

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391276 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.31

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.02.20

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА С УГЛЕВОД-ОПОСРЕДОВАННОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКОЙ

(31) 61/942,942

(32) 2014.02.21

(33) US

(62) 201691686; 2015.02.20

(71) Заявитель:
ЭКОЛЬ ПОЛИТЕКНИК ФЕДЕРАЛЬ
ДЕ ЛОЗАН (ЭПФЛ); АНОКИОН СА
(CH)

(72) Изобретатель:

Хаббелл Джеффри А. (US), Конто
Стефан, Лоренц Кристен Мари,
Уилсон Дэвид Скотт, Гай Шунин (CH)

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Терапевтические средства с углевод-опосредованной адресной доставкой применимы при лечении отторжения трансплантата, аутоиммунного заболевания, пищевой аллергии и иммунного ответа против терапевтического средства.

A1

202391276

202391276

A1

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА С УГЛЕВОД-ОПОСРЕДОВАННОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКОЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании находящейся одновременно на рассмотрении предварительной заявки на патент США с серийным № 61/942942, поданной 21 февраля 2014 года, под названием «ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА С УГЛЕВОД-ОПОСРЕДОВАННОЙ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКОЙ», которая этим включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

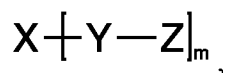
[002] Область техники настоящего раскрытия относится к фармацевтически приемлемым композициям, которые применимы при лечении отторжения трансплантата, аутоиммунного заболевания, пищевой аллергии и иммунного ответа против терапевтического средства.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] 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. Несмотря на положительные результаты, полученные на сегодняшний день при использовании данного подхода, все еще представляет интерес возможность альтернативных подходов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТИЯ

[004] В одном аспекте настоящего раскрытия представлена композиция, предусматривающая соединение формулы 1:



Формула 1

где:

m равняется целому числу 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; и

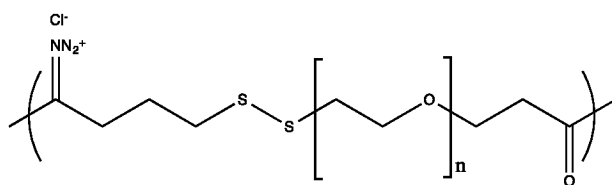
Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень.

[005] Z также может представлять собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин, например, конъюгированные по своим C1, C2 или C6 с Y.

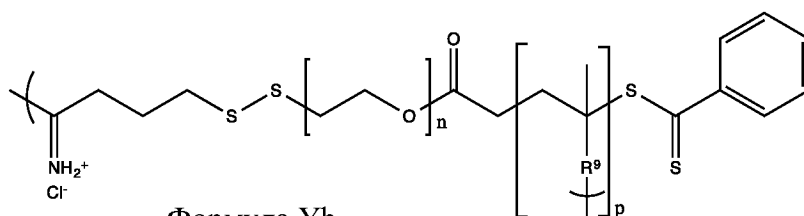
[006] Y может представлять собой Y, выбранный из N-гидроксисукцинамидильных линкеров, линкеров на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновых линкеров, пиридил-дитиол-поли(этиленгликолевых) линкеров, пиридил-дитиольных линкеров, н-нитрофенил-карбонатных линкеров,

линкеров на основе сложных эфиров NHS и линкеров на основе сложных эфиров нитрофенокси-поли(этиленгликоля).

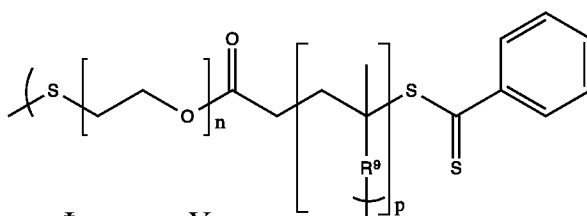
[007] Y также может представлять собой антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают X; дисульфанилэтиловый сложный эфир; структуру, представленную одной из формул Ya - Ye:



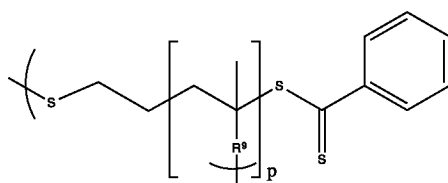
Формула Ya



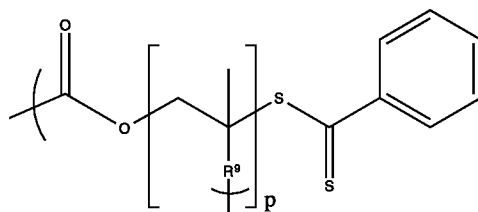
Формула Yb



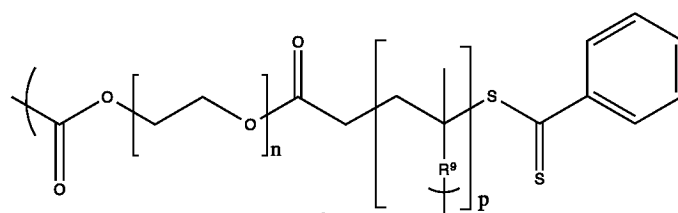
Формула Yc



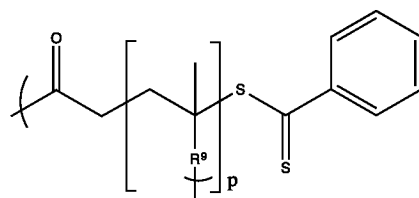
Формула Yd



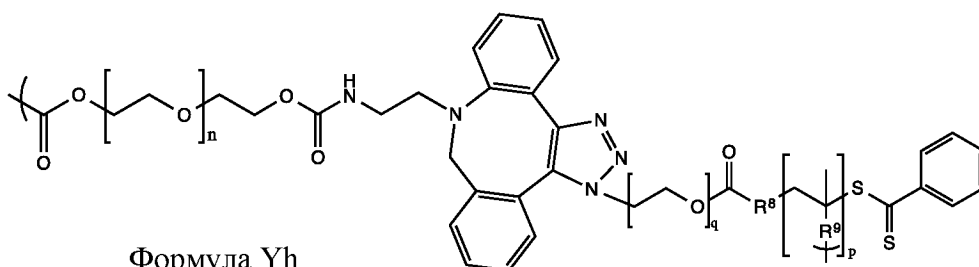
Формула Ye



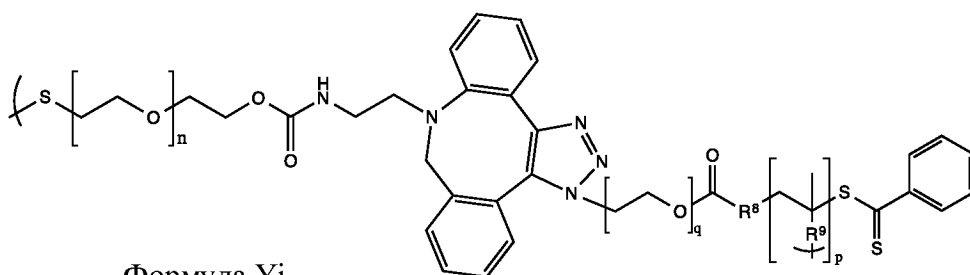
Формула Yf



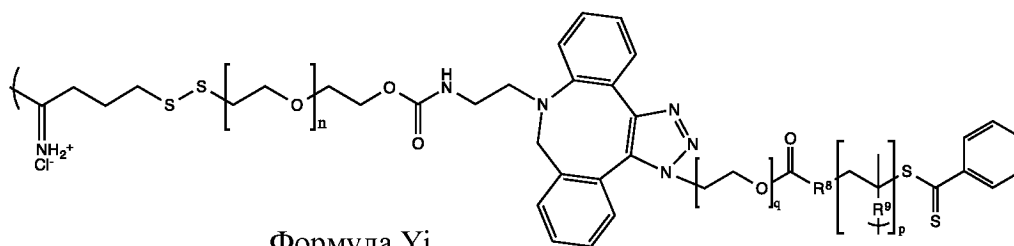
Формула Yg



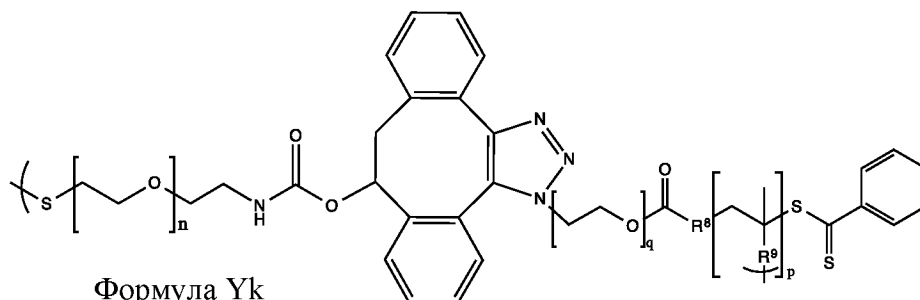
Формула Yh



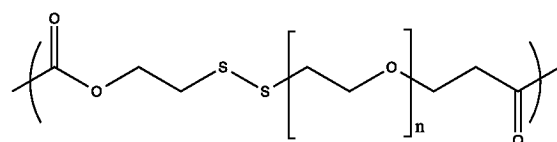
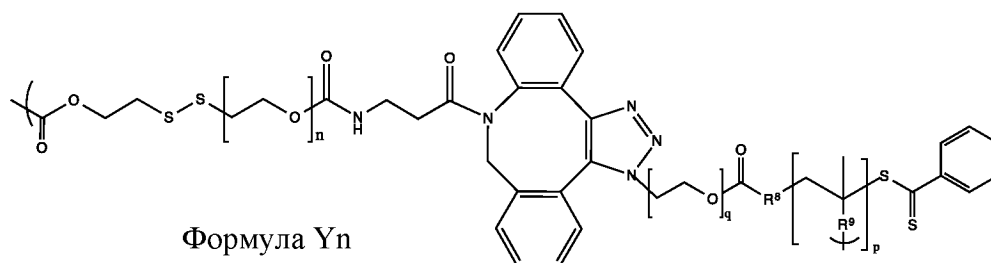
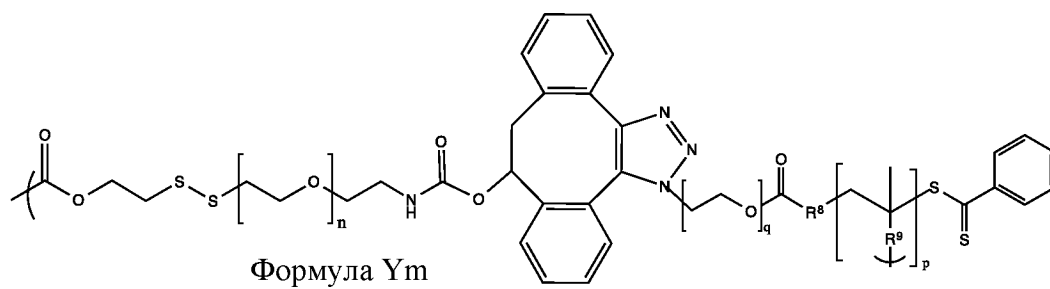
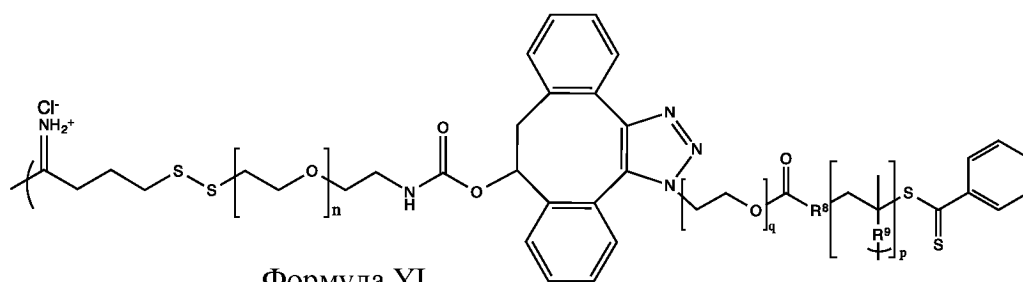
Формула Yi



