленгликоль)пропановой кислоты (формула 109).

На схеме реакции 1, стадия 4, кислоту формулы 109 приводят в контакт с защищенной галактозой или N-ацетилгалактозамином формулы 105, где R<sup>2</sup> представляет собой OH, а R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> представляют собой защитные группы ("PG"), где R<sup>6</sup> представляет собой OH, а R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> представляют собой PG или где R<sup>6</sup> представляет собой N-ацетил, а R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> представляют собой PG, с получением соответствующих пиридил-дителиол-поли(этиленгликоль)-сахаров формул 106B, 106C и 106D, которые можно использовать после снятия защиты.

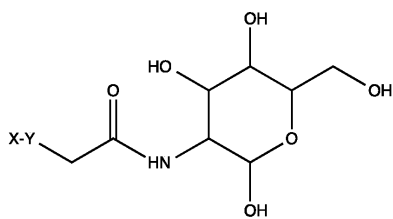
На схеме реакции 1, стадия 5, к перемешиваемому раствору продукта стадии 1 (формула 103') добавляют избыток (соответствующий значению m) продукта стадии 2 или стадии 4 (формула 106, т.е. 106A, 106B, 106C или 106D) в течение приблизительно 1 ч, с последующей центробежной эксклюзионной хроматографией для удаления любых оставшихся свободных реагентов с получением соответствующего продукта согласно формуле 1a, соответственно, формуле 1aA, формуле 1aB, формуле 1aC и формуле 1aD.

Композиции, соответствующие формуле 1a, можно называть, соответственно, например, следующим образом:

"F1aA-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-2NGAL",  
 "F1aB-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-1GAL",  
 "F1aC-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-6GAL",  
 "F1aD-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-6NAcGAL",  
 "F1aA-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-2NGLU",  
 "F1aB-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-1GLU",  
 "F1aC-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-6GLU",  
 "F1aD-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>" или "F1a-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-6NAcGLU",

соответственно, для продуктов, полученных с применением промежуточного продукта согласно формулам 106A-D.

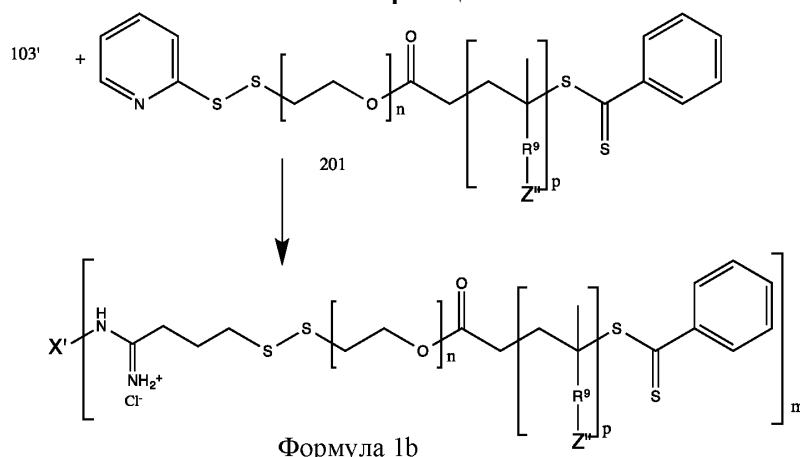
Схемы реакций 2-14 иллюстрируют получение соединений, где W представляет собой полимер одной и той же группы W<sup>1</sup>. Для целей номенклатуры, используемой в связи с ними, за исключением случаев, когда явно заявлено иное, Z" относится к N-ацетилгалактозамину или N-ацетилглюкозамину, конъюгированным по C2:



или к галактозе, глюкозе, галактозамину, глюкозамину, N-ацетилгалактозамину или N-ацетилглюкозамину, конъюгированным по C1. Следует отметить, что для улучшения получения в соответствии с несколькими вариантами осуществления конъюгированные по C1 композиции могут быть защищены в ходе синтеза, например, путем циклизации амина с C3-гидроксидом и подвергнуты снятию защиты с последующим включением защищенного галактозамина в соседнюю часть линкера.

Поли(галактоза-метакрилатные) и поли(глюкоза-метакрилатные) реактивы формул 201, 401, 501, 601, 701, 803 и 1401 можно получать с помощью присоединения метакрилатной группы к галактозе или глюкозе, например, путем приведения в контакт галактозамина или глюкозамина и ангидрида метакриловой кислоты, с последующей полимеризацией путем обратимого присоединения и фрагментирования (RAFT) с помощью соответствующего RAFT-средства в присутствии азо-бис-изобутиронитрила (AIBN) в подходящем растворителе, начиная с циклов замораживания-оттаивания с последующим нагреванием до приблизительно 60-80°C, предпочтительно 70°C в течение 5-8 ч, предпочтительно приблизительно 6 ч. Полимер можно осаждать в низшем алканоле, предпочтительно метаноле.

#### Схема реакции 2



Как проиллюстрировано на схеме реакции 2, полученные антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд со свободной(ыми) поверхностной(ыми) тиольной(ыми) группой(ами), например, как описано со ссылкой на схему реакции 1, стадия 1 (формула 103'), приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) формулы 201 в течение 1 ч с получением соответствующего продукта согласно формуле 1b.

Композиции формулы 1b можно называть следующим образом:

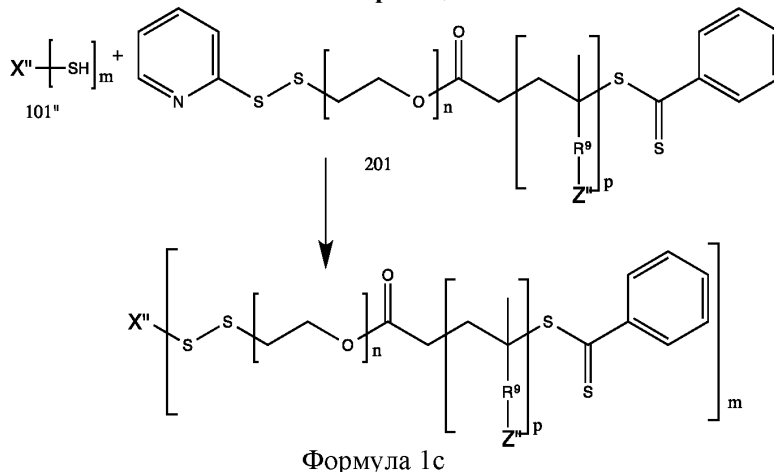
"F1b-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGAL",

"F1b-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGLU" или

"F1b-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-EtAcN-Z".

Например, композицию формулы 1b, где X' представляет собой уриказу, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 4 и Z" представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C2, можно называть "F1b-уриказа-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>4</sub>-2NacGAL" или "30-(уриказа)-3,5,7,9-тетраметил-12-оксо-1-фенил-1-тиоксо-3,5,7,9-тетракис-((2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)карбамоил)-13,16,19,22-тетраокса-2,25,26-тритиатриаконтан-30-иминий".

#### Схема реакции 3



Как проиллюстрировано на схеме реакции 3, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) тиольной(ыми) группой(ами) (цистеины) [формула

101" соответствует формуле 101 и иллюстрирует X" как термин, который будет использоваться в дальнейшем, представляющий собой X, за исключением обозначенной свободной(ых) поверхностной(ых) тиольной(ых) группы(групп)], приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) пиридил-дителиол-поли(этиленгликоля) формулы 201 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1с.

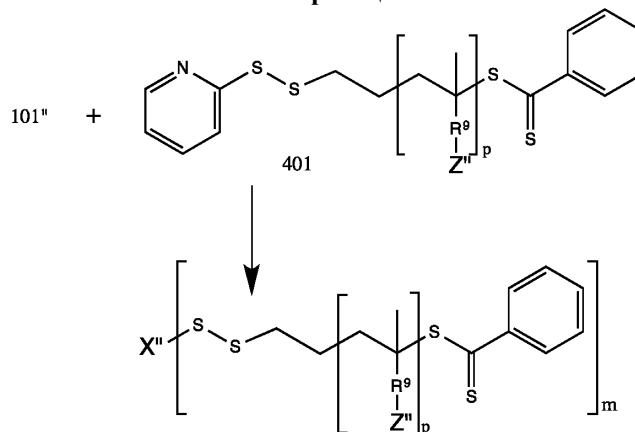
Композиции, соответствующие формуле 1с, можно называть следующим образом:

"F1c-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGAL",

"F1c-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGLU" или

"F1c-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-EtAcN-Z".

#### Схема реакции 4



Формула 1d

Как проиллюстрировано на схеме реакции 4, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) тиольной(ыми) группой(ами) формулы 101" приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) пиридил-дителиола формулы 401 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1d.

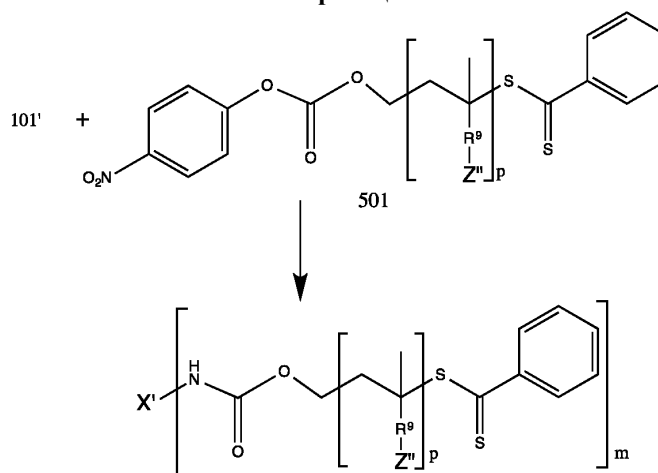
Композиции, соответствующие формуле 1d, можно называть следующим образом:

"F1d-X'-m<sub>m</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGAL",

"F1d-X'-m<sub>m</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGLU" или

"F1d-X'-m<sub>m</sub>-p<sub>p</sub>-EtAcN-Z".

#### Схема реакции 5



Формула 1e

Как проиллюстрировано на схеме реакции 5, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) н-нитрофенилкарбоната формулы 501 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1e.

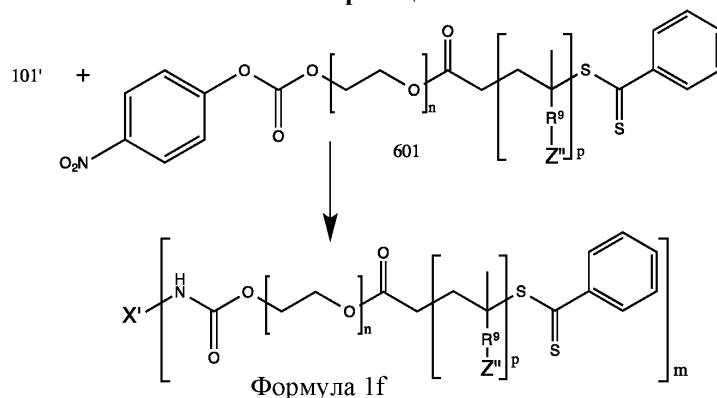
Композиции, соответствующие формуле 1e, можно называть следующим образом:

"F1e-X'-m<sub>m</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGAL",

"F1e-X'-m<sub>m</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGLU" или

"F1e-X'-m<sub>m</sub>-p<sub>p</sub>-EtAcN-Z".

## Схема реакции 6



Как проиллюстрировано на схеме реакции 6, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению  $m$ ) сложного эфира  $n$ -нитрофенилкарбоната и поли(этиленгликоля) формулы 601 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1f.

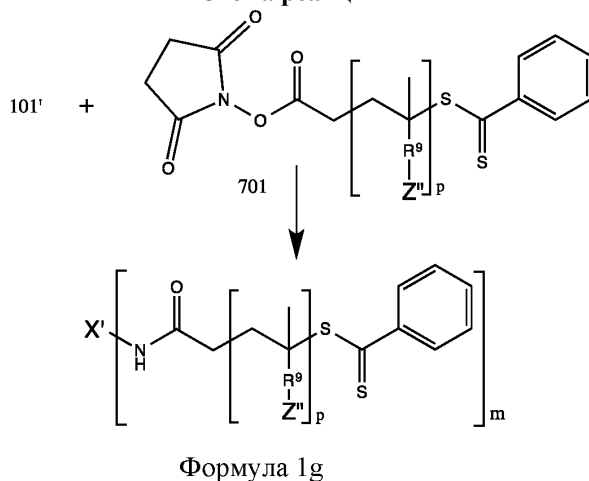
Композиции, соответствующие формуле 1f, можно называть следующим образом:

"F1f-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ -2NacGAL",

"F1f-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ -2NacGLU" или

"F1f-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ -EtAcN-Z".

## Схема реакции 7



Как проиллюстрировано на схеме реакции 7, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению  $m$ ) сложного эфира NHS и поли(этиленгликоля) формулы 701 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1g.

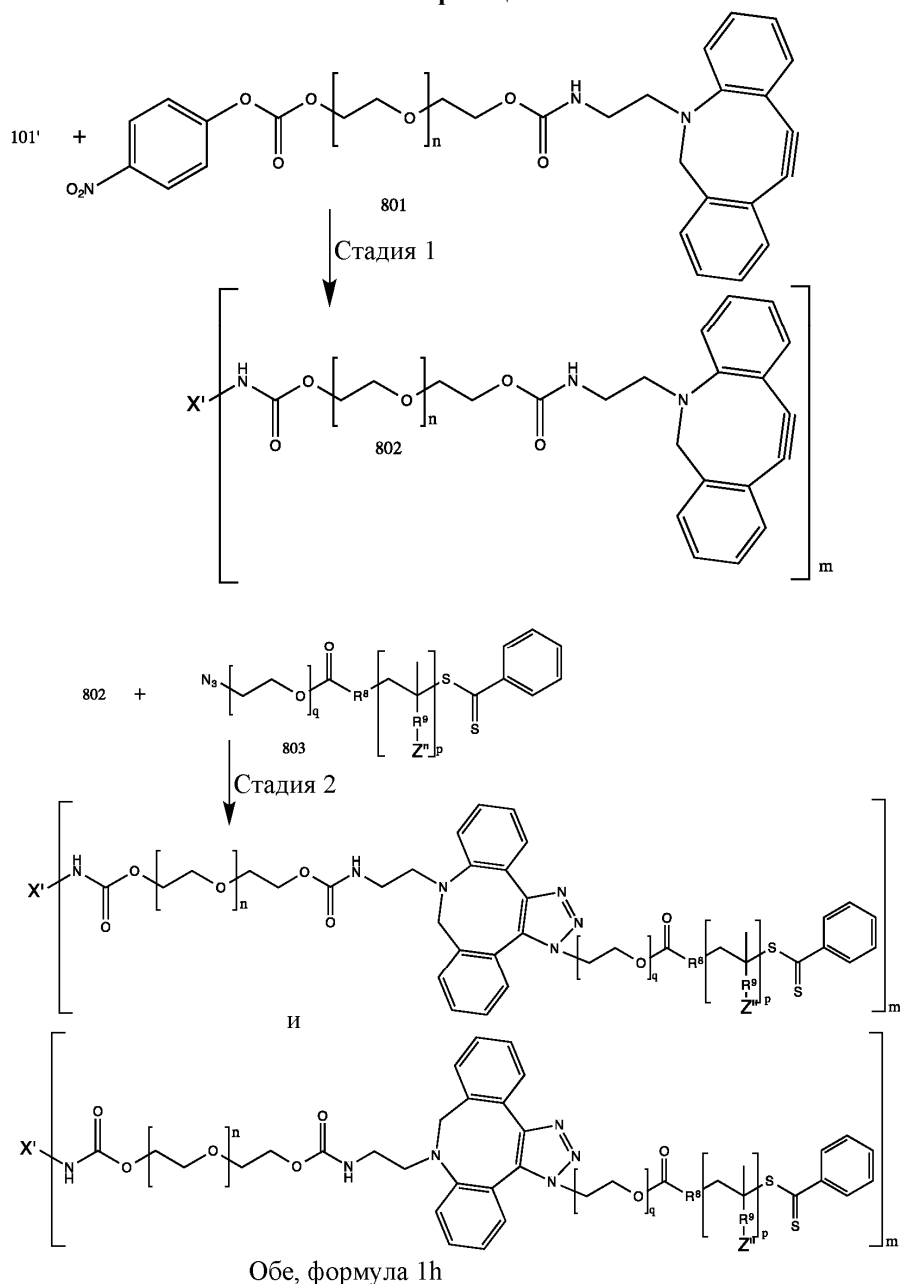
Композиции, соответствующие формуле 1g, можно называть следующим образом:

"F1g-X'- $m_m$ - $p_p$ -2NacGAL",

"F1g-X'- $m_m$ - $p_p$ -2NacGLU" или

"F1g-X'- $m_m$ - $p_p$ -EtAcN-Z".

## Схема реакции 8



Как проиллюстрировано на схеме реакции 8, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению  $m$ ) реагирующего с амином линкера для реакции клик-химии формулы 801 с получением соответствующего продукта согласно формуле 802.

На схеме реакции 8, стадия 2, затем продукт формулы 802 приводят в контакт с эквивалентным количеством (снова, соответствующим значению  $m$ ) галактоз(аминного) полимера формулы 803 с получением соответствующего изомерного продукта согласно формуле 1h. Два изомера, проиллюстрированные выше, получены в результате неспецифической циклизации азида формулы 803 с тройной связью формулы 802. Такая неспецифическая циклизация происходит при синтезе других композиций, где Y выбран из формул Yh - Yn, но не будет показана в каждом случае.

Композиции, соответствующие формуле 1h, можно называть следующим образом:

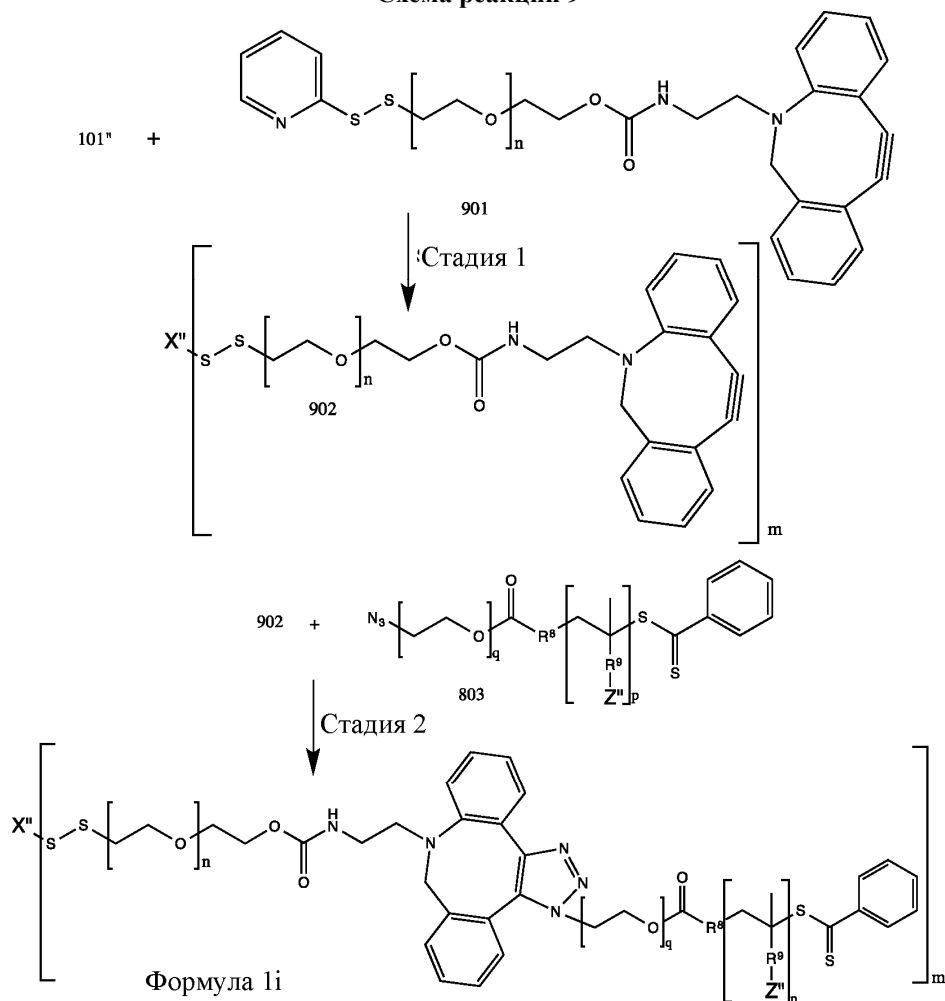
"F1h-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NacGAL",

"F1h-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NacGLU" или

"F1h-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-EtAcN-Z".



## Схема реакции 9



Как проиллюстрировано на схеме реакции 9, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) тиольной группой (тиольными группами) формулы 101'' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению  $m$ ) реагирующего с тиолом линкера для реакции клик-химии формулы 901 с получением соответствующего продукта согласно формуле 902''.

На схеме реакции 9, стадия 2, затем продукт формулы 902'' приводят в контакт с эквивалентным количеством (снова, соответствующим значению  $m$ ) галактоз(аминного) полимера формулы 803 с получением соответствующего изомерного продукта согласно формуле 1i.

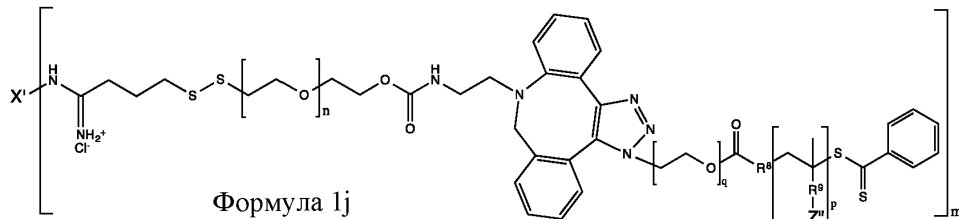
Композиции, соответствующие формуле 1i, можно называть следующим образом:

"F1i-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -2NacGAL",

"F1i-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -2NacGLU" или

"F1i-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -EtAcN-Z".

Действуя согласно процедурам, описанным в отношении схемы реакции 9, но заменяя исходный материал 101'' соединением формулы 103' (derivatизированным с помощью реагента Траута), получают соответствующий изомерный продукт формулы 1j, как показано ниже:



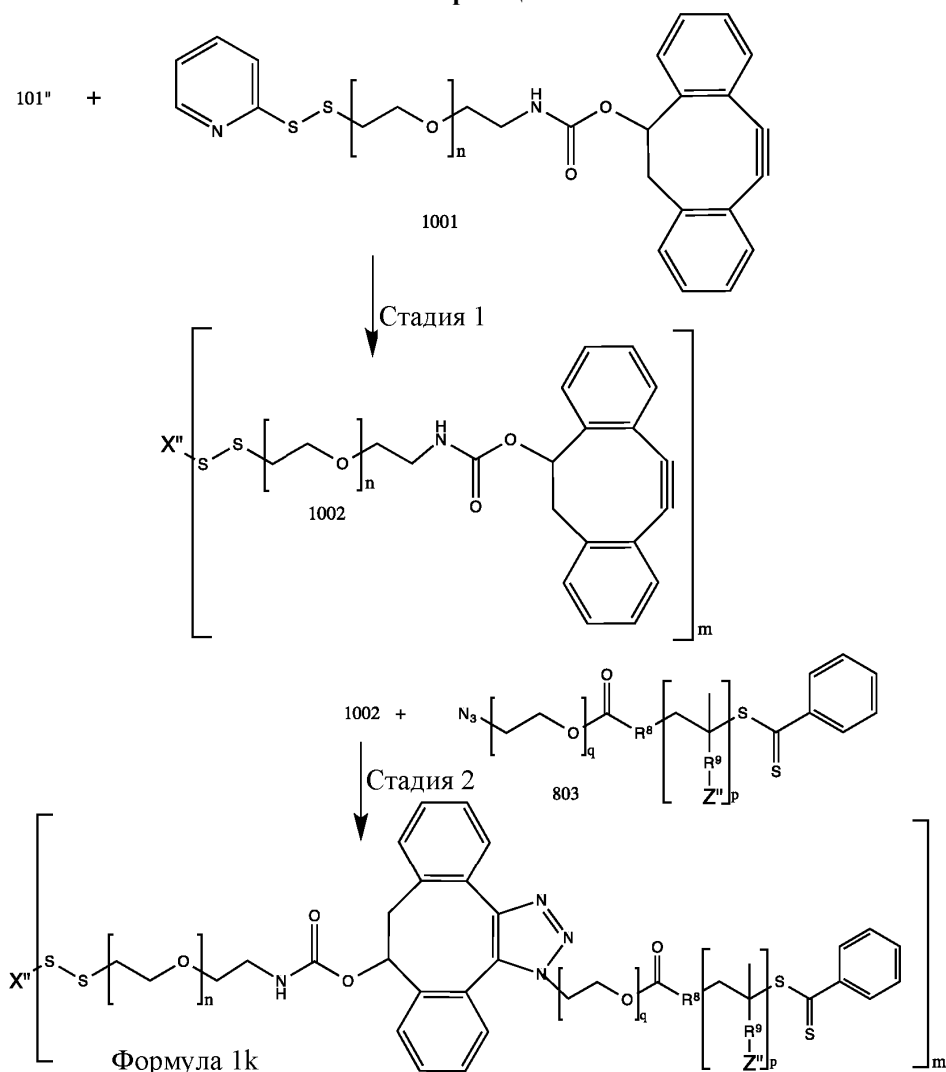
Композиции, соответствующие формуле 1j, можно называть следующим образом:

"F1j-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -2NacGAL",

"F1j-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -2NacGLU" или

"F1j-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -EtAcN-Z".

## Схема реакции 10



Как проиллюстрировано на схеме реакции 10, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) тиольной(ыми) группой(ами) формулы 101" приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) реагирующего с тиолом линкера для реакции клик-химии формулы 1001 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1002.

На схеме реакции 10, стадия 2, затем продукт формулы 1002 приводят в контакт с эквивалентным количеством (снова, соответствующим значению m) галактоз(аминного) полимера формулы 803 с получением соответствующего изомерного продукта согласно формуле 1k.

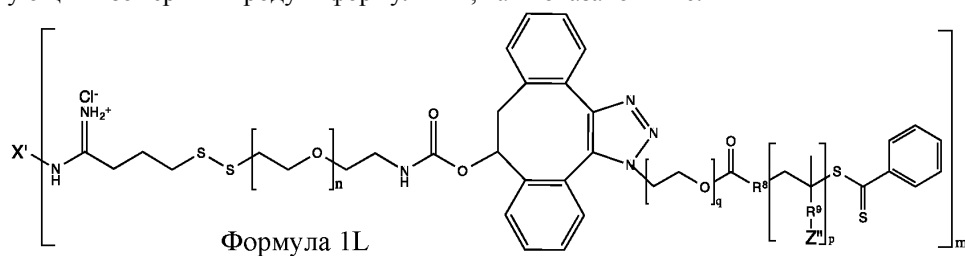
Композиции, соответствующие формуле 1k, можно называть следующим образом:

"F1k-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NacGAL",

"F1k-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NacGLU" или

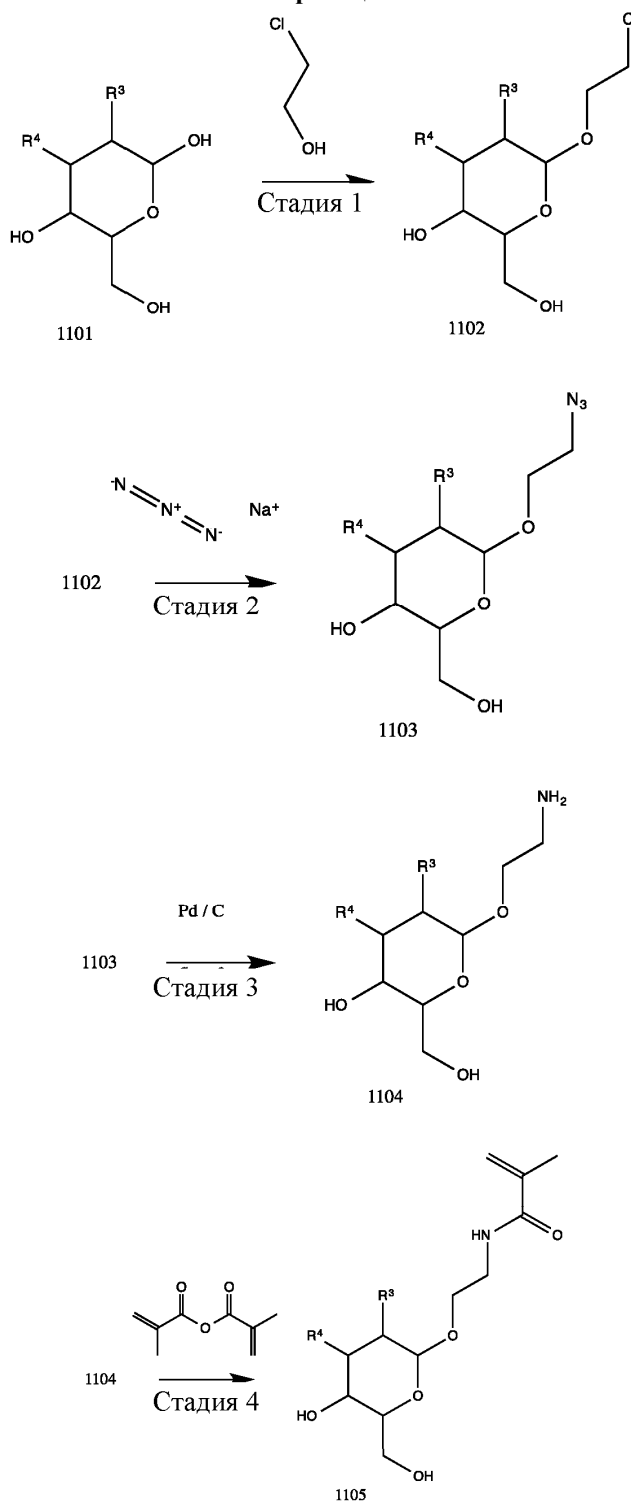
"F1k-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-EtAcN-Z".

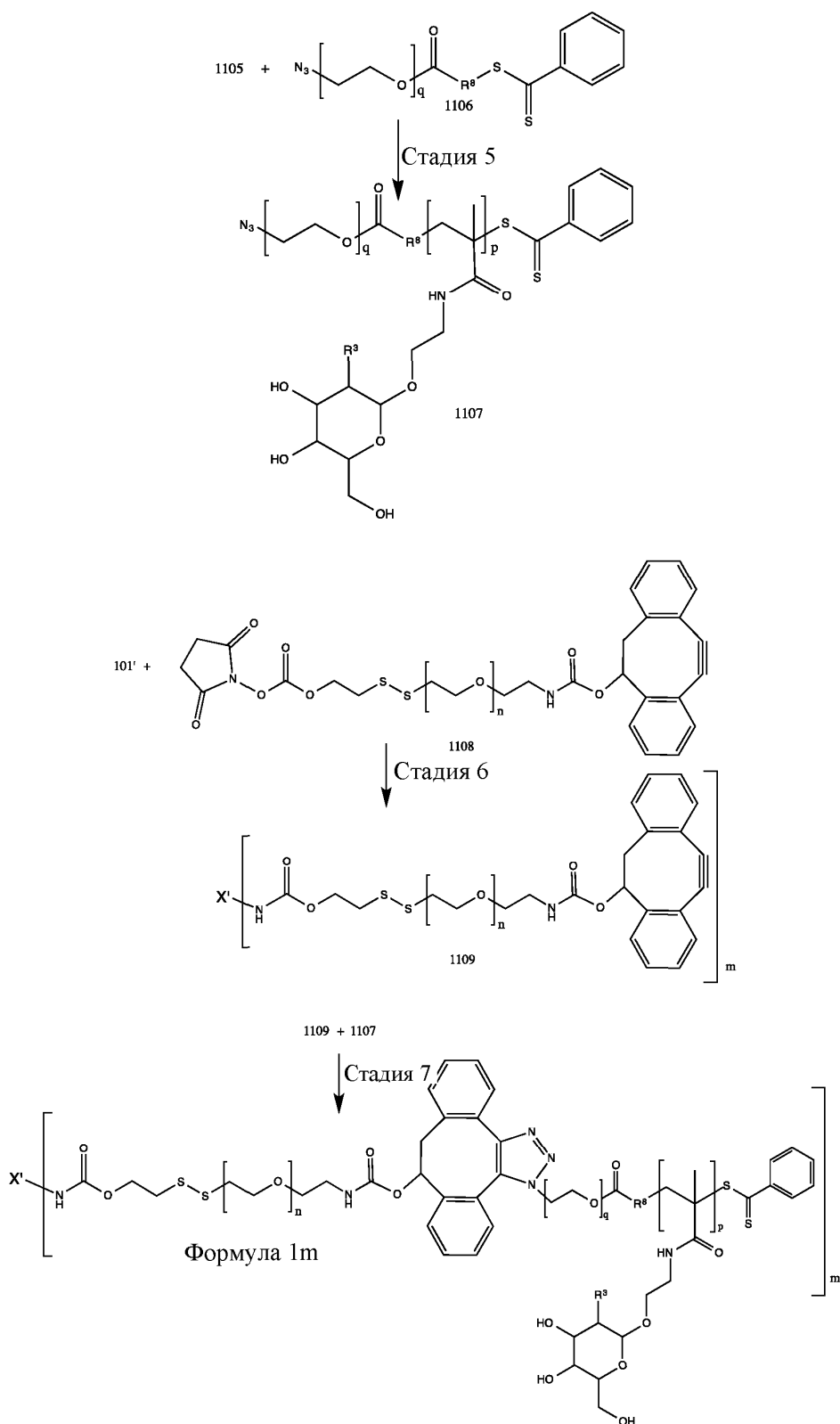
Действуя согласно процедурам, описанным в отношении схемы реакции 10, но заменяя исходный материал 101" соединением формулы 103' (дериватизированным с помощью реагента Траута), получают соответствующий изомерный продукт формулы 1L, как показано ниже.



Композиции, соответствующие формуле 1L, можно называть следующим образом:  
 "F1L-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NacGAL",  
 "F1L-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NacGLU" или  
 "F1L-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-EtAcN-Z".

### Схема реакции 11





Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 1, галактоза, защищенный галактозамин или N-ацетил-D-галактозамин (формула 1101, где R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляют собой OH, R<sup>3</sup> представляет собой NH-защитную группу (например, циклизированную с R<sup>4</sup>) или R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH соответственно) приводят в контакт с 2-хлорэтан-1-олом с последующим охлаждением и добавлением ацетилхлорида по каплям. Раствор нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до 70°C в течение нескольких часов. К неочищенному продукту добавляли этанол и полученный раствор перемешивали в присутствии углерода, а затем фильтровали с последующим удалением растворителя с получением соответствующего продукта формулы 1102.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 2, продукт формулы 1102 добавляли к избытку азид натрия и нагревали до 90°C в течение нескольких часов, затем фильтровали с последующим

удалением растворителя с получением соответствующего продукта формулы 1103.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 3, продукт формулы 1103 добавляли к раствору палладиевого катализатора на углеродном носителе и этанола, и перемешивали в атмосфере газообразного водорода (3 атм.) в течение нескольких часов, затем фильтровали с последующим удалением растворителя с получением соответствующего продукта формулы 1104.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 4, продукт формулы 1104 добавляли к раствору ангидрида метакриловой кислоты. Добавляли триэтиламин и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч с последующим удалением растворителя и выделением с получением соответствующего продукта формулы 1105.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 5, азид-модифицированное uRAFT-средство (формула 1106) добавляли к раствору продукта формулы 1105 с азо-бис-изобутиронитрилом, подвергали 4 циклам замораживание-откачка-размораживание и затем перемешивали при 70°C. Через несколько часов соответствующий полимерный продукт формулы 1107 осаждали путем добавления низшего алканол с последующим удалением растворителя. Если R<sup>3</sup> представляет собой NH-защитную группу (например, циклизированную с R<sup>4</sup>), защитную(ые) группу(ы) в этот момент удаляют.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 6, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' добавляют к буферу, pH 8,0, и приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) диоксопирролидина формулы 1108 при перемешивании. Через 1 ч непрореагировавшее соединение формулы 1108 удаляют и полученный продукт формулы 1109 применяют без дополнительной очистки.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 7, продукт формулы 1107 добавляют к буферу, pH 8,0, в который добавлен продукт формулы 1109. После перемешивания в течение 2 ч избыток соединения формулы 1107 удаляют с получением соответствующего изомерного продукта формулы 1m.

Путем замещения N-(2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-3-ил)метакриламида продуктом формулы 1105 на стадии 5 и продолжения стадиями 6 и 7 получают соответствующий изомерный продукт формулы 1m, где Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C2.

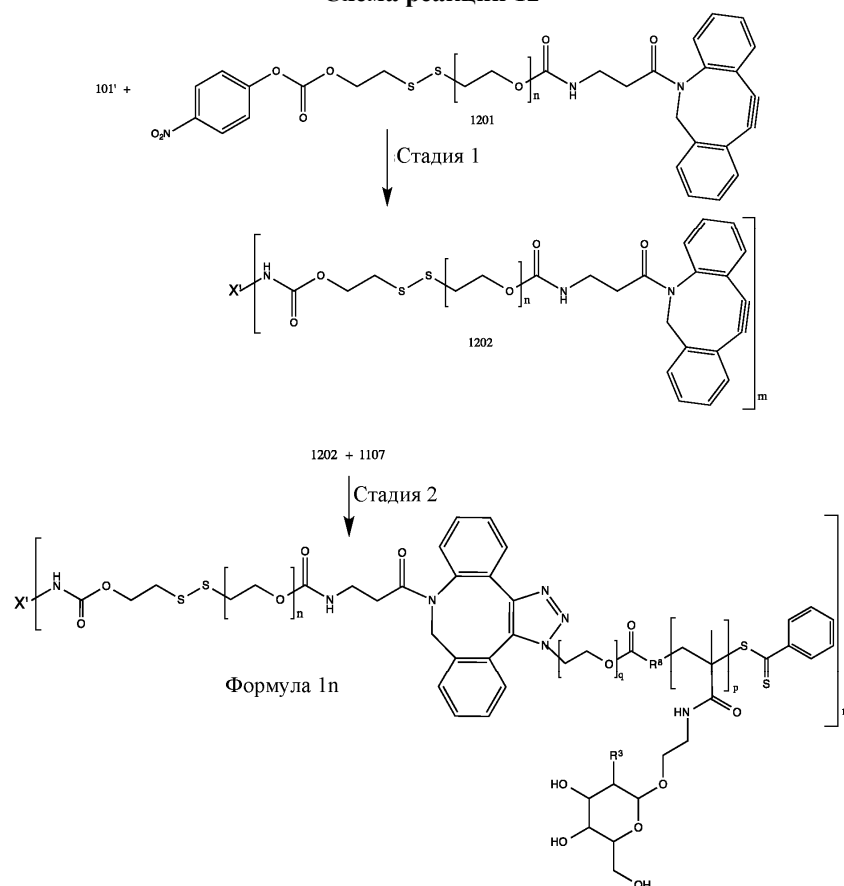
Композиции, соответствующие формуле 1m, можно называть следующим образом:

"F1m-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>.EtAcN-Z'', где Z'' представляет собой 1GAL, 1NGAL, 1NAcGAL,

"F1m-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NAcGAL" или

"F1m-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-2NAcGLU" (или соответствующие соединения 1GAL, 1GLU, 1NGAL, 1NGLU, 1NAcGAL или 1NAcGLU).