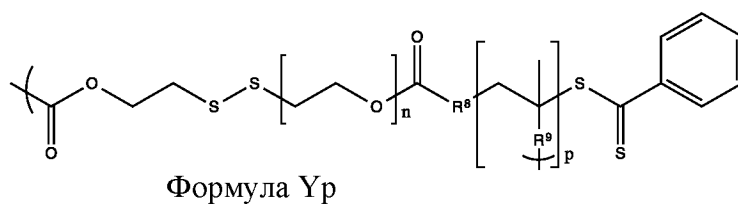
Формула Yj



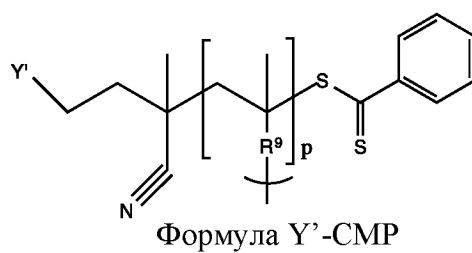
Формула Yk



и



или имеет часть, представленную формулой Y'-CMP:



где левая скобка «(» обозначает связь между X и Y; правая или нижняя скобка и «)» обозначает связь между Y и Z; n равняется целому числу от приблизительно 1 до 100; p равняется целому числу от приблизительно 2 до 150; q равняется целому числу от приблизительно 1 до 44; R⁸ представляет собой –CH₂– или –CH₂–CH₂–C(CH₃)(CN)–; R⁹ представляет собой прямую связь или –CH₂–CH₂–NH–C(O)–; а Y' обозначает остальную часть Y.

[008] В другом аспекте вышеуказанного, n равняется приблизительно 40-80, p равняется приблизительно 10-100, q равняется приблизительно 3-20, R⁸ представляет собой –CH₂–CH₂–C(CH₃)(CN)–; и когда R⁹ представляет собой –CH₂–CH₂–NH–C(O)–, Z представляет собой галактозу или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по своему C1.

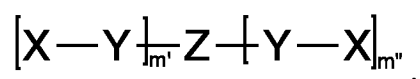
[009] Еще в одном аспекте вышеуказанного, Y предусматривает формулу Ya, формулу Yb, формулу Yh, формулу Yi, формулу Yk, формулу Ym или формулу Yn, в частности, формулу Ya, формулу Yb, формулу Ym или формулу Yn.

[010] 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 из внешней среды, против которого 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.

[011] Настоящее раскрытие 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 отмечалось выше. В таком способе 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 часов после введения. Композицию можно вводить для толеризации пациента в отношении антигенного компонента X.

[012] В еще одном аспекте настоящего раскрытия представлена композиция, предусматривающая соединение формулы 2:



Формула 2

где m' равняется нулю или целому числу от приблизительно 1 до 10, m'' равняется нулю или целому числу от приблизительно 1 до 10, а сумма $m' + m''$ равняется целому числу от приблизительно 1 до 10, но составляет по меньшей мере 1; каждый X представляет собой чужеродный антиген или собственный антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть; каждый 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, при условии, что X не представляет собой интерферон, рибавирин, нексавар/сорафениб, эрбитус/цетуксимаб, авастатин/бевацизумаб или герцептин/трастузумаб, когда $m' + m''$ равняется 1, а Z представляет собой DOM 26h-196-61.

[013] В вышеприведенном аспекте, включающем формулу 2, Z может предусматривать ASGPR-нацеленное антитело, ASGPR-нацеленный фрагмент антитела, ASGPR-нацеленный пептид, ASGPR-нацеленный scFv или другой лиганд для ASGPR. Y может представлять собой линкер с сайтом расщепления для иммунопротеасомы. X может предусматривать группу родственных антигенов, против которых у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или группу их толерогенных фрагментов. Например, X может быть выбран из групп, содержащих:

- два или более из инсулина, проинсулина, препроинсулина, глутаматдекарбоксилазы-65, GAD-67, глюкозо-6-фосфатазы 2, ассоциированного с инсулиновой белка 2, ассоциированного с инсулиновой белка 2 β , ICA69, ICA12, карбоксипептидазы H, имогена 38, GLIMA 38, хромогранина-A, HSP-60, карбоксипептидазы E, периферина, переносчика глюкозы 2, ассоциированного с гепатокарциномой-кишечником-поджелудочной железой/панкреатического белка, S100 β , фибриллярного кислого белка глии, регенерирующего гена II, панкреатического дуоденального гомеобокса 1, протеинкиназы миотонической дистрофии, белка, родственного каталитической субъединице островков-специфичной глюкозо-6-фосфатазы, и SST рецепторов 1-5, сопряженных с G-белком;
- два или более из основного белка миелина, гликопротеина миелина олигодендроцитов, протеолипидного белка миелина, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17; и
- два или более из SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27.

[014] Настоящее раскрытие также относится к способу лечения нежелательного иммунного ответа против антигена путем введения млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении, эффективного количества композиции, предусматривающей соединение формулы 2, как отмечалось выше. В таком способе 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 часов после введения. Композицию можно вводить для толеризации пациента в отношении антигенного компонента X.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[015] Фиг. 1 представляет собой серию графиков, на которых показано, что конъюгат галактозы [F1aA-PE-m₄-n₈₀ (Gal-PE)] предпочтительно адресно доставляет OVA в клетки печени, включающие следующее: (A.) синусоидальные эндотелиальные клетки (LSEC), (B.) клетки Купфера (KC), (C.) гепатоциты и (D.) другие антиген-презентирующие клетки (APC).

[016] Фиг. 2 представляет собой график, на котором показана пролиферация OTI CD8⁺ Т-клеток у мышей, обработанных с помощью F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA), OVA или физиологического раствора (т.е. без воздействия).

[017] Фиг. 3 представляет собой серию графиков, на которых показана процентная доля OT-I CD8⁺ Т-клеток, презентующих маркеры клеточной поверхности (A.) PD-1⁺ и (B.) аннексин-V⁺ у поколений пролиферирующих Т-клеток, обработанных с помощью физиологического раствора, OVA или F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (GAL-OVA).

[018] Фиг. 4 представляет собой график, на котором показано, что конъюгат галактозы [F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA)] снижает иммуногенность OVA, как

определено с помощью титров OVA-специфичного антитела (показано в $\log^{-1}$ титра Ab).

[019] На фиг. 5 показано, что F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA) способен истощать OVA-специфичные антитела в сыворотке.

[020] На фиг. 6 показано, что F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄ (pGal-OVA) и N'-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C' (Dom-OVA) способны ослаблять OVA-специфичный иммунный ответ в дренирующих лимфатических узлах после внутрикожной стимуляции с помощью OVA и адъюванта LPS.

[021] На фиг. 7 показаны характеристики F1aA-OVA-m₄-n₈₀ и F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄. (A). Осциллограммы эксклюзионной HPCL F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (пурпурный), F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄ (синий) и неконъюгированного OVA (черный). Сдвиг влево отражает увеличение молекулярной массы. (B.) Полиакриламидный гель, где показано увеличение молекулярной массы после конъюгации OVA: (1.) неконъюгированный OVA, (2.) F1aA-OVA-m₄-n₈₀ и (3.) F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄.

[022] Фиг. 8 представляет собой график, на котором показано нормализованное количество N-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA), N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (DOM-OVA) или N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA-DOM) в кровотоке мышей после инъекции в виде *i.v.* болюсной дозы.

[023] Фиг. 9 представляет собой серию графиков, на которых изображен титр IgG-антител против OVA в кровотоке отдельных мышей после обработки с помощью физиологического раствора, DOM и OVA, DOM-OVA или OVA-DOM. Выработку IgG против OVA индуцировали *i.v.* инъекциями OVA отдельно (a) или OVA и CpG-B (b). Время осуществления обработки обозначено с помощью вертикальных пунктирных линий. Титр рассчитывали как $\log_{10}$ максимального кратного разведения плазмы с детектируемым IgG против OVA.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[024] Два общеизвестных асиалогликопротеиновых рецептора («ASGPR») экспрессируются на гепатоцитах и синусоидальных эндотелиальных клетках 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]. 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. Подразумевается, 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 антиген-специфичной толерантности.

[025] Одним из отличительных признаков поверхности эритроцита является ее гликозилирование, т.е. наличие значительного количества гликозилированных белков. В этой связи, 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.

[026] До настоящего момента специалистам в данной области было понято, что гликозилирования терапевтического средства таким образом, который приводит к адресной доставке в печень, следует избегать, поскольку клиренс при первом прохождении через печень приводит к сниженному периоду полужизни терапевтического средства в кровотоке. К тому же, некоторые моноклональные антитела необходимо специфически гликозировать по ASN297 для оптимального связывания с их Fc-рецепторами. Теперь неожиданно было обнаружено, что можно применять галактозилирование таким образом, чтобы индуцировать толерогенез.

[027] В настоящем раскрытии 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 специфичного 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), с помощью другого компонента для адресной доставки в печень (например, моноклонального антитела, или его фрагмента, или scFv), или посредством десилирования полипептида, для которого требуется такая адресная доставка в печень. Галактозилированный или другой компонент для адресной доставки в печень может быть химически конъюгирован или рекомбинантно слит с

антигеном, при этом десИАлирование обнажает галактозо-подобный 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 из внешней среды, против которых 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, аутоиммунное 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 раскрытию можно применять для лечения нежелательного иммунного ответа, например, отторжения трансплантата, иммунного ответа против терапевтического средства, аутоиммунного заболевания и/или аллергии. Также представлены фармацевтические композиции, содержащие терапевтически эффективное количество композиции по настоящему раскрытию, 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.

[028] Определения

[029] 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.

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

[031] 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.

[032] «Антиген» представляет собой любое вещество, которое служит в качестве мишени для рецепторов при адаптивном иммунном ответе, таких как Т-клеточный рецептор, В-клеточный рецептор или антитело. Антиген может образовываться в пределах организма («собственный», «ауто» или «эндогенный»). Антиген может образовываться вне организма («не-собственный», «чужеродный» или «экзогенный») и поступать, например, путем вдыхания, проглатывания, инъекции или трансплантации. Чужеродные антигены включают без ограничений пищевые антигены, антигены животного происхождения, антигены растительного происхождения, антигены из внешней среды, терапевтические средства, а также антигены, которые присутствуют на аллогенном трансплантате.