#### Схема реакции 12



Способ синтеза из схемы реакции 12 особенно пригоден для гидрофобных антигенов, антител, фрагментов антител и лигандов (например, инсулина) в связи с применением органических растворителей.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 12, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' растворяют в органическом растворителе (например, DMF), содержащем триэтиламин. К нему добавляют некоторое количество (соответствующее значению  $m$ ) соединения формулы 1201 с последующим перемешиванием и добавлением трет-бутилметилового эфира. Соответствующий продукт формулы 1202 извлекают в виде осадка.

Продукт формулы 1202 ресуспендируют в органическом растворителе и добавляют некоторое количество (соответствующее значению  $m$ ) соединения формулы 1107 (полученного, например, как описано со ссылкой на схему реакции 11) с последующим перемешиванием. Продукт реакции осаждали посредством добавления дихлорметана с последующей фильтрацией и удалением растворителя. Очистка (например, ресуспендирование в PBS с последующей центробежной эксклюзионной хроматографией) приводит к получению соответствующего изомерного продукта формулы 1n.

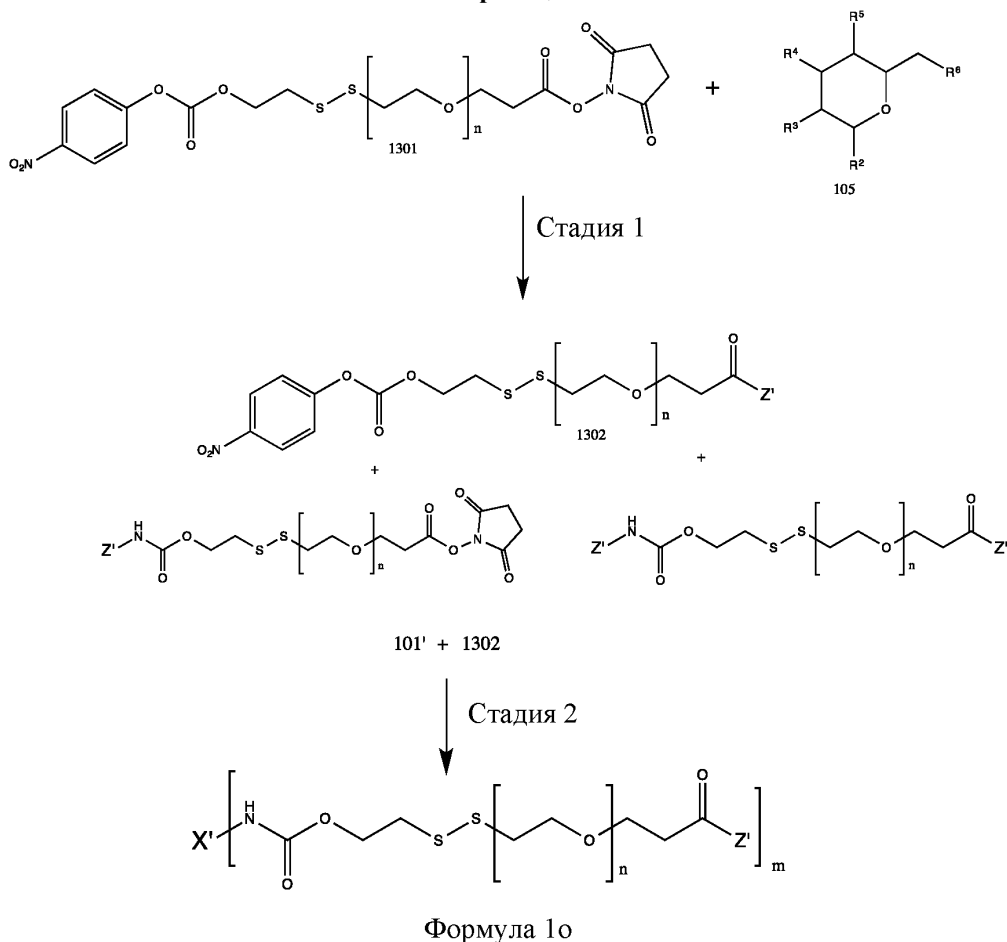
Композиции, соответствующие формуле 1n, можно называть следующим образом:

"F1n-X'- $m_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -EtAcN-Z", где Z" представляет собой 1GAL, 1NGAL, 1NAcGAL, 1GLU, 1NGLU, 1NAcGLU, или

"F1m-X'- $n_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -2NAcGAL", или

"F1m-X'- $n_m$ - $n_n$ - $p_p$ - $q_q$ -2NAcGLU".

### Схема реакции 13

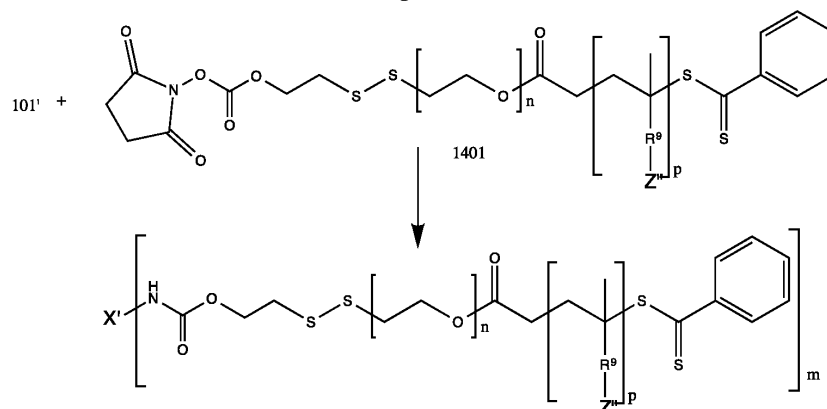


На схеме реакции 13, стадия 1, сложный эфир нитрофеноксикарбонил-оксипали-дителиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 1301) приводят в контакт с галактозой, галактозамин или N-ацетилгалактозамин (формула 105) с получением соответствующего продукта формулы 1302 вместе с двумя другими проиллюстрированными продуктами, из которых, прежде чем перейти к следующей стадии, выделяли необходимые нитрофеноксикарбонил-дителиол-поли(этиленгликоль)-карбоксиэтил-галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин формулы 1302.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 13, стадия 2, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению  $m$ ) продукта формулы 1302 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1o.

Композиции, соответствующие формуле 1o, можно называть следующим образом:  
"Flp-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-Z"<sup>m</sup>.

#### Схема реакции 14



Формула 1p

Как проиллюстрировано на схеме реакции 14, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной(ыми) свободной(ыми) поверхностной(ыми) аминогруппой(ами) (формула 101') приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) сложного эфира пиридил-дителиол-поли(этиленгликоля) и NHS формулы 1401 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1p.

Композиции, соответствующие формуле 1p, можно называть следующим образом:

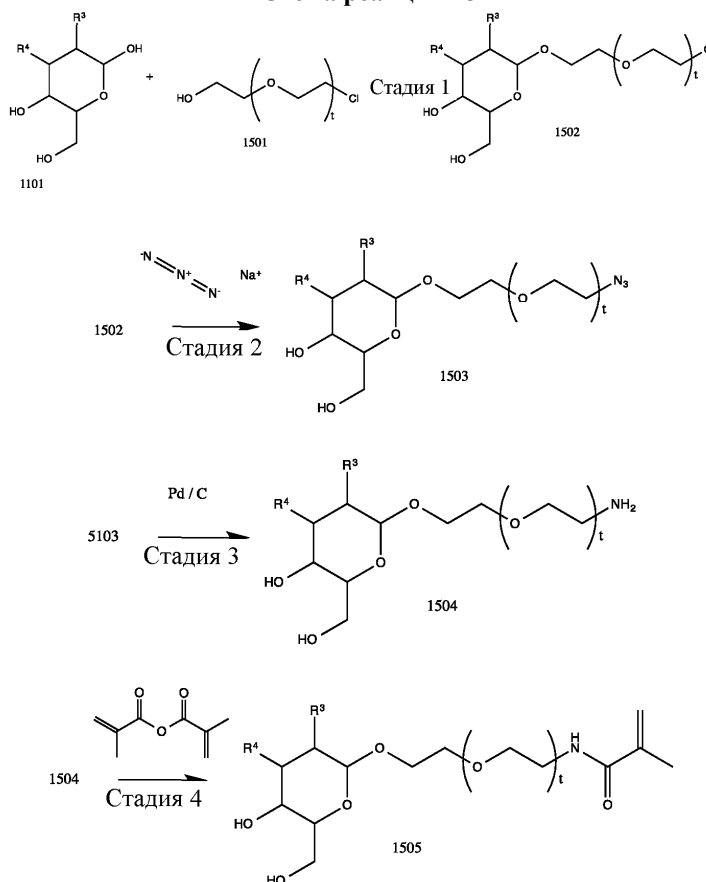
"Flp-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGAL",

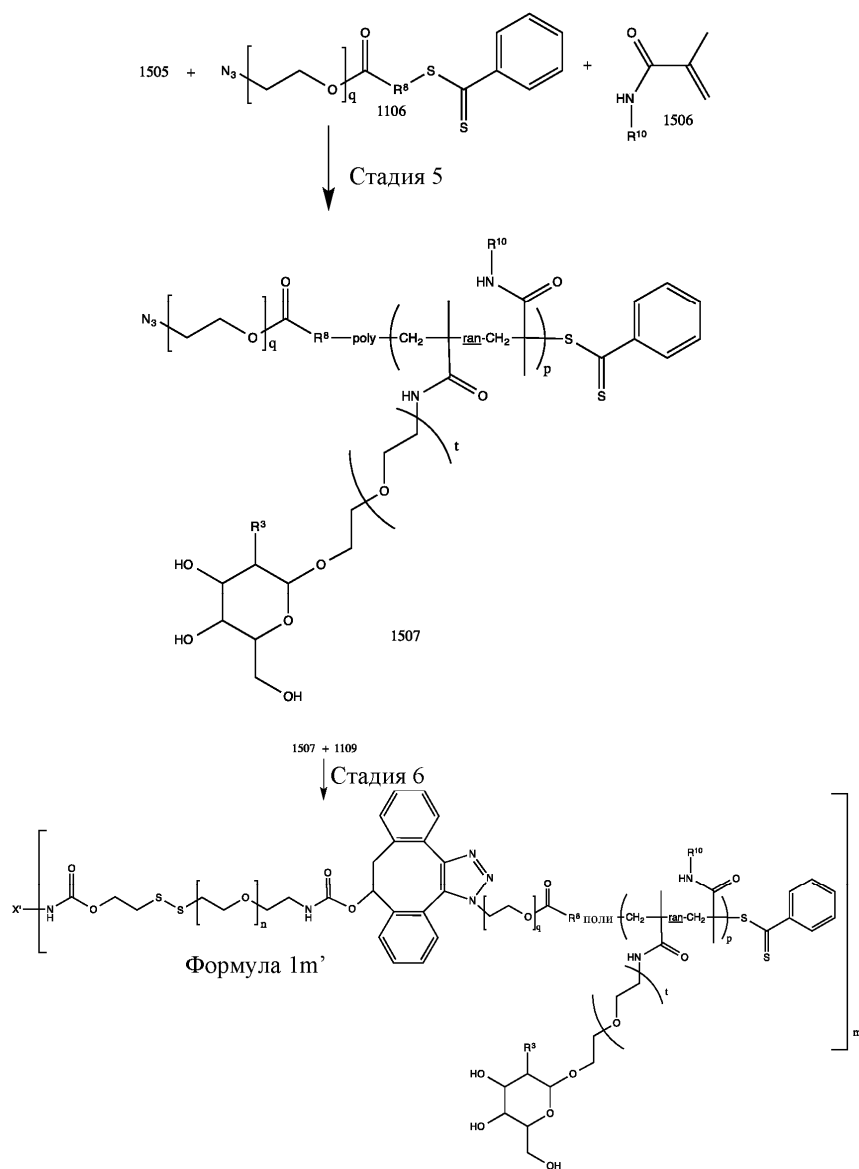
"Flp-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-2NacGLU" или

"Flp-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-EtAcN-Z".

Схемы реакций 15-18 иллюстрируют получение соединений, где W представляет собой сополимер одинаковых или различных групп W<sup>1</sup> и W<sup>2</sup>.

#### Схема реакции 15





Как проиллюстрировано на схеме реакции 15, стадия 1, галактозу или глюкозу (формула 1101, где R<sup>3</sup> и R<sup>4</sup> представляют собой OH), защищенный галактозамин или защищенный глюкозамин (формула 1101, где R<sup>3</sup> представляет собой NH-защитную группу, например, циклизированную с R<sup>4</sup>) или N-ацетил-D-галактозамин или N-ацетил-D-глюкозамин (формулу 1101, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH) приводят в контакт с 2-(поли-(2-хлорэтокси)этокси)этан-1-олом формулы 1501 (где t составляет от 1 до 5) с последующим охлаждением и добавлением ацетилхлорида по каплям. Раствор нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до 70°C в течение нескольких часов. К неочищенному продукту добавляли этанол и полученный раствор перемешивали в присутствии углерода, а затем фильтровали с последующим удалением растворителя с получением соответствующего продукта формулы 1502.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 15, стадия 2, продукт формулы 1502 добавляли к избытку азида натрия и нагревали до 90°C в течение нескольких часов, затем фильтровали с последующим удалением растворителя с получением соответствующего продукта формулы 1503.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 15, стадия 3, продукт формулы 1503 добавляли к раствору палладиевого катализатора на углеродном носителе и этанола и перемешивали в атмосфере газообразного водорода (3 атм) в течение нескольких часов, затем фильтровали с последующим удалением растворителя с получением соответствующего продукта формулы 1504.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 15, стадия 4, продукт формулы 1504 добавляли к раствору ангидрида метакриловой кислоты. Добавляли триэтиламин и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч с последующим удалением растворителя и выделением с получением соответствующего продукта формулы 1505. В качестве альтернативы пентафторфенилметакрилат (или другое акрилатное средство) можно использовать для получения соответствующего продукта формулы 1505. В некоторых вариантах осуществления продукт формулы 1504 добавляют к DMF. Добавляют триэтиламин (например, органическое основание) и смесь охлаждают (например, до 4°C с применением ледяной бани). Впоследствии



вии добавляют (например, по каплям с постоянным перемешиванием) пентафторфенилметакрилат (или другое акрилатное средство). Через время (например, 30 мин) удаляют охлаждение (например, ледяную баню) и реакционную смесь оставляют перемешиваться при комнатной температуре в течение определенного периода времени (например, 4 ч). В некоторых вариантах осуществления затем удаляют растворитель. В некоторых вариантах осуществления продукт очищают с помощью флэш-хроматографии.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 15, стадия 5, азид-модифицированное uRAFT-средство формулы 1106 и метакриламид формулы 1506 добавляли к раствору продукта формулы 1505 с азо-бис-изобутиронитрилом, подвергали 4 циклам замораживание-откачка-размораживание и затем перемешивали при 70°C. Через несколько часов соответствующий продукт формулы 1507, представляющий собой статистический сополимер, осаждали путем добавления низшего алканола или ацетона с последующим удалением растворителя. Если R<sup>3</sup> представляет собой NH-защитную группу (например, пиклизированную с R<sup>4</sup>), защитную(ые) группу(ы) в этот момент удаляют.

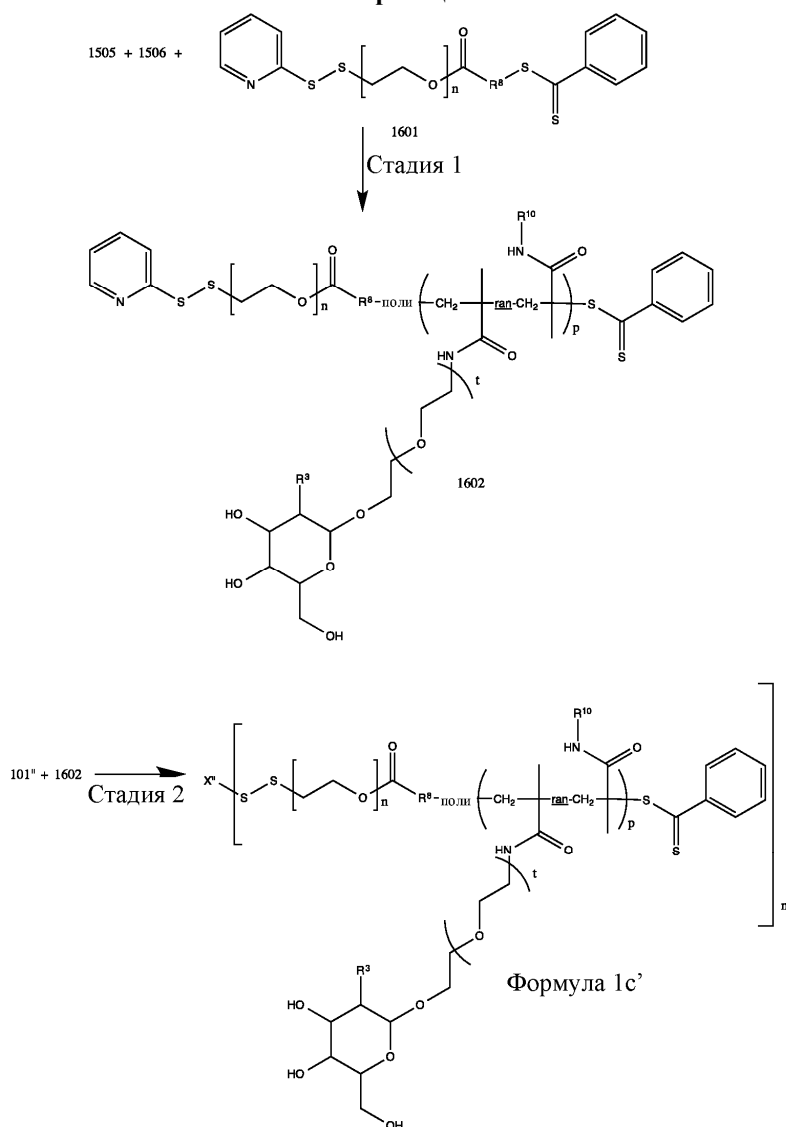
Как проиллюстрировано на схеме реакции 15, стадия 6, продукт формулы 1507 добавляют к буферу, pH 8,0, в который добавлен продукт формулы 1109 (полученный, например, как описано со ссылкой на схему реакции 11). После перемешивания в течение 2 ч избыток соединения формулы 1109 удаляют с получением соответствующего изомерного продукта формулы 1m', представляющего собой статистический сополимер.

При добавлении одного или более метакриламида формулы 1505 на стадии 5 (например, метакриламидов глюкозы и галактозы или двух или более метакриламидов с различными значениями t) и/или двух или более метакриламидов формулы 1506 и с продолжением на стадии 6 получают соответствующий продукт формулы 1m' с совокупностью групп R<sup>3</sup> и/или PEG ("t") и/или R<sup>10</sup>, т.е. соединения формулы 1, где W представляет собой статистический сополимер различных групп W<sup>1</sup> и W<sup>2</sup>.

Композиции, соответствующие формуле 1m', можно называть следующим образом:

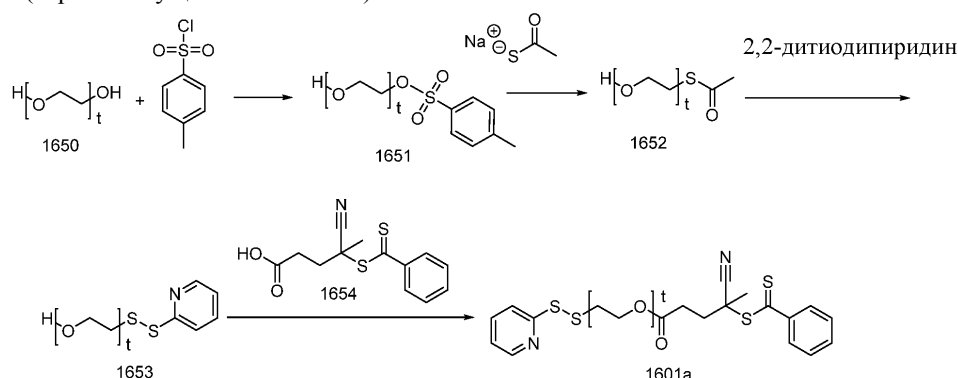
"F1m'-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-q<sub>q</sub>-R<sup>8</sup>-поли-(W<sup>1</sup><sub>t</sub>Z<sup>n</sup><sub>w1p</sub>-ran-W<sup>2</sup><sub>w2p</sub>)".

#### Схема реакции 16



Как проиллюстрировано на схеме реакции 16, стадия 1, соединение формулы 1601 приводят в контакт с соединениями формул 1505 и 1506 при условиях, аналогичных таковым схемы реакции 15, стадии 5, с получением соответствующего соединения формулы 1602.

В некоторых вариантах осуществления осуществляют последующий синтез с образованием соединения 1601a (вариант осуществления 1601):



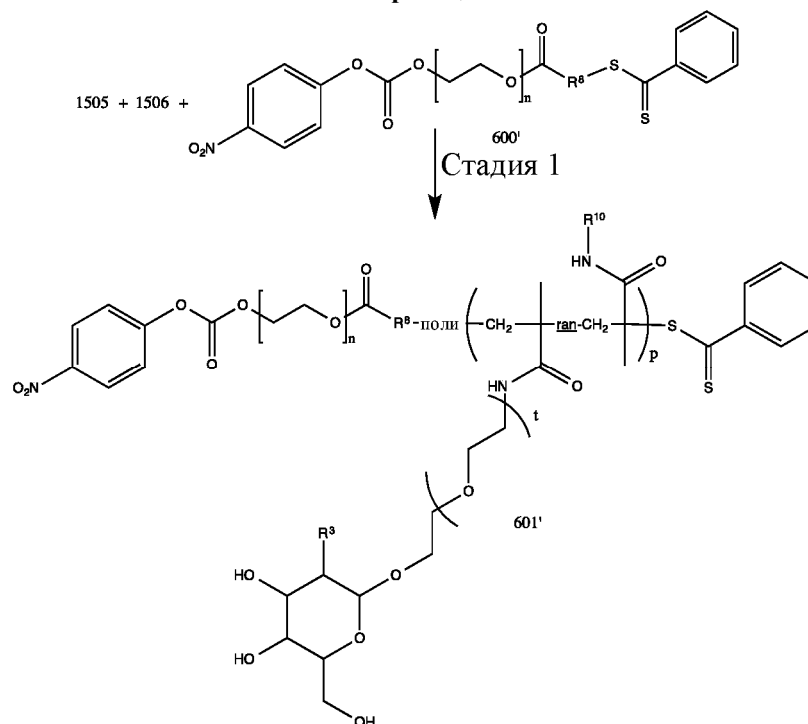
В некоторых вариантах осуществления  $t$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до приблизительно 10 или от приблизительно 1 до приблизительно 5. В некоторых вариантах осуществления олигоэтиленгликоль (1650) вступает в реакцию с  $p$ -толуолсульфонилхлоридом (или каким-либо другим средством, способным обеспечивать функционирование 1650 с уходящей группой) с образованием моно- $p$ -толуолсульфоната олигоэтиленгликоля (1651) (или какого-либо другого олигоэтиленгликоля, функционирующего с уходящей группой). В некоторых вариантах осуществления соединение 1651 может реагировать с тиоацетатом калия с образованием соединения 1652. В некоторых вариантах осуществления соединения 1652 вступает в реакцию с 2,2-дитиодипиридином с образованием соединения 1653. В некоторых вариантах осуществления соединения 1653 сцеплено с соединением 1654 с образованием соединения 1601a.

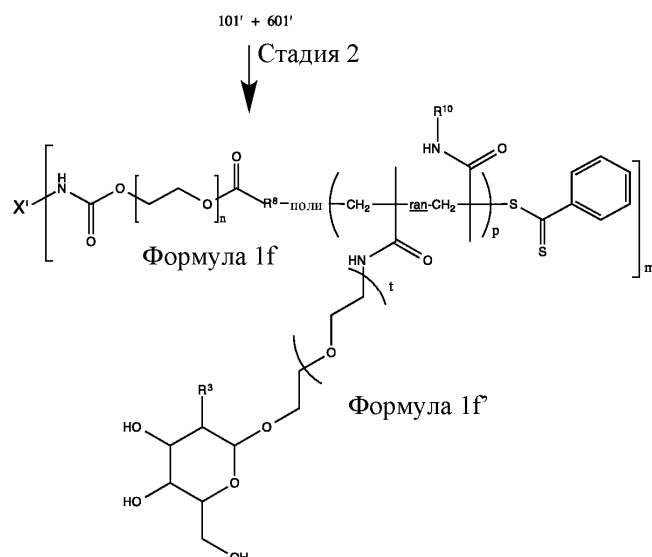
Как проиллюстрировано на схеме реакции 16, стадия 2, соединения формулы 1602 приводят в контакт с соединением формулы 101" при условиях, аналогичных таковым схемы реакции 15, стадии 6, с получением соответствующего соединения формулы 1c'.

Композиции, соответствующие формуле 1c', можно называть следующим образом:

"F1c' -X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-R<sup>8</sup>-поли-(W<sup>1</sup>Z"-ran-W<sup>2</sup>)".

#### Схема реакции 17





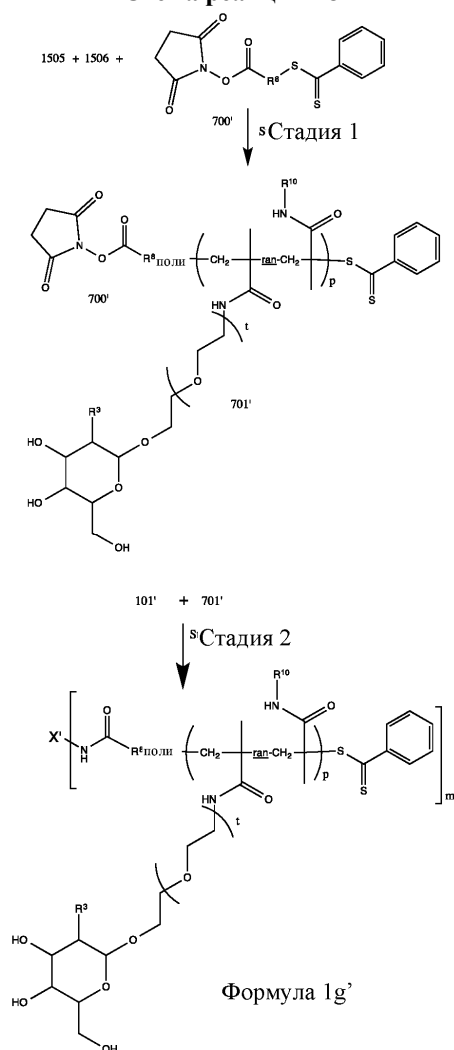
Как проиллюстрировано на схеме реакции 17, стадия 1, соединение формулы 600' приводят в контакт с соединениями формул 1505 и 1506 при условиях, аналогичных таковым схемы реакции 15, стадии 5, с получением соответствующего соединения формулы 601'.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 17, стадия 2, соединение формулы 601' приводят в контакт с соединением формулы 101' при условиях, аналогичных таковым схемы реакции 15, стадии 6, с получением соответствующего соединения формулы 1f'.

Композиции, соответствующие формуле 1f', можно называть следующим образом:

"F1f'-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-R<sup>8</sup>-поли-(W<sup>1</sup><sub>Z</sub>"-ran-W<sup>2</sup>)".

#### Схема реакции 18



Как проиллюстрировано на схеме реакции 18, стадия 1, соединение формулы 700' приводят в контакт с соединениями формул 1505 и 1506 при условиях, аналогичных таковым схемы реакции 15, стадии 5, с получением соответствующего соединения формулы 701'.

Как проиллюстрировано на схеме реакции 18, стадия 2, соединение формулы 701' приводят в контакт с соединением формулы 101' при условиях, аналогичных таковым схемы реакции 15, стадии 6, с получением соответствующего соединения формулы 1g'.

Композиции, соответствующие формуле 1g' могут быть названы следующим образом:

"F1g'-X'-m<sub>m</sub>-n<sub>n</sub>-p<sub>p</sub>-R<sup>8</sup>-поли-(W<sup>1</sup>,Z"-ran-W<sup>2</sup>)".

Конкретные способы и последние стадии.

Соединение формулы 103' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 106 с получением соответствующего продукта формулы 1a.

Соединение формулы 103' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 201 с получением соответствующего продукта формулы 1b.

Соединение формулы 802, 902 или 1002 приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 803 с получением соответствующего продукта формулы 1h, формулы 1i или формулы 1k соответственно.

Соединение формулы 1109 приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 1107 с получением соответствующего продукта формулы 1m, в частности, где n равняется приблизительно 80, p равняется приблизительно 30, q равняется приблизительно 4 и m, определяемое антигеном, равняется от приблизительно 2 до 10.

Соединение формулы 1202 приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 1107 с получением соответствующего продукта формулы 1n, в частности, где n равняется приблизительно 1, p равняется приблизительно 30, q равняется приблизительно 4 и m, определяемое антигеном, равняется от приблизительно от 2 до 10.

Соединение формулы 1507 приводят в контакт с соединением формулы 1109 с получением соответствующего продукта формулы 1m', в частности, где n равняется приблизительно 4, p равняется приблизительно 90, q равняется приблизительно 4, t равняется приблизительно 1 или 2, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP, R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил и m, определяемое антигеном, равняется от приблизительно 1 до 10.

Соединение формулы 101" приводят в контакт с соединением формулы 1602 с получением соответствующего продукта формулы 1c', в частности, где n равняется приблизительно 4, p равняется приблизительно 90, t равняется приблизительно 1 или 2, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP, R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил и m, определяемое антигеном, равняется от приблизительно 1 до 10.

Соединение формулы 101' приводят в контакт с соединением формулы 601' с получением соответствующего продукта формулы 1f', в частности, где n равняется приблизительно 4, p равняется приблизительно 90, t равняется приблизительно 1 или 2, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP, R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил и m, определяемое антигеном, равняется от приблизительно 1 до 10.

Соединение формулы 101' приводят в контакт с соединением формулы 701' с получением соответствующего продукта формулы 1g', в частности, где n равняется приблизительно 4, p равняется приблизительно 90, t равняется приблизительно 1 или 2, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP, R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил и m, определяемое антигеном, равняется от приблизительно 1 до 10.

Конкретные композиции.

В качестве неограничивающего примера конкретной группой, предпочтительной для композиций, фармацевтических составов, способов получения и применения по настоящему изобретению, являются следующие комбинации и сочетания групп заместителей формулы 1 (разделенные на подгруппы, соответственно, в порядке возрастания предпочтения):

X представляет собой чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ, чужеродный антиген, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, терапевтический белок, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, собственный антиген, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть.

X представляет собой терапевтический белок, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, выбранный из: абатацепта, абциксимаба, адалимумаба, аденозиндезаминазы, адо-трастузумаб-энтанзина, агалсидазы-альфа, агалсидазы-бета, альдеслейкина, алглукосеразы, алглукосидазы-альфа, ингибитора α-1-протеиназы, анакинры, анистрепазы (анизотирированный активаторный комплекс плазминогена и стрептокиназы), антитромбина III, антитимоцитарного глобулина, атеплазы, бевацизумаба, бивалирудина, ботулинического токсина типа A, ботулинического токсина типа B, C1-ингибитора эстеразы, канакинумаба, карбоксипептидазы G2 (глюкарпидазы и вораксазы), цертолизу-

маб-пегола, цетуксимаба, коллагеназы, иммунного Fab к Crotalidae, дарбэпэтина- $\alpha$ , деносумаба, иммунного Fab к дигоксину, дорназы-альфа, экулизумаба, этанерцепта, фактора VIIa, фактора VIII, фактора IX, фактора XI, фактора XIII, фибриногена, филграстима, галсульфазы, голимумаба, гистрелин ацетата, гиалуронидазы, идурсульфазы, имиглюцеразы, инфликсимаба, инсулина (в том числе gHu-инсулина и бычьего инсулина), интерферона- $\alpha$ 2a, интерферона- $\alpha$ 2b, интерферона- $\beta$ 1a, интерферона- $\beta$ 1b, интерферона- $\gamma$ 1b, ипилимумаба, L-аргиназы, L-аспарагиназы, L-метионазы, лактазы, ларонидазы, лепирудина/гирудина, меказермина, меказермин-ринфабата, метоксифатумумаба, натализумаба, октреотида, опрелвекина, панкреатической амилазы, панкреатической липазы, папаина, PEG-аспарагиназы, PEG-доксорубицина HCl, PEG-эпоэтина- $\beta$ , пэгфилграстима, PEG-интерферона- $\alpha$ 2a, PEG-интерферона- $\alpha$ 2b, пеглотиказы, пегвисоманта, фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), белка C, расбуриказы (уриказы), сакрозидазы, кальцитонина лососевых, сарграмостимы, стрептокиназы, тенектеплазы, терипаратида, тоцилизумаба (атлизумаба), трастузумаба, альфа-интерферона типа 1, устекинумаба и vW-фактора.

В особенности, где X представляет собой абциксимаб, адалимумаб, агалсидазу-альфа, агалсидазу-бета, альдеслейкин, алглюкозидазу-альфа, фактор VIII, фактор IX, инфликсимаб, L-аспарагиназу, ларонидазу, натализумаб, октреотид, фенилаланин-аммиак-лиазу (PAL) или расбуриказу (уриказу).

В частности, где X представляет собой фактор VIII, фактор IX, уриказу, PAL или аспарагиназу.

X представляет собой полипептид собственного антигена, выбранный для лечения сахарного диабета 1 типа, педиатрического рассеянного склероза, ювенильного ревматоидного артрита, целиакии или общей алопеции.

В особенности, где X представляет собой полипептид собственного антигена, выбранный для лечения выявленного впервые сахарного диабета 1 типа, педиатрического рассеянного склероза или целиакии.

X представляет собой чужеродный антиген, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ:

из арахиса, в том числе конарахин (Ara h 1),

из пшеницы, в том числе альфа-глиадин "33-мерный" нативный (SEQ ID NO: 20), альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный (SEQ ID NO: 21), альфа-глиадин (SEQ ID NO: 22) и омега-глиадин (SEQ ID NO: 23),

от кошки, в том числе Fel d 1A (UNIPROT P30438) и кошачий альбумин (UNIPROT P49064),

от собаки, в том числе Can f 1 (UNIPROT 018873) и собачий альбумин (UNIPROT P49822).

X представляет собой чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ, например, антигенный белок человеческого лейкоцита.

X представляет собой антитело, фрагмент антитела или лиганд, которые специфически связывают циркулирующий белок или пептид, или антитело, где циркулирующий белок, или пептид, или антитело приводят к отторжению трансплантата, иммунному ответу против терапевтического средства, аутоиммунному заболеванию и/или аллергии.

В особенности, где X связывает эндогенный циркулирующий белок, или пептид, или антитело.

Y представляет собой линкер, выбранный из формулы Ya, формулы Yb, формулы Yh, формулы Yi, формулы Yk, формулы Ym, формулы Yn, формулы Yo и формулы Yp.

В особенности, где n равняется от 8 до  $90 \pm 10\%$ , p равняется от 20 до  $100 \pm 10\%$  и q равняется от 3 до  $20 \pm 3$ . В частности, где n равняется от 40 до  $80 \pm 10\%$ , p равняется от 30 до  $40 \pm 10\%$  и q равняется от 4 до  $12 \pm 3$ .

В особенности, где Y представляет собой формулу Ya, формулу Yb, формулу Ym или формулу Yn. В частности, где n равняется от 8 до  $90 \pm 10\%$ , p равняется от 20 до  $100 \pm 10\%$  и q равняется от 3 до  $20 \pm 3$ .

Более конкретно, где n равняется от 40 до  $80 \pm 10\%$ , p равняется от 30 до  $40 \pm 10\%$ , и q равняется от 4 до  $12 \pm 3$ .

В частности, где Z конъюгирован с Y через этилацетамидную группу.

Более конкретно, где Z конъюгирован с Y по его C1.

Более конкретно, где  $R^8$  представляет собой CMP.

Более конкретно, где  $R^8$  представляет собой CMP. В частности, где  $R^8$  представляет собой CMP.

Y представляет собой линкер, выбранный из формулы Yc, формулы Yf, формулы Yg и формулы Ym.

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где t равняется 1 или 2. Более конкретно, где t равняется 1.

В частности, где p равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

Z представляет собой галактозу, галактозамин, N-ацетилгалактозамин, глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин.

В особенности, где Z представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

В частности, где Z представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Более конкретно, где Z представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C1.

В особенности, где Z представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

В частности, где Z представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Более конкретно, где Z представляет собой N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1.

Каждая из описанных выше групп и подгрупп являются предпочтительными по отдельности и могут быть объединены для описания дополнительных предпочтительных аспектов настоящего изобретения, например, но не в качестве ограничения, следующим образом:

X представляет собой полипептид собственного антигена, выбранный для лечения сахарного диабета 1 типа, педиатрического рассеянного склероза, ювенильного ревматоидного артрита, целиакии или общей алопеции.

В особенности, где X представляет собой полипептид собственного антигена, выбранный для лечения выявленного впервые сахарного диабета 1 типа, педиатрического рассеянного склероза или целиакии

В частности, где Y представляет собой линкер, выбранный из формулы Ya, формулы Yb, формулы Yc, формулы Yf, формулы Yg, формулы Yh, формулы Yi, формулы Yk, формулы Ym, формулы Yn, формулы Yo и формулы Yr.

В особенности, где  $W_p$  представляет собой полимер  $W^1$ , в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN, или статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где t равняется 1 или 2.

Более конкретно, где t равняется 2. Более конкретно, где t равняется 1.

В частности, где p равняется приблизительно 90.

Более конкретно, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

В особенности, где n равняется от 8 до  $90 \pm 10\%$ , p равняется от 20 до  $100 \pm 10\%$  и q равняется от 3 до  $20 \pm 3$ .

В частности, где n равняется от 40 до  $80 \pm 10\%$ , p равняется от 30 до  $40 \pm 10\%$  и q равняется от 4 до  $12 \pm 3$ .

В особенности, где Y представляет собой формулу Ya, формулу Yb, формулу Ym или формулу Yn.

В частности, где n равняется от 8 до  $90 \pm 10\%$ , p равняется от 20 до  $100 \pm 10\%$  и q равняется от 3 до  $20 \pm 3$ .

Более конкретно, где n равняется от 40 до  $80 \pm 10\%$ , p равняется от 30 до  $40 \pm 10\%$  и q равняется от 4 до  $12 \pm 3$ .

Еще более конкретно, где Z конъюгирован с Y через этилацетамидную группу.

Более конкретно, где Z конъюгирован с Y через этилацетамидную группу.

В частности, где Z конъюгирован с Y через этилацетамидную группу.

В особенности, где Z представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

В частности, где Z представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

Более конкретно, где Z представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Еще более конкретно, где Z представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C1.

В особенности, где Z представляет собой глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин.

В частности, где Z представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

Более конкретно, где Z представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Еще более конкретно, где Z представляет собой N-ацетилглюкозамин, конъюгированный по C1.

В частности, где Y представляет собой линкер, выбранный из формулы Yc, формулы Yf, формулы Yg и формулы Ym.

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где t равняется 1 или 2.

Более конкретно, где t равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

В частности, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_c$  и формулы  $Y_m$ .

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где  $t$  равняется 1 или 2.

Более конкретно, где  $t$  равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

В частности, где  $Z$  представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

В особенности, где  $Z$  представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

В частности, где  $Z$  представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Более конкретно, где  $Z$  представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C1.

В частности, где  $Z$  представляет собой глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин.

В особенности, где  $Z$  представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

Более конкретно, где  $Z$  представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Еще более конкретно, где  $Z$  представляет собой N-ацетилглюкозамин, конъюгированный по C1.

В особенности, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_a$ , формулы  $Y_b$ , формулы  $Y_h$ , формулы  $Y_i$ , формулы  $Y_k$ , формулы  $Y_m$ , формулы  $Y_n$ , формулы  $Y_o$  и формулы  $Y_r$ .

В частности, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_c$ , формулы  $Y_f$ , формулы  $Y_g$  и формулы  $Y_m$ .

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где  $t$  равняется 1 или 2.

Более конкретно, где  $t$  равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

В частности, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_c$  и формулы  $Y_m$ .

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где  $t$  равняется 1 или 2.

Более конкретно, где  $t$  равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

В частности, где  $n$  равняется от 8 до 90±10%,  $p$  равняется от 20 до 100±10% и  $q$  равняется от 3 до 20±3.

Более конкретно, где  $n$  равняется от 40 до 80±10%,  $p$  равняется от 30 до 40±10% и  $q$  равняется от 4 до 12±3.

В частности, где  $Y$  представляет собой формулу  $Y_a$ , формулу  $Y_b$ , формулу  $Y_m$  или формулу  $Y_n$ .

Более конкретно, где  $n$  равняется от 8 до 90±10%,  $p$  равняется от 20 до 100±10% и  $q$  равняется от 3 до 20±3.

Более предпочтительно, где  $n$  равняется от 40 до 80±10%,  $p$  равняется от 30 до 40±10% и  $q$  равняется от 4 до 12±3.

Более конкретно, где  $Z$  конъюгирован с  $Y$  через этилацетамидную группу.

В особенности, где  $Z$  представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

В частности, где  $Z$  представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

Более конкретно, где  $Z$  представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Более предпочтительно, где  $Z$  представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C1.

Более конкретно, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_c$ , формулы  $Y_f$ , формулы  $Y_g$  и формулы  $Y_m$ .

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где  $t$  равняется 1 или 2.

Более конкретно, где  $t$  равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

В особенности, где  $Z$  представляет собой глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин.

В частности, где  $Z$  представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1, C2 или C6.

Более конкретно, где  $Z$  представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин, конъюгированные по C1 или C2.

Более предпочтительно, где  $Z$  представляет собой N-ацетилглюкозамин, конъюгированный по C1.

Более конкретно, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_c$ , формулы  $Y_f$ , формулы  $Y_g$  и формулы  $Y_m$ .

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где  $t$  равняется 1 или 2.

Более конкретно, где  $t$  равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

Более конкретно, где  $Y$  представляет собой линкер, выбранный из формулы  $Y_c$  и формулы  $Y_m$ .

В особенности, где  $W_p$  представляет собой статистический сополимер, в котором  $R^9$  представляет собой Et-PEG<sub>t</sub>-AcN и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

В частности, где  $t$  равняется 1 или 2.

Более конкретно, где  $t$  равняется 1.

В частности, где  $p$  равняется приблизительно 90 и включает приблизительно 30 сомономеров  $W^1$  и 60 сомономеров  $W^2$ .

$m$  представляет собой целое число от приблизительно 1 до 100.

$m$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или 110.

В частности,  $m$  равняется от приблизительно 1 до 20.

$m$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22.

Более конкретно  $m$  равняется приблизительно 10.

$m$  равняется 9, 10 или 11.

$n$  представляет собой целое число, представляющее собой совокупность, включающую от приблизительно 1 до 100.

$n$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95, 99, 100, 105 или 110.

В частности,  $n$  равняется от приблизительно 8 до 90.

В частности,  $n$  равняется 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95 или 99.

Более конкретно  $n$  равняется от приблизительно 40 до 80.

Более конкретно  $n$  равняется 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 или 88.

$n$  представляет совокупность, охватывающую диапазоны 1-4, 2-4, 2-6, 3-8, 7-13, 6-14, 15-25, 26-30, 42-50, 46-57, 60-82, 85-90, 90-110 и 107-113.

В частности,  $n$  представляет совокупность, охватывающую диапазоны 7-13, 6-14, 15-25, 26-30, 42-50, 46-57, 60-82, 85-90 и 82-99.

Более конкретно  $n$  представляет совокупность, охватывающую диапазоны 36-44, 42-50, 46-57, 60-82 и 75-85.

$r$  представляет собой целое число, представляющее совокупность, включающую от приблизительно 2 до 150.

$r$  равняется 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160 или 165.

В частности, где  $n$  представляет собой целое число, представляющее совокупность, включающую от приблизительно 1 до 100.

В частности,  $n$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95, 99, 100, 105 или 110.

Более конкретно, где  $n$  равняется от приблизительно 8 до 90.

Более конкретно  $n$  равняется 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95 или 99.

Еще более конкретно, где  $n$  равняется от приблизительно 40 до 80.

Еще более конкретно  $n$  равняется 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 или 88.

Более конкретно  $r$  равняется 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или 110.

В частности, где  $n$  равняется целому числу, представляющему совокупность, включающую от приблизительно 1 до 100.



В частности,  $n$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95, 99, 100, 105 или 110.

Более конкретно, где  $n$  равняется от приблизительно 8 до 90.

Более конкретно  $n$  равняется 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95 или 99.

Еще более конкретно, где  $n$  равняется от приблизительно 40 до 80.

Еще более конкретно  $n$  равняется 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 или 88.

Более конкретно  $n$  равняется 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44.

В частности, где  $n$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95, 99, 100, 105 или 110.

Более конкретно, где  $n$  равняется от приблизительно 8 до 90.

Более конкретно  $n$  равняется 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 30, 34, 35, 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95 или 99.

Еще более конкретно, где  $n$  равняется от приблизительно 40 до 80.

Еще более конкретно  $n$  равняется 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 или 88.

$q$  равняется целому числу, представляющему совокупность, включающую от приблизительно 1 до 44.

$q$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 44 или 48.

### **Применимость, тестирование и введение**

Общая применимость.

Композиции по настоящему изобретению применяются в различных способах применения, в том числе, как будет понятно специалистам в данной области, в лечении отторжения трансплантата, иммунного ответа против терапевтического средства, аутоиммунного заболевания и пищевой аллергии, среди прочих применений.

В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению применяют для модуляции, в частности понижающей регуляции, антигенспецифичного нежелательного иммунного ответа.

Композиции по настоящему изобретению применимы в дополнительных вариантах осуществления для связывания и очистки из кровотока специфичных нежелательных белков, в том числе антител, эндогенно вырабатываемых у пациента (т.е. не относящиеся к экзогенным антителам, которые вводят пациенту), пептидов и т.п., которые вызывают аутоиммунную реакцию и ассоциированные с ней патологии, аллергии, воспалительные иммунные ответы и анафилактики.

В нескольких вариантах осуществления в соответствии с настоящим изобретением антигены адресно доставляются в печень для презентации с помощью антигенпрезентирующих клеток с осуществлением специфичной понижающей регуляции иммунной системы или для клиренса нежелательных циркулирующих белков. Это отличается от предыдущих применений адресной доставки в печень, например как описано в патенте США 2013/0078216, где целью молекул адресной доставки в печень, таких как DOM26h-196-61, является доставка терапевтических средств для лечения заболеваний печени, таких как фиброз, гепатит, цирроз и рак печени.

В соответствии с несколькими вариантами осуществления в настоящем изобретении представлены композиции и способы лечения нежелательного иммунного ответа на собственные антигены и чужеродные антигены, в том числе без ограничений чужеродный антиген трансплантата, против которого у реципиентов трансплантата развивается нежелательный иммунный ответ (например, отторжение трансплантата), чужеродный антиген, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, аллергия или гиперчувствительность), терапевтическое средство, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, гиперчувствительность и/или сниженная терапевтическая активность), собственный антиген, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ (например, аутоиммунное заболевание).

Аутоиммунные болезненные состояния, которые можно лечить с применением способов и композиций, представленных в данном документе, включают без ограничений острый диссеминированный энцефаломиелит (ADEM); острый интерстициальный аллергический нефрит (аллергия на лекарственное средство); острый некротизирующий геморрагический лейкоэнцефалит; аддисонову болезнь; очаговую алопецию; генерализованную алопецию; анкилозирующий спондилоартрит; ювенильный артрит; псориаз; псориатический артрит; ревматоидный артрит; атопический дерматит; аутоиммунную апластическую анемию; аутоиммунный гастрит; аутоиммунный гепатит; аутоиммунный гипопаратиреоз; аутоиммунный оофорит; аутоиммунный орхит; аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа; аутоиммунный полиэндокринный синдром 2 типа; аутоиммунный тиреоидит; болезнь Бехчета; облитерирующий бронхит; буллезный пемфигоид; целиакию; синдром Черджа-Строса; хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию; рубцующийся пемфигоид; болезнь Крона; миокардит Коксаки; герпетический дерматит Дюринга; сахарный диабет (1 типа); узелковую эритему; приобретенный буллезный эпидермолиз; гигантоклеточный артериит (артериит височных артерий); гигантоклеточный миокардит; синдром Гудпасчера; болезнь Грейвса; синдром Гийена-Барре; энцефалит Хашимото; тиреоидит Хашимото;

IgG4-связанное склерозирующее заболевание; синдром Ламберта-Итона; смешанное заболевание соединительной ткани; болезнь Мухи-Габерманна; рассеянный склероз; миастению гравис; неврит зрительного нерва; нейромиеелит зрительного нерва; пузырчатку обыкновенную и варианты; пернициозную анемию; аутоиммунное заболевание гипофиза; полимиозит; посткардиотомный синдром; преждевременное угасание функции яичников; первичный билиарный цирроз; первичный склерозирующий холангит; псориаз; ревматическую болезнь сердца; синдром Шегрена; системную красную волчанку; системную склеродермию; неспецифический язвенный колит; недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD); увеит; витилиго и гранулематоз Вегенера.

Конкретная группа аутоиммунных болезненных состояний, которые можно лечить с применением способов и композиций, представленных в настоящем документе, включает без ограничений острый некротический геморрагический лейкоэнцефалит; аддисонову болезнь; псориатический артрит; ревматоидный артрит; аутоиммунную апластическую анемию; аутоиммунный гипопизит; аутоиммунный гастрит; аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа; буллезный пемфигоид; целиакию; миокардит Коксаки; герпетический дерматит Дюринга; сахарный диабет (тип 1); приобретенный буллезный эпидермолиз; гигантоклеточный миокардит; синдром Гудпасчера; болезнь Грейвса; тиреоидит Хашимото; смешанное заболевание соединительной ткани; рассеянный склероз; миастению гравис; нейромиеелит зрительного нерва; пернициозную анемию; пузырчатку обыкновенную и варианты; аутоиммунное заболевание гипофиза; преждевременное угасание функции яичников; ревматическую болезнь сердца; системную склеродермию; синдром Шегрена; системную красную волчанку и витилиго.

В вариантах осуществления, использующих антиген, против которого развивается нежелательный иммунный ответ, такой как пищевые антигены, может обеспечиваться лечение реакций против, например, арахиса, яблока, молока, яичного белка, яичного желтка, горчицы, сельдерея, креветки, пшеницы (и других хлебных злаков), клубники и банана.

Как будет понятно специалистам в данной области, пациента можно тестировать для идентификации чужеродного антигена, против которого развился нежелательный иммунный ответ, и можно разработать композицию по настоящему изобретению на основе этого антигена.

#### Тестирование.

При установлении применимости композиций и способов по настоящему изобретению первоначально следует определить специфичность связывания с антиген-презентирующими клетками в печени (в частности, связывания с гепатоцитами и, конкретно, с ASGPR). Этого можно достигнуть, например, путем использования маркера (такого как флуоресцентный маркер фикоэритрин ("PE")) в композиции по настоящему изобретению. Композицию вводят подходящим экспериментальным субъектам. Контроли, например неконъюгированный PE или носитель (физиологический раствор), вводят другой группе(ам) субъектов. Композицию и контроли оставляют циркулировать в крови течение периода от 1 до 5 ч, после чего селезенку и печень субъектов собирают и измеряют флуоресценцию. Затем можно идентифицировать конкретные клетки, в которых обнаруживается флуоресценция. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему изобретению показаны более высокие уровни концентрации в антиген-презентирующих клетках печени по сравнению с неконъюгированным PE или носителем.

Эффективность иммуномодуляции можно протестировать путем измерения пролиферации OT-I CD8<sup>+</sup> клеток (трансплантированных в мышей-хозяев) в ответ на введение композиции по настоящему изобретению, включающей известный антиген, такой как овальбумин ("OVA"), по сравнению с введением антигена отдельно или только носителя. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему изобретению показано увеличение пролиферации клеток OT-I по сравнению с антигеном отдельно или носителем, что демонстрирует увеличение перекрестного примирования CD8<sup>+</sup> Т-клеток. Для различения Т-клеток, подвергающихся экспансии и развитию в фенотип функционального эффектора, от клеток, подвергающихся экспансии и делеции, пролиферирующие OT-I CD8<sup>+</sup> Т-клетки можно анализировать фенотипически в отношении молекулярных сигнатур истощения [таких как белок программируемой гибели-1 (PD-1), FasL и другие], а также связывания аннексина-V в качестве отличительного признака апоптоза и, таким образом, делеции. OT-I CD8<sup>+</sup> Т-клетки можно также оценивать в отношении их способности реагировать на антигенную стимуляцию с адъювантом, чтобы продемонстрировать отсутствие функционального ответа и, таким образом, иммунную толерантность в отношении антигена. С этой целью клетки анализируют в отношении воспалительных сигнатур после введения композиций по настоящему изобретению в мышей-хозяев с последующей антигенной стимуляцией. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему изобретению показаны очень низкие (например, фоновые) уровни воспалительных ответов с OT-I CD8<sup>+</sup> Т-клетками в отношении OVA по сравнению с контрольными группами, что демонстрирует, таким образом, иммунную толерантность.

Гуморальный иммунный ответ можно тестировать путем введения композиции по настоящему изобретению, включающей известный антиген, такой как OVA, по сравнению с введением антигена отдельно или только носителя и измерения уровней полученных антител. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему изобретению показаны очень низкие (например, фоновые) уровни образования антител в ответ на их введение и введение носителя, со значительно более высокими уровнями образования антител в ответ на введение антигена.

Эффективность толеризации в отношении антигена можно тестировать, как описано выше, со ссылкой на гуморальный иммунный ответ, где через несколько недель после обработки(обработок) с помощью композиции по настоящему изобретению группу субъектов стимулировали путем введения антигена отдельно, с последующим измерением уровней антител к антигену. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему изобретению показаны низкие уровни образования антител в ответ на стимуляцию антигеном в группах, предварительно обработанных с помощью таких композиций, по сравнению с группами, которые не были предварительно обработаны.

Болезнь-ориентированные экспериментальные модели хорошо известны специалистам в данной области и включают мышиную модель NOD (или с диабетом без ожирения) аутоиммунитета и толерантности и модель ЕАЕ (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита) для воспалительного демиелинизирующего заболевания человека, рассеянного склероза. В частности, у NOD-мышей развивается спонтанный аутоиммунный диабет (подобный диабету 1а типа у человека). Группы NOD-мышей обрабатывают тестируемым соединением или соединением отрицательного контроля с последующим измерением уровня глюкозы в крови. Успешное лечение соответствует возможности лечения диабета у человека или доказательству механизма подходов к лечению других аутоиммунных заболеваний. (См., например Anderson and Bluestone, *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:447-85.)

#### Введение.

Композиции по настоящему изобретению вводят в терапевтически эффективной дозировке, например в дозировке, достаточной для обеспечения лечения болезненных состояний, описанных ранее. Введения соединений по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемых солей можно осуществить с помощью любых общепринятых способов введения средств, которые служат для подобных применений.

Хотя уровни дозировки для человека еще должны быть оптимизированы для соединений по настоящему изобретению, их можно изначально экстраполировать на основании от приблизительно 10 до 100 мкг доз, вводимых мышам. Как правило, индивидуальная доза для человека составляет от приблизительно 0,01 до 2,0 мг/кг массы тела, предпочтительно от приблизительно 0,1 до 1,5 мг/кг веса тела и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,3 до 1,0 мг/кг веса тела. Лекарственный препарат можно вводить в течение одного дня или в течение нескольких дней и можно повторять с интервалами в несколько дней, одну или несколько недель или один или нескольких месяцев. Введение можно осуществлять в виде однократной дозы (например, в виде болюсной дозы) или как первоначальную болюсную дозу с последующей непрерывной инфузией оставшейся части полной дозы в течение продолжительного времени, например от 1 до 7 дней. Количество вводимого активного соединения, разумеется, будет зависеть от чего-либо одного или всего из следующего: субъекта и болезненного состояния, подлежащего лечению, тяжести поражения, способа и схемы введения и решения лечащего врача. Следует также понимать, что вводимые количества будут зависеть от молекулярной массы антигена, антитела, фрагмента антитела или лиганда, а также от размера линкера.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить либо отдельно, либо в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Хотя предполагаются все типичные способы введения (например, пероральный, местный, трансдермальный, инъекционный (внутримышечный, внутривенный или внутриаартериальный)), в настоящее время предпочтительно обеспечивать жидкие лекарственные формы, подходящие для инъекций. Составы, как правило, будут включать традиционный фармацевтический носитель или наполнитель, а также композицию по настоящему изобретению или ее фармацевтически приемлемую соль. В дополнение, эти композиции могут включать другие лечебные средства, фармацевтические средства, носители и т.п., в том числе без ограничений терапевтический белок, пептид, антитело или антитело-подобную молекулу, соответствующие антигену (X), который используется в композиции по настоящему изобретению, и другие активные средства, которые могут выступать в качестве иммуномодулирующих средств и более конкретно могут оказывать ингибиторные эффекты в отношении В-клеток, в том числе антифолаты, иммуносупрессоры, цитостатики, ингибиторы митоза и анти-метаболиты или их комбинации.

Как правило, в зависимости от предполагаемого способа введения фармацевтически приемлемая композиция будет содержать от приблизительно 0,1 до 95%, предпочтительно от приблизительно 0,5 до 50% по весу композиции по настоящему изобретению, остальную часть составляют подходящие фармацевтические наполнители, носители и т.п. Можно получать лекарственные формы или композиции, содержащие активный ингредиент в диапазоне от 0,005 до 95% с остатком, состоящим из нетоксичного носителя.

Пригодные для введения жидкие фармацевтические композиции можно получать, например, растворением, диспергированием и т.д. активной композиции по настоящему изобретению (например, лиофилизированного порошка) и необязательно фармацевтических адъювантов в носителе, таком как, например, вода (вода для инъекций), физиологический раствор, водный раствор декстрозы, глицерин, гликоли, этанол или т.п. (за исключением галактозы), для получения, таким образом, раствора или суспензии. Если необходимо, фармацевтическая композиция, подлежащая введению, может также содержать незначительные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие средства, эмуль-

гирующие средства, стабилизирующие средства, солюбилизирующие средства, pH-буферные средства и т.п., например, ацетат натрия, цитрат натрия, производные циклодекстрина, сорбитанмонолаурат, триэтанолaminaцетат и триэтанолamинолеат и т.д., осмолиты, аминокислоты, сахара и углеводы, белки и полимеры, соли, поверхностно-активные вещества, хелатирующие средства и антиоксиданты, консерванты и специфические лиганды. Современные способы получения таких лекарственных форм известны или будут очевидны для специалистов в данной области; например, см. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, 22<sup>nd</sup> Edition, 2012. Композиция или состав, подлежащие введению, будут в любом случае содержать активное вещество в количестве, эффективном для лечения симптомов субъекта, подлежащего лечению.

### Примеры

Следующие примеры служат для более полного описания способа применения описанного выше раскрытия, а также изложения самых лучших режимов, предусмотренных для выполнения различных аспектов настоящего изобретения. Понятно, что эти примеры никоим образом не служат для ограничения истинного объема настоящего изобретения, а скорее представлены в иллюстративных целях. Все источники, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Пример 1.

F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> (или F1a-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>-2NGAL).

1A. Формула 103', где X' представляет собой OVA и m равняется 4.

В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (5,0 мг, 0,00012 ммоль) добавляли к 100 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA, и перемешивали. Отдельно 1 мг реагента Траута растворяли в 100 мкл PBS, pH 7,0, и 16 мкл (0,00119 ммоль) раствора реагента Траута, полученного таким образом, добавляли к перемешиваемому раствору OVA при непрерывном перемешивании. Через 1 ч избыток реагента Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением соответствующего продукта формулы 103'.

1B. Формула 106A, где n равняется 80.

В не содержащей эндотоксинов пробирке галактозамин (10,0 мг, 0,04638 ммоль) растворяли при перемешивании в 100 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA. Сложный эфир пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 104, где n равняется 80) (16,23 мг, 0,00464 ммоль), растворенный в 100 мкл PBS, pH 7,0, добавляли к перемешиваемому раствору галактозамина. Через 1 ч полученный пиридил-дитиол-поли(этиленгликоль)-N-ацетилгалактозамин (формула 106A) был готов к применению без дополнительной очистки.

1C. Формула 1aA, где X' представляет собой OVA, m равняется 4, n равняется 80 (и Z' представляет собой C2-галактозамин).

Очищенный конъюгат OVA-реагент Траута формулы 103', полученный в примере 1A, добавляли непосредственно к перемешиваемому продукту формулы 106A, полученному в примере 1B. Через 1 ч полученный продукт формулы 1a очищали пропусканием реакционной смеси через колонку для центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта. (См. фиг. 5).

1D. Другие соединения формулы 103'.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 1A, и заменяя OVA следующим:

абциксимабом,  
адалимумабом,  
агалсидазой-альфа,  
агалсидазой-бета,  
альдеслейкином,  
алглюкозидазой-альфа,  
фактором VIII,  
фактором IX,  
L-аспарагиназой,  
ларонидазой,  
октреотидом,  
фенилаланин аммиак-лиазой,  
расбуриказой,  
инсулином (SEQ ID NO: 1),  
GAD-65 (SEQ ID NO: 2),  
IGRP (SEQ ID NO: 3),  
MBP (SEQ ID NO: 4),  
MOG (SEQ ID NO: 5),  
PLP (SEQ ID NO: 6),  
MBP13-32 (SEQ ID NO: 7),  
MBP83-99 (SEQ ID NO: 8),  
MBP111-129 (SEQ ID NO: 9),

MBP 146-170 (SEQ ID NO: 10),  
 MOG1-20 (SEQ ID NO: 11),  
 MOG35-55 (SEQ ID NO: 12),  
 PLP139-154 (SEQ ID NO: 13),  
 MART1 (SEQ ID NO: 14),  
 тирозиназой (SEQ ID NO: 15),  
 PMEL (SEQ ID NO: 16),  
 аквапорином-4 (SEQ ID NO: 17),  
 S-аррестином (SEQ ID NO: 18),  
 IRBP (SEQ ID NO: 19),  
 конарахином (UNIPROT Q6PSU6),  
 альфа-глиадином "33-мерным" нативным (SEQ ID NO: 20),  
 альфа-глиадином "33-мерным" деамидированным (SEQ ID NO: 21),  
 альфа-глиадином (SEQ ID NO: 22),  
 омега-глиадином (SEQ ID NO: 23),  
 Fel d 1A (UNIPROT P30438),  
 кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),  
 Can f 1 (UNIPROT O18873),  
 собачьим альбумином (UNIPROT P49822) и  
 RhCE (UNIPROT P18577),  
 получали следующие соответствующие соединения формулы 103', где  
 X представляет собой абциксимаб и m равняется 10,  
 X представляет собой адалимумаб и m равняется 11,  
 X представляет собой агалсидазу-альфа и m равняется 14,  
 X представляет собой агалсидазу-бета и m равняется 14,  
 X представляет собой альдеслейкин и m равняется 6,  
 X представляет собой алглюкозидазу-альфа и m равняется 13,  
 X представляет собой фактор VIII и m равняется 100,  
 X представляет собой фактор IX и m равняется 18,  
 X представляет собой L-аспарагиназу и m равняется 5,  
 X представляет собой ларонидазу и m равняется 7,  
 X представляет собой октреотид и m равняется 1,  
 X представляет собой фенилаланин-аммиак-лиазу и m равняется 12,  
 X представляет собой расбуриказу и m равняется 12,  
 X представляет собой инсулин (SEQ ID NO: 1) и m равняется 2,  
 X представляет собой GAD-65 (SEQ ID NO: 2) и m равняется 8,  
 X представляет собой IGRP (SEQ ID NO: 3) и m равняется 7,  
 X представляет собой MBP (SEQ ID NO: 4) и m равняется 6,  
 X представляет собой MOG (SEQ ID NO: 5) и m равняется 5,  
 X представляет собой PLP (SEQ ID NO: 6) и m равняется 8,  
 X представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO: 7) и m равняется 1,  
 X представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO: 8) и m равняется 1,  
 X представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO: 9) и m равняется 1,  
 X представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO: 10) и m равняется 2,  
 X представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO: 11) и m равняется 1,  
 X представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO: 12) и m равняется 2,  
 X представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO: 13) и m равняется 3,  
 X представляет собой MART1 (SEQ ID NO: 14) и m равняется 4,  
 X представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO: 15) и m равняется 8,  
 X представляет собой PMEL (SEQ ID NO: 16) и m равняется 5,  
 X представляет собой аквапорин-4 (SEQ ID NO: 17) и m равняется 4,  
 X представляет собой S-аррестин (SEQ ID NO: 18) и m равняется 12,  
 X представляет собой IRBP (SEQ ID NO: 19) и m равняется 21,  
 X представляет собой конарахин и m равняется 21,  
 X представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" нативный (SEQ ID NO: 20) и m равняется 1,  
 X представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный (SEQ ID NO: 21) и m равняется 1,  
 X представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO: 22) и m равняется 1,  
 X представляет собой омега-глиадин (SEQ ID NO: 23) и m равняется 1,  
 X представляет собой Fel d 1 и m равняется 4,  
 X представляет собой кошачий альбумин и m равняется 16,  
 X представляет собой Can f 1 и m равняется 6,  
 X представляет собой собачий альбумин и m равняется 23,

X представляет собой RhCE и m равняется 10.

1E. Другие соединения формулы 1aA.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 1C, и заменяя соединения формулы 103', например, теми, которые получены в примере 1D, получали следующие соответствующие соединения формулы 1aA:

FlaA-абциксимаб-m<sub>10</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-адалимуаб-m<sub>11</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-агалсидаза-альфа-m<sub>14</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-агалсидаза-бета-m<sub>14</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-альдеслейкин-m<sub>6</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-алглюкозидаза-альфа-m<sub>13</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-фактор VIII-m<sub>100</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-фактор IX-m<sub>18</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-L-аспарагиназа-m<sub>5</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-ларонидаза-m<sub>7</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-октреотид-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-фенилаланин-аммиак-лиаза-m<sub>12</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-расбуриказа-m<sub>12</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-GAD-65-m<sub>8</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-IGRP-m<sub>7</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MBP-m<sub>6</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MOG-m<sub>5</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-PLP-m<sub>8</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MBP13-32-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MBP83-99-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MBP111-129-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MBP146-170-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MOG1-20-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MOG35-55-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-PLP139-154-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-MART1-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-тирозидаза-m<sub>8</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-PMEL-m<sub>5</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-аквапорин-4-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-S-аррестин-m<sub>12</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-IRBP-m<sub>21</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-конарахин-m<sub>21</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-альфа-глиадин "33-мерный" нативный-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-омега-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-Fel d l-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-кошачий альбумин-m<sub>16</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-Can f l-m<sub>6</sub>-n<sub>80</sub>,  
 FlaA-собачий альбумин-m<sub>23</sub>-n<sub>80</sub> и  
 FlaA-RhCE-m<sub>10</sub>-n<sub>80</sub>.

1F. Другие соединения формулы 106A.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 1B, и заменяя сложный эфир пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 104, где n равняется 80) следующим:

формулой 104, где n равняется 12,  
 формулой 104, где n равняется 33,  
 формулой 104, где n равняется 40,  
 формулой 104, где n равняется 43,  
 формулой 104, где n равняется 50,  
 формулой 104, где n равняется 60,  
 формулой 104, где n равняется 75 и  
 формулой 104, где n равняется 80,  
 получали следующие соответствующие соединения формулы 106A, где  
 n равняется 12,  
 n равняется 33,  
 n равняется 40,

n равняется 43,  
n равняется 50,  
n равняется 60,  
n равняется 75 и  
n равняется 84.

1G. Другие соединения формулы 1aA.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 1E, и заменяя соединения формулы 106A соединениями, полученными в примере 1F, получали соответствующие соединения формулы 1aA, где n равняется 12, 33, 40, 43, 50, 60, 75 и 84, такие как:

F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>12</sub>,  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>33</sub>,  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>40</sub>,  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>43</sub>,  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>50</sub>,  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>60</sub>,  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>75</sub> и  
F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>84</sub>.

1H. Другие соединения формулы 1aA.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 1A-G, и заменяя соединение глюкозамина на галактозамин, получали соответствующие соединения формулы 1aA, где Z' представляет собой C2 глюкозамина.

Пример 2.

F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL.

2A. Формула 103', где X' представляет собой овальбумин и m равняется 1.

В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (6,5 мг, 0,000155 ммоль) добавляли к 200 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA, и перемешивали. Отдельно 1 мг реагента Траута растворяли в 100 мкл PBS, pH 7,0, и 43 мкл (0,00310 ммоль) раствора реагента Траута, полученного таким образом, добавляли к перемешиваемому раствору OVA при непрерывном перемешивании. Через 1 ч непрореагировавший реагент Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 103'.

2B. Формула 1b, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 34, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NacGAL.

В микроцентрифужной пробирке поли(галактозамин-метакрилат)-(пиридил дисульфид) (формула 201) (20,0 мг, 0,0020 ммоль) солибилизировали в 50 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA. К нему добавляли очищенный продукт OVA-реагент Траута из примера 2A с последующим перемешиванием в течение 1 ч. Полученный продукт формулы 1b очищали пропусканием реакционной смеси через колонку для центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта. (См. фиг. 5).

2C. Другие соединения формулы 1b.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 2B, и заменяя соединения формулы 103', например, теми, которые получены в примере 1D, получали соответствующие соединения формулы 1b:

F1b-абциксимаб-m<sub>10</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-адалимуаб-m<sub>11</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-агальсидаза-альфа-m<sub>14</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-агальсидаза-бета-m<sub>14</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-альдеслейкин-m<sub>6</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-алглюкозидаза-альфа-m<sub>13</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-фактор VIII-m<sub>100</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-фактор IX-m<sub>18</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-L-аспарагиназа-m<sub>5</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-ларонидаза-m<sub>7</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-октреотид-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-фенилаланин-аммиак-лиаза-m<sub>12</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-расбуриказа-m<sub>12</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-GAD-65-m<sub>8</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-IGRP-m<sub>7</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-MBP-m<sub>6</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-MOG-m<sub>5</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-PLP-m<sub>8</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-MBP13-32-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,  
F1b-MBP83-99-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL,

F1b-MBP111-129-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-MBP146-170-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-MOG1-20-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-MOG35-55-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-PLP139-154-m<sub>3</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-MART1-m<sub>4</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-тирозидаза-m<sub>8</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-PMEL-m<sub>5</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-аквапорин-4-m<sub>4</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-S-аррестин-m<sub>12</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-IRBP-m<sub>21</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-конарахин-m<sub>21</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-альфа-глиадин "33-мерный" нативный-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-омега-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-Fel d 1-m<sub>4</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-кошачий альбумин-m<sub>16</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-Can f 1-m<sub>6</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL,  
 F1b-собачий альбумин-m<sub>23</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL и  
 F1b-RhCE-m<sub>10</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL.

1D. Другие соединения формулы 1b.

Действуя согласно процедурам, описанным в примере 2B-C, и заменяя соединение поли(глюкозамин-метакрилат)-(пиридил-дисульфида) или поли(галактозамин-метакрилат)-(пиридил-дисульфида), получали соответствующие соединения формулы 1b, где Z" представляет собой 2-NAcGLU.

Пример 3.

F1f-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>33</sub>-2NAcGAL.

3A. Формула 1f, где X' представляет собой овальбумин, и m равняется 1, n равняется 4, p равняется 33, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z" представляет собой 2NAcGAL.

В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (4,0 мг, 0,0000952381 ммоль) добавляли к 0,1 мл PBS, pH 7,4, и перемешивали. Отдельно поли-(N-ацетилгалактозамин)-p-нитрофенолкарбонат формулы 601, где n равняется 4 и p равняется 33 (33,0 мг, 0,002380952 ммоль), добавляли к 100 мкл PBS, pH 7,5, и перемешивали на вортексе до растворения. Оба раствора смешивали и смесь энергично перемешивали в течение 1 ч. Затем смесь собирали и подвергали диализу в течение 3 дней против PBS, pH 7,4 (отсечение молекулярной массы 30 кДа), с получением продукта формулы 1f.

3B. Формула 1f, где X' представляет собой овальбумин, и m равняется 1, n равняется 4, p равняется 33, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z" представляет собой 2NAcGLU.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 3A и заменяя поли-(n-ацетилглюкозамин)-p-нитрофенолкарбонат на поли-(n-ацетилгалактозамин)-p-нитрофенолкарбонат, получали следующее соответствующее соединение формулы 1f, где Z" представляет собой 2NAcGLU.

Пример 4.

F1g-PVA-m<sub>1</sub>-p<sub>90</sub>-2NAcGAL.

4A. Формула 1g, где X' представляет собой овальбумин, и m равняется 1, p равняется 90, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z" представляет собой 2NAcGAL.

В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (5,0 мг, 0,000119048 ммоль) добавляли к 0,2 мл PBS, pH 7,4, и перемешивали. К перемешиваемому раствору добавляли 75 мг (0,00297619 ммоль) поли(галактозамин-метакрилат)-NHS (формула 701), растворенного в 0,4 мл PBS, pH 7,4. Обеспечивали перемешивание смеси в течение 2 ч. Затем смесь собирали и подвергали диализу в течение 3 дней против PBS, pH 7,4 (отсечение молекулярной массы 30 кДа), с получением продукта формулы 1g.

4B. Формула 1g, где X' представляет собой овальбумин, и m равняется 1, p равняется 90, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z" представляет собой 2NAcGLU.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 4A и заменяя поли(глюкозамин-метакрилат)-NHS на поли(галактозамин-метакрилат)-NHS, получали соответствующее соединение формулы 1g, где Z" представляет собой 2NAcGLU.

Пример 5.

F1h-OVA-m<sub>2</sub>-n<sub>45</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NAcGAL.

5A. Формула 802', где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2 и n равняется 45.

В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (3,0 мг, 0,0000714286 ммоль) добавляли к 150 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA, и перемешивали. К раствору OVA добавляли дибензоциклооктин-PEG-(p-нитрофенилкарбонат) (формула 801) (5,265 мг, 0,002142857 ммоль), растворенный в DMF, и перемешивали в течение 1 ч. Избыток дибензоциклооктин-PEG-(p-нитрофенилкарбоната) удаляли с



применением колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 802'.

5В. Формула 1h, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 45, p равняется 55, q равняется 4, R<sup>8</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL.