[033] «Антиген-связывающая молекула», как используется в данном документе, относится к молекулам, в частности к белкам, таким как молекулы

иммуноглобулина, которые содержат переменные области антитела, обеспечивающие специфичное связывание с эпитопом. Переменная область антитела может присутствовать, например, в полном антителе, фрагменте антитела и рекомбинантном производном антитела или фрагмента антитела. Термин «антиген-связывающий фрагмент» антитела (или «связывающая часть»), как используется в данном документе, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связывать последовательность-мишень. Антиген-связывающие фрагменты, содержащие переменные области антитела, включают (без ограничений) области «Fv», «Fab» и «F(ab')₂», «однодоменные антитела (sdAb)», «нанотела», «одноцепочечные Fv (scFv)» фрагменты, «тандемные scFv» (V_HA-V_LA-V_HB-V_LB), «диатела», «триатела» или «тритела», «одноцепочечные диатела (scDb)» и «биспецифичные фрагменты, связывающие Т-клетки (BiTE)».

[034] «Химическая модификация» относится к изменению химической структуры одной или более встречающихся в природе аминокислот полипептида. Такие модификации можно проводить в 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.

[035] 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.

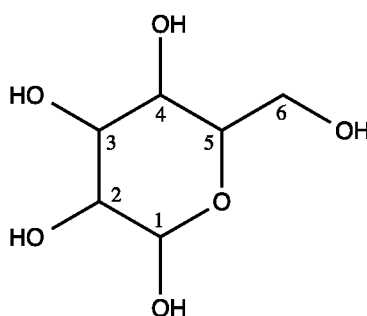
[036] «Консервативные изменения» в целом можно производить в аминокислотной последовательности без изменения активности. Эти изменения называются «консервативными заменами» или мутациями; то есть аминокислоту, принадлежащую к группе аминокислот с определенным размером или характеристиками, можно заменить 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 -NH₂. 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 -NH₂ 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 варианте, который можно применять согласно настоящему изобретению, может присутствовать суммарно до 200 (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) изменений в аминокислотной последовательности (т.е. замен, вставок, делеций, N-терминальных усечений и/или C-терминальных усечений). 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.

[037] Термины «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относятся к такому количеству композиции по настоящему раскрытию, 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 раскрытию, схемы приема, которой необходимо следовать, продолжительности введения, способа введения и т. п., все из которого может без труда определить обычный специалист в данной области.

[038] «Эпитоп», также известный как антигенная детерминанта, представляет собой сегмент макромолекулы, например белка, который распознается адаптивной иммунной системой, например, антителами, В-клетками или Т-клетками. Эпитоп представляет собой именно ту часть или сегмент макромолекулы, которые способны связываться с антителом или его антиген-связывающим фрагментом. В данном контексте термин «связывающий», в частности, относится к специфичному связыванию. В контексте настоящего изобретения предпочтительно, что термин «эпитоп» относится к сегменту белка или полипротеина, который распознается иммунной системой.

[039] Термин «галактоза» хорошо известен в данной области техники и 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 (α -D-галактопиранозе). Структура и нумерация галактозы проиллюстрирована ниже.



[040]

[041] 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.

[042] 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 компонентом, десилирования антигена или лиганда для обнажения нижележащих галактозильных компонентов, рекомбинантного слияния или химической конъюгации антигена или лиганда с ASGPR-связывающим компонентом или специфичного связывания эндогенного антитела с антигеном или лигандом, при этом антиген или лиганд являются: десилированными для обнажения галактозильных компонентов, конъюгированными с галактозилированным компонентом или рекомбинантно слитыми или химически конъюгированными с ASGPR-связывающим компонентом. Встречающиеся в природе десилированные белки не охватываются объемом настоящего раскрытия.

[043] «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, ± 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) 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 « ± 3 » раскрывают и обеспечивают конкретную поддержку эквивалентных диапазонов во всех случаях их применения.

[044] 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.

[045] Пептид, который специфически связывает определенную мишень, называется «лигандом» для этой мишени.

[046] «Полипептид» является термином, который относится к цепи из аминокислотных остатков, вне зависимости от пост-трансляционной 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 «антиген-связывающей молекулой», «антителом», «фрагмент 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.

[047] 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.

[048] 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 раскрытию, находятся не в своей естественной среде. Выделенные продукты по настоящему раскрытию, 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.

[049] Термин «идентичность последовательности» используется в отношении сравнения полипептидных последовательностей. Данное выражение, в частности, относится к процентной доле идентичности последовательностей, 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.

[050] «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.

[051] 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.

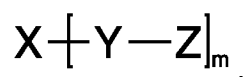
[052] Термин «нежелательный иммунный ответ» относится к реакции иммунной системы субъекта, которая в данной ситуации не является желательной. Реакция иммунной системы является нежелательной, если такая реакция не приводит к предотвращению, уменьшению или излечению заболевания или расстройства, но вместо этого вызывает, усиливает или ухудшает расстройство или заболевание. 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.

[053] Термин «вариант» следует понимать, как белок, который в сравнении с белком, от которого он происходит, отличается одним или более изменениями в его длине, последовательности или структуре. Полипептид, из которого получен 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, можно 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, т.е. является функционально активным. Вариант может характеризоваться определенной степенью идентичности последовательности с исходным полипептидом, из которого он получен. Точнее говоря, в контексте настоящего раскрытия 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.

[054] Композиции

[055] Один аспект настоящего раскрытия относится к композициям, фармацевтическим составам и способам лечения с использованием таких композиций, которые представлены формулой 1:



Формула 1

где:

m равняется целому числу 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;

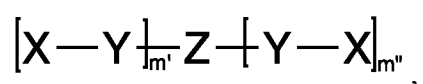
Y представляет собой линкерный компонент или прямую связь, или антитело, фрагмент антитела, пептид или другой лиганд, которые специфически связывают X ; и

Z представляет собой компонент для адресной доставки в печень, в частности, галактозилированный 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 или галактозилированный 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 в композициях формулы 1 так, чтобы облегчить поглощение клетками печени. В фармацевтических составах и способах по настоящему раскрытию могут использоваться смеси из композиций формулы 1, соответственно несущих различные компоненты X (например, несколько эпитопов, ассоциированных с определенным нежелательным иммунным ответом).

[056] 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 из внешней среды, против которого 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_p; и/или где Z представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин, как проиллюстрировано формулами 1a - 1p, как описано ниже со ссылкой на схемы реакций.

[057] В настоящем раскрытии дополнительно представлена фармацевтически приемлемая композиция, представленная формулой 2:



Формула 2

где:

m' равняется нулю или целому числу от приблизительно 1 до 10, m'' равняется нулю или целому числу от приблизительно 1 до 10, а сумма m' + m'' равняется целому числу от приблизительно 1 до 10, но составляет по меньшей мере 1;

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 ASGPR-нацеленное антитело, ASGPR-нацеленный фрагмент антитела, ASGPR-нацеленный пептид, ASGPR-нацеленный scFv или другой лиганд для ASGPR,

при этом такая композиция необязательно включает аминокислотные последовательности для облегчения выделения и очистки [например, «His-метку» или «6xHis» с последовательностью HHHHHH (SEQ ID NO:1) и дополнительные линкеры [например, «Gly₃Ser» с последовательностью GGGS (SEQ ID NO:2)]. В композициях формулы 2, где m' + m'' составляет больше единицы, компоненты X могут быть одинаковыми или различными, и компоненты Y могут быть одинаковыми или различными. Значение m' + m'' будет меньше (например, 3 или меньше), когда X представляет собой полный белок, или больше (вплоть до приблизительно 10), когда X представляет собой пептид. Линкер(ы) «Y» может преимущественно содержать сайт расщепления, в частности сайт расщепления для иммунопротеасомы.

[058] Композиции формулы 2 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 из внешней среды, против которого 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).

[059] В качестве альтернативы, в композициях формулы 1 и/или формулы 2 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.

[060] Композиции формулы 2 можно получать в виде слитых белков, и они могут включать несколько компонентов, применимых при их получении и очистке, таких как сигнальная или лидерная последовательность, которая направляет экспрессированный полипептид по специфичному транспортному пути и впоследствии отщепляется от полипептида; таким образом, сигнальная последовательность может представлять собой часть экспрессированного белка и кодирующей его ДНК, но не является частью конечной композиции. Одним примером сигнальной последовательности млекопитающих, применяемой в системах экспрессии, является последовательность к-цепи Ig, которая приводит к секреции белка: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:3). Аналогично, одним примером обычной бактериальной сигнальной последовательности, применяемой в системах экспрессии, является сигнальная последовательность *pelB*, которая направляет экспрессированный белок в бактериальную периплазму: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO:4).

[061] Антигены

[062] Антиген, используемый в качестве X в композициях формулы 1 и/или формулы 2, 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.

[063] Антигены, которые используются при осуществлении настоящего раскрытия 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 неприродные (т.е. сконструированные) белки, антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и связывающие каркасы, на относящиеся к антителам, такие как фибронектины, белки DARPin, пептиды knottin 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 раскрытию, 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 из внешней 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 раскрытия 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 из внешней 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 раскрытию, 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 десилилированным.

[064] В вариантах осуществления, где антиген представляет собой терапевтический белок, пептид, антитело или антитело-подобную молекулу, специфичные антигены могут быть выбраны из: абатацепта, абциксимаба, адалимумаба, аденозиндезаминазы, адо-трастузумаб-энтанзина, агалсидазы-альфа, агалсидазы-бета, альдеслейкина, алглюцеразы, алглюкозидазы-альфа, ингибитора α -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, C1-ингибитора эстеразы, канакинумаба, карбоксипептидазы G2 (глюкарпидазы и вораксазы), цертолизумаб-пегола, цетуксимаба, коллагеназы, иммунного Fab к Crotalidae, дарбэпоэтина- α , 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, имиглоцеразы, 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, Пэг-аспарагиназы, Пэг-доксорубицина HCl, ПЭГ-эпоэтина- β , пэгфилграстима, Пэг-интерферона- $\alpha 2a$, Пэг-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-антитела, которые, как правило, представляют собой моноклональные IgG или их фрагменты или слитые конструкции.

[065] Конкретный терапевтический белок, пептид, антитело или антитело-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 антитела IgG в их различных форматах.

[066] 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.

[067] 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 МНС класса I и МНС 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.

[068] 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 инсулиномой белок 2 (IA-2) и ассоциированный с инсулиномой белок 2 β (IA-2 β); 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, S100 β , 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 по настоящему раскрытию используют рекомбинантную форму.

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

MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY
LVCGERGFFY TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPL
ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN (SEQ ID NO:5).