Поли(галактозамин-метакрилат)-N<sub>3</sub> (формула 803, где p равняется 55, q равняется 4 и Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин) (33 мг, 0,002142857 ммоль) растворяли в 100 мкл PBS, pH 7,4, и добавляли к продукту из примера 5А при перемешивании. Через 1 ч полученный продукт формулы 1h очищали с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии.

5С. Формула 1h, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 45, p равняется 55, q равняется 4, R<sup>8</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGLU.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 5В и заменяя поли(глюкозамин-метакрилат)-NHS на поли(галактозамин-метакрилат)-NHS, получали соответствующее соединение формулы 1h, где Z'' представляет собой 2NAcGLU.

Пример 6.

Flj-OVA-m<sub>10</sub>-n<sub>45</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NAcGAL.

6А. Формула 103', где X' представляет собой овальбумин и m равняется 10.

В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (5,0 мг, 0,00019 ммоль) добавляли к 150 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA, и перемешивали. Отдельно, 1 мг реагента Траута растворяли в 100 мкл PBS, pH 7,0, и 16 мкл (0,0019 ммоль) раствора реагента Траута, полученного таким образом, добавляли к перемешиваемому раствору OVA при непрерывном перемешивании. Через 1 ч непрореагировавший реагент Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 103'.

6В. Формула 902'', где X' представляет собой овальбумин, m равняется 10 и n равняется 45.

Дибензоциклооктин-PEG-(пиридил-дисульфид) (формула 901, где n равняется 45) (6,0 мг, 0,00238 ммоль) растворяли в DMF и полученный раствор добавляли к раствору OVA, полученному в примере 6А, и перемешивали в течение 1 ч. Избыток дибензоциклооктин-PEG-(пиридил-дисульфида) удаляли с применением центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 902''.

6С. Формула 1j, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 10, n равняется 45, p равняется 55, q равняется 4, R<sup>8</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL.

Поли(галактозамин метакрилат)-N<sub>3</sub> (формула 803, где p равняется 55, q равняется 4 и Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин) (36 мг, 0,00238 ммоль) растворяли в 150 мкл PBS, pH 7,4, и добавляли к продукту из примера 6В при перемешивании. Через 1 ч полученный продукт формулы 1j очищали (избыток р(GMA)-N<sub>3</sub> удаляли) с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта.

6D. Формула 1j, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 10, n равняется 45, p равняется 55, q равняется 4, R<sup>8</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGLU.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 6С и заменяя поли(глюкозамин-метакрилат)-NHS на поли(галактозамин-метакрилат)-NHS, получали соответствующее соединение формулы 1j, где Z'' представляет собой 2NAcGLU.

Пример 7.

FlL-OVA-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NAcGAL.

7А. Формула 1002, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2 и n равняется 80.

Дибензоциклооктин-PEG-(пиридил-дисульфид) (формула 1001, где n равняется 80) (9,0 мг, 0,00238 ммоль) растворяли в DMF и полученный раствор добавляли к очищенному раствору OVA формулы 103' (где X' представляет собой овальбумин и m равняется 2), например, полученному, как описано в примере 6А, и перемешивали в течение 1 ч. Избыток дибензоциклооктин-PEG-(пиридил-дисульфида) удаляли с применением центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 1002.

7В. Формула 1L, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 80, p равняется 55, q равняется 4, R<sup>8</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL.

Поли(галактозамин метакрилат)-N<sub>3</sub> (формула 803, где p равняется 55, q равняется 4 и Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин) (36 мг, 0,00238 ммоль) растворяли в 150 мкл PBS, pH 7,4, и добавляли к продукту из примера 7А при перемешивании. Через 1 ч полученный продукт формулы 1L очищали (избыток поли(галактозамин-метакрилат)-N<sub>3</sub> удаляли) с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта.

7С. Формула 1L, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 80, p равняется 55, q равняется 4, R<sup>8</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>, R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGLU.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 7В и заменяя поли(глюкозамин-метакрилат)-NHS на поли(галактозамин-метакрилат)-NHS, получали соответствующее соединение формулы 1j, где Z'' представляет собой 2NAcGLU.

Пример 8.

Получение поли(галактозамин-метакрилатных) полимеров.

8А. Галактозамин-метакрилат.

К перемешиваемому галактозамина гидрохлориду (2,15 г, 10,0 ммоль) добавляли 0,5 М метоксида натрия (22 мл, 11,0 ммоль). Через 30 мин добавляли ангидрид метакриловой кислоты (14,694 г, 11,0 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 4 ч. Полученный галактозамин-метакрилат загружали на силикагель на роторном испарителе и очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием DCM:MeOH (85:15).

8В. Формула 201, где n равняется 4 и p равняется 30.

Галактоза-метакрилат (600 мг, 2,43 ммоль), 2-(2-(2-(2-(пиридин-2-илдисульфанил)этокси)этокси)-этокси)этил-2-((фенилкарбонотиоил)тио)ацетат (44,8 мг, 0,081 ммоль) и AIBN (3,174089069 мг, 0,016 ммоль) добавляли к 1,5 мл DMF в сосуде Шленка. Реакционную смесь подвергали 4 циклам замораживания-оттаивания, а затем перемешивали при 70°C в течение 6 ч. Необходимый полимерный продукт формулы 201 осаждали в 12 мл метанола, а избыток растворителя удаляли при пониженном давлении.

8С. Формула 201, где n равняется 4 и p равняется 30.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 8В и заменяя глюкоза-метакрилат на галактоза-метакрилат, получали соответствующие полимеры поли(глюкозамин-метакрилат).

Пример 9.

Получение F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>.

9А. Формула 103', где X' представляет собой фикоэритрин.

В не содержащей эндотоксинов пробирке фикоэритрин ("РЕ") (приобретен в Pierce) (200 мкл, 0,000004 ммоль) добавляли к 50 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA, и перемешивали. Отдельно 1 мг реагента Траута растворяли в 100 мкл PBS, pH 7,0, и 2 мкл (0,00013 ммоль) раствора реагента Траута, полученного таким образом, добавляли к перемешиваемому раствору РЕ при непрерывном перемешивании. Через 1 ч избыток реагента Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 103'.

9В. Формула 106А, где n равняется 80.

В не содержащей эндотоксинов пробирке галактозамин (7,0 мг, 0,03246 ммоль) растворяли при перемешивании в 100 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 mM EDTA. Сложный эфир пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 104, где n равняется 80) (16,23 мг, 0,00464 ммоль), растворенный в 50 мкл PBS, pH 7,0, добавляли к перемешиваемому раствору галактозамина. Через 1 ч полученный продукт формулы 106А был готов к применению без дополнительной очистки.

9С. Формула 1a, где X' представляет собой фикоэритрин, m равняется 3, n равняется 80 и Z' представляет собой галактозамин.

Очищенные конъюгаты РЕ-реагент Траута, полученные в примере 9А, добавляли непосредственно к перемешиваемому продукту формулы 106А, полученному в примере 9В. Через 1 ч полученный продукт формулы 1a очищали пропусканием реакционной смеси через колонку для центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта.

9D. Формула 1a, где X' представляет собой фикоэритрин, m равняется 3, n равняется 80 и Z' представляет собой глюкозамин.

Аналогично, действуя согласно процедурам по примеру 9В и 9С и заменяя глюкозамин на галактозамин, получали соответствующее соединение формулы 1a, где Z'' представляет собой глюкозамин.

Пример 10.

Распределение в печени.

10А. F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub> получали, например, как описано в примере 9. Для инъекций готовили 30 мкг/100 мкл раствор в стерильном физиологическом растворе.

Раствор F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub> (30 мкг) вводили одной из трех групп мышей "C57 black 6" (по 3 в каждой группе) путем инъекции в хвостовую вену. Две другие группы мышей получали эквивалентный объем фикоэритрина в 100 мкл физиологического раствора или физиологический раствор-носитель. Через 3 ч после введения печень и селезенку этих животных собирали и определяли уровень клеточной флуоресценции в этих органах с помощью проточной цитометрии в качестве показателя содержания РЕ в клетках.

Как показано на фиг. 1A-D, синусоидальные эндотелиоциты (LSEC) (1A), гепатоциты (1C), клетки Купфера (KC) (1B) и другие антиген-презентирующие клетки (APC) (1D) из печени мышей, кото-

рых обрабатывали с помощью F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>, проявляли по меньшей мере трехкратное увеличение флуоресценции по сравнению с животными, которые получали раствор PE. Не было обнаружено детектируемой разницы в флуоресценции клеток селезенки, собранных в этих трех группах. Эти результаты подтверждают, что F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub> обладал достаточной специфичностью для связывания с антиген-презентирующими клетками в печени.

10B. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 10A, и заменяя F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub> соединениями F1b-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL, F1f-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>33</sub>-2NacGAL, F1g-PE-m<sub>3</sub>-p<sub>90</sub>-2NacGAL, F1h-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>45</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NacGAL, F1j-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>45</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NacGAL, F1L-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NacGAL, F1m-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, F1m-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH, F1n-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc и F1n-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH, полученными, например, как описано со ссылкой на пример 9 путем замены X в примерах 2B, 3, 4, 5B, 6B, 7B, 15G, 15L, 16B и 16F соответственно, было подтверждено, что соединения, в которых F1aA-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub> заменили соединениями F1b-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NacGAL, F1f-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>33</sub>-2NacGAL, F1g-PE-m<sub>3</sub>-p<sub>90</sub>-2NacGAL, F1h-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>45</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NacGAL, F1j-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>45</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NacGAL, F1L-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>55</sub>-q<sub>4</sub>-2NacGAL, F1m-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, F1m-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH, F1n-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc и F1n-PE-m<sub>3</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH, обладали достаточной специфичностью для связывания с антиген-презентирующими клетками в печени.

10C. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 10A и 10B и заменяя соответствующие гликозилированные соединения на галактозилированные соединения, было подтверждено, что гликозилированные соединения обладали достаточной специфичностью для связывания с антиген-презентирующими клетками в печени.

Пример 11.

Пролиферация антигенспецифичных OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

11A. F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>, синтезированный, например, как описано в примере 1, получали для инъекций при концентрации 10 мкг/100 мкл в физиологическом растворе. В день 0 10<sup>6</sup> OT-I Т-клеток подвергали флуоресцентному мечению и адаптивному переносу в 3 группы мышей CD 45.2 (по 5 на группу) путем инъекции в хвостовую вену. На следующий день (т.е. в день 1) каждой из 3 групп мышей вводили соответственно 10 мкг F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>, OVA или физиологический раствор путем инъекции в хвостовую вену. В день 6 животных умерщвляли и определяли % пролиферирующих OT-I клеток в селезенке с помощью клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

Результаты этого исследования (см. фиг. 2) показывают, что процентная доля пролиферирующих OTI Т-клеток у мышей, обработанных с помощью F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> ("Gal-OVA" на фиг. 2), была значительно выше, чем процентная доля пролиферирующих OTI-клеток в селезенке мышей, обработанных с помощью OVA или физиологического раствора ("без обработки" на фиг. 2). Повышение пролиферации OTI-клеток демонстрирует повышенное перекрестное примирования CD8<sup>+</sup> Т-клеток у животных, которых обрабатывали с помощью F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>, по сравнению с другими средствами обработки. Совместно с результатами из примера 12 эти результаты означают, что способность F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> адресно доставлять антигены в печень повышает презентацию OVA антиген-презентирующими клетками в печени OVA-специфичным OTI Т-клеткам.

11B. Для различения Т-клеток, подвергающихся экспансии и развитию в фенотип функционального эффектора, от клеток, подвергающихся экспансии и делеции, пролиферирующие OTI CD8<sup>+</sup> Т-клетки анализировали в отношении фосфатидилсерина под воздействием аннексина-V, в качестве отличительного признака апоптоза и, таким образом, делеции, а также маркера истощения, белка программируемой гибели-1 (PD-1). Как показано на фиг. 3A, B, F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> ("Gal-OVA" на фиг. 3A, B) индуцировал намного более высокие количества аннексин-V<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> пролиферирующих OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем растворимый OVA. Эти данные демонстрируют, что в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, связь антигена, толерантность которого индуцируется линкерами и компонентами для адресной доставки в печень, как раскрыто в данном документе, приводит к неожиданному повышению накопления Т-клеток, обладающих способностью к иммунологическому функционированию.

11C. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 11A и 11B, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 19G, было показано, что соединения из примеров 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 19G индуцируют намного более высокое количество аннексин-V<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> пролиферирующих OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем растворимый OVA.

11D. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 11A и 11B, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> соединениями формул 1 и 2, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X"), соответственно, было показано, что соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F индуцируют намного более высокое количество аннексин-V<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> пролиферирующих OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем растворимый антиген X.

11E. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 11A-D, и заменяя соответствующие гликозилированные соединения на галактозилированные соединения, было подтверждено, что гликозилированные соединения индуцируют намного более высокое количество аннексин-V<sup>+</sup> и PD-1<sup>+</sup> пролифери-

рующих OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток, чем растворимый антиген X.

Пример 12.

F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> не индуцирует ответ с OVA-специфичными антителами.

12A. Для оценки гуморального иммунного ответа на F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> мышей обрабатывали с помощью еженедельных i.v. инъекций либо F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub>, либо OVA, а затем измеряли уровни OVA-специфичных антител в крови. В дни 0, 7 и 14 эксперимента мышам вводили i.v. инъекцию из 100 мкл физиологического раствора, содержащего одно из следующего:

- 1) 6 мкг OVA;
- 2) 6 мкг F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub>;
- 3) 30 мкг OVA;
- 4) 30 мкг F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> или
- 5) только физиологический раствор.

Каждая группа состояла из 5 мышей. В день 19 у мышей брали кровь путем прокола щеки и определяли титр OVA-специфичных антител в крови каждой мыши с помощью ELISA. Результаты данного исследования показали, что, хотя у мышей, которых обрабатывали с помощью 6 и 30 мкг OVA, увеличивались титры OVA-специфичных антител, у мышей, которых обрабатывали с помощью 6 и 30 мкг F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> ("Gal-OVA" на фиг. 4), титры в крови были аналогичны таковым у мышей, обработанных с помощью физиологического раствора (т.е. у животных, обработанных носителем) (фиг. 4). Например, у мышей, обработанных с помощью 6 и 30 мкг OVA, средний титр антител составлял 3,5 и 2,5 соответственно; в то время как у мышей, обработанных с помощью 6 и 30 мкг OVA, средний титр антител составлял 0,75 и 0,25 соответственно. Таким образом, эти данные демонстрируют, что связь антигена, которому требуется толерантность к линкерам и компонентам для адресной доставки в печень, в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, приводит к образованию намного меньшего количества антигенспецифичных антител. В связи с этим эти данные демонстрируют, что иммунный ответ на антиген, доставленный в печень с помощью композиций, раскрытых в данном документе, снижается.

12B. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 12A, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 15G, было показано, что для мышей, обработанных соединениями из примеров 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 15G, характерны титры OVA-специфичного антитела, аналогичные таковым у мышей, обработанных физиологическим раствором.

12C. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 12B, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что для мышей, обработанных соединениями из примеров 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F, характерны титры антиген X-специфичных антител, аналогичные таковым у мышей, обработанных физиологическим раствором.

12D. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 12A-C, и заменяя соответствующие гликозилированные соединения на галактозилированные соединения, было подтверждено, что для гликозилированных соединений характерны титры антиген X-специфичных антител, аналогичные таковым у мышей, обработанных физиологическим раствором.

Пример 13.

F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> истощает OVA-специфичные антитела.

13A. Мышей, которые имели различные титры антител к OVA в крови (каждая мышь имела титр от 0 до 4,5), обрабатывали с помощью i.v. инъекции 20 мкг F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub>, растворенного в 100 мкл физиологического раствора. Мыши получали i.v. инъекции F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> в дни 0, 5, 7, 12 и 14 (инъекции F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> обозначены как "Gal-OVA" и показаны в виде зеленых стрелок на оси абсцисс на фиг. 5). Для определения способности F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> истощать OVA-специфичные антитела сыворотки крови у мышей брали кровь в день -1, чтобы установить начальный титр антитела, а затем проводили последующие заборы крови после каждой инъекции F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> в дни 2, 6, 9, 13 и 16. Титр антител у каждой мыши определяли с помощью ELISA. Результаты этого исследования показывают, что F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> способен истощать уровни антител сыворотки крови у мышей. Например, через один день после первой инъекции F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> (т.е. день 2) мыши с положительными титрами антител к OVA проявляли от 5- до 100-кратного снижения уровней антител сыворотки крови (фиг. 5). Результаты показывают, что, хотя в течение 19-дневного эксперимента титры антител у некоторых мышей увеличивались, уровни титра никогда не достигали начального титра антитела, измеренного в день -1, и последующие дозы F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> были эффективны в снижении этих кратковременных повышений титров антител. Эти результаты демонстрируют, что F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> характеризуется специфичностью связывания OVA-специфичных антител сыворотки крови и кинетикой, необходимой для истощения OVA-специфичных антител сыворотки крови.

13B. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 13A, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 15G, было по-

казано, что соединения из примеров 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 15G характеризуются специфичностью связывания OVA-специфичных антител сыворотки крови и кинетикой, необходимой для истощения OVA-специфичных антител сыворотки крови.

13C. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 13A, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 10D, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F характеризуются специфичностью связывания антиген X-специфичных антител сыворотки крови и кинетикой, необходимой для истощения антиген X-специфичных антител сыворотки крови.

13D. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 13A-C, и заменяя соответствующие гликозилированные соединения на галактозилированные соединения, было подтверждено, что гликозилированные соединения характеризуются специфичностью связывания антиген X-специфичных антител сыворотки крови и кинетикой, необходимой для истощения антиген X-специфичных антител сыворотки крови.

#### Пример 14.

Модель от стимуляции OT-1 до развития толерантности.

14A. Путем применения стандартной модели от стимуляции OTI до развития толерантности (Liu, Iyoda, et al., 2002) продемонстрировали способность F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> (mGal-OVA) и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> (pGal-OVA) предотвращать последующие иммунные ответы на антигенную стимуляцию, опосредованную вакциной, даже в случае стимуляции, включающей очень сильный адъювант бактериального происхождения (т.е. липополисахарид). Для развития толерантности 233 нмоль одного из F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub>, F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> или растворимого OVA вводили внутривенно в 100 мкл физиологического раствора в дни 1 и 6 с последующим адаптивным переносом OTI CD8<sup>+</sup> (CD45.2<sup>+</sup>) Т-клеток мышам CD45.1<sup>+</sup> (n=5 мышей на группу). После 9 дополнительных дней для обеспечения возможности потенциальной делеции перенесенных Т-клеток мышей-реципиентов затем подвергали стимуляции с помощью OVA (10 мкг) с адъювантом липополисахаридом (LPS) (50 нг) путем внутрикожной инъекции. Определение характеристик дренирующих лимфатических узлов через 4 дня после стимуляции позволяло определить, действительно ли имела место делеция или нет.

14B. Внутривенное введение F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> приводило к значительному уменьшению популяций OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах по сравнению с мышами, обработанными немодифицированным OVA перед антигенной стимуляцией с LPS, что демонстрирует делеционную толерантность. Например, на фиг. 6A-F показано, что дренирующие лимфатические узлы от мышей, обработанных с помощью одного из F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> (mGal-OVA) и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> (pGal-OVA), содержали более чем в 9 раз меньше OTI CD8<sup>+</sup> Т-клеток по сравнению с мышами, обработанными с помощью OVA, и более чем в 43 раза меньше по сравнению с мышами контрольной стимуляции, которые не получали внутривенные инъекции антигена; причем ответы в клетках селезенки были сходными. Эти результаты демонстрируют, что F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> ослабляли OVA-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью OVA с адъювантом, таким образом устанавливая, что композиции, раскрытые в данном документе, подходят для индукции иммунной толерантности. Что касается характеристики, на фиг. 7 показаны характеристики F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>44</sub>-p<sub>34</sub>.

14C. Действуя согласно процедуре, описанной в примерах 14A и B, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 15G, было показано, что соединения из примеров 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 15G ослабляют OVA-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью OVA с адъювантом.

14D. Действуя согласно процедуре, описанной в примерах 14A и B, и заменяя F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 15I, 15L, 16B, 16D и 16F ослабляют антиген X-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью антигена X с адъювантом.

14E. Действуя согласно процедуре, описанной в примере 14A-D, и заменяя соответствующие гликозилированные соединения на галактозилированные соединения, было подтверждено, что гликозилированные соединения ослабляют антиген X-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью антигена X с адъювантом.

#### Пример 15.

F1m-OVA-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc.

15A. Формула 1102, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-Ацетил-D-галактозамин (формула 1101, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH) (5 г, 22,6 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору хлорэтанола (200 мл) при комнатной температуре. Раствор охлаждали до 4°C и в раствор добавляли по каплям ацетилхлорид. Температуру раствора доводили до комнатной температуры и затем нагревали до 70°C. Через 4 ч непрореагировавший хлорэтанол удаляли при пониженном давлении. К неочищенному продукту добавляли 100 мл этанола и

полученный раствор перемешивали в присутствии углерода в течение 2 ч. Раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Соответствующий продукт формулы 1102, N-(2-(2-хлорэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)ацетамид, использовали без дополнительной очистки.

15B. Формула 1103, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-(2-(2-Хлорэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)ацетамид, полученный в примере 15A (2 г, 7,4 ммоль), добавляли к перемешиваемому раствору DMF (100 мл) и азида натрия (4 г, 61,5 ммоль). Раствор нагревали при температуре 90°C в течение 12 ч и затем фильтровали. Остаточный растворитель удаляли при пониженном давлении и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (10% MeOH в дихлорметане) с получением соответствующего продукта формулы 1103, N-(2-(2-азидоэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)ацетамида.

15C. Формула 1104, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-(2-(2-Азидоэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)ацетамид, полученный в примере 15B (2 г, 6,9 ммоль), добавляли к раствору палладиевого катализатора на углеродном носителе и этанола (50 мл). Раствор перемешивали в атмосфере газообразного водорода (3 атм.) в течение 4 ч. Полученный раствор фильтровали и остаточный растворитель удаляли при пониженном давлении с получением соответствующего продукта формулы 1104, N-(2-(2-аминоэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)ацетамида, который использовали без дополнительной очистки.

15D. Формула 1105, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-(2-(2-Аминоэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)ацетамид, полученный в примере 15C (1,0 г, 3,78 ммоль), добавляли к раствору ангидрида метакриловой кислоты (0,583 г, 3,78 ммоль) в DMF (50 мл). Затем в раствор добавляли триэтиламин и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Через 2 ч избыток растворителя удаляли при пониженном давлении и соответствующий продукт формулы 1105, N-(2-((3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)этил)метакриламид, выделяли с помощью флэш-хроматографии.

15E. Формула 1107, где p равняется 30, q равняется 4, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH и R<sup>8</sup> представляет собой CMP.

Азид-модифицированное средство uRAFT формулы 1106, где q равняется 4 (28 мг), добавляли к раствору N-(2-((3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2Н-пиран-2-ил)окси)этил)-метакриламида, полученного в примере 15D (579 мг, 1,74 ммоль), и азо-бис-изобутиронитрила (2,2 мг, 0,0116 ммоль) в DMF. Реакционную смесь подвергали 4 циклам замораживание-откачка-размораживание и затем перемешивали при 70°C. Через 12 ч полимерный продукт формулы 1107, где p равняется 30 и q равняется 4, осаждали из реакционной смеси путем добавления метанола. Растворитель сливали с твердого вещества и твердое вещество собирали, а остаточный растворитель удаляли с помощью пониженного давления.

15F. Формула 1109, где X' представляет собой OVA, m равняется 2 и n равняется 80.

Овальбумин (5 мг, 0,00012 ммоль) добавляли к 100 мкл буфера на основе фосфата натрия (pH 8,0) и перемешивали. К этому раствору добавляли 5 мг соединения формулы 1108, где n равняется 80. Через 1 ч непрореагировавшее соединение формулы 1108 удаляли из раствора с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии. Полученный забуференный раствор, содержащий соответствующий продукт формулы 1109, использовали в следующей реакции без дополнительной очистки.

15G. Формула 1m, где X' представляет собой OVA, m равняется 2, n равняется 80, p равняется 30, q равняется 4, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>8</sup> представляет собой CMP.

Раствор, полученный в примере 15F, добавляли к 100 мкл буфера на основе фосфата натрия (pH 8,0), который содержал 10 мг продукта формулы 1107, полученного в примере 15E. Обеспечивали перемешивание реакционной смеси в течение 2 ч и затем избыток соединения формулы 1107 удаляли с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии с получением соответствующего изомерного продукта формулы 1m в растворе, который использовали в биологических исследованиях без дополнительной очистки. Заместитель R<sup>3</sup> обозначен в названии указанного в заголовке соединения как 2NHAc.

15H. Другие соединения формулы 1109.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 15F, и заменяя OVA следующим:

абциксимабом,  
адалимумабом,  
агалсидазой-альфа,  
агалсидазой-бета,  
альдеслейкином,  
алглюкозидазой-альфа,  
фактором VIII,  
фактором IX,

L-аспарагиназой,  
 ларонидазой,  
 октреотидом,  
 фенилаланин аммиак-лиазой,  
 расбуриказой,  
 инсулином (SEQ ID NO: 1),  
 GAD-65 (SEQ ID NO: 2),  
 IGRP (SEQ ID NO: 3),  
 MBP (SEQ ID NO: 4),  
 MOG (SEQ ID NO: 5),  
 PLP (SEQ ID NO: 6),  
 MBP13-32 (SEQ ID NO: 7),  
 MBP83-99 (SEQ ID NO: 8),  
 MBP111-129 (SEQ ID NO: 9),  
 MBP146-170 (SEQ ID NO: 10),  
 MOG1-20 (SEQ ID NO: 11),  
 MOG35-55 (SEQ ID NO: 12),  
 PLP139-154 (SEQ ID NO: 13),  
 MART1 (SEQ ID NO: 14),  
 тирозиназой (SEQ ID NO: 15),  
 PMEL (SEQ ID NO: 16),  
 аквапорином-4 (SEQ ID NO: 17),  
 S-аррестином (SEQ ID NO: 18),  
 IRBP (SEQ ID NO: 19),  
 конарахином (UNIPROT Q6PSU6),  
 альфа-глиадином "33-мерным" нативным (SEQ ID NO: 20),  
 альфа-глиадином "33-мерным" деамидированным (SEQ ID NO: 21),  
 альфа-глиадином (SEQ ID NO: 22),  
 омега-глиадином (SEQ ID NO: 23),  
 Fel d 1A (UNIPROT P30438),  
 кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),  
 Can f 1 (UNIPROT 018873),  
 собачьим альбумином (UNIPROT P49822) и  
 RhCE (UNIPROT P18577),

получали следующие соответствующие соединения формулы 1109, где n равняется 80:

X представляет собой абциксимаб и m равняется 10,  
 X представляет собой адалимумаб и m равняется 11,  
 X представляет собой агалсидазу-альфа и m равняется 14,  
 X представляет собой агалсидазу-бета и m равняется 14,  
 X представляет собой альдеслейкин и m равняется 6,  
 X представляет собой алглюкозидазу-альфа и m равняется 13,  
 X представляет собой фактор VIII и m равняется 100,  
 X представляет собой фактор IX и m равняется 18,  
 X представляет собой L-аспарагиназу и m равняется 5,  
 X представляет собой ларонидазу и m равняется 7,  
 X представляет собой октреотид и m равняется 1,  
 X представляет собой фенилаланин-аммиак-лиазу и m равняется 12,  
 X представляет собой расбуриказу и m равняется 12,  
 X представляет собой инсулин (SEQ ID NO: 1) и m равняется 2,  
 X представляет собой GAD-65 (SEQ ID NO: 2) и m равняется 8,  
 X представляет собой IGRP (SEQ ID NO: 3) и m равняется 7,  
 X представляет собой MBP (SEQ ID NO: 4) и m равняется 6,  
 X представляет собой MOG (SEQ ID NO: 5) и m равняется 5,  
 X представляет собой PLP (SEQ ID NO: 6) и m равняется 8,  
 X представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO: 7) и m равняется 1,  
 X представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO: 8) и m равняется 1,  
 X представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO: 9) и m равняется 1,  
 X представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO: 10) и m равняется 2,  
 X представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO: 11) и m равняется 1,  
 X представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO: 12) и m равняется 2,  
 X представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO: 13) и m равняется 3,  
 X представляет собой MART1 (SEQ ID NO: 14) и m равняется 4,

X представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO: 15) и m равняется 8,  
 X представляет собой PMEL (SEQ ID NO: 16) и m равняется 5,  
 X представляет собой аквапорин-4 (SEQ ID NO: 17) и m равняется 4,  
 X представляет собой S-аррестин (SEQ ID NO: 18) и m равняется 12,  
 X представляет собой IRBP (SEQ ID NO: 19) и m равняется 21,  
 X представляет собой конарахин и m равняется 21,  
 X представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" нативный (SEQ ID NO: 20) и m равняется 1,  
 X представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный (SEQ ID NO: 21) и m равняется 1,  
 X представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO: 22) и m равняется 1,  
 X представляет собой омега-глиадин (SEQ ID NO: 23) и m равняется 1,  
 X представляет собой Fel d 1 и m равняется 4,  
 X представляет собой кошачий альбумин и m равняется 16,  
 X представляет собой Can f 1 и m равняется 6,  
 X представляет собой собачий альбумин и m равняется 23 и  
 X представляет собой RhCE и m равняется 10.

15I. Другие соединения формулы 1m.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 15G, и заменяя соединения формулы 1109, например, теми, которые получены в примере 15H, получали следующие соответствующие соединения формулы 1m:

F1m-абиксимаб-m<sub>10</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-адалимуаб-m<sub>11</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-агальсидаза-альфа-m<sub>14</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-агальсидаза бета-m<sub>14</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-альдеслейкин-m<sub>6</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-аглокозидаза-альфа-m<sub>13</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-фактор VIII-m<sub>100</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-фактор IX-m<sub>18</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-L-аспарагиназа-m<sub>5</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-ларонидаза-m<sub>7</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-октреотид-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-фенилаланин-аммиак-лиаза-m<sub>12</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-расбуриказа-m<sub>12</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-GAD-65-m<sub>8</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-IGRP-m<sub>7</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MBP-m<sub>6</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MOG-m<sub>5</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-PLP-m<sub>8</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MBP13-32-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MBP83-99-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MBP111-129-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MBP146-170-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MOG1-20-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MOG35-55-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-PLP139-154-m<sub>3</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-MART1-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-тирозиназа-m<sub>8</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-PMEL-m<sub>5</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-аквапорин-4-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-S-аррестин-m<sub>12</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-IRBP-m<sub>21</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-конарахин-m<sub>21</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-альфа-глиадин "33-мерный" нативный-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, F1m-омега-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-Fel d 1-m<sub>4</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-кошачий альбумин-m<sub>16</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-Can f 1-m<sub>6</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 F1m-собачий альбумин-m<sub>23</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc и  
 F1m-RhCE-m<sub>10</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc.

15J. Формула 1107, где p равняется 30, q равняется 8, R<sup>3</sup> представляет собой OH, R<sup>4</sup> представляет собой OH и R<sup>8</sup> представляет собой CMP.



Действуя согласно процедуре, описанной в примере 15А, и заменяя N-ацетил-D-галактозамин галактозой, и действуя согласно процедурам, описанным в примере 15Е, за исключением использования азид-модифицированного средства uRAFT формулы 1106, где q равняется 8, получали соединение формулы 1107, где р равняется 30, q равняется 8, R<sup>3</sup> представляет собой OH, R<sup>4</sup> представляет собой OH и R<sup>8</sup> представляет собой CMP.

15K. Формула 1109, где n равняется 62 и X' и m такие же, как в примере 19H.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 15F, заменяя OVA соединениями, описанными в примере 15H, и используя соединение формулы 1108, где n равняется 62, получали соответствующие соединения формулы 1109, где n равняется 62.

15L. Другие соединения формулы 1m.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 15G, и заменяя соединение формулы 1107 соединениями, полученными в примере 15J, и заменяя соединение формулы 1109 соединениями, полученными в примере 15K, получали соответствующие соединения формулы 1m:

F1m-абциксимаб-m<sub>10</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-адалимуаб-m<sub>11</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-агалсидаза-альфа-m<sub>14</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-агалсидаза бета-m<sub>14</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-альдеслейкин-m<sub>6</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-аглюкозидаза-альфа-m<sub>13</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-фактор VIII-m<sub>100</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-фактор IX-m<sub>18</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-L-аспарагиназа-m<sub>5</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-ларонидаза-m<sub>7</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-октреотид-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-фенилаланин-аммиак-лиаза-m<sub>12</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-расбуриказа-m<sub>12</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-GAD-65-m<sub>8</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-IGRP-m<sub>7</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MBP-m<sub>6</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MOG-m<sub>5</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-PLP-m<sub>8</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MBP13-32-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MBP83-99-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MBP111-129-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MBP146-170-m<sub>2</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MOG1-20-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MOG35-55-m<sub>2</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-PLP139-154-m<sub>3</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-MART1-m<sub>4</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-тирозидаза-m<sub>8</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-PMEL-m<sub>5</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-аквапорин-4-m<sub>4</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-S-апрестин-m<sub>12</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-IRBP-m<sub>21</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-конарахин-m<sub>21</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-альфа-глиадин "33-мерный" нативный-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-омега-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-Fel d 1-m<sub>4</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-кошачий альбумин-m<sub>16</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-Can f 1-m<sub>6</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 F1m-собачий альбумин-m<sub>23</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH и  
 F1m-RhCE-m<sub>10</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH.

15M. Другие соединения формулы 1m.

Действуя согласно процедуре, описанной в примерах 15А-L, и заменяя галактозамин или галактозу на глюкозамин или глюкозу, соответственно, получали соответствующие гликозилированные соединения формулы 1m.

Пример 16.

F1m-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc.

16А. Формула 1202, где X' представляет собой инсулин, m равняется 2 и n равняется 1.

Рекомбинантный человеческий инсулин (5 мг) добавляли к 100 мкл DMF, содержащего 10 мкл триэтиламина, и перемешивали до тех пор, пока инсулин не становился растворимым. К этому раствору добавляли 10 мг (0,0161 ммоль) предшественника линкера формулы 1201, где  $n$  равняется 1, и обеспечивали перемешивание реакционной смеси. Через 1 ч добавляли 1,3 мл трет-бутил-метилового эфира для выделения соответствующего продукта формулы 1202, который извлекали в виде осадка. Остаточный DMF и трет-бутил-метилловый эфир удаляли при пониженном давлении. Определение характеристик с помощью жидкостной хроматографии, масс-спектропии и электрофореза в полиакриламидном геле подтверждало идентичность продукта. Модифицированный продукт инсулина формулы 1202 использовали без дополнительной очистки.

16B. Формула 1n, где X' представляет собой инсулин,  $m$  равняется 2,  $n$  равняется 1,  $p$  равняется 30,  $q$  равняется 4 и  $R^8$  представляет собой CMP.

Продукт формулы 1202, полученный в примере 16A, ресуспендировали в 100 мкл DMF. Добавляли полимерный продукт формулы 1107, полученный в примере 15E (10 мг), и обеспечивали перемешивание реакционной смеси в течение 1 ч. Через 1 ч продукты реакции осаждали путем добавления дихлорметана (1,3 мл). Продукт фильтровали и остаточный растворитель удаляли при пониженном давлении. Затем неочищенный продукт ресуспендировали в 500 мкл PBS и низкомолекулярные компоненты удаляли с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии с получением соответствующего изомерного продукта формулы 1n. Определение характеристик с помощью жидкостной хроматографии, масс-спектропии и электрофореза в полиакриламидном геле подтверждало идентичность продукта. Модифицированный продукт инсулина формулы 1202 использовали без дополнительной очистки.

16C. Другие соединения формулы 1202.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 16A, и заменяя инсулин следующим:

абциксимабом,  
адалimumабом,  
агальсидазой-альфа,  
агальсидазой-бета,  
альдеслейкином,  
алглюкозидазой-альфа,  
фактором VIII,  
фактором IX,  
L-аспарагиназой,  
ларонидазой,  
октреотидом,  
фенилаланин аммиак-лиазой,  
расбуриказой,  
GAD-65 (SEQ ID NO: 2),  
IGRP (SEQ ID NO: 3)  
MBP (SEQ ID NO: 4),  
MOG (SEQ ID NO: 5),  
PLP (SEQ ID NO: 6),  
MBP13-32 (SEQ ID NO: 7),  
MBP83-99 (SEQ ID NO: 8),  
MBP111-129 (SEQ ID NO: 9),  
MBP146-170 (SEQ ID NO: 10),  
MOG1-20 (SEQ ID NO: 11),  
MOG35-55 (SEQ ID NO: 12),  
PLP139-154 (SEQ ID NO: 13),  
MART1 (SEQ ID NO: 14),  
тирозидазой (SEQ ID NO: 15),  
PMEL (SEQ ID NO: 16),  
аквапорином-4 (SEQ ID NO: 17),  
S-аррестинном (SEQ ID NO: 18),  
IRBP (SEQ ID NO: 19),  
конарахином (UNIPROT Q6PSU6),  
альфа-глиадином "33-мерным" нативным (SEQ ID NO: 20),  
альфа-глиадином "33-мерным" деамидированным (SEQ ID NO: 21),  
альфа-глиадином (SEQ ID NO: 22),  
омега-глиадином (SEQ ID NO: 23),  
Fel d 1A (UNIPROT P30438),  
кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),  
Can f 1 (UNIPROT 018873),  
собачьим альбумином (UNIPROT P49822) и

RhCE (UNIPROT P18577),

получали следующие соответствующие соединения формулы 1202, где n равняется 1:

- X представляет собой абциксимаб и m равняется 10,
- X представляет собой адалимумаб и m равняется 11,
- X представляет собой агалсидазу-альфа и m равняется 14,
- X представляет собой агалсидазу-бета и m равняется 14,
- X представляет собой альдеслейкин и m равняется 6,
- X представляет собой алглюкозидазу-альфа и m равняется 13,
- X представляет собой фактор VIII и m равняется 100,
- X представляет собой фактор IX и m равняется 18,
- X представляет собой L-аспарагиназу и m равняется 5,
- X представляет собой ларонидазу и m равняется 7,
- X представляет собой октреотид и m равняется 1,
- X представляет собой фенилаланин-аммиак-лиазу и m равняется 12,
- X представляет собой расбуриказу и m равняется 12,
- X представляет собой GAD-65 (SEQ ID NO: 2) и m равняется 8,
- X представляет собой IGRP (SEQ ID NO: 3) и m равняется 7,
- X представляет собой MBP (SEQ ID NO: 4) и m равняется 6,
- X представляет собой MOG (SEQ ID NO: 5) и m равняется 5,
- X представляет собой PLP (SEQ ID NO: 6) и m равняется 8,
- X представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO: 7) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO: 8) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO: 9) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO: 10) и m равняется 2,
- X представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO: 11) и m равняется 1,
- X представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO: 12) и m равняется 2,
- X представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO: 13) и m равняется 3,
- X представляет собой MART1 (SEQ ID NO: 14) и m равняется 4,
- X представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO: 15) и m равняется 8,
- X представляет собой PMEL (SEQ ID NO: 20) и m равняется 5,
- X представляет собой аквапорин-4 (SEQ ID NO: 21) и m равняется 4,
- X представляет собой S-аррестин (SEQ ID NO: 22) и m равняется 12,
- X представляет собой IRBP (SEQ ID NO: 19) и m равняется 21,
- X представляет собой конарахин и m равняется 21,
- X представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" нативный (SEQ ID NO: 20) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный (SEQ ID NO: 21) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO: 22) и m равняется 1,
- X представляет собой омега-глиадин (SEQ ID NO: 27) и m равняется 1,
- X представляет собой Fel d 1 и m равняется 4,
- X представляет собой кошачий альбумин и m равняется 16,
- X представляет собой Can f 1 и m равняется 6,
- представляет собой собачий альбумин и m равняется 23 и
- X представляет собой RhCE и m равняется 10.

16D. Другие соединения формулы 1n.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 16B, и заменяя соединения формулы 1202, например, теми, которые получены в примере 16C, получали следующие соответствующие соединения формулы 1m:

- F1n-абциксимаб-m<sub>10</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-адалимумаб-m<sub>11</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-агалсидаза-альфа-m<sub>14</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-агалсидаза beta-m<sub>14</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-альдеслейкин-m<sub>6</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-алглюкозидаза-альфа-m<sub>13</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-фактор VIII-m<sub>100</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-фактор IX-m<sub>18</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-L-аспарагиназа-m<sub>5</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-ларонидаза-m<sub>7</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-октреотид-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-фенил аланин-аммиак-лиаза-m<sub>12</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-расбуриказа-m<sub>12</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-GAD-65-m<sub>8</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,
- F1n-IGRP-m<sub>7</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,

Fl<sub>n</sub>-MBP-m<sub>6</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MOG-m<sub>5</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-PLP-m<sub>8</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP13-32-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP83-99-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP111-129-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP146-170-m<sub>2</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MOG1-20-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MOG35-55-m<sub>2</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-PLP139-154-m<sub>3</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-MART1-m<sub>4</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-тирозидаза-m<sub>8</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-PMEL-m<sub>5</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-аквапорин-4-m<sub>4</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-S-аррестин-m<sub>12</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-IRBP-m<sub>21</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-конарахин-m<sub>21</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-альфа-глиадин "33-мерный" нативный-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-омега-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-Fel d l-m<sub>4</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-кошачий альбумин-m<sub>16</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-Can f l-m<sub>6</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc,  
 Fl<sub>n</sub>-собачий альбумин-m<sub>23</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc и  
 Fl<sub>n</sub>-RhCE-m<sub>10</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc.

16E. Формула 1202, где n равняется 33 и X' и m такие же, как в примере 20C.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 16F, заменяя инсулин соединениями, описанными в примере 16C, и используя соединение формулы 1201, где n равняется 33, получали соответствующие соединения формулы 1202, где n равняется 33.

16F. Другие соединения формулы 1n.

Действуя согласно процедуре, описанной в примере 16B, и заменяя соединение формулы 1107 соединениями, полученными в примере 15J, и заменяя соединение формулы 1202 соединениями, полученными в примере 16E, получали следующие соответствующие соединения формулы 1n:

Fl<sub>n</sub>-абциксимаб-m<sub>10</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-адалимуаб-m<sub>10</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-агалсидаза-альфа-m<sub>14</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-агалсидаза бета-m<sub>14</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-альдеслейкин-m<sub>6</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-аглюкозидаза-альфа-m<sub>13</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-фактор VIII-m<sub>100</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-фактор IX-m<sub>18</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-L-аспарагиназа-m<sub>5</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-ларонидаза-m<sub>7</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-октреотид-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-фенилаланин-аммиак-лиаза-m<sub>12</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-расбуриказа-m<sub>12</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-GAD-65-m<sub>8</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-IGRP-m<sub>7</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP-m<sub>6</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MOG-m<sub>5</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-PLP-m<sub>8</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP13-32-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP83-99-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP111-129-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MBP146-170-m<sub>2</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MOG1-20-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MOG35-55-m<sub>2</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-PLP139-154-m<sub>3</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-MART1-m<sub>4</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-тирозидаза-m<sub>8</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fl<sub>n</sub>-PMEL-m<sub>5</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,

Fln-аквапорин-4-m<sub>4</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-S-аррестин-m<sub>12</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-IRBP-m<sub>21</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-конарахин-m<sub>21</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-альфа-глиадин "33-мерный" нативный-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-альфа-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-омега-глиадин-m<sub>1</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-Fel d l-m<sub>4</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-кошачий альбумин-m<sub>16</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-Can f l-m<sub>6</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH,  
 Fln-собачий альбумин-m<sub>23</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH и  
 Fln-RhCE-m<sub>10</sub>-n<sub>33</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH.  
 16G. Другие соединения формулы 1n.

Действуя согласно процедуре, описанной в примерах 16A-F, и заменяя галактозилированные компоненты на гликозилированные компоненты, получали соответствующие гликозилированные соединения формулы 1n.

Пример 17.

Формула 1507, где p равняется 90, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

17A. Формула 1502, где t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-Ацетил-D-глюкозамин (формула 1101, где R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH) (5,0 г, 22,6 ммоль), добавляли к перемешиваемому раствору (2-хлорэтокси)этан-1-ола (200 мл) при комнатной температуре. Раствор охлаждали до 4°C и в раствор по каплям добавляли ацетилхлорид. Температуру раствора доводили до комнатной температуры, а затем нагревали до 70°C. Через 4 ч реакционную смесь добавляли к 200 мл этилацетата. Образованный осадок охлаждали, добавляли к 100 мл этанола и перемешивали в присутствии углерода в течение 2 ч. Раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Соответствующий продукт формулы 1502, N-ацетил-D-глюкозамина-2-(хлорэтокси)этанол, применяли без дополнительной очистки.

17B. Формула 1503, где t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-Ацетил-D-глюкозамин-2-(хлорэтокси)этанол (2,0 г, 6,11 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору DMF (100 мл) и азида натрия (4,0 г, 61,5 ммоль). Раствор нагревали при температуре 90°C в течение 12 ч, а затем фильтровали. Остаточный растворитель удаляли при пониженном давлении и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (10% MeOH в дихлорметане) с получением соответствующего продукта формулы 1503, N-ацетил-D-глюкозамин-2-(азидоэтокси)этанола.

17C. Формула 1504, где t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-Ацетил-D-глюкозамина-2-(азидоэтокси)этанол (2,0 г, 5,9 ммоль) добавляли к раствору палладиевого катализатора на углеродном носителе и этанола (50 мл). Раствор перемешивали в атмосфере газообразного водорода (3 атм.) в течение 4 ч. Полученный раствор фильтровали и остаточный растворитель удаляли при пониженном давлении с получением соответствующего продукта формулы 1504, N-ацетил-D-глюкозамин-2-(аминоэтокси)этанола.

17D. Формула 1505, где t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.

N-Ацетил-D-глюкозамин-2-(аминоэтокси)этанол (1,0 г, 3,25 ммоль) добавляли к раствору ангидрида метакриловой кислоты (0,583 г, 3,78 ммоль) в DMF (50 мл). Затем в раствор добавляли триэтиламин и реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Через 2 ч избыток растворителя удаляли при пониженном давлении и соответствующий продукт формулы 1505, ((2S,3S,4S,5R,6S)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-2-(2-(2-метакриламиэтокси)этокси)тетрагидро-2H-пиран-3-ил)карбаминовую кислоту, выделяли с помощью флэш-хроматографии.

17E. Формула 1507, где p равняется 90, q равняется 4, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

Сосуд Шленка на 25 мл наполняли соединением формулы 1505, продуктом из примера 17D (272 мг, 0,72 ммоль), N-(2-гидроксипропил)метакриламидом ("HPMA", используемый в качестве полученного от производителя) (211 мг, 1,47 ммоль), азид-модифицированным средством uRAFT формулы 1106, где q равняется 4 и R<sup>8</sup> представляет собой CMP (10,41 мг, 0,0217 ммоль), азо-бис-(изобутиронитрил) (0,98 мг, 0,005 ммоль) и 1,2 мл диметилформамида. Реакционную смесь подвергали четырем циклам дегазации охлаждение-откачка-нагревание, а затем перемешивали при 70°C в течение 20 ч. Соответствующий продукт формулы 1507, представляющий собой статистический полимер, извлекали посредством осаждения реакционной смеси в ацетоне. Избыток ацетона удаляли при пониженном давлении с обеспечением продукта, представляющего собой статистический полимер, который применяли без дополнительной очистки.

17F. Формула 1507, где p равняется 90, q равняется 4, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил, с

применением N-ацетил-D-галактозамина.

Действуя согласно процедурам по примерам 17A-17E и заменяя N-ацетил-D-галактозамин на N-ацетил-D-глюкозамин в процедуре по примеру 17A, получали соответствующее галактозильное соединение формулы 1507.

17G. Соединения формулы 1507, где  $t$  не равняется 1.

Действуя согласно процедурам по примерам 17A-17E и заменяя 2-(2-хлорэтокс)этан-1-ол на:

2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этан-1-ол, из которого будут получать соответствующее соединение формулы 1507, где  $t$  равняется 2,

2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этан-1-ол, из которого будут получать соответствующее соединение формулы 1507, где  $t$  равняется 3,

2-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)этан-1-ол, из которого будут получать соответствующее соединение формулы 1507, где  $t$  равняется 4,

2-(2-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)этокс)этан-1-ол, из которого будут получать соответствующее соединение формулы 1507, где  $t$  равняется 5, и

2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)этокс)этокс)этокс)этокс)этан-1-ол, из которого будут получать соответствующее соединение формулы 1507, где  $t$  равняется 6.

17H. Соединения формулы 1507 с множеством групп  $W^1$ , где  $t$  варьирует.

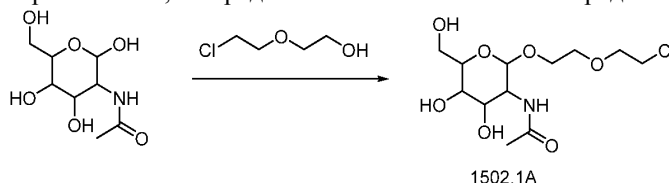
Действуя согласно процедурам по примеру 17E и заменяя соединение формулы 1505, где  $t$  равняется 1, на 0,36 ммоль каждого из формулы 1505, где  $t$  равняется 2 и 4 (полученного, например, как описано в примере 17F, действуя согласно процедурам, описанным в примере 17A-17D), получали соответствующий статистический сополимер формулы 1507 приблизительно с 15 группами  $W^1$ , где  $t$  равняется 2, 15 группами  $W^1$ , где  $t$  равняется 4, и 60 группами  $W^2$ .

17I. Соединения формулы 1507 со смесью гликозильных и галактозильных компонентов.

Действуя согласно процедуре по примеру 17E и заменяя соединение формулы 1505 на 0,36 ммоль каждого из гликозила и галактозила формулы 1505 (полученного, например, как описано в примере 17D и в примере 17F, действуя согласно процедурам, описанным в примере 17A-17D), получали соответствующий статистический сополимер формулы 1507 приблизительно с 15 гликозильными группами  $W^1$ , 15 галактозильными группами  $W^1$  и 60 группами  $W^2$ .

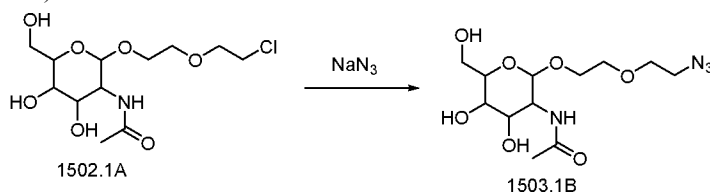
Пример 17.1.

Формула 1507, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH.



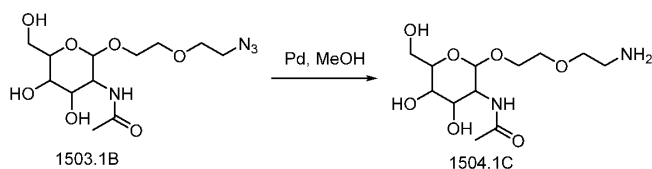
17.1A. Формула 1502, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH; 2-(2-(2-хлорэтокс)этокс)- $\alpha$ -NAc-галактозамин (1502.1A).

Ацетилхлорид (4,35 мл, 61,05 ммоль) по каплям добавляли в ледяной раствор NHAc, защищенный D-галактозаминном (10,0 г) в 2-(2'-хлорэтокс)этанол (40 мл). Смесь перемешивали в течение 15 мин при 4°C, а затем переносили на масляную баню при 70°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться под охлаждающим конденсатором в течение 4 ч. Через указанное время темно-коричневый раствор охлаждали и вливали в 400 мл раствора этилацетата и дихлорметана (3:1, объем/объем) для того, чтобы избавиться от избытка непрореагировавшего хлорэтанола. Смесь помещали в морозилку на 30 мин, а затем сливали из темно-коричневого вязкого осадка. Осадок растворяли в безводном этаноле и добавляли активированный уголь. Суспензию перемешивали в течение 1,5 ч, а затем отфильтровывали через целит и промывали этанолом. На последней схеме этанол выпаривали под вакуумом с получением 12,8 г продукта (1502.1A) (выход 95,24%).



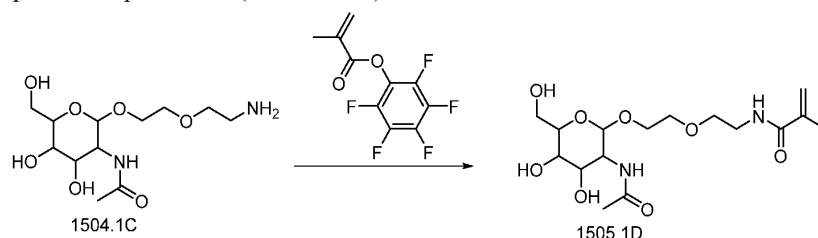
17.1B. Формула 1503, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH; 2-(2-(2-азидэтокс)этокс)- $\alpha$ -NAc-галактозамин (1503.1B).

Соединение (1502.1A) (5,0 г) растворяли в 20 мл N,N-диметилформамида. К данному раствору добавляли азид натрия (26628-22-8) (5,0 г). Суспензию помещали на масляную баню и перемешивали в течение ночи при 80°C. Спустя ночь реакционную смесь отфильтровывали через целит. Затем растворитель выпаривали под высоким давлением с получением маслянистого коричневого вещества. Конечный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (выход 82,2%).



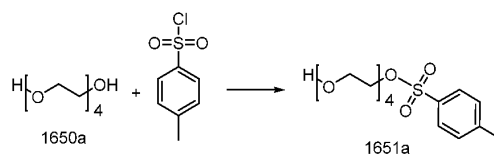
17.1C. Формула 1504, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH; 2-(2-(2-аминоэтокс)этокс)- $\alpha$ -NAc-галактозамин (1504.1C).

Суспензию (1503.1B) (5,5 г) и 10% палладиевого катализатора на углеродном носителе (са. 500 мг) в 20 мл этанола гидрировали в колбе Шленка при исходном давлении, составляющем 2 бар газообразного водорода. Процесс восстановления контролировали с помощью TLC. Через 3 ч реакцию завершали и суспензию фильтровали через целит (выход 78%).



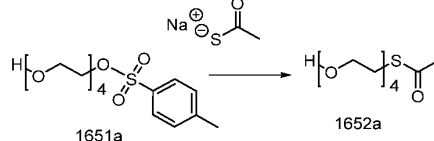
17.1D. Формула 1505, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH;  $\alpha$ -NAc-галактозамин-амин-метакрилат (1505.1D).

Соединение (1504.1C) (4,5 г) растворяли в 10 мл N,N-диметилформамида. К данному раствору добавляли триэтиламин (3 мл) и смесь охлаждали до 4°C. Впоследствии по каплям добавляли пентафтор-фенилметакрилат (13642-97-2) (4,38 мл) при постоянном перемешивании. Через 30 мин убирали ледяную баню и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре в течение следующих 4 ч. Затем растворитель выпаривали и остаток адсорбировали на силикагель. Очистка неочищенного материала с применением флэш-хроматографии (дихлорметан:метанол 95:5, объем/объем) обеспечивает 3,8 г мономера NAc-галактозамина ( $\alpha$ -NAc-галактозамин-амин-метакрилат (1505.1D)) (выход 64,73%).



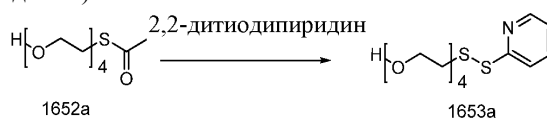
Моно- $p$ -толуолсульфонат тетраэтиленгликоля (1651a).

Тетраэтиленгликоль (1650a) (112-60-7) (2,5 г) и пиридин (1,0 г) добавляли к 50 мл дихлорметана и перемешивали в течение 20 мин при 0°C. К данному раствору медленно добавляли  $p$ -толуолсульфонилхлорид (98-59-9) (2,37) в 15 мл дихлорметана. Реакционную смесь затем перемешивали в течение 2 ч при 0°C с последующими 4 ч при комнатной температуре. Через указанное время растворитель выпаривали и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии (этилацетат:гексан 6:4, объем/объем) с получением 1651a (выход 44%).



S-[2-[2-[2-(2-Гидроксиэтокс)этокс]этокс]этил]эфир (1652a).

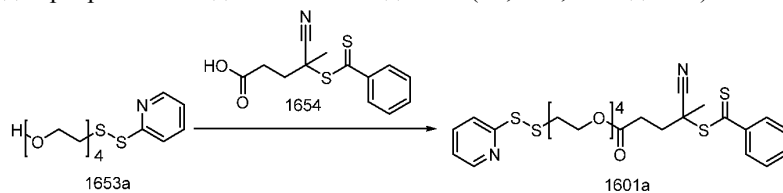
К суспензии тиацетата калия (10387-40-3) (10,1 г, 88 ммоль) в 650 мл DMF добавляли раствор (1651a) (15,4 г) в 100 мл DMF. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем при 90°C в течение 4 ч. После фильтрации растворитель выпаривали при пониженном давлении. Остаток растворяли в этилацетате (150 мл) и промывали водой (2×50 мл) и соевым раствором (2×50 мл). Отмывающий водный раствор переэкстрагировали этилацетатом (2×50 мл) и объединенные органические слои промывали над сульфатом магния и выпаривали при пониженном давлении с получением желтого масляного продукта 1652a (выход 45%).



2-(2-(2-(2-(Пиридин-2-илдисульфанил)этокс)этокс)этокс)этан-1-ол (1653a).

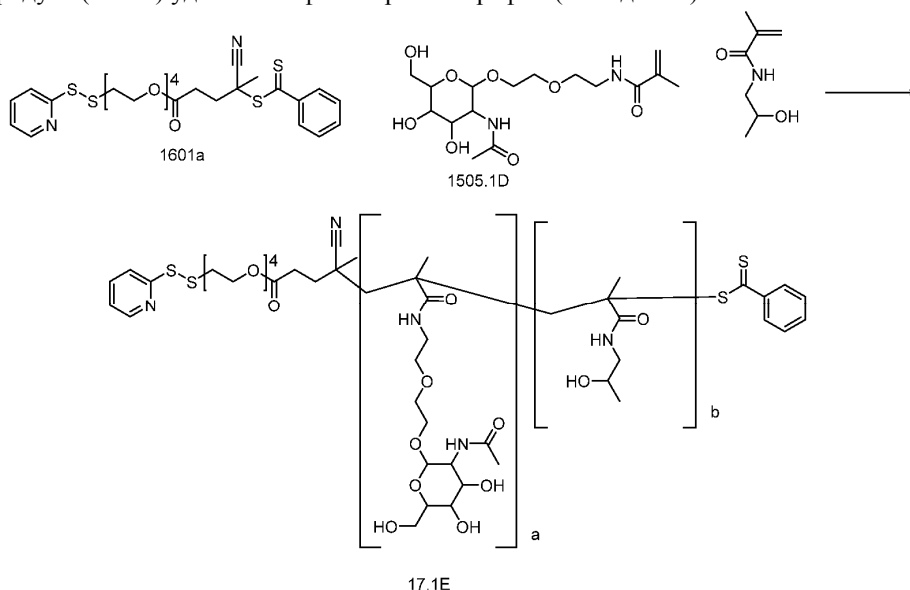
Метоксид натрия (1,40 мл 0,5M в метаноле) по каплям добавляли к перемешиваемому раствору (1652a) (70,9 мг) и 2,2-дителидиопиридина (2127-03-9) (77,4 мг, 0,351 ммоль) в безводном метаноле (3 мл) в

атмосфере аргона. Через 2 ч реакционную смесь концентрировали на силикагеле до порошка и неочищенный продукт очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (1:1 гексаны:EtOAc) с получением 1653a в виде прозрачной бледно-желтой жидкости (26,3 мг, выход 44%).



Средство uRAFT (1601a).

Соединение 1653a (1 г) по каплям добавляли к перемешиваемому раствору 4-циано-4-(тиобензоилтио)пентановой кислоты (1,1 г) (201611-92-9), N-дициклогексилкарбодиимида (538-75-0) (0,5 г) и 4-диметиламинопиридина (DMAP) (1122-58-3) (0,1 г) в DCM (15 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем оставляли нагреваться до комнатной температуры. Через 3 ч реакционную смесь фильтровали через целит и с помощью пониженного давления удаляли растворитель. Конечный продукт (1601a) удаляли из флэш-хроматографии (выход 67%).



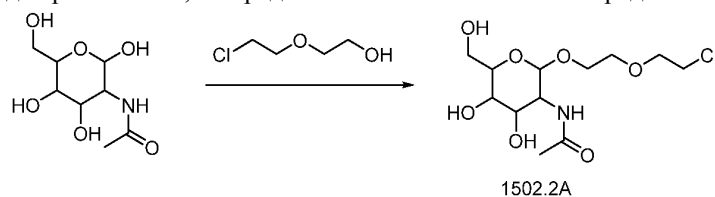
pGal (17.1E).

Следующие условия выполняли с применением мономера  $\alpha$ -NAc-галактозамин-амин-метакрилата (например, 1505.1D) с получением 17.1E. В некоторых вариантах осуществления мономер  $\alpha$ -NAc-глюкозамин-амин-метакрилата (например, 1505.2D) может применяться вместо получения полимера на основе глюкозамина. В некоторых вариантах осуществления а равняется от приблизительно 0 до приблизительно 150, от приблизительно 1 до приблизительно 100, от приблизительно 1 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 10 или от приблизительно 1 до приблизительно 5. В некоторых вариантах осуществления b равняется от приблизительно 0 до приблизительно 150, от приблизительно 1 до приблизительно 100, от приблизительно 1 до приблизительно 50, от приблизительно 1 до приблизительно 10 или от приблизительно 1 до приблизительно 5.

Соединение 1601a, 1505.1D, азо-бис-изобутиронитрил (78-67-1) и N-(2-гидроксипропил)-метакриламид (21442-01-3) добавляли в DMF (1 мл). Реакционную смесь подвергли 4 циклам дегазации охлаждение-откачка-нагревание перед перемешиванием в течение 20 ч при 70°C. Полимерный продукт удаляли с помощью осаждения из ацетона. Избыток растворителя удаляли при пониженном давлении (выход 55%).

Пример 17.2.

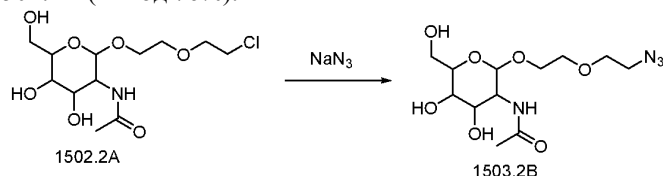
Формула 1507, где t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH.



17.2A. Формула 1502, где t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc и R<sup>4</sup> представляет собой OH; 2-(2-(2-хлорэтокс)этокси)- $\alpha$ -NAc-глюкозамин (1502.2A).

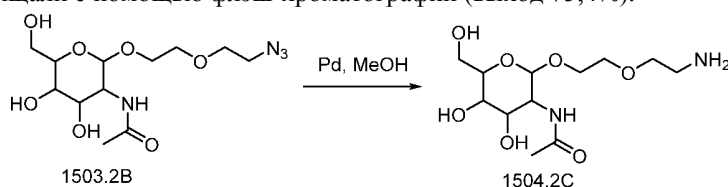


Ацетилхлорид (75-36-5) (4,35 мл, 61,05 ммоль) по каплям добавляли в ледяной раствор D-глюкозамина (7512-17-6) (10,0 г) в 2-(2'-хлорэтокси)этанол (628-89-7) (40 мл). Смесь перемешивали в течение 15 мин при 4°C, а затем переносили на масляную баню при 70°C. Реакционную смесь оставляли перемешиваться под охлаждающим конденсатором в течение 4 ч. Через указанное время темно-коричневый раствор охлаждали и вливали в 400 мл раствора этилацетата и дихлорметана (3:1, объем/объем) для того, чтобы избавиться от избытка непрореагировавшего хлорэтанола. Смесь помещали в морозилку на 30 мин, а затем сливали из темно-коричневого вязкого осадка. Осадок растворяли в безводном этаноле и добавляли активированный уголь. Суспензию перемешивали в течение 1,5 ч, а затем отфильтровывали через целит и промывали этанолом. На последней схеме этанол выпаривали под вакуумом с получением 1502.2A (выход 76%).



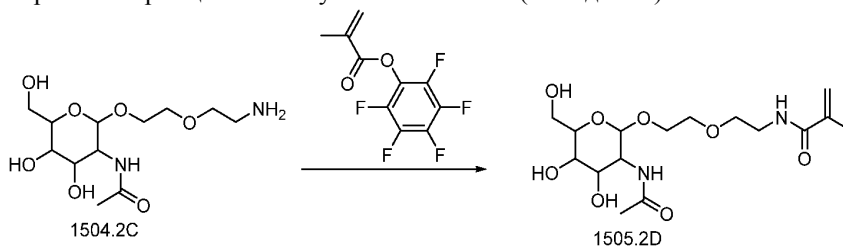
17.2B. Формула 1503, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH; 2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)- $\alpha$ -NAc-глюкозамин (1503.2B).

Соединение (1502.2A) (5,0 г) растворяли в 20 мл N,N-диметилформамида. К данному раствору добавляли азид натрия (26628-22-8) (5,0 г). Суспензию помещали на масляную баню и перемешивали в течение ночи при 80°C. Спустя ночь реакционную смесь отфильтровывали через целит. Затем растворитель выпаривали под высоким давлением с получением маслянистого коричневого вещества. Конечный продукт 1503.2B очищали с помощью флэш-хроматографии (выход 75,4%).



17.2C. Формула 1504, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH; 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)- $\alpha$ -NAc-глюкозамин (1504.2C).

Суспензию (1503.2B) (5,5 г) и 10% палладиевого катализатора на углеродном носителе (са. 500 мг) в 20 мл этанола гидрировали в колбе Шленка при исходном давлении, составляющем 2 бар газообразного водорода. Процесс восстановления контролировали с помощью TLC. Через 3 ч реакцию завершали и суспензию фильтровали через целит с получением 1504.2C (выход 65%).



17.2D. Формула 1505, где  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc и  $R^4$  представляет собой OH;  $\alpha$ -NAc-глюкозамин-амин-метакрилат (1505.2D).

Соединение 1504.2C (4,5 г) растворяли в 10 мл N,N-диметилформамида. К данному раствору добавляли триэтиламин (3 мл) и смесь охлаждали до 4°C. Впоследствии по каплям добавляли пентафторфенилметакрилат (13642-97-2) (4,38 мл) при постоянном перемешивании. Через 30 мин убирали ледяную баню и обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре в течение следующих 4 ч. Затем растворитель выпаривали и остаток адсорбировали на силикагель. Очистка неочищенного материала с применением флэш-хроматографии (дихлорметан:метанол 95:5, объем/объем) обеспечивает 3,8 г мономера NAc-глюкозамина 1505.2D (выход 74%).

Пример 18.

Формула 1m', где  $X'$  представляет собой OVA,  $m$  равняется 1-3,  $n$  равняется 79,  $p$  равняется 90 ( $30 W^1 + 60 W^2$ ),  $q$  равняется 4,  $t$  равняется 1,  $R^3$  представляет собой NHAc,  $R^4$  представляет собой OH,  $R^8$  представляет собой CMP и  $R^{10}$  представляет собой 2-гидроксипропил.

18A. Формула 1109, где  $X'$  представляет собой OVA,  $m$  равняется 1-3 и  $n$  равняется 79.

Раствор формулы 101', где  $X'$  представляет собой OVA (10 мг не содержащего эндотоксинов овальбумина) в PBS с pH 7,6, добавляли к соединению формулы 1108, где  $n$  представляет собой 79 (10 мг), в не содержащую эндотоксинов пробирку. Обеспечивали перемешивание реакционной смеси при комнатной температуре. Через 1 ч любое неконъюгированное соединение формулы 1108 удаляли с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии с получением соответствующего продукта формулы 1109,

который использовали без дополнительной очистки.

18B. Формула 1m', где X' представляет собой OVA, m равняется 1-3, n равняется 79, p равняется 90, q равняется 4, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

Раствор формулы 1109, полученный в примере 18A, затем добавляли к соединению формулы 1507, полученному в примере 17E (20 мг), в не содержащую эндотоксинов пробирку и перемешивали при комнатной температуре с получением соответствующего продукта формулы 1m' ("F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>"), который очищали от реакционной смеси с помощью быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) с применением подготовительной колонки Superdex 200, используемой без дополнительной очистки.

18C. Формула 1m', где X' представляет собой OVA, m равняется 1-3, n равняется 79, p равняется 90, q равняется 4, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил, с применением N-ацетил-D-галактозамина.

Действуя согласно процедурам по примеру 18B и заменяя галактозильное соединение формулы 1507, полученное в примере 17F, получали соответствующее галактозильное соединение формулы 1m' ("F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>").

18D. Другие соединения формулы 1m', где X' представляет собой OVA, m равняется 1-3, n равняется 79, p равняется 90, q равняется 4, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 18A, 18B и 18C, и заменяя OVA следующим:

абциксимабом,  
адалимумабом,  
агалсидазой-альфа,  
агалсидазой-бета,  
альдеслейкином,  
алглюкозидазой-альфа,  
фактором VIII,  
фактором IX,  
L-аспарагиназой,  
ларонидазой,  
октреотидом,  
фенилаланин аммиак-лиазой,  
расбуриказой,  
GAD-65 (SEQ ID NO: 2),  
IGRP (SEQ ID NO: 3)  
MBP (SEQ ID NO: 4),  
MOG (SEQ ID NO: 5),  
PLP (SEQ ID NO: 6),  
MBP13-32 (SEQ ID NO: 7),  
MBP83-99 (SEQ ID NO: 8),  
MBP111-129 (SEQ ID NO: 9),  
MBP146-170 (SEQ ID NO: 10),  
MOG1-20 (SEQ ID NO: 11),  
MOG35-55 (SEQ ID NO: 12),  
PLP139-154 (SEQ ID NO: 13),  
MART1 (SEQ ID NO: 14),  
тирозидазой (SEQ ID NO: 15),  
PMEL (SEQ ID NO: 16),  
аквапорином-4 (SEQ ID NO: 17),  
S-аррестинном (SEQ ID NO: 18),  
IRBP (SEQ ID NO: 19),  
конарахином (UNIPROT Q6PSU6),  
альфа-глиадином "33-мерным" нативным (SEQ ID NO: 20),  
альфа-глиадином "33-мерным" деамидированным (SEQ ID NO: 21),  
альфа-глиадином (SEQ ID NO: 22),  
омега-глиадином (SEQ ID NO: 23),  
Fel d 1A (UNIPROT P30438),  
кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),  
Can f 1 (UNIPROT 018873),  
собачьим альбумином (UNIPROT P49822) и  
RhCE (UNIPROT P18577),

получали следующие соответствующие гликозильные и галактозильные соединения формулы 1m':

- X' представляет собой абциксимаб и m равняется 10,
- X' представляет собой адалимумаб и m равняется 11,
- X' представляет собой агалсидазу-альфа и m равняется 14,
- X' представляет собой агалсидазу-бета и m равняется 14,
- X' представляет собой альдеслейкин и m равняется 6,
- X' представляет собой алглюкозидазу-альфа и m равняется 13,
- X' представляет собой фактор VIII и m равняется 100,
- X' представляет собой фактор IX и m равняется 18,
- X' представляет собой L-аспарагиназу и m равняется 5,
- X' представляет собой ларонидазу и m равняется 7,
- X' представляет собой октреотид и m равняется 1,
- X' представляет собой фенилаланин-аммиак-лиазу и m равняется 12,
- X' представляет собой расбуриказу и m равняется 12,
- X' представляет собой GAD-65 (SEQ ID NO: 2) и m равняется 8,
- X' представляет собой IGRP (SEQ ID NO: 3) и m равняется 7,
- X' представляет собой MBP (SEQ ID NO: 4) и m равняется 6,
- X' представляет собой MOG (SEQ ID NO: 5) и m равняется 5,
- X' представляет собой PLP (SEQ ID NO: 6) и m равняется 8,
- X' представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO: 7) и m равняется 1,
- X' представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO: 8) и m равняется 1,
- X' представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO: 9) и m равняется 1,
- X' представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO: 10) и m равняется 2,
- X' представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO: 11) и m равняется 1,
- X' представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO: 12) и m равняется 2,
- X' представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO: 13) и m равняется 3,
- X' представляет собой MART1 (SEQ ID NO: 14) и m равняется 4,
- X' представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO: 15) и m равняется 8,
- X' представляет собой PMEL (SEQ ID NO: 16) и m равняется 5,
- X' представляет собой аквапорин-4 (SEQ ID NO: 17) и m равняется 4,
- X' представляет собой S-аррестин (SEQ ID NO: 18) и m равняется 12,
- X' представляет собой IRBP (SEQ ID NO: 19) и m равняется 21,
- X' представляет собой конарахин и m равняется 21,
- X' представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" нативный (SEQ ID NO: 20) и m равняется 1,
- X' представляет собой альфа-глиадин "33-мерный" деамидированный (SEQ ID NO: 21) и m равняется 1,
- X' представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO: 22) и m равняется 1,
- X' представляет собой омега-глиадин (SEQ ID NO: 23) и m равняется 1,
- X' представляет собой Fel d 1 и m равняется 4,
- X' представляет собой кошачий альбумин и m равняется 16,
- X' представляет собой Can f 1 и m равняется 6,
- X' представляет собой собачий альбумин и m равняется 23 и
- X' представляет собой RhCE и m равняется 10.

18E. Соединения формул 1h', 1i', 1j', 1k', 1L' и 1n'.

Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 18B, 18C и 18D, и заменяя соединение формулы 1109 следующим:

соединением формулы 802, из которого будут получать соответствующие статистические сополимеры формулы 1h',

соединением формулы 902, из которого будут получать соответствующие статистические сополимеры формулы 1i',

соединением формулы 902, полученным с соединением формулы 103', из которых будут получать соответствующие статистические сополимеры формулы 1j',

соединением формулы 1002, из которого будут получать соответствующие статистические сополимеры формулы 1k',

соединением формулы 1002, полученным с соединением формулы 103', из которых будут получать соответствующие статистические сополимеры формулы 1L', и

соединением формулы 1202, из которого будут получать соответствующие статистические сополимеры формулы 1n'.

18F. Другие соединения формул 1h', 1i', 1j', 1k', 1L' и 1n'.

Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 18B, 18C, 18D и 18E, и заменяя соединение формулы 1507 на соединения, полученные как описано в примерах 17G, 17H и 17I, получали соответствующие соединения формул 1h', 1i', 1j', 1k', 1L', 1m' и 1n', где t не равняется 1, с множеством групп t и со смесью гликозильных и галактозильных компонентов.

Пример 19.

Формула 1с', где X" представляет собой инсулин-В, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 90 ( $30 W^1 + 60 W^2$ ), t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил

19А. Формула 1602, где n равняется 4, p равняется 90, t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

Сосуд Шленка на 25 мл наполняли ((2S,3S,4S,5R,6S)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-2-(2-(2-метакриламидэтокси)этокси)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)карбаминовой кислотой (272 мг, 0,72 ммоль) (формула 1505, полученная, например, как описано в примере 17D), HPMA (211 мг, 1,47 ммоль) (формула 1506), дигидропиридилом функционирующего средства uRAFT формулы 1601, где n равняется 4 и R<sup>8</sup> представляет собой CMP (12,5 мг, 0,0217 ммоль), азо-бис-(изобутиронитрилом) (0,98 мг, 0,005 ммоль) и 1,2 мл диметилформамида. Реакционную смесь подвергали четырем циклам дегазации охлаждение-откачка-нагревание, а затем перемешивали при 70°C в течение 20 ч. Соответствующий продукт формулы 1602, представляющий собой статистический полимер (приблизительно с 30 группами W<sup>1</sup> и приблизительно 60 группами W<sup>2</sup>) выделяли посредством осаждения реакционной смеси в ацетоне. Избыток ацетона удаляли при пониженном давлении с обеспечением продукта, представляющего собой статистический полимер, который применяли без дополнительной очистки.