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

MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGI
GNKLCALLYG DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPC
SCSKVDVNIA FLHATDLLPA CDGERPTLAF LQDVMNILLQ
YVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA DQPQNLEEIL
MHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTA
NTNMFTYEIA PVFVLLEYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFS
PGGAISNMYA MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH
SHFSLKKGAA ALGIGTDSVI LIKCDERGKM IPSDLERRIL EAKQKGFVPF
LVSATAGTTV YGAFDPLLAV ADICKKYKIW MHVDAAWGGG
LLMSRKHKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV PLQCSALLVR
EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSYDTG DKALQCGRHV
DVFKLWLMWR AKGTTGFEAH VDKCLELAEY LYNIIKNREG
YEMVFDGKPQ HTNVCFWYIP PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA
PVIKARMMEY GTTMVSYQPL GDKVNFFRMV ISNPAATHQD
IDFLIEEIER LGQDL (SEQ ID NO:6).

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

MDFLHRNGVLIIQHLQKDYRAYYTFLNFM SNVGDPRNIFFIYFPLCFQFN
QTVGTKMIWVAVIGDWLNLIFKWILFGHRPYWWVQETQIYPNHSSPCLE
QFPTTCETGPGSPSGHAMGASCVWYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHR
LTWSFLWSVFWLIQISVCISRVFIATHFPHQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGI
QTASLGTYLKTNLFLFLFAVGFYLLLRVLNIDLLWSVPIAKKWCANPDWI
HIDTTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLLSRGGNNTLSFRLLCALTS
LTIQLYHFLQIPTHEEHLYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLMKQSG
KKSQ (SEQ ID NO:7).

- При аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, в том числе тиреоидите Хашимото и болезни Грейвса, основные антигены включают тиреоглобулин (TG), тиреоидную пероксидазу (TPO) 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 α -гидроксилазу и P450-фермент расщепления боковой цепи (P450scs); другие антигены включают АСТН-рецептор, P450c21 и P450c17.
- При преждевременном угасании функции яичников основные антигены включают FSH-рецептор и -енолазу.
- При аутоиммунном гипопизите или аутоиммунном заболевании гипопиза основные антигены включают гипопиз-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 миелина олигодендроцитов («MOG») и протеолипидный белок миелина («PLP»).

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

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEA
DANQNNGTSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLF SRD
APGREDNTFKDRPSESEDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKY
LATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHP
ARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSR
FSWGAEGQRPFGFYGGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLSKIFKLGG RDS
RSGSPMARR (SEQ ID NO:8).

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

MASLSRPSLPSC LCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHP IRALVGDEVELP
CRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRG RTTEL
LKDAIGEGKVTLRIRNVRFSDGGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFY
WVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQYRLRGKLR AEIENLHRTFDP
HFLRVPCWKITL FVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF
(SEQ ID NO:9).

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

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIET
YFSKNYQDY EYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQ
IFGDYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHS LERVCHCLGKWLG

HPDKFVGITYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTTCQSIAFPSKTSASIG
SLCADARMYGVLPWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGA
AATLVSLTTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF (SEQ ID NO:10).

- Пептиды/эпитопы, применимые в композициях по настоящему раскрытию для лечения рассеянного склероза, включают некоторые или все из следующих последовательностей, индивидуально в композициях формулы 1, вместе в смеси из композиций формулы 1 или слитые в одну или более композиций формулы 2:
 - MBP13-32: KYLATASTMDHARHGFLPRH (SEQ ID NO:11);
 - MBP83-99: ENPWHFFKNIVTPRTP (SEQ ID NO:12);
 - MBP111-129: LSRFSWGAEGQRPGFGYGG (SEQ ID NO:13);
 - MBP146-170: AQGTLSKIFKLGGDRSGSPMARR (SEQ ID NO:14);
 - MOG1-20: GQFRVIGPRHPIRALVGDEV (SEQ ID NO:15);
 - MOG35-55: MEVGWYRPPFSRWHL YRNGK (SEQ ID NO:16); и
 - PLP139-154: HCLGKWLGHDPDKFVGI (SEQ ID NO:17).
- 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 трансглютаминазу и природные и деамидированные формы глютена или глютенотипных белков, таких как альфа-, гамма- и омега-глиадин, глютеин, гордеин, 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 тирозиназе белок 1 и 2.

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

MPREDAHFIYGYPPKKGHGHSTTAEEAAGIGILTVILGVLLIGCWYCRR
RNGYRALMDKSLHVGTVQCALTRRCPQEGFDHRDSKVSLQEKNCPEVVP
NAPPAYEKLSEQSPPPYSP (SEQ ID NO:18).

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

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQL
SGRGSCQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFN
CGNCKFGFWGPNCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDY
VIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFVWMHYVSMALLGGSEIWRDI

DFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRDAEKCDIC
TDEYMGGQHPTNPNNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYN SHQSLCNGTPEGPL
RRNPGNHDKSRTPLRPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGF
ASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFFVDSIF
EQWLRRHRPLQE VYPEANAPIGHNRESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGY
DYSYLQDSDPDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGL
VSLLCRHKRKQLPEEKQPLLMEKEDYHSLYQSHL (SEQ ID NO:19).

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

MDLV LKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRLRTKAWN RQ
LYPEWTEAQRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKV
LPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVPYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQ
KRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGHTTMEVTVYHRR
GSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFAL
QLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVV
LQAAIPLTSCGSSPVP GTTDGHRPTAEAPNT_{метку}QVPTTEVVGTTPGQAP
TAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAE
MSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDA
SSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQG
IESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRLCQP
VLPSACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGL
GQVPLIVGILLVLMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIF
CSCPIGENSPLLSGQQV (SEQ ID NO:20).

- 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, десмоколлины, 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 эндомиций 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, цистеин-сульфиновая кислота декарбоксилазу, 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 нейромиелите зрительного нерва основной антиген представляет собой AQP4.

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

MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIF
VLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMVLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPA
VTVAMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTM
VHGNLметкуHGLLVELIITFQLVFTIFASCDKRTDVTGSIALAIGFSVAIG
HLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGPIIGAVLAGGLYE
YVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGV
VHVIDVDRGEEKKGKDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:21).

- При увеите основные антигены включают S-антиген сетчатки или «S-аррестин» и межфоторецепторный ретинол-связывающий белок (IRBP) или ретинол-связывающий белок 3.

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

```

MAASGKTSKS      EPNHVIFKKI      SRDKSVTIYL      GNRDYIDHVS
QVQPV DGVVL      VDPDLVKGKK      VYVTLTCAFR      YGQEDIDVIG
LTFRRDL YFS      RVQVYPPVGA      ASTPTKLQES      LLKKLGSNTY
PFLTTFPDYL      PCSVMLQPAP      QDSGKSCGVD      FEVKAFATDS
TDAEEDKIPK      KSSVRLLRK      VQHAPLEMGP      QPRAEAAWQF
FMSDKPLHLA      VSLNKEIYFH      GEPIVTVTV      TNNTEKTVKK
IKAFVEQVAN      VVLYSSDY YV      KPVAMEEAAQE      KVPPNSTLTK
TLTLLPLLAN NRERRGIALD GKI KHEDTNL ASSTIIKEGI DRTVLGILVS
YQIKVKLTVS      GFLGELTSSE      VATEVPFRLM      HPQPEDPAKE
SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAE EGKRDK NDVDE (SEQ ID NO:22).

```

○ IRBP, в том числе экзогенно полученная форма, применяемая в композициях по настоящему раскрытию, имеет следующую последовательность (UNIPROT P10745):

```

MMREWVLLMSVLLCGLAGP THLFQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLG
MQEAIQQA IKSHEILSISDPQTLASVLметкиVQSSLNDPRLVISYEPSTPEPP
PQVPALTS LSEEELLAWLQRGLRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMM
GEFLVAHVWGNLMGTSALVLDLRHCTGGQVSGIPYIISYLHPGNTILHVD
TIYNRPSNTTTEIWTL PQVLGERYGADKD VVVLTSSQTRGVAEDIAHILK
QMRRAIVVGERTGGGALDLRKL RIGESDFFFTVPVSRSLGPLGGGSQTWE
GSGVLPCVGT PAEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLKDYYTLVDR
VPTLLQH LASMDFSTV VSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETP
SWPAPDAAAEDSPGVAPELPEDEAIRQALVDSVFQVS VLPGNVGYLRFD
SFADASVLGVLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRHNPGGPSSAVPLLLS
YFQGPEAGPVHLFTTYDRRTNITQE HFSHMELPGPRYSTQRGVYLLTSHR
TATAAE EFAFLMQSLGWATLVGEITAGNLLHTRTVPLLDTPEGSLALTVP
VLT FIDNHGEAWLGGGVVPDAIVLAEEALDKAQEVLEFHQSLGALVEGT

```

GHLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGAYRTAVDLESLASQLTADLQ
 EVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEVLPGQ
 LGYLRFDAMAELETVKAVGPQLVRLVWQQQLVDTAALVIDLRYNPGSYS
 TAIPLLCSYFFEAEPQHLYSVFDRATSKVTEVWTLQPQVAGQRYGSHKD
 LYILMSHTSGSAAEFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSSPL
 YASMPTQMAMSATTGKAWDLAGVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRAKV
 PTVLQTAGKLVADNYASAELGAKMATKLSGLQSRYSRVTSEVALAEILG
 ADLQMLSGDPHLKAHIPENAKDRIPGIVPMQIPSPVEFEELIKFSFHTNV
 LEDNIGYLRFDMMFGDGELLTQVSRLLEHIVKKIMHTDAMIIDMRFNIGG
 PTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKKS
 MVILTSSVTAGTAEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNL
 YLTIPTARSVGASDGSSWEGVGVTTPHVVPAAEEALARAKEMLQHNQLR
 VKRSPGLQDHL (SEQ ID NO:23).

[069] 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: конархин (Ara h 1), аллерген II (Ara h 2), агглютинин арахиса, конглоутин (Ara h 6);
 - конархин, 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: α -лактальбумин (ALA), лактотрансферрин; из киви: актинидин (Act c 1, Act d 1), фитоцистатин, тауматин-подобный белок (Act d 2), кивеллин (Act d 5);
- из яичных белков: овомукоид, ovalbumin, овотрансферрин и лизоцим;

- из яичных желтков: ливетин, аповитиллин и восветин;
- из горчицы: 2S альбумин (Sin a 1), 11S 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, гордеин, секалин и/или авенин;

○ пептиды/эпитопы, применимые в композициях по настоящему раскрытию для лечения целиакии, включают некоторые или все из следующих последовательностей, индивидуально в композициях формулы 1, вместе в смеси композиций формулы 1 или слитые в одну или более композиций формулы 2:

- соответствующий DQ-2, альфа-глиадин «33-мерный» нативный:

LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO:24)

- соответствующий DQ-2, альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный:

LQLQPFQPPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF (SEQ ID NO:25)

- соответствующий DQ-2, альфа-глиадин:

QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:26)

- соответствующий DQ-2, омега-глиадин (пшеница, U5UA46):

QPFPQPEQPFPW (SEQ ID NO:27)

- из клубники: основной аллерген клубники Fra 1-E (Fra 1); и
- из бананов: профилин (Mus xp 1).

[070] 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 из внешней среды, специфичными антигенами могут представлять собой, например: антигены с происхождением от кошек, мышей, собак, лошадей, пчел, из пыли, от деревьев и золотарника, в том числе следующие белки или пептиды, которые происходят 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 Cyn 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 тимофеевки 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 farina*, 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 Blo t 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19 и 21; а также аллергены Eur m 2 из *Euroglyphus maynei*, Tug 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*.