19В. Формула 1с', где X" представляет собой инсулин-В, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 90 ( $30 W^1 + 60 W^2$ ), t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

Раствор формулы 1602, полученный в примере 19А (20 мг), суспендировали в 200 мкл диметилформамида и добавляли в не содержащую эндотоксинов пробирку, содержащую инсулин-В (1 мг), и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч с получением соответствующего продукта формулы 1с' ("F1c'-инсулин-В-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>"). Затем реакционную смесь осаждали в ацетоне и очищали от реакционной смеси с помощью быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) с применением подготовительной колонки Superdex 200, используемой без дополнительной очистки.

19С. Формула 1с', где X" представляет собой инсулин-В, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 90 ( $30 W^1 + 60 W^2$ ), t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил, с применением N-ацетил-D-галактозамина.

Действуя согласно процедурам по примерам 19А и 19В и заменяя ((2S,3S,4S,5S,6S)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)-2-(2-(2-метакриламидэтокси)этокси)тетрагидро-2Н-пиран-3-ил)карбаминовую кислоту на соединение формулы 1505, получали соответствующее галактозильное соединение формулы 1с' ("F1c'-инсулин-В-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>").

19D. Формула 1с', где X" представляет собой P31, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 90 ( $30 W^1 + 60 W^2$ ), t равняется 1, R<sup>3</sup> представляет собой NHAc, R<sup>4</sup> представляет собой OH, R<sup>8</sup> представляет собой CMP и R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил

Действуя согласно процедурам по примерам 19В и 19С и заменяя 20 мг P31 на инсулин-В, получали соответствующие гликозильные и галактозильные соединения формулы 1с', где X" представляет собой P31.

19Е. Соединения формулы 1f' и 1g'.

Действуя согласно процедурам по примерам 19А и 19В и заменяя средство uRAFT формулы 1601 на средство uRAFT формул 600' или 700', получали соответствующие соединения формул 601' или 701', которые, в свою очередь, приводят в контакт с соединением формулы 101' с получением соответствующего соединения формулы 1f' или формулы 1g', соответственно.

Пример 20.

Модель от стимуляции ОТ-1 до развития толерантности 20А.

Как рассматривалось выше в примере 14, F1aA-OVA-m<sub>4</sub>-n<sub>8</sub> и F1b-OVA-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub> ослабляли OVA-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью OVA с адьювантом.

20В. Всего в мышей-реципиентов CD45.1<sup>+</sup> вводили  $3 \times 10^5$  CFSE-меченных ОТI CD8<sup>+</sup> Т-клеток и  $3 \times 10^5$  CFSE-меченных ОТII CD4<sup>+</sup> Т-клеток. В дни 1 и 6 после адаптивного переноса мышам i.v. вводили физиологический раствор, содержащий OVA, F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal-HPMA)"], F1m'-OVA-m<sub>1.3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu-HPMA)"] или только физиологический раствор. Каждая мышь, обработанная составом, содержащим OVA в своей свободной или конъюгированной форме, получала молярный эквивалент 20 мкг OVA. На 15 день после адаптивного переноса мышей подвергали стимуляции с помощью 5 мкг OVA и 25 нг сверхчистой LPS E. coli (InvivoGen) в 25 мкл физиологического раствора, введенных внутрикожно в каждую подушечку задних лап (способ Хока: общая доза, составляющая 10 мкг OVA и 50 нг LPS). Мышей умерщвляли через 4 дня после стимуляции и выделяли селезенку и клетки дренирующих лимфатических узлов для повторной стимуляции. В случае анализа внутриклеточных цитокинов 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 брефелдин-A (5 мкг/мл; Sigma) и возобновляли повторную стимуляцию в течение дополнительных 3 ч перед окрашиванием и анализом с помощью проточной цитометрии.

Как показано на фиг. 8А-В, введение OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA) приводило к значительному снижению процентной доли ОТ-I клеток (из всей популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток) и ОТ-II клеток (из всей популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток). На фиг. 8А показано, что введение OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA) значительно снижает количество ОТ-I клеток по сравнению с мышами, получающими повторное введение OVA отдельно (например, неконъюгированного). Снижение было еще большим при сравнении с мышами, получающими стимуляцию только OVA и LPS (например, получавшими инъекции физиологического раствора). Примечательно, что снижение, полученное при обработке с помощью OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA), снижает уровни ОТ-I клеток до уровней, значительно не отличающихся от таковых у мышей без обработки. Аналогично, как показано на фиг. 8В, введение OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA) приводит к значительному снижению количества ОТ-II клеток по сравнению с мышами, получающими неконъюгированный OVA или только стимуляцию. Эти данные указывают на то, что получение клеток, которые специально создавались для осуществления реакций при столкновении с OVA в качестве антигена, уменьшается, что свидетельствует о снижении иммунного ответа на OVA.

Кроме того, введение OVA-p(Gal-HPMA) и OVA-p(Glu-HPMA) приводит к значительному повышению антигенспецифичных регуляторных Т-клеток в лимфатическом узле и селезенке мышей. Как показано на фиг. 9А, обработка с помощью любого из этих конъюгатов индуцирует значительное повышение CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> клеток в лимфатическом узле. Подобным образом, на фиг. 9В показано значительное повышение (в сравнении с животными без обработки, со стимуляцией (только физиологическим раствором) и обработанными OVA животными) в CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup> ОТ-II клетках. Эти данные указывают на то, что активируется получение регуляторных Т-клеток, что, в свою очередь, указывает на то, что иммунная система подвергается отрицательной модуляции в соответствии с ее ответом на OVA (например, менее отзывчива или более толерантна).

Дальнейшее построение вышеуказанных данных, демонстрирующих повышенную толерантность к антигену после доставки этого комплекса антигена с фрагментом, нацеленным на печень, представляет собой данные, показанные на фиг. 10. В данном эксперименте измеряли процентную долю клеток, экспрессирующих интерферон гамма (IFN $\gamma$ ). IFN $\gamma$  получали с применением CD4 и CD8 Т-клеток после развития антигенспецифичного иммунитета. Как показано на фиг. 10, мыши, получающие предварительную обработку только физиологическим раствором, имеют приблизительно 60% от всех ОТ-I-клеток, экспрессирующих IFN $\gamma$ . В отличие от этого, мыши, обработанные OVA, имеют приблизительно 40% клеток, экспрессирующих IFN $\gamma$ . Почти так же, как мыши без обработки, ОТ-I-клетки OVA-p(Gal-HPMA) и мыши, обработанные с помощью OVA-p(Glu-HPMA), имели менее чем 20% клеток, положительных по IFN $\gamma$ . Такое значимое снижение уровня IFN $\gamma$  указывает на снижение в механизмах, которые управляют антигенспецифичным иммунитетом. В общей сложности и с учетом дополнительного изобретения в данном документе эти данные демонстрируют, что адресная доставка антигена в печень может снижать антигенспецифичный иммунный ответ на данный антиген. В частности, адресная доставка глюкозы или галактозы приводит к значительной изменчивости клеточных популяций, отвечающих на антигенспецифичный иммунитет, изменчивость которых демонстрирует толерантность в отношении конкретного антигена.

20С. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 20А или 20В, и заменяя тестируемые композиции OVA на другие композиции формулы 1 с последующей стимуляцией неконъюгированным антигеном X, обработанные животные проявляли толерантность в отношении конкретного антигена X.

Пример 21.

Воздействие QTI/QTII на модель толерантности.

С применением модели по примеру 20, в дополнение к QTII-клеткам (которые являются CD4<sup>+</sup> Т-клетками от мышей CD45.2<sup>+</sup>, аналогичными CD8<sup>+</sup> Т-клетке QTII-клеток), определяли способность F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-p<sub>79</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub> ["OVA-p(Gal-HPMA)"] и F1m'-OVA-m<sub>1-3</sub>-p<sub>79</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub> ["OVA-p(Glu-HPMA)"] индуцировать регуляторные ответы и предотвращать последующие реакции на антигенное воздействие, опосредованное вакциной, кроме того, с применением различных схем приема. 3×10<sup>5</sup> клеток QTII, меченных CFSE, и 3×10<sup>5</sup> клеток QTII, меченных CFSE, подвергали адаптивному переносу в мышей CD45.1<sup>+</sup> (n=8 мышей на группу) в день 0. В дни 1, 4 и 7 вводили толерогенные дозы или контрольные дозы. В одной схеме приема лекарств OVA предусмотрен в дозе, составляющей 2,5 мкг в день 1; 2,5 мкг в день 4 и 16 мкг в день 7. В другой OVA предусмотрен в дозе, составляющей 7 мкг в день 1; 7 мкг в день 4 и 7 мкг в день 7, для такой же общей дозы. Подобным образом каждую из pGal-OVA и pGlu-OVA вводили в разные группы при таких же дозировках, составляющих 2,5 мкг в день 1; 2,5 мкг в день 4 и 16 мкг в день 7 или 7 мкг в день 1; 7 мкг в день 4 и 7 мкг в день 7, при этом все дозы основаны на эквивалентной дозе OVA. В конечной группе физиологический раствор вводили в те же дни. Затем в день 14 мышам-реципиентам подвергали стимуляции с помощью OVA (10 мкг) с адъювантом липополисахаридом (50 нг)

путем внутрикожной инъекции. Определение характеристик дренирующих лимфатических узлов осуществляли в день 19 с обеспечением возможности определения, действительно ли имела место делеция или нет, и действительно ли регуляторные Т-клетки подвергались индукции адаптивно перенесенных клеток.

Выраженную толерантность индуцировали в компартменте CD4<sup>+</sup> Т-клеток, как показано на фиг. 11А, 11В. С точки зрения общей частоты клеток обе схемы приема как OVA-p(Gal-HPMA), так и OVA-p(Glu-HPMA) приводили к эквивалентно низким уровням OTII-клеток после воздействия, статистически более низким по сравнению с обработкой посредством OVA (\* и # обозначают  $p < 0,05$ , \*\* и ## обозначают  $p < 0,01$ ), как показано на фиг. 11А. Когда оставшиеся клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на присутствие фактора транскрипции FoxP3 и рецептора CD25, статистически значимо повышалось количество клеток FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (маркеры регуляторных Т-клеток) по сравнению с обработкой только с помощью OVA, как показано на фиг. 11В. В данном случае количество регуляторных Т-клеток было статистически выше при схеме приема 2,5 мкг/2,5 мкг/16 мкг по сравнению со схемой приема 7 мкг/7 мкг/7 мкг, при обработке как с помощью OVA-p(Gal-HPMA), так и с помощью OVA-p(Glu-HPMA).

Выраженную толерантность также индуцировали в компартменте CD8<sup>+</sup> Т-клеток, как показано на фиг. 12А, В. С точки зрения общей частоты клеток, обе схемы приема как OVA-p(Gal-HPMA), так и OVA-p(Glu-HPMA) приводили к эквивалентно низким уровням OTI-клеток после воздействия, статистически более низким по сравнению с обработкой посредством OVA (\* и # обозначают  $p < 0,05$ , \*\* и ## обозначают  $p < 0,01$ ), как показано на фиг. 12А. Когда оставшиеся клетки анализировали с помощью проточной цитометрии в отношении экспрессии IFN- $\gamma$  после повторного воздействия антигеном OVA, частота клеток, экспрессирующих данный воспалительный цитокин, повышалась в группах, получающих схему приема 2,5 мкг/2,5 мкг/16 мкг, по сравнению со схемой приема 7 мкг/7 мкг/7 мкг при обработке с помощью как OVA-p(Gal-HPMA), так и OVA-p(Glu-HPMA), как показано на фиг. 12В.

Пример 22.

Исследование BDC2.5.

22А. CD4<sup>+</sup> Т-клетки трансгенных мышей NOD-BDC2.5 экспрессировали диабетогенный BDC-2.5-специфичный регуляторный Т-клеточный рецептор (TCR). Т-клетки BDC2.5 служат для специфичной адресной доставки аутоантигена бета-клеток островков, хромогранина-А. Т-клетки выделяли из селезенки трансгенных мышей NOD-BDC2.5 и культивировали в течение 4 дней в DMEM, дополненной 10% (объем/объем) FBS, 0,05 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 1% пуромидина/стрептомицина и 0,5 мкМ пептида P31, мимеотоп аутоантигена бета-клеток островков, хромогранина-А, который стимулирует Т-клетки, экспрессирующие Т-клеточный рецептор BDC2.5. После стимуляции посредством P31 клетки промывали с помощью основного DMEM и анализировали в отношении чистоты с помощью проточной цитометрии, и  $5 \times 10^6$  Т-клеток вводили i.v. нормогликемическим мышам NOD/ShiLtJ. В 8 ч и через 3 дня адаптивного переноса мышам i.v. вводили физиологический раствор, 10 мкг Flc'-P31-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), 10 мкг Flc'-P31-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) или эквивалентную дозу пептида P31. Начиная с 4 дня контролировали возникновение заболевания путем измерения уровня глюкозы в крови натощак с применением глюкометра AccuCheck Aviva (Roche). Считалось, что у мышей есть диабет при показателе уровня глюкозы в крови, равном  $\geq 300$  мг/дл. После определения двух гипергликемических показателей мышей умерщвляли. Данные, полученные в этом эксперименте, показаны во временном интервале на фиг. 13. Показано, что у мышей, получающих физиологический раствор, развивался диабетический уровень глюкозы в крови в течение 4-8 дней после адаптивного переноса. Аналогично у мышей, получающих P31 (неконъюгированный), развивался диабетический уровень глюкозы в крови в течение приблизительно 7-10 дней после переноса. С большой разницей у мышей, получающих Flc'-P31-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) или Flc'-P31-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), сохранялись относительно стабильные значения глюкозы в крови ( $< 200$  мг/дл) в течение 40 дней.

22В. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 21А, и заменяя тестируемые композиции на другие композиции формулы 1, где X представляет собой инсулин-В или проинсулин, препроинсулин, глутаматдекарбоксилазу-65 (GAD-65 или глутаматдекарбоксилазу-2), GAD-67, глюкозо-6-фосфатазу 2 (IGRP или белок, родственный каталитической субъединице островков-специфичной глюкозо-6-фосфатазы), ассоциированный с инсулиновой белок 2 (IA-2) и ассоциированный с инсулиновой белок 2 $\beta$  (IA-2 $\beta$ ), ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазу Н, имоген 38, GLIMA 38, хромогранин-А, HSP-60, карбоксипептидазу Е, периферии, переносчик глюкозы 2, ассоциированный с гепатокарциномой-кишечником-поджелудочной железой/панкреатический белок, S100, фибриллярный кислый белок глии, регенерирующий ген II, панкреатический дуоденальный гомеобокс 1, протеинкиназу миотонической дистрофии, белок, родственный каталитической субъединице островков-специфичной глюкозо-6-фосфатазы, и SST рецепторы 1-5, сопряженные с G-белком, такие как FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>12</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>33</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>40</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>43</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>50</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>60</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>75</sub>, FlaA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>84</sub>, Flb-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL, Flm-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, Flm-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-

CMP-2OH, F1n-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) или F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), значения глюкозы в крови у мышей, обработанных NOD, оставались стабильными по сравнению с животными, которые получали физиологический раствор.

Пример 23.

NOD-мыши.

23А. Мыши с диабетом без ожирения (NOD), такие как мыши NOD/ShiLt, склонны к спонтанному появлению аутоиммунного сахарного диабета, который является результатом аутоиммунного ответа на различные панкреатические аутоантигены. Диабет развивается у NOD-мышей в результате инсулита, характеризующегося инфильтрацией различных лейкоцитов в островки поджелудочной железы. При развитии диабета происходила инфильтрация лейкоцитами островков поджелудочной железы после значительного снижения выработки инсулина и соответствующее повышение уровней глюкозы в крови.

Для оценки эффективности лечения сахарного диабета в настоящем изобретении предусматривались композиции и способы лечения, начиная с 5-недельного возраста еженедельно контролировали возникновение диабета в группе мышей NOD/ShiLt путем измерения уровня глюкозы в крови не натощак с применением глюкометра AccuCheck Aviva (Roche). Начиная с 6-недельного возраста мышей разделяли на контрольную и тестируемую группы (n=15 для каждой группы) и обрабатывали соответственно с помощью еженедельных внутривенных инъекций физиологического раствора, 10 мкг F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) или 10 мкг F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>). Инъекции продолжали в течение 10 недель подряд. Процентную долю животных без диабета измеряли в течение продолжительного времени. Считалось, что у мышей есть диабет при двух последовательных показателях уровня глюкозы в крови, составляющих  $\geq 300$  мг/дл, или одним показателем уровня глюкозы в крови, составляющем  $\geq 450$  мг/дл. Мышей, у которых предполагали диабет, умерщвляли.

На фиг. 14 изображены данные, полученные как описано выше, как процентная доля животных без диабета, измеренная в течение продолжительного времени. Мыши, обработанные с помощью F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), показаны в виде заполненных квадратов. Мыши, обработанные с помощью F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), показаны в виде заполненных треугольников. Мыши, обработанные с помощью физиологического раствора, показаны в виде закрашенных ромбов. Как можно легко понять из данных, собранных на животных, обработанных физиологическим раствором, в течение продолжительного времени до 11-недельного возраста присутствовал спонтанный диабет. Распространенность повышалась в течение продолжительного времени (показанная тенденцией к снижению на графике), при этом у 60% испытуемых животных на 20 неделе развивался диабет. Как показано на фиг. 14, обработка мышей NOD или с помощью F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), или с помощью F1c'-инсулин-B-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) снижала частоту возникновения диабета у NOD-мышей по сравнению с животными, получающими физиологический раствор. Данные демонстрируют, что введение инсулина, сопряженного с линкерами, и адресная доставка компонентов, раскрытых в данном документе, в печень может успешно снижать развитие сахарного диабета I типа посредством снижения аутоиммунного ответа на различные аутоантигены, вырабатываемые поджелудочной железой.

23В. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 22А, и заменяя тестируемые композиции на другие композиции формулы I, где X представляет собой инсулин-B или проинсулин, препроинсулин, глутаматдекарбоксилазу-65 (GAD-65 или глутаматдекарбоксилазу-2), GAD-67, глюкозо-6-фосфатазу 2 (IGRP или белок, родственной каталитической субъединице островков-специфичной глюкозо-6-фосфатазы), ассоциированный с инсулиновой белок 2 (IA-2) и ассоциированный с инсулиновой белок 2β (IA-2β), ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазу H, имоген 38, GLIM A 38, хромогранин-A, HSP-60, карбоксипептидазу E, периферин, переносчик глюкозы 2, ассоциированный с гепатокарциномой-кишечником-поджелудочной железой/панкреатический белок, S100, фибриллярный кислый белок глии, регенерирующий ген II, панкреатический дуоденальный гомеобокс 1, протеинкиназу миотонической дистрофии, белок, родственной каталитической субъединице островков-специфичной глюкозо-6-фосфатазы, и SST рецепторы 1-5, сопряженные с G-белком, такие как F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>12</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>33</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>40</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>43</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>50</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>60</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>75</sub>, F1aA-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>84</sub>, F1b-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>34</sub>-2NAcGAL, F1m-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>80</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, F1m-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>62</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>8</sub>-CMP-2OH, F1n-инсулин-m<sub>2</sub>-n<sub>1</sub>-p<sub>30</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-2NHAc, F1c'-P31-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) или F1c'-P31-m<sub>1</sub>-n<sub>4</sub>-p<sub>90</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>), частота возникновения диабета у обработанных NOD-мышей снижалась по сравнению с животными, которые получали физиологический раствор.

Пример 24.

Биораспределение.

Для проверки биораспределения антигенных конъюгатов гликополимеров авторы настоящего изобретения обрабатывали мышей BALB/c с помощью флуоресцентно меченого OVA или флуоресцентно меченого OVA, конъюгированного с одним из p(Gal-HPMA), p(Glu-HPMA), p(Gal $\beta$ -HPMA) или p(Glu $\beta$ -HPMA). Компоненты сахара, присоединенные к остову p(Gal-HPMA) и p(Glu-HPMA), присоединяют к полимеру в  $\alpha$ -конформации в положении C1, где сахара, присоединенные к остову p(Gal $\beta$ -HPMA) и p(Glu $\beta$ -HPMA), присоединяют к полимеру в  $\beta$ -конформации в положении C1. OVA метили посредством Dy750. Все лекарственные средства предоставляли посредством инъекции 140 мкл в хвостовую вену. Каждого животного обрабатывали с помощью равного количества флуоресцентного конъюгата на флуоресцентной основе. Через 3 ч животных умерщвляли, а печень каждого животного поливали физиологическим раствором, затем собирали и печень, и селезенку и визуализировали с помощью IVIS Spectrum system с подходящим набором фильтров.

На фиг. 15 изображены образцовые изображения флуоресцентных сигналов печени (А) и селезенки (В) животных, обработанных с помощью конъюгатов гликополимеров OVA или OVA. Ниже представлены составы:

- 1) OVA,
- 2) F1m'-OVA750-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL $\beta$ <sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal $\beta$ -HPMA)"],
- 3) F1m'-OVA750-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal-HPMA)"],
- 4) F1m'-OVA750-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU $\beta$ <sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu $\beta$ -HPMA)"],
- 5) F1m'-OVA750-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu-HPMA)"].

На изображениях печени животных, обработанных, как описано выше, показано, что конъюгаты гликополимеров значительно повышают доставку их конъюгированного антигена в печень (или селезенку) по сравнению с поглощением неконъюгированных антигенов. Печень животных, обработанная неконъюгированным OVA, характеризовалась сниженным флуоресцентным сигналом по сравнению с печенью животных, обработанных с помощью OVA, конъюгированным с одним из p(Gal-HPMA), p(Glu-HPMA), p(Gal $\beta$ -HPMA) или p(Glu $\beta$ -HPMA). Кроме того, изображения печени, полученные от животных, обработанных, как показано выше, демонстрируют, что конъюгация антигенов с гликополимерами снижает доставку антигенов в селезенку. Селезенка животных, обработанная неконъюгированным OVA, характеризовалась намного большим флуоресцентным сигналом по сравнению с селезенкой животных, обработанных с помощью OVA, конъюгированным с одним из p(Gal-HPMA), p(Glu-HPMA), p(Gal $\beta$ -HPMA) или p(Glu $\beta$ -HPMA). Эти данные существенны тем, что они демонстрируют повышенную адресную доставку антигена, к которому требуется толерантность в печени и/или селезенке, что, как показывают экспериментальные данные, представленные в данном документе, приводит к снижению иммунного ответа (т.е. индуцированной толерантности) к антигену. В соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, такая индуцированная толерантность может обеспечивать лечение, снижение, предотвращение или иным образом улучшение нежелательного иммунного ответа, который иным образом был бы ассоциирован с воздействием антигена.

Пример 25.

7-дневный анализ фенотипа QTI/QTH.

Для сравнения способности различных конъюгатов гликополимеров с антигеном индуцировать антигенспецифичную Т-клеточную пролиферацию, а также активацию экспрессии и презентацию различных маркеров Т-клеточной энергии и делеции мышей, которые получали инфузию 400000 OTI-клеток, меченных сукцинимидоловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CSFE), обрабатывали с помощью внутривенной инъекции либо OVA, либо OVA, конъюгированным с одним из p(Gal-HPMA), p(Glu-HPMA), p(Gal $\beta$ -HPMA) или p(Glu $\beta$ -HPMA) с представленными ниже составами:

- F1m'-OVA-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal-HPMA)"];  
 F1m'-OVA-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU<sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu-HPMA)"];  
 F1m'-OVA-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGAL $\beta$ <sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Gal $\beta$ -HPMA)"];  
 F1m'-OVA-m<sub>1,3</sub>-n<sub>79</sub>-p<sub>90</sub>-q<sub>4</sub>-CMP-поли-(EtPEG<sub>1</sub>AcN-1NAcGLU $\beta$ <sub>30</sub>-ran-HPMA<sub>60</sub>) ["OVA-p(Glu $\beta$ -HPMA)"].

Животных обрабатывали с помощью OVA либо в его свободной форме, либо в конъюгированной форме с получением 10 мкг OVA в 1 день и 3 день эксперимента. Хронологическая шкала подробностей эксперимента показана на фиг. 16А. Через 7 дней мышей умерщвляли и собирали спленоциты животных, а также анализировали их с помощью проточной цитометрии в отношении фенотипических маркеров, отличающихся Т-клеточной энергией, делецией и памятью.

На фиг. 16В показано, что конъюгаты OVA-гликополимер индуцируют большую OTI Т-клеточную пролиферацию по сравнению с пролиферацией OTI, наблюдаемой у животных, обработанных с помо-



щью неконъюгированного OVA. Как рассматривалось выше, эти данные дополнительно подтверждают, что в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, адресная доставка гликозилированных компонентов, раскрытых в данном документе, приводит к повышенной антигенспецифичной Т-клеточной пролиферации - ключевому шагу в индукции толерантности к антигену. Интересно, что животные, обработанные конъюгатами OVA-гликополимер, содержащими сахара, сцепленные  $\beta$ -связью, индуцировали намного большую пролиферацию по сравнению с животными, обработанными с помощью гликополимеров, содержащих такой же фрагмент сахара, сцепленный с полимером с помощью  $\alpha$ -сцепления (например,  $p(\text{Gal}\beta\text{-HPMA})$  в сравнении с  $p(\text{Gal-HPMA})$ ). Неожиданно такое конформационное изменение в одном элементе всей композиции приводит к повышенной эффективности с точки зрения Т-клеточной пролиферации, которая по мнению заявителя (без привязки к теории) является результатом синергетического взаимодействия компонентов композиции с их соответствующими физиологическими мишенями. Кроме того, популяция ОТИ-клеток, взятых у животных, обработанных с помощью всех конъюгатов OVA-гликополимер, за исключением OVA- $p(\text{Gal-HPMA})$ , демонстрирует намного большую экспрессию маркеров аннексии  $V^+$  на поверхности по сравнению с клетками, взятыми у животных, обработанных с помощью OVA (см. на фиг. 16C). В соответствии с данными, рассмотренными выше, они указывают, что большая процентная доля антигенспецифичных Т-клеток подвергается адресной доставке к апоптотическому каскаду или в него. Как показано на фиг. 16D, ОТИ-клетки, полученные от животных, обработанных с помощью конъюгатов OVA-гликополимер, содержащих сахара, сцепленные  $\beta$ -связью, демонстрируют повышенную экспрессию Т-клеточного маркера истощения PD-1 по сравнению с животными, обработанными с помощью гликополимеров, содержащих такой же фрагмент сахара, сцепленный с полимером с помощью  $\alpha$ -сцепления, а также животными, обработанными свободным OVA. Для сохранения продолжительной толерантности лекарственные средства должны обеспечивать снижение количества долгоживущих антигенспецифичных Т-клеток памяти. На фиг. 16E и 16F показано, что как OVA- $p(\text{Gal}\beta\text{-HPMA})$ , так и OVA- $p(\text{Glu}\beta\text{-HPMA})$  индуцируют значимое снижение ОТИ-клеток, экспрессирующих маркеры для Т-клеток памяти. Как OVA- $p(\text{Gal}\beta\text{-HPMA})$ , так и OVA- $p(\text{Glu}\beta\text{-HPMA})$  индуцируют пятикратное повышение количества Т-клеток памяти по сравнению с животными, обработанными с помощью свободного OVA. Эти данные дополнительно указывают на то, что композиции, раскрытые в данном документе, могут индуцировать толерантность к антигену (OVA, выбранный в данном документе благодаря его всеобщему признанию в области в качестве "золотого стандарта" антигена), и в нескольких вариантах осуществления могут неожиданно повышать индукцию толерантности (как представлено по меньшей мере частично с помощью антигенспецифичной Т-клеточной пролиферации, повышенная экспрессия аннексина V на антигенспецифичных Т-клетках повышает экспрессию маркеров истощения на антигенспецифичных Т-клетках и снижает экспрессию Т-клеток памяти).

#### Пример 26.

Антигены, сопряженные с глюкозой - исследование BDC2.5.

Этот эксперимент проводили для исследования способности антигенных конъюгатов  $p(\text{Glu})$  ингибировать развитие аутоиммунитета, управляемой CD4 Т-клетками. Применяли мышиную модель антиген-специфичных Т-клеток, индуцирующих аутоиммунный диабет. Аутоиммунный диабет индуцировали путем переноса активированных Т-клеток BDC2.5, которые несут Т-клеточный рецептор для диабетического аутоантигена хромогранина А, в мышей с ослабленным иммунитетом. Затем мышей-реципиентов обрабатывали с помощью миметопы аутоантигенного пептида, названного p31, или с помощью конъюгатов p31- $p(\text{Glu})$ .

Протокол. Свежевыделенные спленоциты из самок трансгенных мышей BDC2.5 стимулировали в течение 4 дней в DMEM, дополненной 10% FBS, 0,05 mM  $\beta$ -меркаптоэтанолом, 1% пуромидина/стрептомицина и 0,5 мкМ пептида p31. После стимуляции клетки промывали в DMEM, ресуспендировали в DMEM и вводили внутривенно нормогликемическим мышам NOD/Scid. Через 8 ч после адаптивного переноса мышам внутривенно вводили физиологический раствор (без обработки), 2 мкг p31 или 2 мкг p31 в виде конъюгатов p31- $p(\text{Glu})$  (в данном эксперименте применяли глюкозу в бета-конформации, хотя в нескольких вариантах осуществления может применяться альфа-конформация). Через 3 дня после начальной стадии лечения мышей снова обрабатывали с помощью физиологического раствора, 2 мкг p31 или 2 мкг p31 в виде конъюгатов p31- $p(\text{Glu})$ . Начиная с 1 дня у каждой мыши измеряли уровень глюкозы в крови не натошак с применением глюкометра Accucheck Aviva. Считалось, что у мышей есть диабет, если при однократном измерении уровень сахара в крови составлял более 450 мг/дл или два последовательных показателя уровня глюкозы в крови составляли более 350 мг/дл. В каждой группе было по 7 мышей.

Результаты. Как показано на фиг. 17, у мышей без обработки в течение 5 дней после переноса спленоцитов начинал развиваться диабет (как измерено при гипергликемии). В течение приблизительно 7 дней у всех мышей без обработки развивалась гипергликемия. У этих мышей, обработанных контрольной композицией (p31; заполненные кружки), начала развиваться гипергликемия вскоре после мышей без обработки. Через 8 дней после переноса у всех мышей, обработанных p31, развивалась гиперглике-

мия. С большой разницей введение конъюгатов p31-p(Glu) (заполненные треугольники) приводило к сохранению нормального уровня глюкозы в крови у мышей в течение более длительного периода времени по сравнению с животными без обработки и животными, обработанными только с помощью пептида p31. В день 15 после переноса у 100% мышей p31-pGlu все еще сохранялись нормальные уровни глюкозы в крови.

Такие результаты демонстрируют, что конъюгаты p31-p(Glu) предотвращают развитие гипергликемии у мышей. Таким образом, в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, такие конъюгаты эффективны при применении для предотвращения развития диабета. В еще дополнительных вариантах осуществления конъюгаты p(Glu) эффективны при применении для снижения прогрессирования уже существующего диабета, а в еще дополнительных вариантах осуществления эффективны при применении для регрессии уже существующего диабета. В дополнительных вариантах осуществления могут применяться другие миметопы аутоантигена бета-клеток островков, хромогранина-А. В дальнейшем хромогранин-А в виде белка полной длины или его фрагменты можно использовать в качестве антигенной части толерогенных композиций в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе. Кроме того, в нескольких вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, можно применять другие связанные с диабетом антигены, в том числе без ограничений инсулин, проинсулин, препроинсулин, GAD-65, GAD-67, IGRP, IA-2, IA-2 $\beta$ , их фрагменты или их миметопы. В данном документе раскрыты другие связанные с диабетом антигены. К тому же, в нескольких вариантах осуществления могут применяться связанные с другими аутоиммунными заболеваниями антигены, раскрытые в данном документе. В еще дополнительных вариантах осуществления могут применяться чужеродные антигены, антигены трансплантата или другие типы/группировки, как использованный в данном документе хромогранин-А, и с применением данной модели в качестве неограничивающего примера способности композиций, раскрытых в данном документе, применяться в индукции толерантности.

Пример 27.

Память в отношении толерантности.

Следующий эксперимент проводили, чтобы продемонстрировать, что раскрытые в данном документе толерогенные композиции могут установить память в отношении толерантности. Для определения того, являются ли регуляторные Т-клетки (Treg), индуцируемые введением толерогенных композиций, раскрытых в данном документе (в качестве неограничивающего примера в данном документе использовали антигенные конъюгаты p(Glu)), способными установить долгосрочную толерантность после первоначального введения лекарственных средств, мышей предварительно обрабатывали инфузией ОТИ Т-клеток с последующим введением конъюгатов p(Glu)-OVA. Затем спустя 3 недели этих мышей подвергали стимуляции с помощью инфузии OVA-специфичных Т-клеток и антигенной стимуляции. Чтобы продемонстрировать, что любой эффект, индуцирующий толерантность, приводил к образованию Treg, мышам, обработанным с помощью p(Glu)-OVA, вводили антитело к CD25, которое, как было показано, истощает Treg.

Протокол. Мышей C57BL/6, получивших внутривенную инфузию 450000 ОТИ-клеток в день 0, затем обрабатывали в дни 1 и 4 с помощью физиологического раствора или 1,5 мкг OVA в виде свободного OVA или конъюгатов p(Glu)-OVA (OVA применяют в данном документе в качестве неограничивающего примера антигена, к которому требуется толерантность; в данном эксперименте применяли глюкозу в бета-конформации, хотя в нескольких вариантах осуществления может применяться альфа-конформация). В день 7 мыши получали конечную обработку физиологическим раствором или 15 мкг OVA в виде свободного OVA или конъюгатов p(Glu)-OVA. В день 15 половину животных, обработанных с помощью p(Glu)-OVA, обрабатывали посредством внутрибрюшинной инъекции 300 мкг антитела к CD25, которое, как было показано, истощает регуляторные Т-клетки (Treg). В день 29 мыши получали инфузию 750000 ОТИ Т-клеток и 750000 ОТИ Т-клеток. На следующий день животных стимулировали с помощью 5 мкг OVA и 50 нг сверхчистой LPS в каждую из 4 подушечек стопы. Через пять дней антигенной стимуляции мышей умерщвляли и с помощью проточной цитометрии оценивали количество ОТИ и ОТИ Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах. (Группы n=5: стимуляция (т.е. животные, обработанные носителем), OVA, p(Glu)-OVA, p(Glu)-OVA +  $\alpha$ CD25). Данный протокол схематически изображен на фиг. 18.

Результаты. Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 19А, В. На фиг. 19А изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ Т-клетки (как процентная доля от всех клеток CD8<sup>+</sup>). На фиг. 19В изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ Т-клетки (как процентная доля от всех клеток CD4<sup>+</sup>). У таких мышей, получающих стимуляцию посредством LPS и OVA, отсутствующую в толерогенной композиции, проявлялось значительное повышение количества ОТИ и ОТИ Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах. У таких мышей, получающих pGlu-OVA, показано значительное снижение как ОТИ-клеток, так и ОТИ-клеток. Отмена толерантности, индуцируемой pGlu-OVA при введении антител к CD25, демонстрирует, что ролью Treg является индуцированная pGlu-OVA толерантность. Взятые вместе эти данные указывают на то, что толерогенные композиции, раскрытые в данном

документе, способны индуцировать продолжительную толерантность благодаря индукции регуляторных Т-клеток. В нескольких вариантах осуществления это является предпочтительным в связи с тем, что продолжительная толерантность обеспечивает снижение (или в нескольких вариантах осуществления устранение) необходимости непрерывного введения композиций, раскрытых в данном документе. Тем не менее, в нескольких вариантах осуществления необязательно выполняют повторное введение.

Пример 28.

Память в отношении толерантности (эндогенной).

Следующий эксперимент проводили, чтобы продемонстрировать, что толерогенные композиции, раскрытые в данном документе, могут установить память в отношении толерантности к эндогенным Т-клеткам. Данный эксперимент проводили аналогично примеру 27, однако мыши не получали первоначального введения донорных ОТИ Т-клеток.

Для определения того, можно ли индуцировать Treg из популяции эндогенных Т-клеток конъюгатами антигена p(Glu) и проявлять продолжительную толерантность, мышей обрабатывали конъюгатами p(Glu)-OVA. Затем спустя 3 недели их подвергали стимуляции с помощью инфузии OVA-специфичных Т-клеток и антигенной стимуляции. Чтобы исследовать, был ли продемонстрированный эффект, индуцирующий толерантность, результатом применения эндогенных Treg, мышей обрабатывали с помощью p(Glu)-OVA, а затем обрабатывали антителом к CD25.

Протокол. В день 0 и 3 мыши BL6/C57 получали внутривенную инфузию физиологического раствора или 1,5 мкг OVA в виде свободного OVA или конъюгатов p(Glu)-OVA (в данном эксперименте применяли глюкозу в бета-конформации, хотя в нескольких вариантах осуществления может применяться альфа-конформация). На 6 день мыши получали конечную обработку физиологическим раствором или 15 мкг OVA в виде свободного OVA или конъюгатов p(Glu)-OVA. На 14 день половину животных, обработанных с помощью p(Glu)-OVA, обрабатывали посредством внутрибрюшинной инъекции 300 мкг антитела к CD25. На 28 день мыши получали инфузию 750000 ОТИ и 750000 ОТИ Т-клеток. На следующий день животных стимулировали с помощью 5 мкг OVA и 50 нг сверхчистой LPS в каждую из 4 подушечек стопы. Через пять дней антигенной стимуляции мышей умерщвляли и с помощью проточной цитометрии оценивали количество ОТИ и ОТИ Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах. (Группы n=5: стимуляция (т.е. животные, обработанные носителем), OVA, p(Glu)-OVA, p(Glu)-OVA +  $\alpha$ CD25). Данный протокол схематически изображен на фиг. 20.

Результаты. Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 21A, B. На фиг. 21A изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ Т-клетки (как процентная доля от всех клеток CD8<sup>+</sup>). На фиг. 21B изображены оставшиеся после антигенной стимуляции ОТИ Т-клетки (как процентная доля от всех клеток CD4<sup>+</sup>). У таких мышей, получающих стимуляцию посредством LPS и OVA, отсутствующую в толерогенной композиции, проявлялось значительное повышение количества ОТИ и ОТИ Т-клеток в дренирующих лимфатических узлах. У таких мышей, получающих pGlu-OVA, при сравнении показано значительное снижение как ОТИ-клеток, так и ОТИ-клеток. Отмена толерантности, индуцируемой pGlu-OVA при введении антител к CD25, демонстрирует, что Treg, полученные из популяции эндогенных Т-клеток, играют значимую роль в индукции толерантности с помощью антигенной композиции pGlu. Взятые вместе эти данные указывают на то, что толерогенные композиции, раскрытые в данном документе, способны индуцировать продолжительную толерантность благодаря индукции эндогенных регуляторных Т-клеток. В нескольких вариантах осуществления это является предпочтительным в связи с тем, что продолжительная толерантность обеспечивает снижение (или в нескольких вариантах осуществления устранение) необходимости непрерывного введения композиций, раскрытых в данном документе. Тем не менее, в нескольких вариантах осуществления необязательно выполняют повторное введение. Кроме того, эти данные указывают на то, что дополнение Т-клеток реципиента экзогенными Т-клетками не является необходимым для индукции толерантности. Скорее всего эндогенный пул Т-клеток является достаточным для получения регуляторных Т-клеток в подходящем количестве, что приводит к продолжительной толерантности.

Пример 29.

Профилактическое введение толерогенных композиций снижает последующее образование антител.

Как раскрыто в данном документе в нескольких вариантах осуществления, толерогенные композиции применимы для уменьшения, лечения, предотвращения или иным образом облегчения иммунных ответов против антигенов, представляющих интерес. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления конечное применение толерогенной композиции, например, для профилактики по сравнению с лечением определяют с помощью текущего состояния субъекта до введения композиции. Данный эксперимент выполняли, чтобы продемонстрировать, что раскрытые в данном документе толерогенные композиции можно использовать для снижения степени образования антител к конкретному антигену посредством профилактического введения толерогенной композиции.

Протокол. План эксперимента изображен на фиг. 22. Предварительное лечение происходило в двух группах, которые получали 15 мкг толерогенной композиции, содержащей p-Glu-аспарагиназу (высокую дозу), и которые получали 2,5 мкг p-Glu-аспарагиназы (низкую дозу) (в данном эксперименте применяли глюкозу в бета-конформации, хотя в нескольких вариантах осуществления может применяться альфа-конформация). Такие стадии предварительного лечения изображены на фиг. 22 в виде стадии "А". Отмечено, что аспарагиназу применяют в данном эксперименте в качестве неограничивающего примера антигена, к которому требуется толерантность. Как рассматривалось выше, в зависимости от варианта осуществления можно также применять множество других антигенов, их фрагменты или их мимеотопы. После предварительного лечения или в момент введения в действие экспериментального протокола для аспарагиназы дикого типа (WT-Asn) и смешанных групп животным вводили либо 15 мкг аспарагиназы, либо комбинацию из 12,5 мкг аспарагиназы вместе с 2,5 мкг pGlu-аспарагиназы. Такое введение изображено как стадия "В" на фиг. 22. В случае всех экспериментальных групп стадия "С" представляет собой отбор из образцов крови 10 мкл.

Результаты данного эксперимента показаны на фиг. 23. Признак, который указывает на повышение титров антител к аспарагиназе, начиная примерно через 2 дня и непрерывно возрастающий до относительных значений от 3 до 4, является результатом введения только аспарагиназы. В отличие от этого, предварительное лечение либо помощью высокой дозы, либо с помощью низкой дозы аспарагиназы значительно снижало образование антител к аспарагиназе и постоянно удерживало титры антител на относительно низких значениях благодаря использованию 59-дневного протокола для проведения тестирования. Группа негативного контроля (антиген без обработки) не демонстрирует выработки антиген-специфичных антител.

Эти данные демонстрируют, что в дополнение к лечению или снижению уже существующего иммунного ответа к представляющему интерес антигену в нескольких вариантах осуществления толерогенные композиции, раскрытые в данном документе, могут также применяться для предотвращения первоначального иммунного ответа. Как показано в данном эксперименте, как высокие, так и низкие дозы лекарственных средств с углевод-опосредованной адресной доставкой, сцепленных с представляющим интерес антигеном, введенным при предварительном лечении, улучшают образование антител против представляющего интерес антигена. В нескольких вариантах осуществления такой подход является особенно эффективным, если экзогенное терапевтическое средство вводят пациенту. В некоторых таких вариантах осуществления в зависимости от терапевтического средства толерогенная композиция не нуждается во включении целого терапевтического средства в качестве представляющего интерес антигена (хотя некоторые варианты осуществления включают целое терапевтическое средство), но, скорее, она может включать фрагмент терапевтического средства, определенный эпитоп терапевтического средства или мимеотоп антигенного участка терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой белковое лекарственное средство. Кроме того, в нескольких вариантах осуществления более продолжительное и/или более частое предварительное лечение толерогенной композицией может способствовать еще большему снижению образования антител против представляющего интерес антигена. Однако в нескольких вариантах осуществления стадия однократной предварительной обработки может быть достаточной.

#### Пример 30.

Толерогенные композиции, облегчающие рассеянный склероз.

Как рассматривалось выше, различные заболевания, связанные с иммунным ответом, в том числе аутоиммунные ответы, можно лечить путем получения и применения толерогенных композиций, раскрытых в данном документе. В качестве неограничивающего примера таковых, применяемых в аутоиммунном контексте, данный эксперимент создавали для определения эффективности толерогенной композиции при лечении рассеянного склероза (MS).

Осуществляли тестирование толерогенных композиций, связанных с MS, на мышинной модели рассеянного склероза (экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, ЕАЕ). Аутоантигеном, применяемым для вакцинации в модели, был пептид, полученный из гликопротеина олигодендроцитов миелина (MOG), аминокислот под номерами 35-55 (MOG35-55; SEQ ID NO: 24). Аутоантигеном, используемым для лечения в модели, была немного более длинная пептидная последовательность (MOG30-60; SEQ ID NO: 25), которая содержала изложенный выше пептид для вакцинации. Более длинную терапевтическую последовательность использовали для обеспечения обработки с помощью антигенпрезентирующих клеток, и вследствие этого происходило снижение склонности растворимого пептида связываться с клеточной поверхностью главного комплекса гистосовместимости при отсутствии поглощения антигенпрезентирующими клетками.

Протокол. Экспериментальный протокол показан на фиг. 24А вместе с терапевтической толерогенной композицией, показанной на фиг. 24В. ЕАЕ индуцировали с помощью иммунизации донорных мышей B6.SJL посредством MOG35-55/CFA. Через 11 дней собирали клетки их селезенки и повторно стимулировали с помощью пептида MOG35-55, антител к IFN $\gamma$  и IL-12 в течение 3 дней. Полученные энцефалитогенные клетки вводили группам мышей-реципиентов, у которых затем развивались симптомы MS. Размеры групп составляли по 10 мышей в каждой, из которых половину умерщвляли в разгар болез-

ни (день 11), а половину умерщвляли в конце эксперимента (день 20). Вес тела измеряли 3 раза в неделю и ежедневно вслепую отмечали стадию заболевания. Контрольный пептид (MOG<sub>30-60</sub>), пептид для углевод-опосредованной адресной доставки (pGlu-MOG<sub>30-60</sub>); (в данном эксперименте применяли глюкозу в альфа-конформации, хотя в нескольких вариантах осуществления может применяться бета-конформация) или носитель (физиологический раствор) предоставляли в дни 0, 3 и 6 в любой из доз 0,8 или 4,0 мкг. Контроль положительной эффективности обработки (FTY720) проводили ежедневно на протяжении всего исследования. FTY720 (финголимод) является первым в своем классе модуляторов рецептора сфингозин-1-фосфата (S1P), считающимся эффективным во II фазе клинических испытаний в отношении MS.

На фиг. 25A показана оценка способности толерогенной композиции замедлять возникновение заболевания по сравнению с животными контрольной группы. Как можно видеть в день 11 (разгар симптомов болезни в контрольной группе), введение 0,8 мкг pGlu-MOG<sub>30-60</sub> (заполненные треугольники) приводит к значительному снижению показателя заболеваемости EAE (по сравнению только с пептидом MOG). На фиг. 25B показаны данные относительно снижения потери веса, которая связана с MS. Аналогично показателю заболеваемости EAE, посредством pGlu-MOG<sub>30-60</sub> продемонстрировано значительное снижение потери веса в день 11 эксперимента (на фиг. 25B; по сравнению только с MOG). В отличие от этого, в группе с пептидом отдельно и контрольной группе проявлялась потеря веса примерно на 25% в тот же момент времени эксперимента.

Фиг. 26A соответствует оценке возможности замедлять возникновение заболевания посредством более высокой дозы pGlu-MOG<sub>30-60</sub>, равной 4 мкг. Неожиданно была отмечена поразительная задержка начала заболевания (значительная по сравнению как с MOG отдельно, так и с FTY720), при этом ни одна из мышей из группы обработки (заполненные треугольники) не проявляла отличного от нуля показателя заболеваемости EAE до 14 дней в эксперименте. В отличие от этого, к дню 6 каждая из других экспериментальных групп демонстрировала признаки MS, о чем свидетельствует повышенный показатель заболеваемости EAE. Снова, подобно показателю заболеваемости EAE, более высокая доза pGlu-MOG<sub>30-60</sub>, равная 4 мкг, привела к значительному снижению массы тела. На 11 день группа pGlu-MOG<sub>30-60</sub> (закрашенные треугольники) характеризовалась фактически нулевой потерей веса, в то время как в остальных группах имела место потеря веса (~2,5 г в группе FTY720 и ~5 г в группе с MOG отдельно и контрольной группе, см. на фиг. 26B). Таким образом, более высокая доза pGlu-MOG<sub>30-60</sub>, равная 4 мкг, привела к намного лучшему сохранению веса (по сравнению как с MOG отдельно, так и с FTY720), которое продолжалось на протяжении практически всего эксперимента.

Как рассматривалось выше, данный конкретный эксперимент был неограничивающим примером того, как толерогенная композиция в соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, может применяться для снижения иммунного ответа, который образуется у субъекта по отношению к представляющему интерес антигену, при этом в данном документе антиген ассоциирован с аутоиммунным заболеванием - рассеянным склерозом. Как отмечалось выше, другие антигены, аутоантигены, терапевтические белки, фрагменты или специфичные эпитопы любых из предыдущих или мимеотопы любых из предыдущих также могут успешно применяться в соответствии с изобретением, предусмотренным в данном документе, для индукции иммунной толерантности.

#### Пример 31.

Биораспределение бета конъюгатов pGal и pGlu.

Данный эксперимент проводили для определения типов клеток печени, подвергаемых нацеливанию конъюгатов pGal и pGlu, раскрытых в данном документе.

Протокол. Мышей обрабатывали посредством инъекции в хвостовую вену 100 мкг OVA, флуоресцентно меченного с помощью флуоресцентного красителя Dy-649 (OVA649), 100 мкг OVA, конъюгированного с pGluβ (OVA649-pGluβ) или 100 мкг OVA, конъюгированного с pGalβ (OVA649-pGalβ). Через 3 ч этих мышей умерщвляли и печень собирали, перерабатывали в суспензию из отдельных клеток и разделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Затем анализировали различные типы клеток печени на содержание белка (например, измеренного OVA649) с помощью проточной цитометрии.

Результаты. Результаты показывают, что конъюгаты как OVA649-pGalβ, так и OVA649-pGluβ являются более эффективными при адресной доставке в синусоидальные эндотелиоциты печени (LSEC) по сравнению с OVA649 (на фиг. 27A). LSEC, полученные от животных, обработанных с помощью OVA649-pGalβ, характеризовались двукратным повышением средней интенсивности флуоресценции (MFI), и LSEC, полученные от животных, обработанных с помощью OVA649-pGluβ, характеризовались 2,5-кратным повышением MFI по сравнению с LSEC, полученными от животных, обработанных с помощью OVA649.

Клетки Купфера также эффективно подвергались нацеливанию конъюгатов OVA649-pGluβ. Процентная доля клеток Купфера, которые поглощали OVA649-pGluβ, у животных, обработанных OVA649-pGluβ, была значительно выше, чем процентная доля клеток Купфера, которые поглощали OVA649 (на фиг. 27B). Следовательно, в нескольких вариантах осуществления pGlu в бета-конформации применяют,

когда это может потребоваться для адресной доставки в клетки Купфера. Тем не менее, конъюгаты pGal могут также необязательно применяться в определенных вариантах осуществления.

В дополнение к клеткам Купфера, клетки CD11c<sup>+</sup> также эффективно поглощают OVA649-pGluβ. Процентная доля клеток CD11c<sup>+</sup>, которые поглощали OVA649-pGluβ, была значительно выше, чем процентная доля CD11c<sup>+</sup>, которые подвергались нацеливанию OVA649 (на фиг. 27C). Следовательно, в нескольких вариантах осуществления pGlu в бета-конформации применяют, когда это может потребоваться для адресной доставки в клетки CD11C<sup>+</sup>. Тем не менее, конъюгаты pGal могут также необязательно применяться в определенных вариантах осуществления.

Интересно, что конъюгаты как OVA649-pGluβ, так и OVA649-pGalβ были более эффективными при адресной доставке в гепатоциты по сравнению с OVA649. См. на фиг. 27D. Однако процентная доля гепатоцитов, которые поглощали OVA649-pGalβ, была выше, чем процентная доля гепатоцитов, подвергавшихся нацеливанию OVA649-pGluβ. Таким образом, в нескольких вариантах осуществления pGal в бета-конформации применяют, когда это может потребоваться для адресной доставки в гепатоциты. Тем не менее, конъюгаты pGlu могут также необязательно применяться в определенных вариантах осуществления.

Интересно, что анализ способности свободного OVA и конъюгатов OVA-гликополимер адресно доставляться в звездчатые клетки показал контрастирующие результаты. На фиг. 27E показано, что OVA адресно доставляется в звездчатые клетки с большей эффективностью, чем конъюгаты OVA-гликополимер.

В нескольких вариантах осуществления могут потребоваться комбинации конъюгатов pGlu и pGal, и два типа композиций взаимодействуют синергетически для адресной доставки в печень (и различные типы клеток печени). При этом, в нескольких вариантах осуществления также могут использоваться смеси конъюгатов в альфа- и бета-конфигурациях. В соответствии с другими экспериментами, раскрытыми в данном документе, применение OVA представляет собой антиген в качестве неограничивающего примера, к которому требуется толерантность. Другие антигены, раскрытые в данном документе, их фрагменты и их мимеотопы также могут быть конъюгированы с компонентами для углевод-опосредованной адресной доставки, и к тому же может индуцироваться толерантность на основе изобретения, предусмотренного в данном документе. В соответствии с несколькими вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, такая индуцированная толерантность может обеспечивать лечение, снижение, предотвращение или иным образом улучшение нежелательного иммунного ответа, который иным образом был бы ассоциирован с воздействием антигена.

В то время как настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты его осуществления, специалистам в данной области следует понимать, что можно осуществлять различные изменения и можно проводить замену на эквиваленты без отклонения от истинных сути и объема настоящего изобретения. Кроме того, многие модификации можно осуществить, чтобы адаптировать конкретную ситуацию, материал, смесь веществ, способ, технологическую стадию или стадии к цели, сути и объему настоящего изобретения. Все такие модификации предусматриваются в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты, заявки на патент, интернет-сайты и номера доступа/последовательности баз данных (в том числе как полинуклеотидных, так и полипептидных последовательностей), процитированные в данном документе, включены в него посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждое из отдельно публикации, патента, заявки на патент, интернет-сайта или номера доступа/последовательности базы данных были особым образом и отдельно обозначены как включенные посредством ссылки.

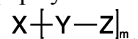
Предполагается, что могут быть получены различные комбинации или подкомбинации отличительных признаков и аспектов раскрытых выше вариантов осуществления, и они все еще будут подпадать под одно или несколько изобретений. К тому же, раскрытие в данном документе любого конкретного признака, аспекта, способа, свойства, характеристики, качества, атрибута, элемента и т.п. в связи с вариантом осуществления может использоваться во всех других вариантах осуществления, изложенных в данном документе. Соответственно, следует понимать, что различные признаки и аспекты раскрытых вариантов осуществления можно объединять или заменять друг другом с образованием различных способов раскрытых изобретений. Таким образом, предполагается, что объем настоящего изобретения, раскрытого в данном документе, не должен ограничиваться определенными раскрытыми вариантами осуществления, описанными выше. Кроме того, хотя изобретение подвержено различным модификациям и альтернативным формам, его конкретные примеры были показаны на чертежах и подробно описаны в данном документе. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено определенными формами или раскрытыми способами, а наоборот, настоящее изобретение охватывает все модификации, эквиваленты и альтернативы, соответствующие сущности и объему различных вариантов осуществления, описанной и прилагаемой формулы изобретения. Любые способы, раскрытые в данном документе, необязательно должны выполняться в указанном порядке. Способы, раскрытые в данном документе, включают определенные действия, полученные от практикующего специалиста; однако, прямо или косвенно они также могут включать любую стороннюю инструкцию относительно таких действий. Напри-

мер, действия, такие как "введение толерогенной композиции для углевод-опосредованной адресной доставки", включают "инструктаж по введению толерогенной композиции для углевод-опосредованной адресной доставки". Кроме того, если признаки или аспекты изобретения описаны относительно групп Маркуша, специалисты в данной области поймут, что изобретение, таким образом, также описано относительно любого отдельного представителя подгруппы или представителей группы Маркуша.

Диапазоны, раскрытые в данном документе, также охватывают любые и все наложения, поддиапазоны и их комбинации. Выражения, такие как "до", "по меньшей мере", "выше чем", "менее", "между" и т.д., включают перечисленные числа. Числа, которым предшествует термин "приблизительно" или "примерно", включают перечисленные числа. Например, "приблизительно 10 нм", в том числе "10 нм".

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее соединение формулы 1



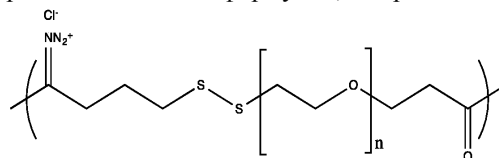
Формула 1,

где m представляет собой целое число от 1 до 100;

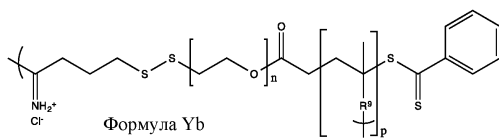
X содержит антиген, который индуцирует нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть;

при этом X содержит пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген пыли; собственный антиген; терапевтическое средство или антиген трансплантата;

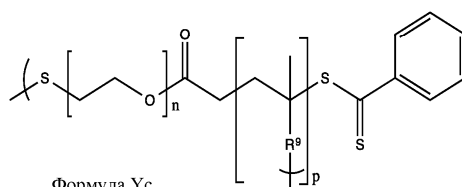
Y представляет собой линкерный компонент с формулой, выбранной из группы, состоящей из:



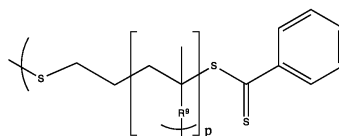
Формула Ya



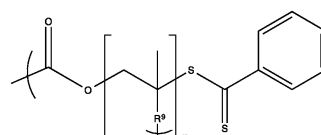
Формула Yb



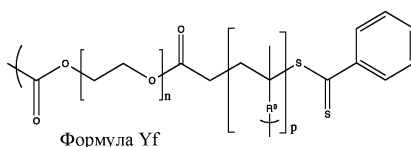
Формула Yc



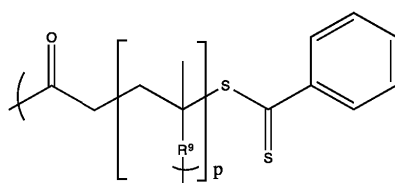
Формула Yd



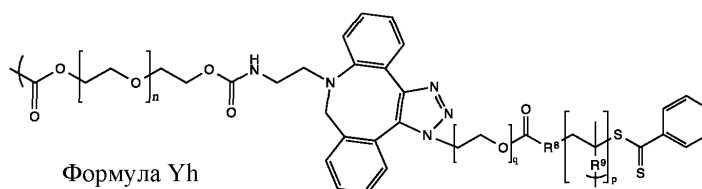
Формула Ye



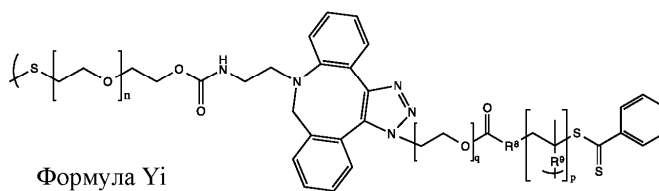
Формула Yf



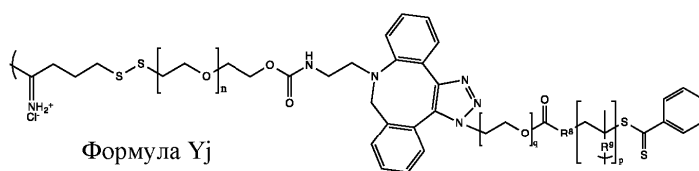
Формула Yg



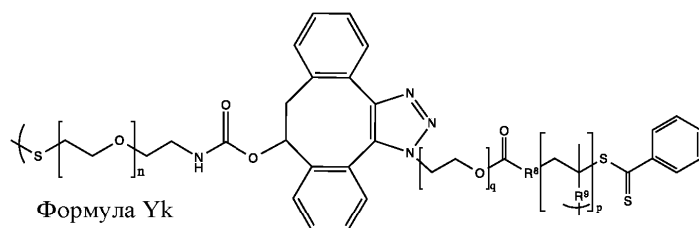
Формула Yh



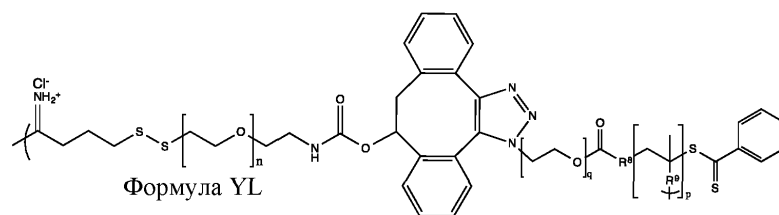
Формула Yi



Формула Yj

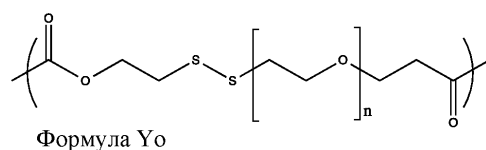
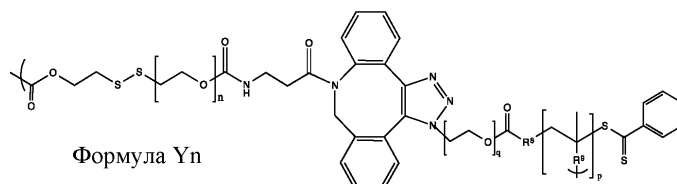
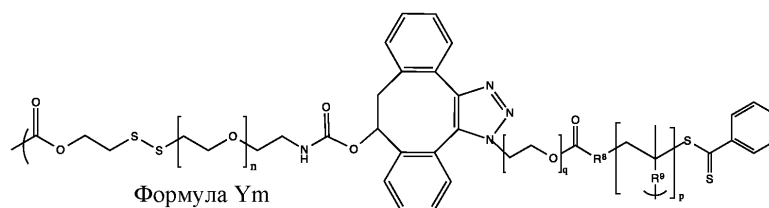


Формула Yk

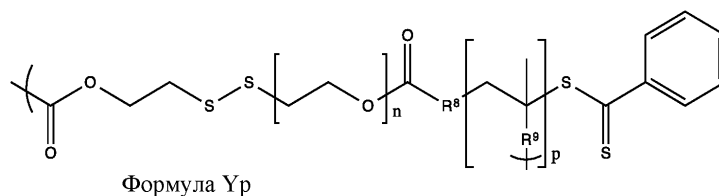


Формула YL





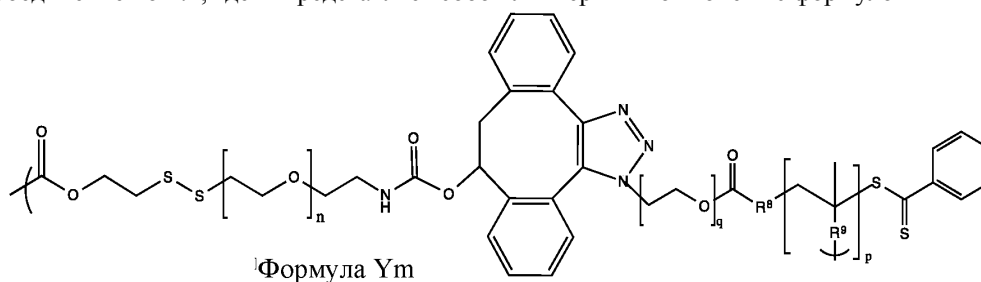
и



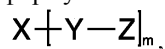
;

где левая скобка "(" обозначает связь с X;  
 правая ")" или "⌋" нижняя скобки обозначают связь между Y и Z;  
 n представляет собой целое число от 1 до 100;  
 присутствующее p представляет собой целое число от 2 до 150;  
 присутствующее q представляет собой целое число от 1 до 44;  
 присутствующий R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;  
 присутствующий R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь или -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>;  
 Z содержит один или более компонентов для адресной доставки в печень, выбранных из группы, состоящей из глюкозы, глюкозамина и N-ацетилглюкозамина.

2. Соединение по п.1, где Y представляет собой линкерный компонент с формулой



3. Соединение, содержащее соединение формулы 1

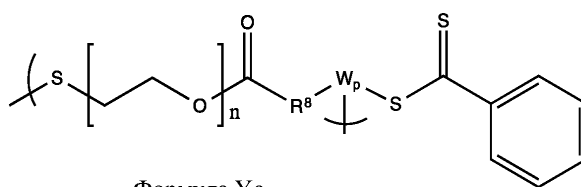


Формула 1

где m представляет собой целое число от 1 до 100;  
 X содержит антиген, который индуцирует нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть;

при этом X содержит пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген пыли; собственный антиген; терапевтическое средство или антиген трансплантата;

Y содержит структуру, представленную формулой Yc



Формула Yc

где левая скобка "(" обозначает связь с X;

присутствующая нижняя скобка "└" обозначает связь с Z;

n представляет собой целое число от 1 до 80;

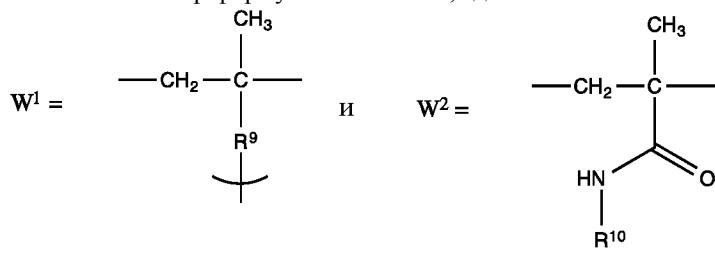
присутствующее q представляет собой целое число от 1 до 4;

присутствующее p представляет собой целое число;

присутствующий R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

присутствующий W представляет собой полимер группы формулы W<sup>1</sup> или W<sup>2</sup> или

W представляет собой сополимер формулы W<sup>1</sup> или W<sup>2</sup>, где



где R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- или -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>t</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>;

t представляет собой целое число от 1 до 5;

R<sup>10</sup> представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт;

Z содержит один или более компонентов для адресной доставки в печень.

4. Соединение по п.3, где

m составляет от 1 до 3;

R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

R<sup>9</sup> представляет собой -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>t</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>;

t равняется 1;

R<sup>10</sup> представляет собой CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH;

Z содержит один или более компонентов для адресной доставки в печень, выбранных из галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина и N-ацетилглюкозамина.

5. Соединение по п.1 или 2, где

n представляет собой целое число от 40 до 80;

q представляет собой целое число от 3 до 20;

R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;

когда R<sup>9</sup> представляет собой -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, Z представляет собой глюкозу или N-ацетилглюкозамин.

6. Соединение по п.4 или 5, где Z содержит компонент для адресной доставки в печень, содержащий один или более из галактозы, галактозамина, N-ацетилгалактозамина, глюкозы, глюкозамина и N-ацетилглюкозамина.

7. Соединение по любому из пп.1-6, где Z конъюгирован с Y по своим C1, C2 или C6 положениям.

8. Соединение по любому из пп.1-7, где R<sup>10</sup> представляет собой 2-гидроксипропил.

9. Соединение по любому из пп.1-8, где p представляет собой целое число от 2 до 150.

10. Соединение по любому из пп.1, 2 и 4-9, где Z содержит бета-аномер.

11. Соединение по любому из пп.1-9, где Y выбран из N-гидроксисукцинамидильных линкеров, линкеров на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновых линкеров, пиридил-дитиол-поли(этиленгликолевых) линкеров, пиридил-дитиольных линкеров, н-нитрофенил-карбонатных линкеров, линкеров на основе сложных эфиров NHS и линкеров на основе сложных эфиров нитрофеноксиполи(этиленгликоля).

12. Соединение по любому из пп.1-11, где X содержит один или более из конарахина (Ara h 1), аллергена II (Ara h 2), агглютинаина арахиса, конглутина (Ara h 6), 31 кДа основного аллерген/гомолога белка устойчивости к заболеванию (Mal d 2), предшественника белка-переносчика липидов (Mal d 3), основного аллергена Mal d 1.03D (Mal d 1), а-лактальбумина (ALA), лактотрансферрина, актинидина (Act s 1, Act d 1), фитоцистатина, тауматин-подобного белка (Act d 2), кивеллина (Act d 5), овомукоида, овальбумина, овотрансферрина, лизоцима, ливетина, аповитиллина, восветина, 2S альбумина (Sin a 1), 11S глобулина (Sin a 2), белка переносчика липидов (Sin a 3), профилина (Sin a 4), профилина (Api g 4), высокомолекулярного гликопротеина (Api g 5), аллергена Pen a 1 (Pen a 1), аллергена Pen m 2 (Pen m 2), изоформы быстрого тропомиозина, высокомолекулярного глютеина, низкомолекулярного глютеина,

альфа-глиадина, гамма-глиадина, омега-глиадина, хордеина, секалина, авенина, основного аллергена клубники Fra 1-E (Fra 1), профилина (Mus xp 1), части любого из указанных антигенов и миметика любого из указанных антигенов.

13. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из высокомолекулярного глютеина, низкомолекулярного глютеина, альфа-глиадина, гамма-глиадина, омега-глиадина, хордеина, секалина, авенина, части любого из указанных антигенов и миметика любого из указанных антигенов.

14. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из глиадина, части глиадина, и миметика любого из указанных антигенов.

15. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из инсулина, проинсулина, препроинсулина, глутаматдекарбоксилазы-65 (GAD-65), GAD-67, ассоциированного с инсулиновой белка 2 (IA-2), ассоциированного с инсулиновой белка 2β (IA-2β), ICA69, ICA12 (SOX-13), карбоксипептидазы H, имогена 38, GLIMA 38, хромогранина-A, HSP-60, карбоксипептидазы E, периферина, переносчика глюкозы 2, ассоциированного с гепатокарциномой-кишечником-поджелудочной железой/панкреатического белка, S100β, фибриллярного кислого белка глии, регенерирующего гена II, панкреатического дуоденального гомеобокса 1, протеинкиназы миотонической дистрофии, белка, родственного каталитической субъединице островков-специфичной глюкозо-6-фосфатазы, SST рецепторов 1-5, сопряженных с G-белком, части любого из указанных антигенов и миметика любого из указанных антигенов.

16. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из основного белка миеллина, гликопротеина олигодендроцитов миеллина, протеолипидного белка миеллина, части любого из указанных антигенов и миметика любого из указанных антигенов.

17. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из абциксимаба, адалимумаба, агалсидазы-альфа, агалсидазы-бета, альдеслейкина, алглюкозидазы-альфа, фактора VIII, фактора IX, инфликсимаба, L-аспарагиназы, ларонидазы, натализумаба, октреотида, фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), расбуриказы (уриказы), части любого из указанных антигенов и миметика любого из указанных антигенов.

18. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из субъединиц белков различных гаплотипов MHC класса I и MHC класса II и антигенов минорных групп крови RhCE, Kell, Kidd, Duffy и Ss.

19. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из инсулина, проинсулина, препроинсулина, толерогенной части любого из указанных антигенов и миметика любого из указанных антигенов.

20. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

21. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит полипептид, содержащий часть аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

22. Соединение по п.21, где X содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, содержащую часть SEQ ID NO: 1 и один или более из IA-2, его фрагмента или мимеотопа.

23. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит полипептид, содержащий часть любой из SEQ ID NO: 4-13.

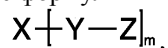
24. Соединение по любому из пп.1-12, где X содержит один или более из фибриногена, виментина, коллагена II типа, альфа-енолазы, Pmel17, тирозиназы, аррестина сетчатки глаза, межфоторецепторного ретинол-связывающего белка (IRBP), десмоглеина 3, 1 и 4, пемфаксина, десмоколлина, плакоглобина, перплакина, десмоплакинов, ацетилхолинового рецептора, аквапорина-4, их фрагмента или их мимеотопа.

25. Композиция для индукции толерантности к X, содержащая соединение по любому из пп.1-24.

26. Применение соединения по любому из пп.1-24 в индукции толерантности к X.

27. Способ лечения нежелательного иммунного ответа на антиген, предусматривающий введение эффективного количества соединения по любому из пп.1-24 млекопитающему, нуждающемуся в лечении.

28. Соединение, содержащее соединение формулы 1



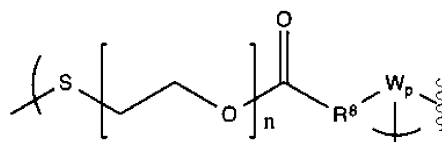
Формула 1,

где m представляет собой целое число от 1 до 100;

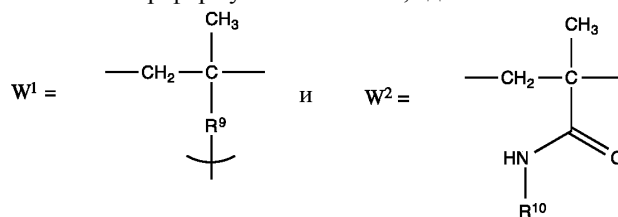
X содержит антиген, который индуцирует нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть;

при этом X содержит пищевой антиген, антиген животного происхождения, антиген растительного происхождения или антиген пыли; собственный антиген; терапевтическое средство или антиген трансплантата;

Y содержит структуру, представленную



где левая скобка "(" обозначает связь с X;  
 присутствующая нижняя скобка ")" обозначает связь с Z;  
 присутствующее n представляет собой целое число от 1 до 80;  
 присутствующее q представляет собой целое число от 1 до 4;  
 присутствующий r представляет собой целое число;  
 присутствующий R<sup>8</sup> представляет собой -CH<sub>2</sub>- или -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)(CN)-;  
 присутствующий W представляет собой полимер группы формулы W<sup>1</sup> или W<sup>2</sup> или  
 W представляет собой сополимер формулы W<sup>1</sup> или W<sup>2</sup>, где



где R<sup>9</sup> представляет собой прямую связь, -C(O)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- или -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>t</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>;  
 t представляет собой целое число от 1 до 5;

R<sup>10</sup> представляет собой алифатическую группу, спирт или алифатический спирт;

Z содержит один или более компонентов для адресной доставки в печень.

29. Соединение для индукции антигенспецифической иммунологической толерантности у субъекта, при этом соединение содержит

антиген, к которому требуется толерантность, или его толерогенную часть;

при этом антиген, к которому требуется толерантность, при представлении субъекту способен индуцировать у субъекта нежелательный иммунный ответ;

полимерный линкер, содержащий:

сополимер или статистический сополимер, при этом сополимер или статистический сополимер содержит первое звено метакрилата и второе звено метакрилата, причем первое звено метакрилата содержит первую этилацетамидную функциональную группу и второе звено метакрилата содержит вторую этилацетамидную функциональную группу;

при этом вторая этилацетамидная функциональная группа конъюгирована с алифатической группой, спиртом или алифатическим спиртом;

при этом полимерный линкер связан с антигеном, к которому требуется толерантность, или с его толерогенной частью посредством дитиольной связи или дисульфанилэтилового сложного эфира;

при этом каждая дитиольная связь или дисульфанилэтиловый сложный эфир предусматривают возможность расщепления при введении соединения субъекту и высвобождения антигена, к которому требуется толерантность, или его толерогенной части из полимерного линкера; и

компонент для адресной доставки в печень;

при этом компонент для адресной доставки в печень содержит галактозилированный или гликозилированный компонент;

при этом компонент для адресной доставки в печень связан с полимерным линкером благодаря первой этилацетамидной функциональной группе.

30. Соединение по п.29, при этом полимерный линкер содержит 1-циано-1-метилпропил.