[071] 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 раскрытию.

[072] Сиалированные антигены, антитела, фрагменты антител

[073] Ниже приведены примеры антигенов, антител, фрагментов антител с сиалированием, 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), эпоэтин-альфа и эпоэтин-бета, фоллитропин-альфа (GONAL-F®; Merck/Serono) и фоллитропин-бета (FOLLISTIM®; Schering-Plough), связывающий белок 6 инсулиноподобного 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 десиалированию для адресной доставки в гепатоцит-ASGPR включают: интерферон-альфа и гамма, лютеинизирующий гормон, Fv фрагменты антител, аспарагиназу, холинэстеразу, дарбэпозтин-альфа (AraNESP®; Amgen), тромбозептин, лептин, FSH, IFN- α 2, сывороточный альбумин и корифоллитропин-альфа.

[074] 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 десиалированию.

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

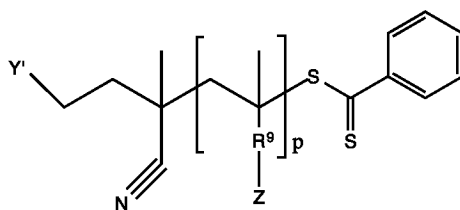
[076] Антитела и пептидные лиганды

[077] 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, и 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.

[078] Линкеры

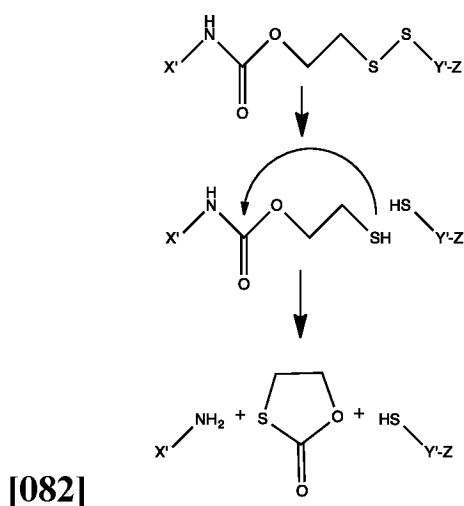
[079] Линкеры, используемые в композициях по настоящему раскрытию («Y» в формуле 1) могут включать N-гидроксисукцинамидильные линкеры, линкеры на основе амидов яблочной кислоты, винилсульфоновые линкеры, пиридил-дитиол-поли(этиленгликолевые) линкеры, пиридил-дитиольные линкеры, н-нитрофенил-карбонатные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

[080] Одна конкретная группа линкеров формулы Y'-CMP приведена ниже (где Y' обозначает оставшуюся часть линкера, а R⁹ и Z являются такими, как определено). Более конкретно, в группе линкеров, включающих формулу Y'-CMP, заместитель R⁹ представляет собой этилацетамидную группу, и еще более конкретно этилацетамид конъюгирован с C1 N-ацетилгалактозамина,



Формула Y'-CMP

[081] 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 раскрытию, так как обладают способностью расщеплять и высвобождать антиген в его первоначальной форме после попадания внутрь клетки, например как проиллюстрировано ниже (где Y' обозначает оставшуюся часть линкера, а X' и Z являются такими, как определено).



[083] 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 скобка и «)» обозначает связь между Y и Z;

n равняется целому числу, представляющему 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 $n \pm 10\%$;

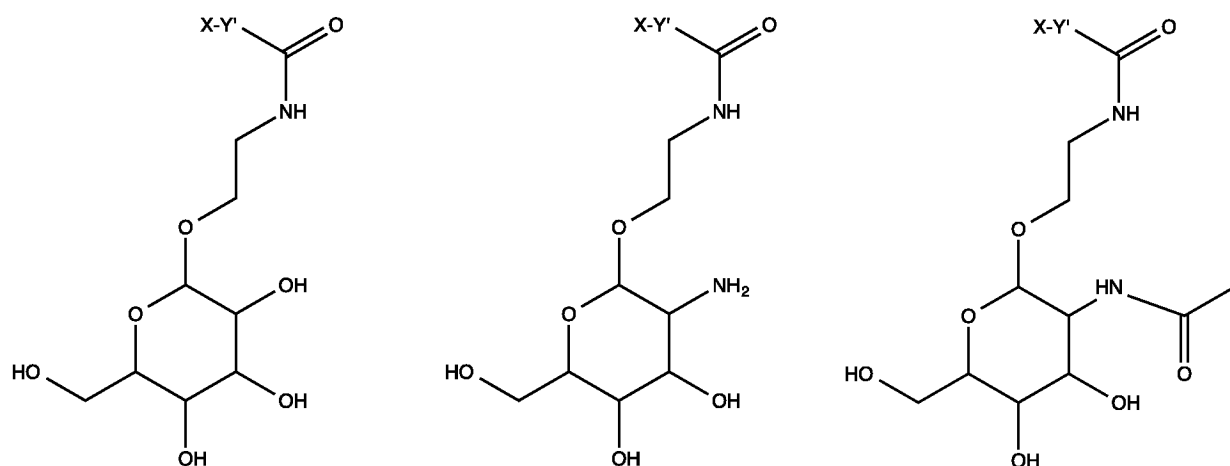
r равняется целому числу, представляющему совокупность, включающую от приблизительно 2 до 150, в частности от приблизительно 20 до 100 (например, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или 105) и более конкретно от приблизительно 30 до 40 (например, 28, 29, 30, 31,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

q равняется целому числу, представляющему совокупность, включающую от приблизительно 1 до 44, в частности от приблизительно 3 до 20

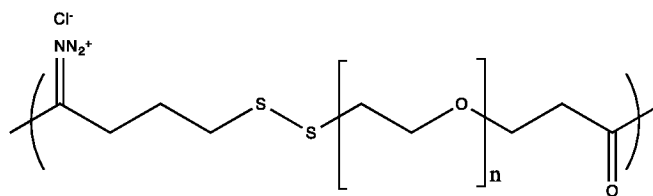
(например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 или 22) и более конкретно от приблизительно 4 до 12 (например, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13), где совокупность обычно охватывает целое число, определенное как $q \pm 10\%$; и

R^8 представляет собой $-\text{CH}_2-$ («метил») или $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ («1-циано-1-метил-пропил» или «CMP»).

R^9 представляет собой прямую связь или $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ (этилацетамидную группу или «EtAcN»), как проиллюстрировано в следующих структурах формулы 1 (где показана группа EtAcN и остальная часть линкера обозначена как Y'):



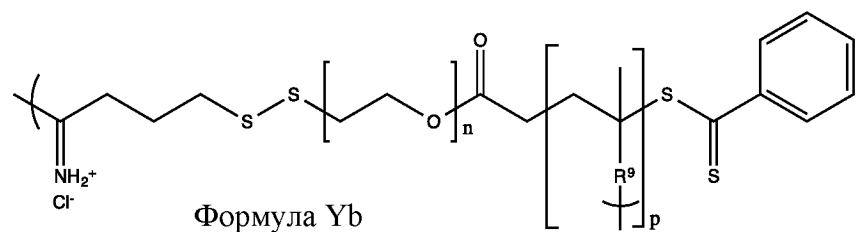
и Z представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1.



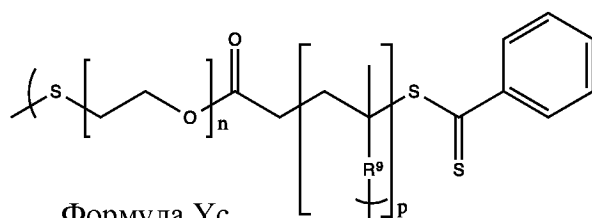
[084]

Формула Ya

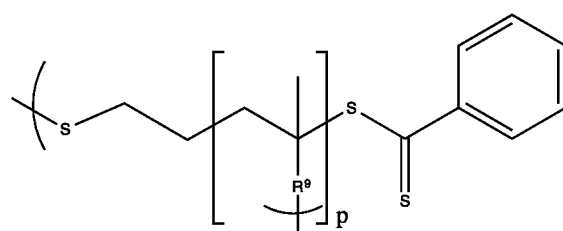
[085]



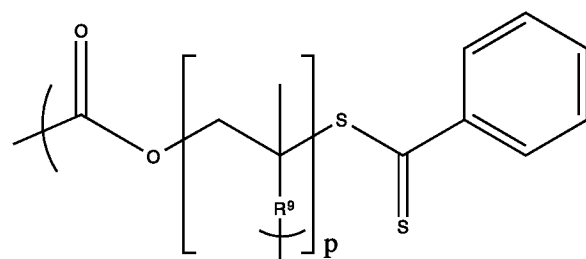
[086]



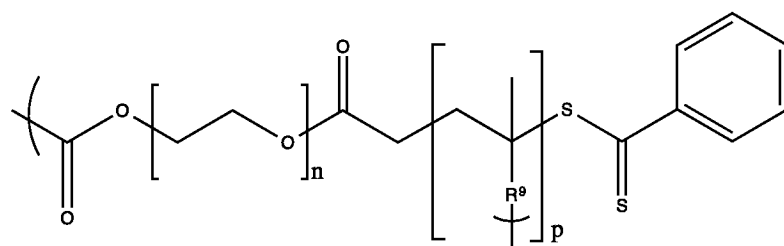
[087]



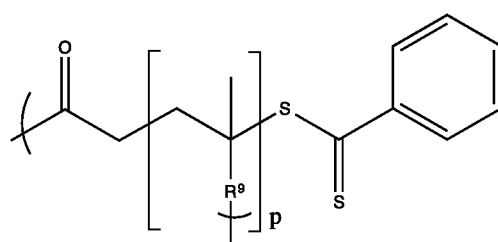
[088]



[089]

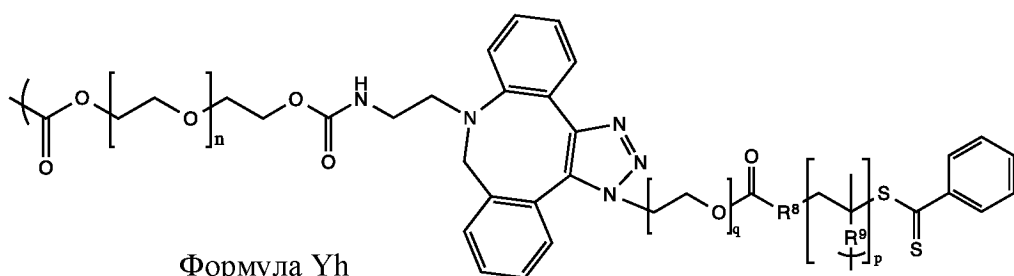


[090]



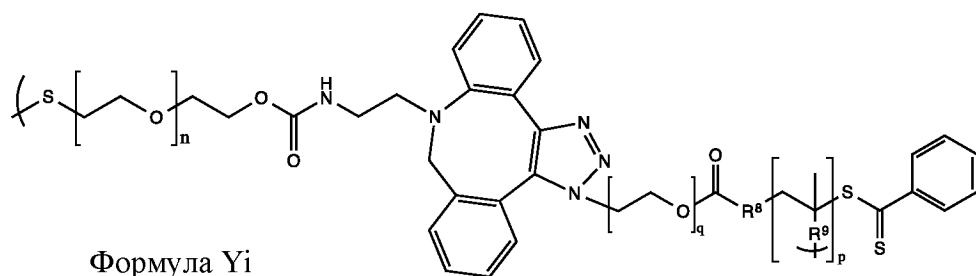
[091]

Формула Yh



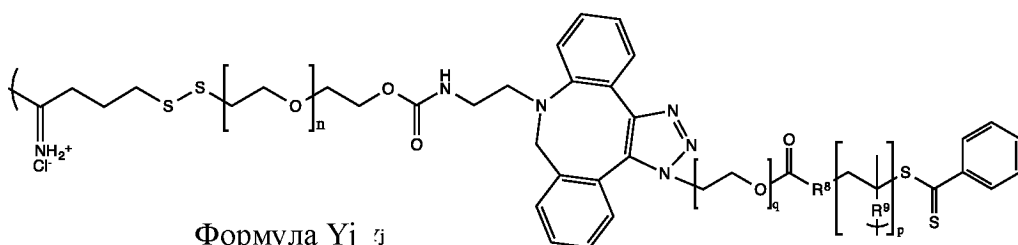
[092]

Формула Yi



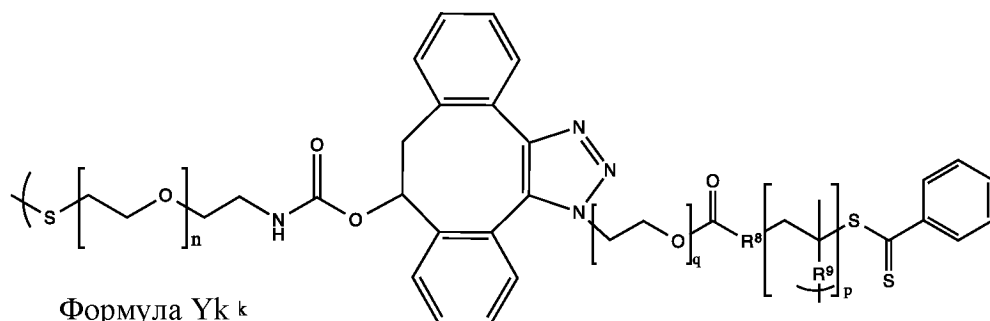
[093]

Формула Yj



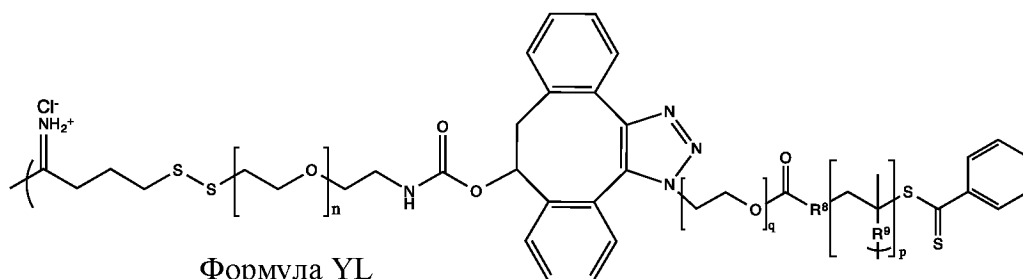
[094]

Формула Yk

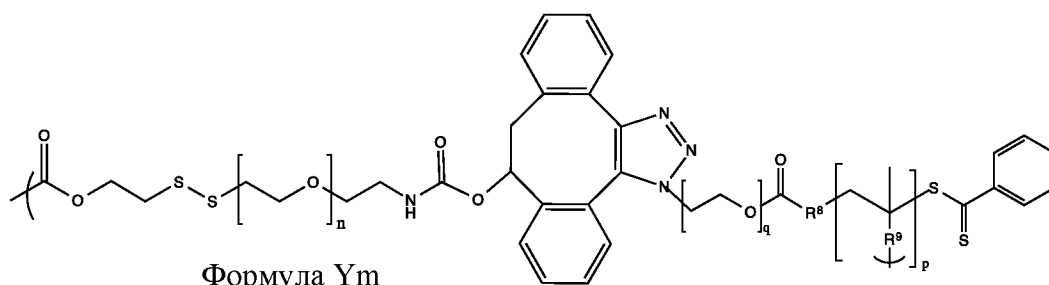


[095]

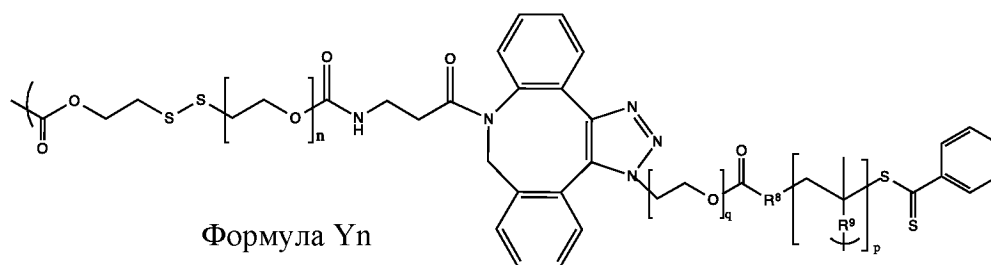
Формула YL



[096]

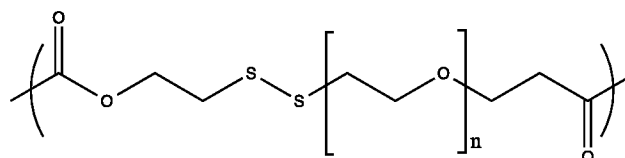


[097]

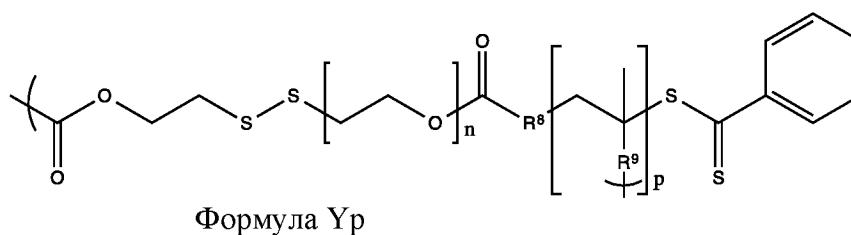


(линкеры формулы Yn можно синтезировать через определенные предшественники, которые делают Yn особенно подходящим для конъюгации с гидрофобными антигенами)

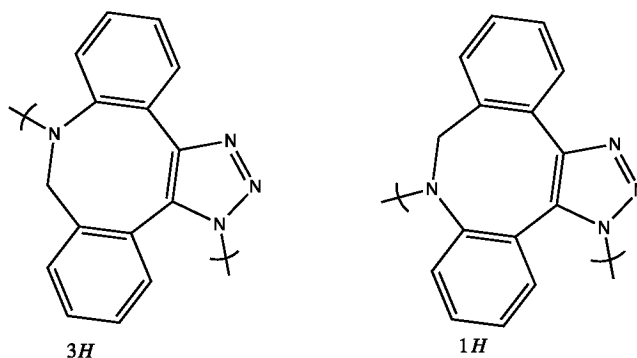
[098]



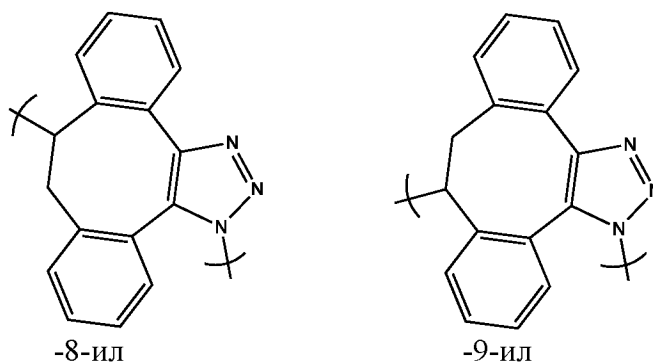
[099]



[0100] 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-1H-дibenzo[b,f][1,2,3]триазоло[4,5-d]азоцин-8-ильных и 8,9-дигидро-3H-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-1H-дibenzo[3,4:7,8]циклоокта[1,2-d][1,2,3]триазол-8-ильных и 8,9-дигидро-1H-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.

[0101] Галактозилированные компоненты

[0102] Галактозилированные компоненты, используемые в композициях по настоящему раскрытию, служат для адресной доставки композиций в клетки печени (например, специфично связывающие гепатоциты) и могут быть выбраны из: галактозы, галактозамина или N-ацетилгалактозамина. 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 расположены, в частности, на C1, C2 и C6.

[0103] Конкретные галактозилированные компоненты включают галактозу, конъюгированную по C1 или C6, галактозамин, конъюгированный по C2, и N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C6. Другие конкретные галактозилированные компоненты включают N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C2, более конкретно конъюгированный с линкером, несущим заместитель R⁹, который представляет собой CH₂. Третьи галактозилированные компоненты включают галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1, более конкретно конъюгированные с линкером, несущим заместитель R⁹, который представляет собой этилацетамидную группу.

[0104] ASGPR-нацеленные антитела

[0105] ASGPR-специфичные антитела, используемые в композициях по настоящему раскрытию, также служат для адресной доставки композиций по настоящему раскрытию в клетки печени, и их можно выбирать из коммерчески доступных продуктов, таких как антитело к асиалогликопротеиновому рецептору 1 (ab42488) от Abcam plc, Кембридж, Великобритания, и ASGPR1/2 (FL-291) (sc28977) от Santa Cruz Biotechnology, Inc., Даллас, Техас. В качестве альтернативы, такие антитела можно экспрессировать с применением любой из множества опубликованных последовательностей, таких как Dom26h-196-61, однодоменное антитело к ASGPR:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRIS
ARGVTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEH
TRFDSWGQGTLVTVSS (SEQ.ID.No:6)

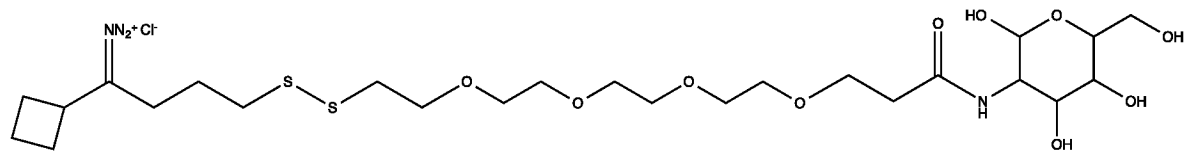
[Coulstock E, et al., (2013) “Liver-targeting of interferon-alpha with tissue-specific domain antibodies.” *PLoS One*. 8(2):e57263 и US 2013/0078216], или такая последовательность с консервативными заменами. В вышеупомянутой заявке на патент США раскрыты молекулы для адресной доставки в печень, такие как DOM26h-196-61 для доставки определенных терапевтических средств [в том числе интерферона (интерферон-альфа 2, интерферон-альфа 5, интерферон-

альфа 6 или консенсусный интерферон), рибавирина, нексавара/сорафениба, эрбитуса/цетуксимаба, авастатина/бевацизумаба и герцептина/трастузумаба] для лечения заболеваний печени. Композиции, соответствующие формуле 2, в которых используется DOM26h-196-61 или другая молекула для адресной доставки в печень, описанные в US 2013/0078216, не включают интерферон (интерферон-альфа 2, интерферон-альфа 5, интерферон-альфа 6 или консенсусный интерферон), рибавирин, нексавар/сорафениб, эрбитус/цетуксимаб, авастатин/бевацизумаб и герцептин/трастузумаб в пределах их объема.