31. Композиция для лечения нежелательного иммунного ответа на антиген, при этом композиция содержит

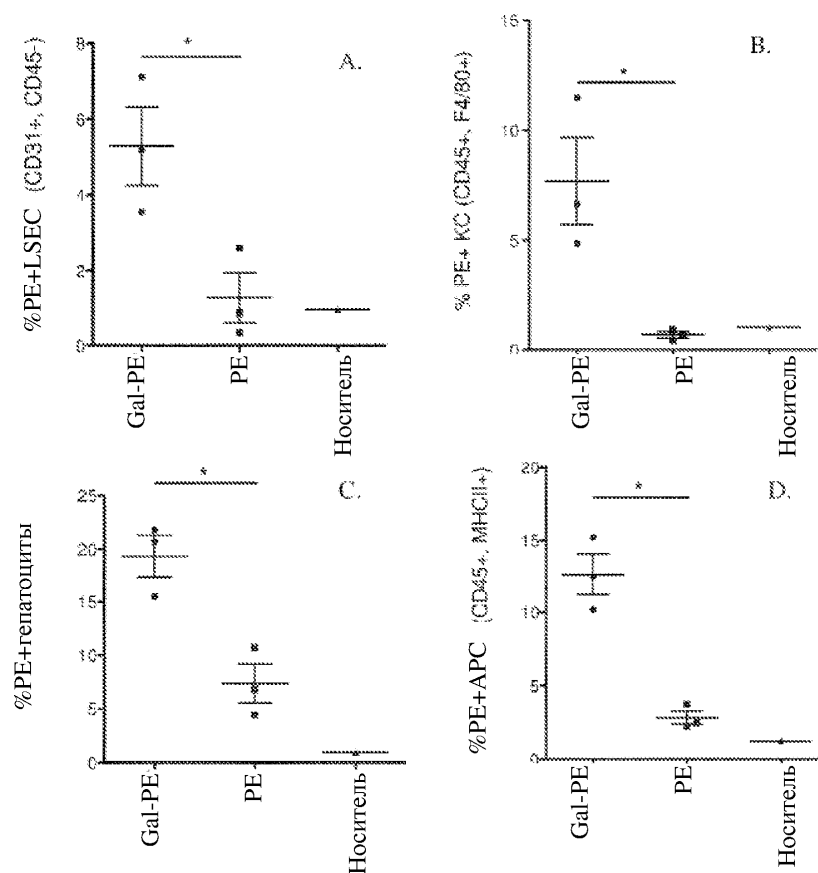
антиген;

полимерный линкер,

при этом полимерный линкер связан с антигеном посредством дитиольной связи или дисульфанилэтилового сложного эфира,

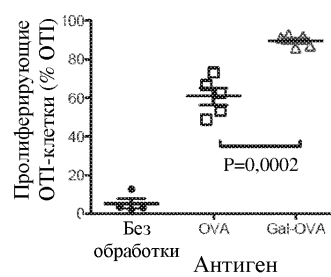
при этом каждая дитиольная связь или дисульфанилэтиловый сложный эфир предусматривают возможность расщепления при введении соединения субъекту и высвобождения антигена из полимерного линкера; и

гликозилированный компонент.

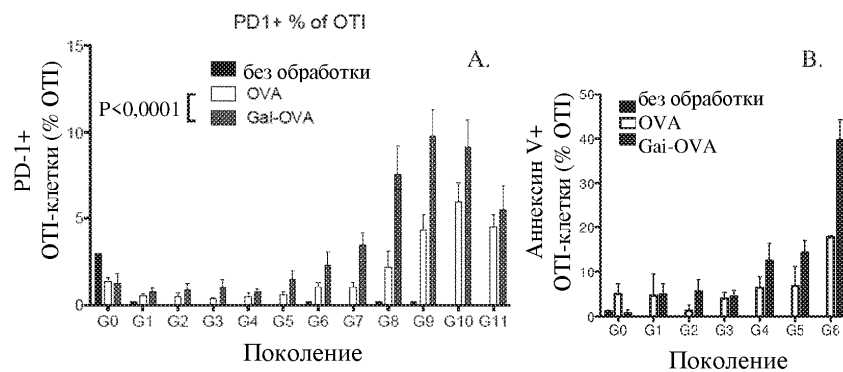


Фиг. 1

## Проллиферация OTI

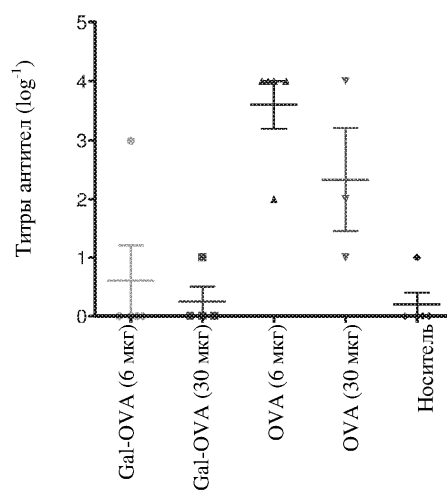


Фиг. 2

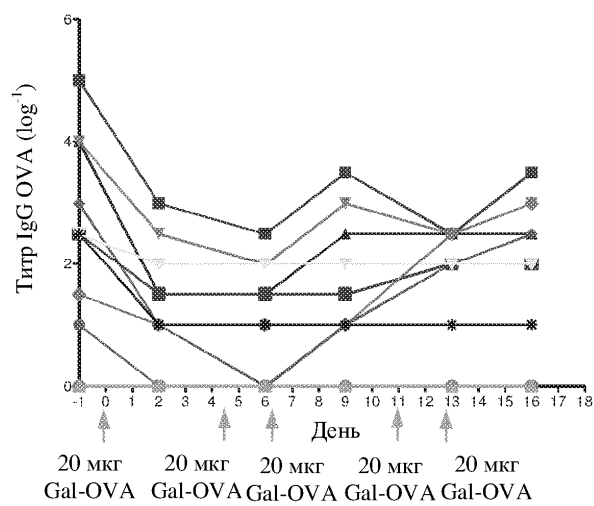


Фиг. 3

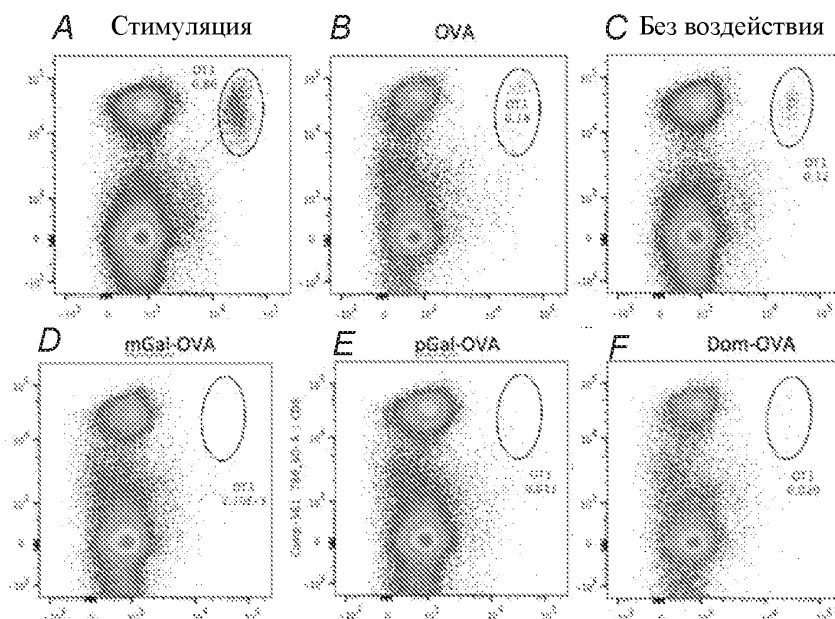
День 19



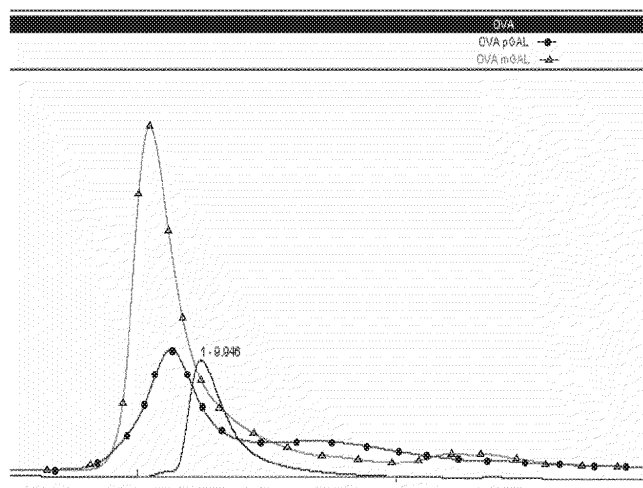
Фиг. 4



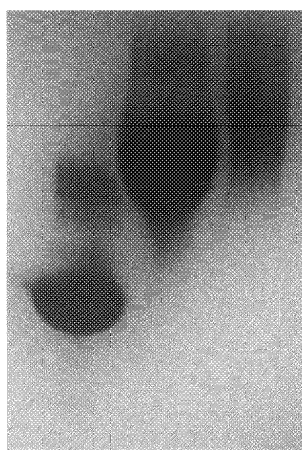
Фиг. 5



Фиг. 6



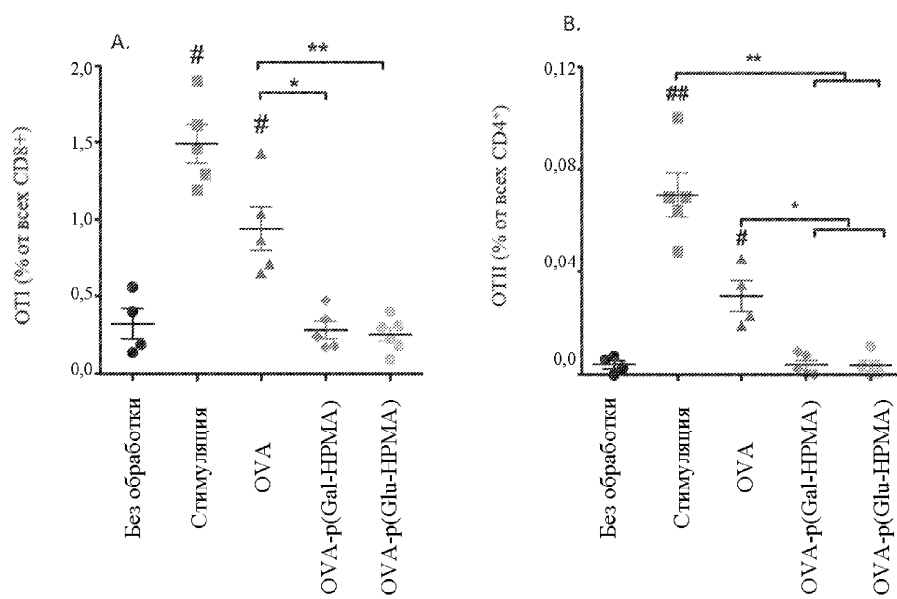
А



В

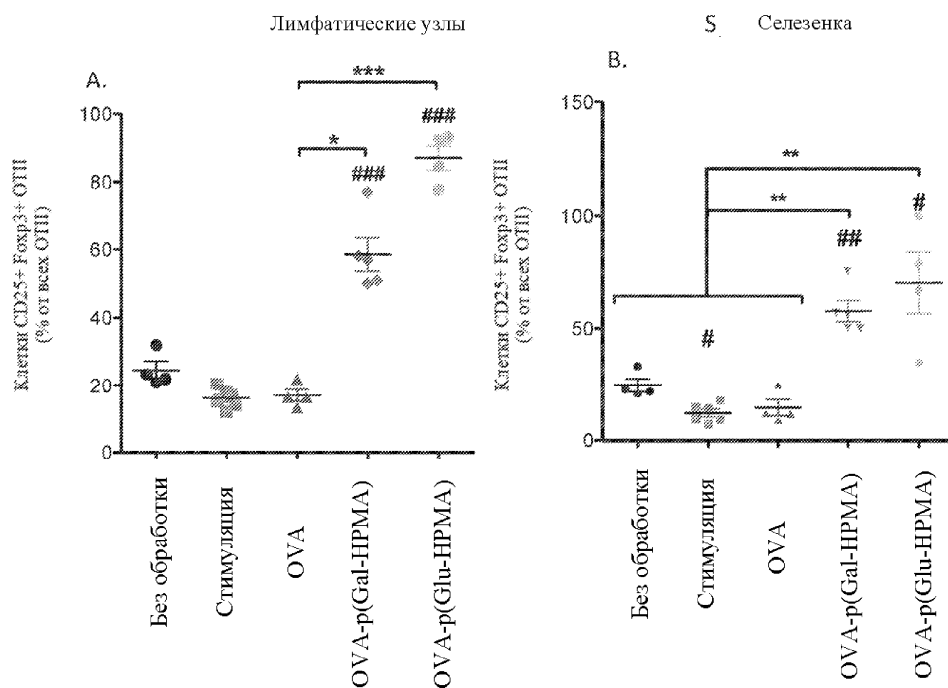
Фиг. 7

Считывания показателей ОТІ и ОТІІ в лимфатических узлах (20 мкг)



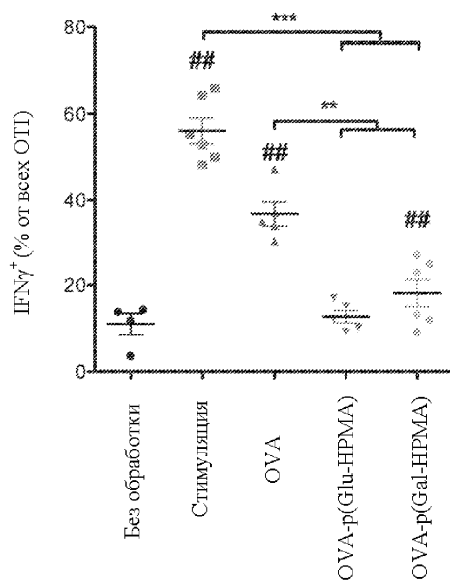
Фиг. 8

# Трег в лимфатических узлах и селезенке на 19-й день (20 мкг)



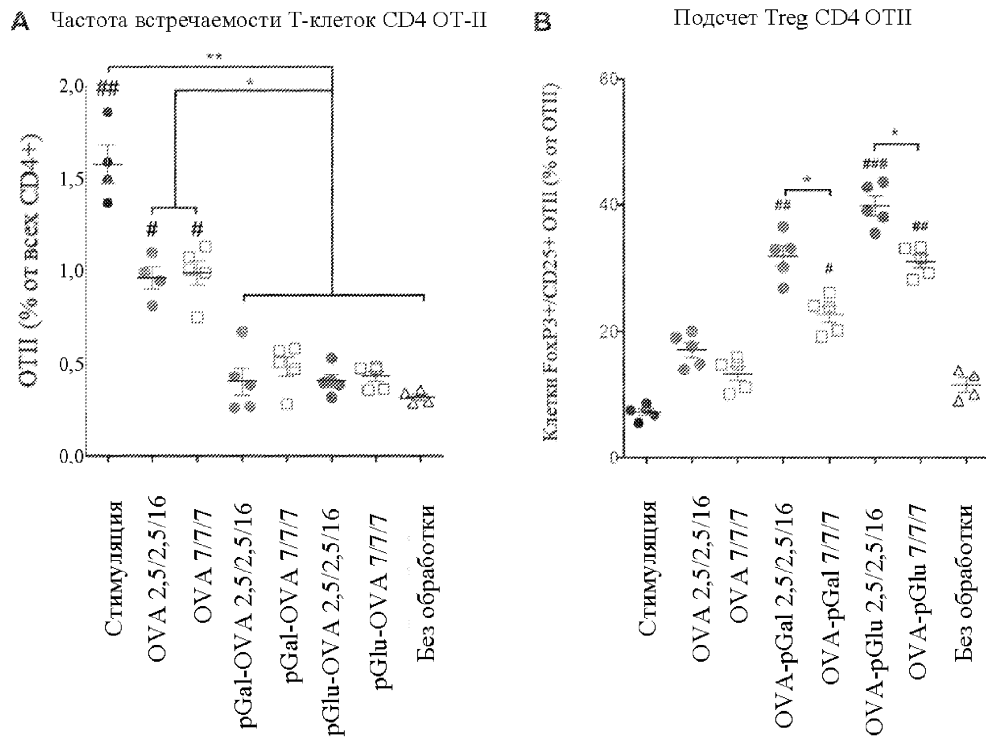
Фиг. 9

## IFNγ<sup>+</sup> на 19-й день исследования

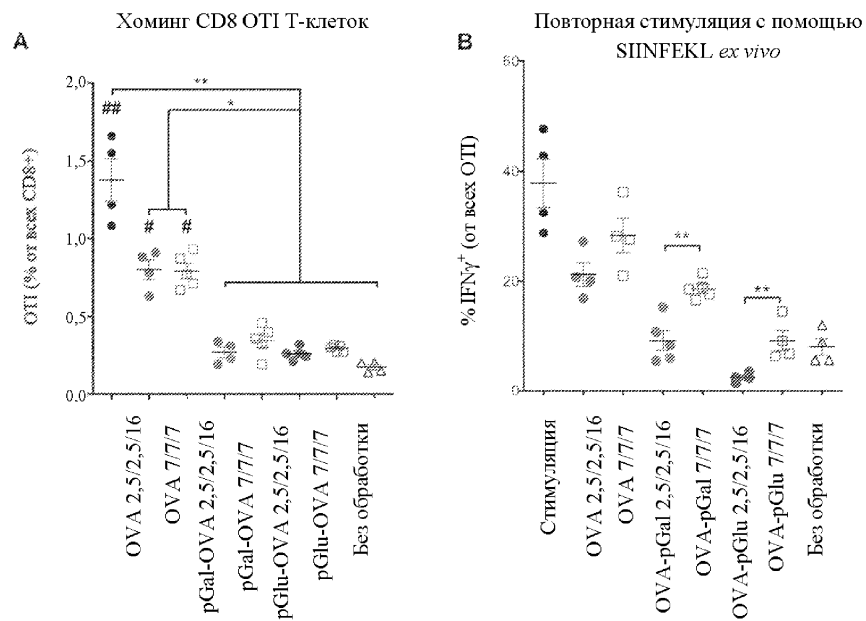


Фиг. 10





Фиг. 11

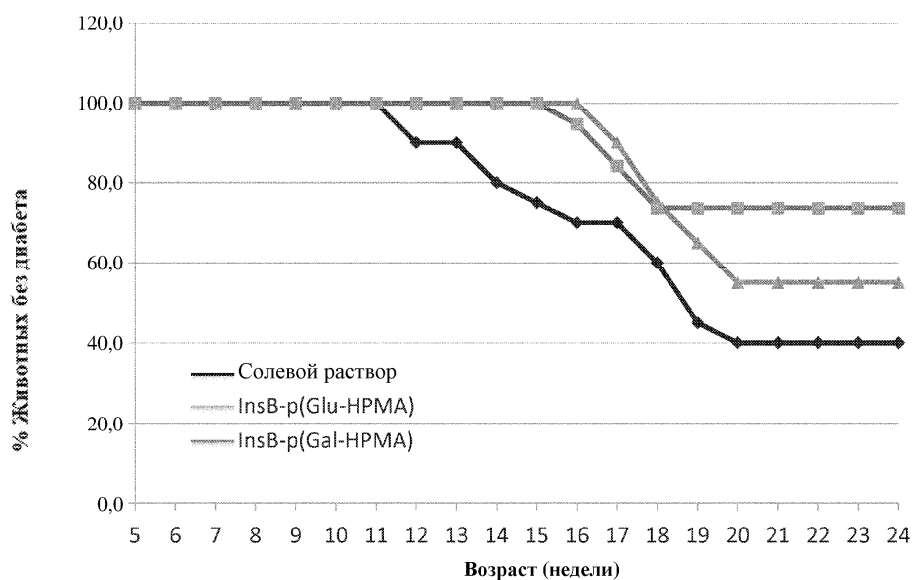


Фиг. 12

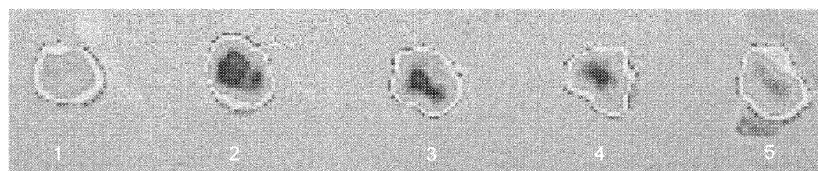
## Исследование BDC2.5



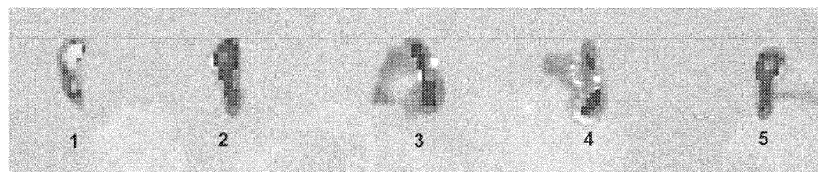
## NOD-модели спонтанного диабета



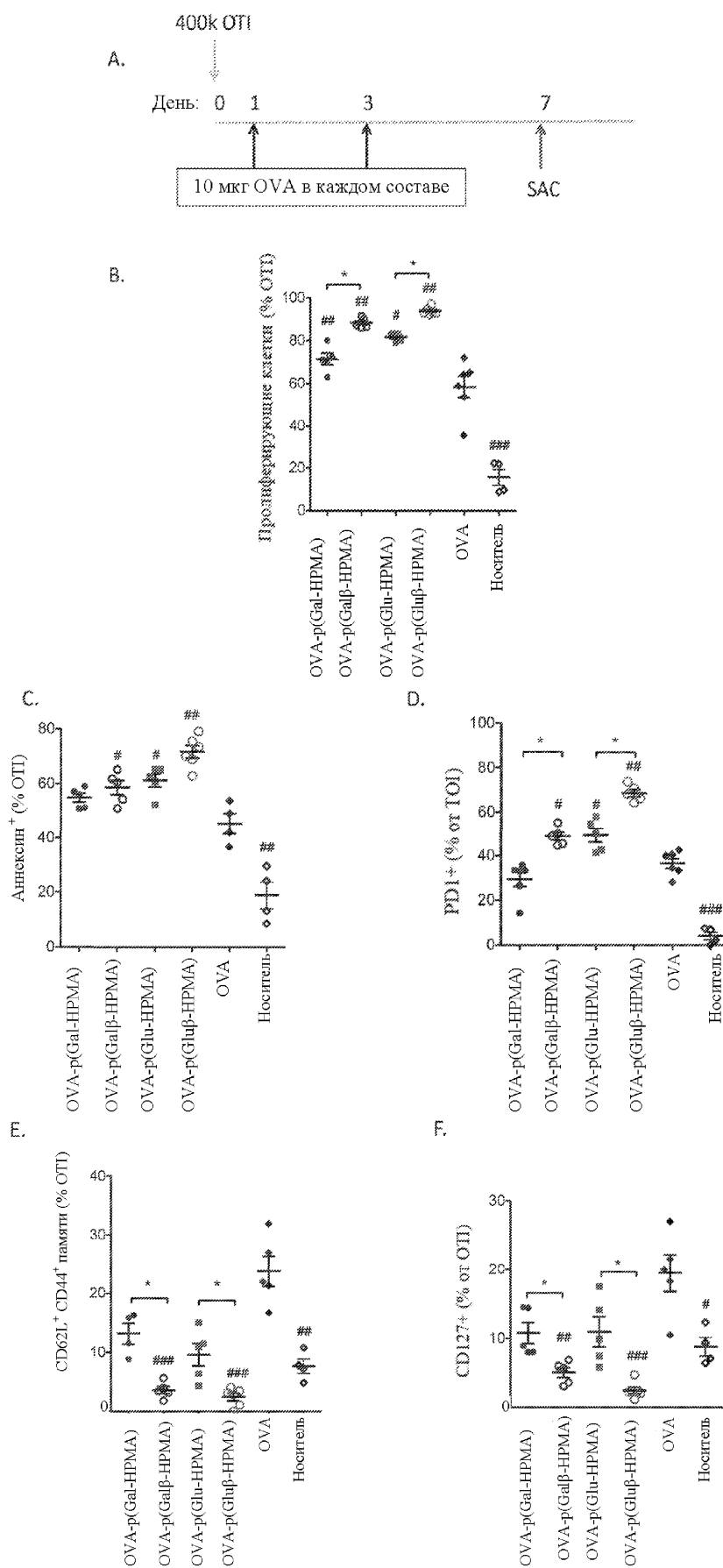
А. Печень



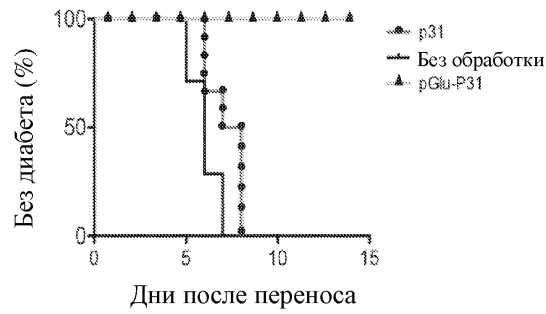
В. Селезенка



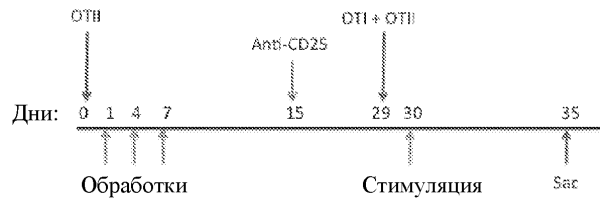
Фиг. 15



Фиг. 16



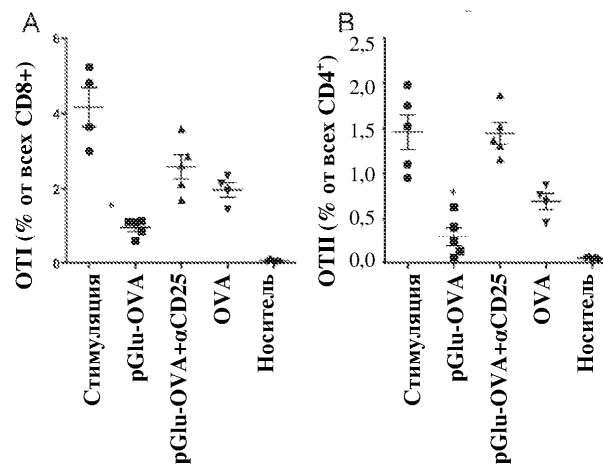
Фиг. 17



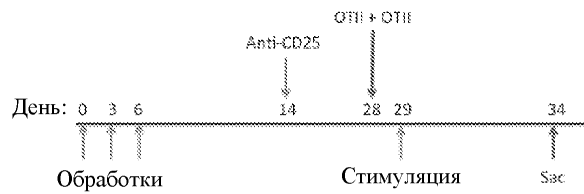
Способы обработки:

1. pGlu-OVA
2. OVA
3. pGlu-OVA + AntiCD25
4. Носитель

Фиг. 18



Фиг. 19



Способы обработки:

1. pGlu-OVA
2. OVA
3. pGlu-OVA + AntiCD25
4. Носитель

Фиг. 20

Высокая доза в 15 мкг или низкая доза в 2,5 мкг pGlu-аспарагиназы (pGlu-ASНазы)

## Взятие крови

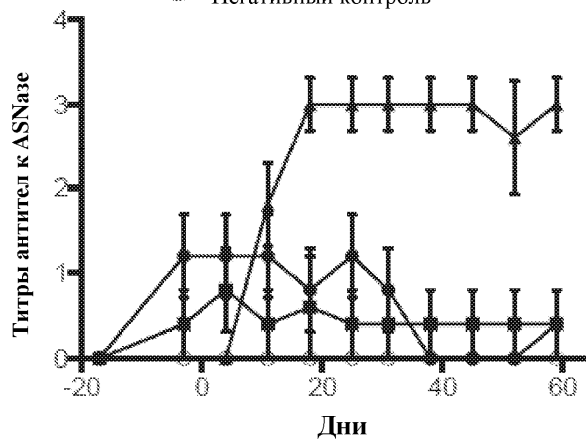
День: 
 

|     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| A   | CA  | A  | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | C |
| 2   | 2   | 2  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4  | 4 |
| -17 | -10 | -3 | 0  | 7  | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 | 49 | 56 | 59 |   |

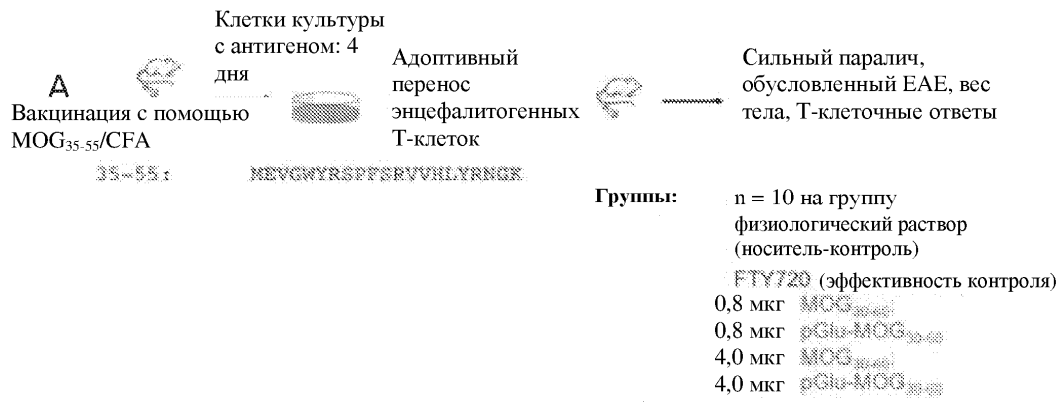
День: 
 

|     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| A   | CA  | A  | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | CB | C |
| ↓   | ↓   | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓  | ↓ |
| -17 | -10 | -3 | 0  | 7  | 14 | 21 | 28 | 35 | 42 | 49 | 56 | 59 |   |

 Низкая доза pGlu-ASНазы  
 Высокая доза pGlu-ASНазы  
 WT-ASНаза  
 Негативный контроль



ФИГ. 23

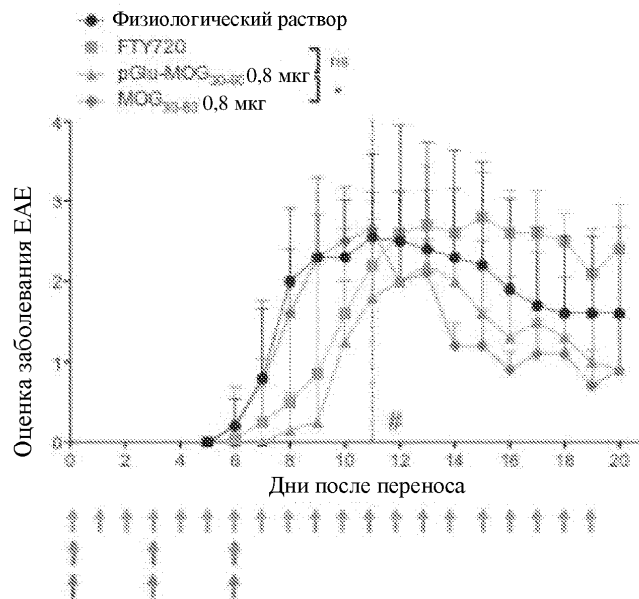


30-60: KNATCMEVGVYRSPPFSEVNVLYRNGKQDQDAE

Фиг. 24

**А**

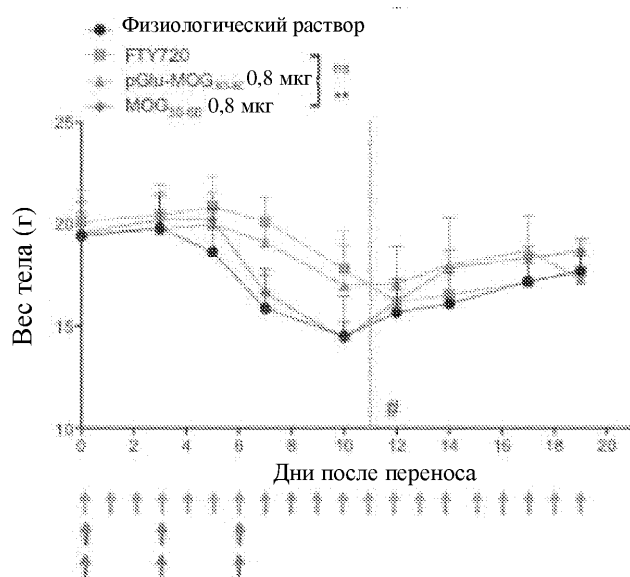
**Замедление возникновения заболевания**



■ День 11 (пик заболевания – контроли)  
5 из 10 умерщвляли и подвергали анализу  
5 из 10 обследовали до окончания исследования

## Снижение потери веса

В

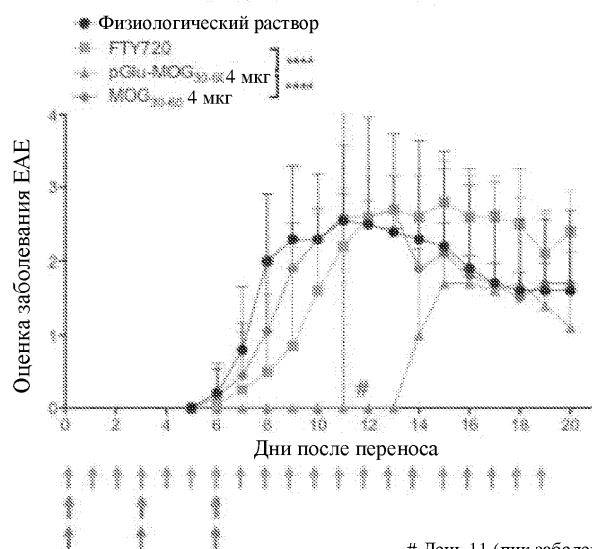


# День 11 (пик заболевания – контроли)  
5 из 10 умерщвляли и подвергали анализу  
5 из 10 обследовали до окончания исследования

Фиг. 25

А

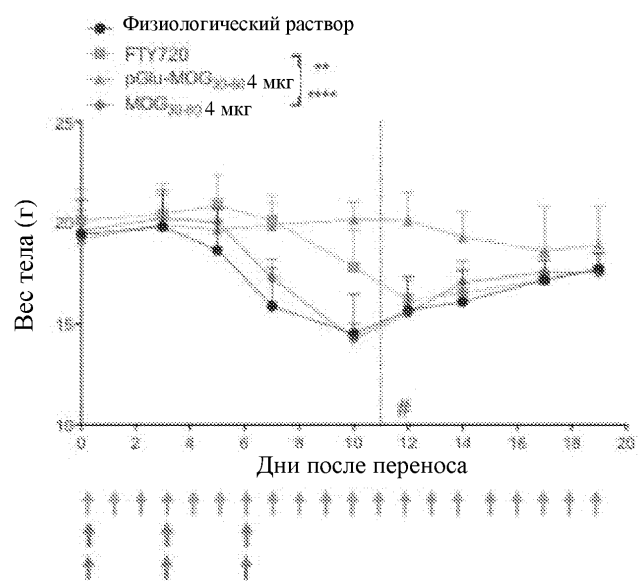
## Замедление возникновения заболевания



# День 11 (пик заболевания – контроли)  
5 из 10 умерщвляли и подвергали анализу  
5 из 10 обследовали до окончания исследования

В

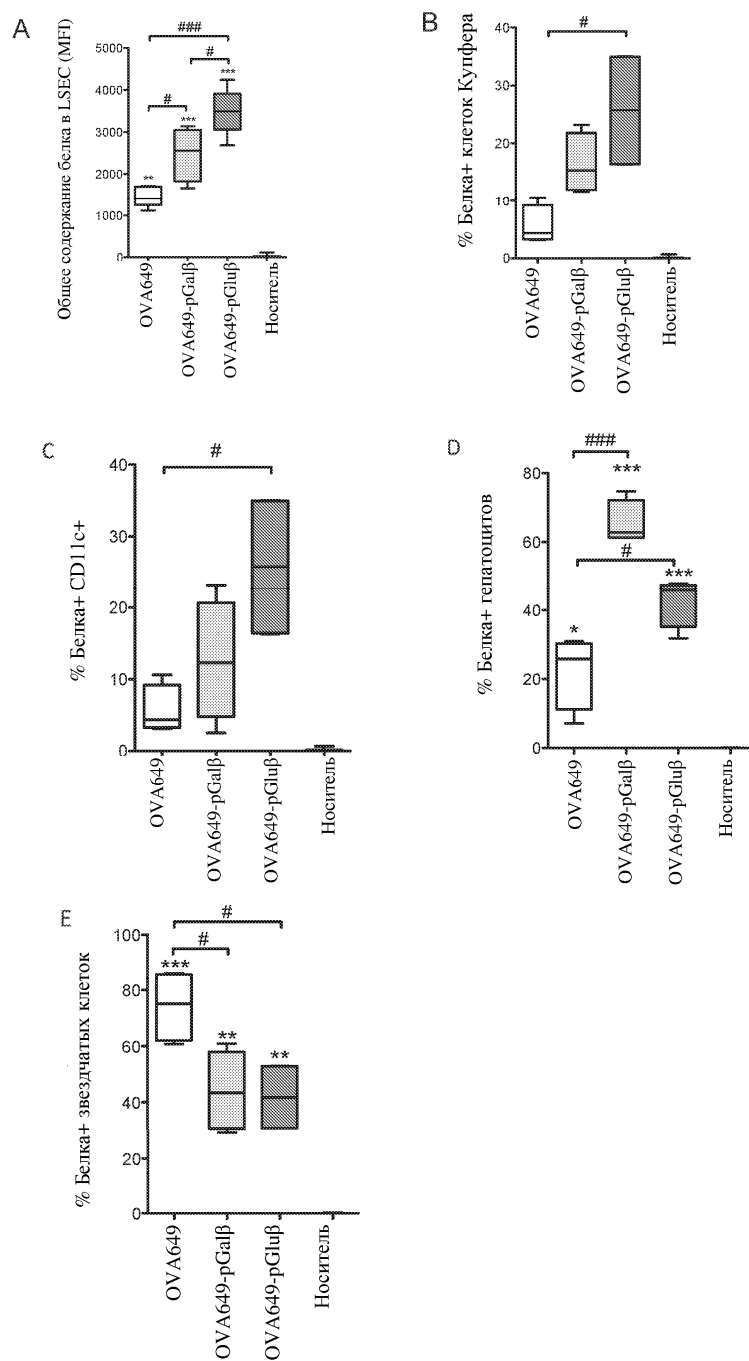
## Снижение потери веса



#День 11 (пик заболевания – контроли)  
 5 из 10 умерщвляли и подвергали анализу  
 5 из 10 обследовали до окончания исследования

Фиг. 26





Фиг. 27