[0106] Новые последовательности для антитела, фрагмента антитела или пептида, которые специфически нацелены на ASGPR, могут быть обнаружены с применением различных способов, известных специалистам в данной области. Эти способы могут включать без ограничений технологию вакцинации, гибридную технологию, технологии дисплейных библиотек (в том числе бактериальные и фаговые платформы), технологии скрининга репертуара эндогенных антигенов, направленную эволюцию и рациональный дизайн.

[0107] Номенклатура

[0108] 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:

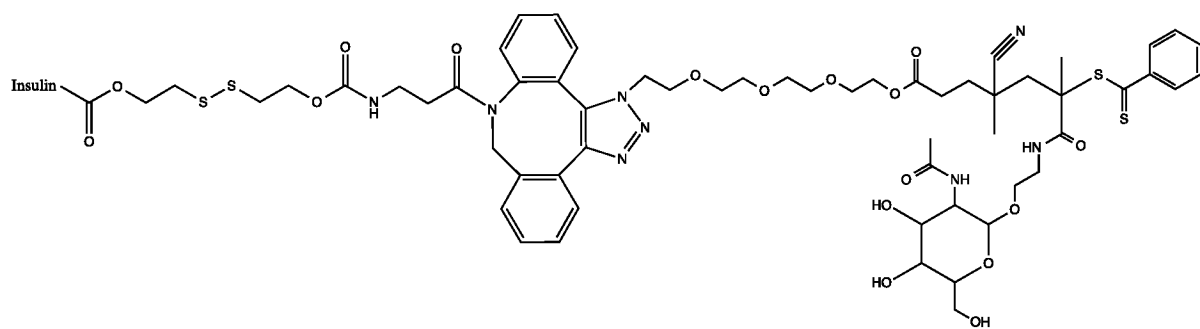


может быть названо (Z)-(21-циклобутил-1-оксо-1-((2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-3-ил)амино)-4,7,10,13-тетраокса-16,17-дитиагеникозан-21-илиден)триаз-1-ин-2-ия хлорид, так соответствующая

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

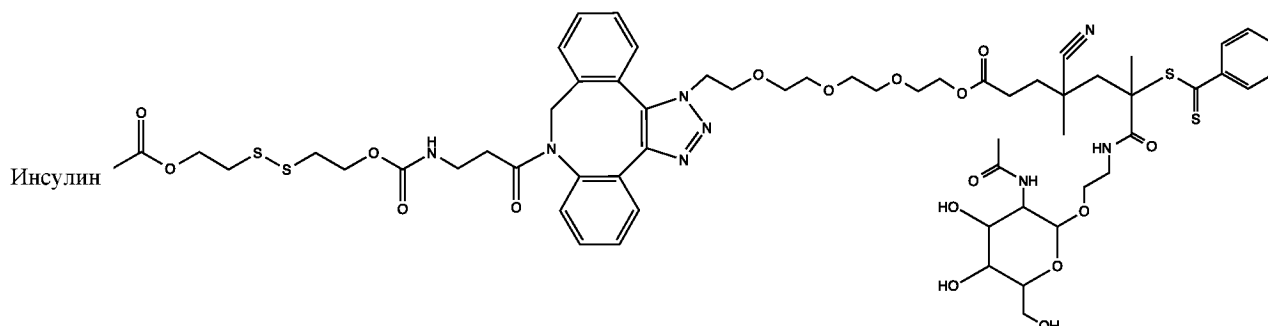
[0109] С целью упрощения композиции формулы 1 могут быть названы с применением альтернативной системы присвоения имен путем ссылки на X и соответствие одной из формул 1a - 1p (как проиллюстрировано в схемах реакций) с последующим повторением целых чисел для переменных m, n, p и/или q, R⁸, R⁹ и идентификацией галактозилированного компонента и положения, по которому он конъюгирован. Согласно этой системе, композиция формулы 1a, где X представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 4, а Z представляет собой N-ацетилгалактозамин-2-ил, может быть названа «F1a-OVA-m₂-n₄-2NAcGAL».

[0110] Аналогично, следующая композиция формулы 1,



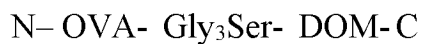
может быть названа «2-((2-(((3-(3-(22-((3-ацетидамо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)-16-циано-16,18-диметил-13,19-диоксо-18-((фенилкарбонотиоил)тио)-3,6,9,12-тетраокса-20-азадокозил)-3,9-

дигидро-8*H*-дibenzo[*b,f*][1,2,3]триазоло[4,5-*d*]азоцин-8-ил)-3-оксопропил)карбамоил)окси)этил)дисульфанил)этил инсулина карбоксилат». Изомер

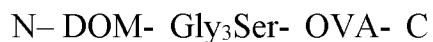


может быть назван «2-(((2-(((3-(1-(22-((3-ацетамидо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)-16-циано-16,18-диметил-13,19-диоксо-18-((фенилкарбонотиоил)тио)-3,6,9,12-тетраокса-20-азадокосил)-1,9-дигидро-8*H*-дibenzo[*b,f*][1,2,3]триазоло[4,5-*d*]азоцин-8-ил)-3-оксопропил)карбамоил)-окси)этил)дисульфанил)этил инсулина карбоксилат» (выделения жирным шрифтом добавлены для удобства в идентификации различия между формальными названиями). Путем использования системы присвоения имен, принятой для настоящего раскрытия, оба изомера можно называть «F1n-инсулин-*m*₁-*n*₁-*p*₁-*q*₄-CMP-EtAcN-1NAcGAL», где CMP обозначает, что R⁸ представляет собой 1-циано-1-метил-пропил, EtAcN обозначает, что R⁹ представляет собой этилацетамид, а 1NAcGAL обозначает, что Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C1. Отсутствие аббревиатуры EtAcN перед обозначением Z будет означать, что R⁹ представляет собой прямую связь.

[0111] В композициях формулы 2, ориентацию слева направо не следует воспринимать как определение порядка от N для C при отсутствии конкретного указания об обратном. Например, соединение формулы 2, где *m*' равняется 1, *m*'' равняется 0, X представляет собой овальбумин, Y представляет собой Gly₃Ser, и Z представляет собой антитело к ASGPR, Dom26h-196-61, может быть названо OVA-Gly₃Ser-DOM и толковаться как охватывающее оба из следующего:



и



Композиции формулы 2, например, где m' равняется 1, m'' равняется 0, X представляет собой овальбумин, Y представляет собой Gly₃Ser, и Z представляет собой анти-ASGPR Dom26h-196-61 (с меткой для очистки, присоединенной через дополнительный линкер), могут быть названы следующим образом:

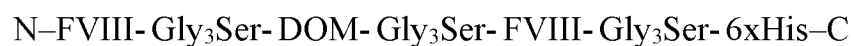


или

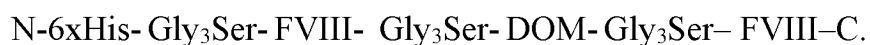


где С'-концевая группа Gly₃Ser-6xHis представляет собой аминокислотную последовательность, которая облегчает выделение и очистку.

[0112] Композиция формулы 2, где m' равняется 1, m'' равняется 1, каждый X представляет собой фактор VIII, каждый Y представляет собой Gly₃Ser, и Z представляет собой антитело к ASGPR, Dom26h-196-61 (с меткой для очистки, присоединенной через дополнительный линкер), может быть названа FVIII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVIII-Gly₃Ser-6xHis и охватывает оба из следующего:



и



[0113] Композиция формулы 2, где m' равняется 3, m'' равняется 0, один, три антигена X, соответственно, представляют собой альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25), альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) и омега-глиадин (SEQ ID NO:27), каждый Y представляет собой линкер с сайтом

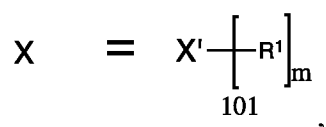
расщепления для иммунопротеасомы («IPC»), и Z представляет собой антитело к ASGPR, Dom26h-196-61, может быть названа:

альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный- IPC- альфа-глиадин- IPC- омега-глиадин- IPC- DOM.

[0114] Получение композиций по настоящему раскрытию

[0115] 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.

[0116] Формула 101 (ниже) является альтернативным представлением X,



где R¹ представляет собой свободный поверхностный амино (-NH₂) 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 аминогруппы(аминогрупп) [(X'' используется в схемах реакций для обозначения остальной части X за исключением свободной тиольной группы(групп)]. В зависимости от индивидуального состава X, в нем будет по меньшей мере одна (N-концевой амин) и может быть несколько R¹-групп (преимущественно из остатков лизина или остатков цистеина, которые не вовлечены в образование дисульфидных связей), как представлено с помощью m, которое равняется целому числу от приблизительно 1 до 100, более типично 1 или от приблизительно 4 до 20, и наиболее типично от 1 до приблизительно 10.

[0117] 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 OH или защитную группу;
- R^3 представляет собой OH, NH_2 , $NHAc$, защитную группу или NH -защитную группу;
- R^4 представляет собой OH или защитную группу;
- R^5 представляет собой OH или защитную группу;
- R^6 представляет собой OH или защитную группу;
- Z' представляет собой галактозу, конъюгированную по C1 или C6, галактозамин, конъюгированный по C2, или N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C6;
- R^8 представляет собой $-CH_2-$ или $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$; и
- R^9 представляет собой прямую связь, и Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C2;
- R^9 представляет собой этилацетамидную группу, и Z'' представляет собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин, конъюгированные по C1.

[0118] Параметры реакции синтеза

[0119] 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, метиленхлорид (или дихлорметан), диэтиловый эфир, метанол, пиридин и т.п.]. Если не указано иное, растворители, применяемые в реакциях по настоящему раскрытию, представляют собой инертные органические растворители.

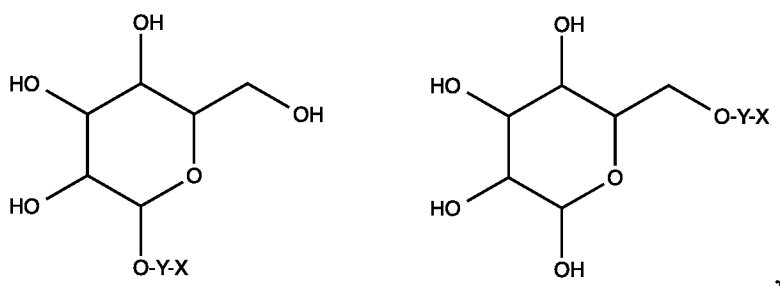
[0120] Термин «q.s.» означает добавление количества, достаточного для достижения заявленной цели, например, доведение раствора до необходимого объема (т.е. 100%).

[0121] 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.

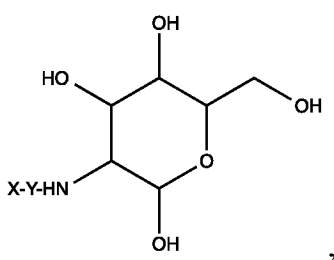
[0122] Если не указано иное (в том числе в примерах), все реакции проводят при стандартном атмосферном давлении (приблизительно 1 атмосфера) и температуре окружающей среды (или комнатной) (приблизительно 20°C), при pH приблизительно 7,0-8,0.

[0123] Определение характеристик продуктов реакции можно проводить с помощью обычных средств, например, протонного и углеродного ЯМР, масс-спектрометрии, эксклюзионной хроматографии, инфракрасной спектроскопии, гель-электрофореза.

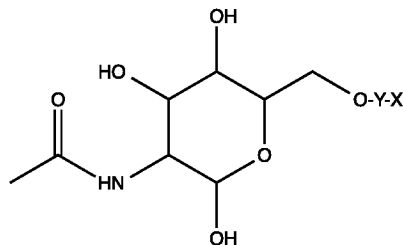
[0124] На схеме реакции 1 проиллюстрировано получение композиций формулы 1, где Z может представлять собой галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин. В связи с этим и как определено выше, Z', используемый в схеме реакции 1, охватывает галактозу, конъюгированную по C1 и C6 и соответствующую следующим структурам согласно формуле 1:



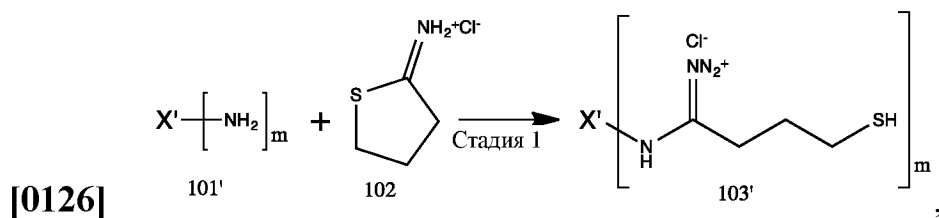
галактозамин, конъюгированный по C2 и соответствующий следующей структуре согласно формуле 1:

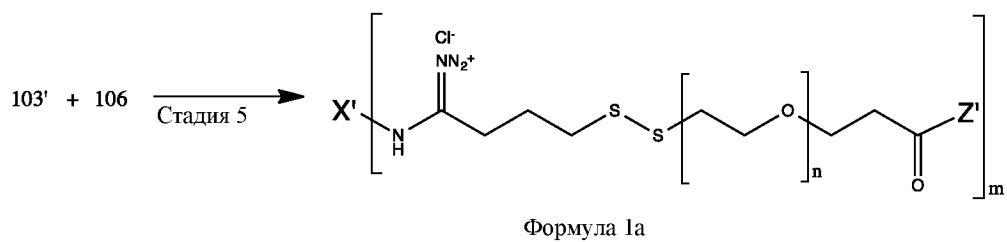
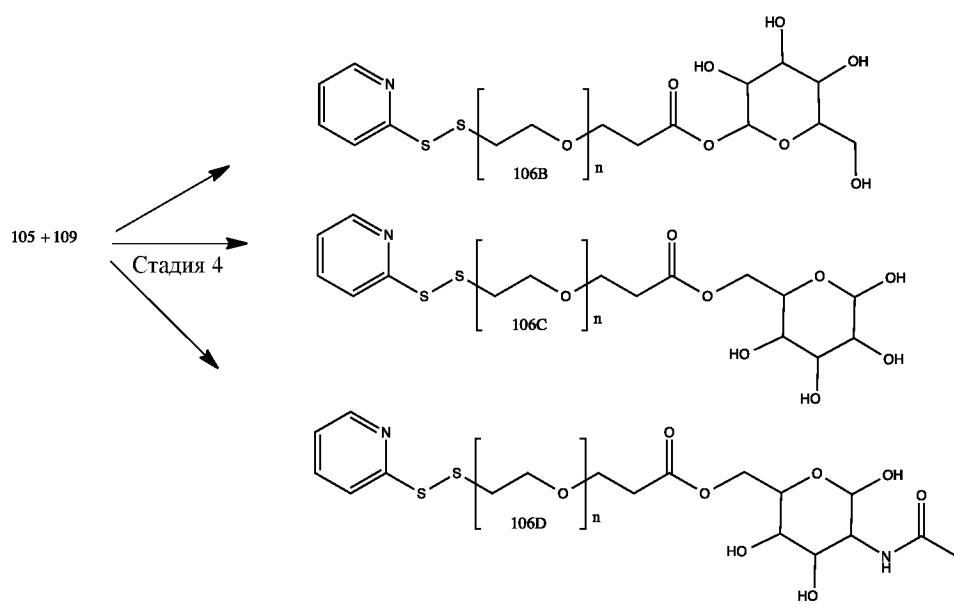
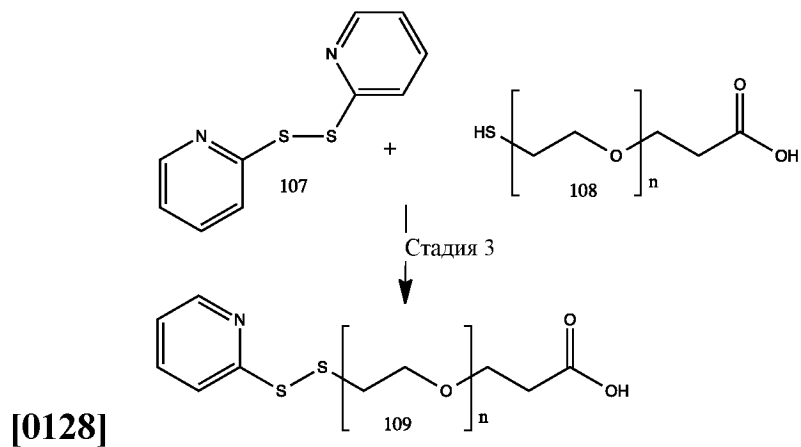
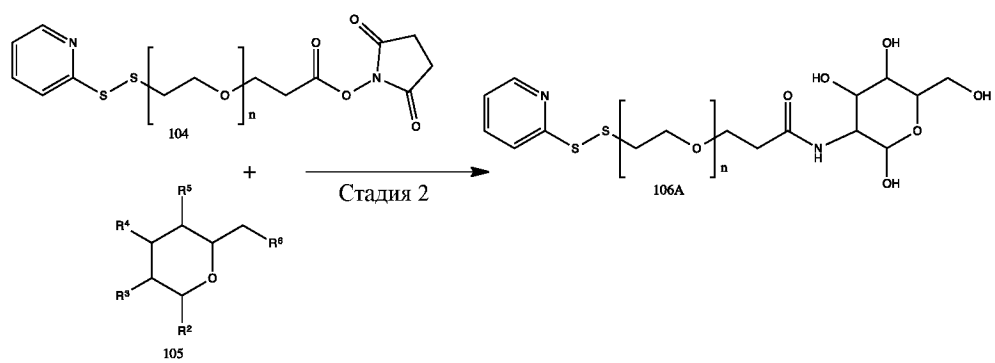


и N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C6 и соответствующий следующей структуре согласно формуле 1:

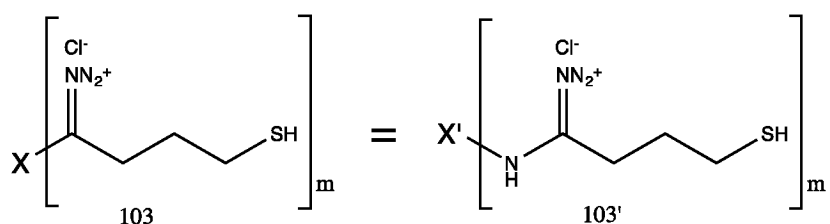


[0125] Схема реакции 1





[0131] Как проиллюстрировано выше на схеме реакции 1, стадия 1, поверхностная тиольная группа(ы) может быть получена на антигене, антителе, фрагменте антитела или лиганде со свободной поверхностной аминогруппой(ами) (формула 101') путем осуществления контакта с реагентом Траута (формула 102) при pH приблизительно 8,0 в течение приблизительно 1 часа 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 поверхностную аминогруппу(ы), изначально находящуюся на X (т.е. формула 103', где X' представляет собой остальную часть X за исключением обозначенных свободных поверхностных аминогрупп), и исключающий свободную поверхностную аминогруппу(ы) (т.е. формула 103). Это соответствует проиллюстрированному отличию между X и формулой 101. Такого условного обозначения придерживались в последующих схемах реакций.



[0132] На схеме реакции 1, стадия 2, сложный эфир пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 104) приводят в контакт с галактозоамином (формула 105, где R³ представляет собой NH₂, а R², R⁴, R⁵ и R⁶ представляют собой OH) в условиях перемешивания при pH приблизительно 8 в течение 1 часа с получением соответствующего пиридил-дитиол-поли(этиленгликоль)-сахара формулы 106А, который может использоваться без дополнительной очистки.

[0133] На схеме реакции 1, стадия 3, 4,4'-дитиодипиридин (формула 107) приводят в контакт с тиол-поли(этиленгликоль)пропановой кислотой (формула

108) с получением соответствующей пиридил-дитиол-поли(этиленгликоль)пропановой кислоты (формула 109).

[0134] На схеме реакции 1, стадия 4, кислоту формулы 109 приводят в контакт с защищенной галактозой или N-ацетилгалактозамином формулы 105, где R^2 представляет собой OH, а R^3 , R^4 , R^5 и R^6 представляют собой защитные группы («PG»), где R^6 представляет собой OH, а R^2 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой PG, или где R^6 представляет собой N-ацетил, а R^2 , R^3 , R^4 и R^5 представляют собой PG, с получением соответствующих пиридил-дитиол-поли(этиленгликоль)-сахаров формул 106B, 106C и 106D, которые можно использовать после снятия защиты.

[0135] 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 часа, 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.

[0136] Композиции, соответствующие формуле 1a, можно называть, соответственно, например, следующим образом:

«F1aA-X'- m_m - n_n » или «F1a-X'- m_m - n_n -2NGAL»,

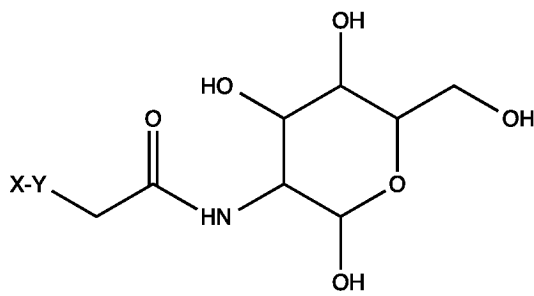
«F1aB-X'- m_m - n_n » или «F1a-X'- m_m - n_n -1GAL»,

«F1aC-X'- m_m - n_n » или «F1a-X'- m_m - n_n -6GAL»,

«F1aD-X'- m_m - n_n » или «F1a-X'- m_m - n_n -6NAcGAL»,

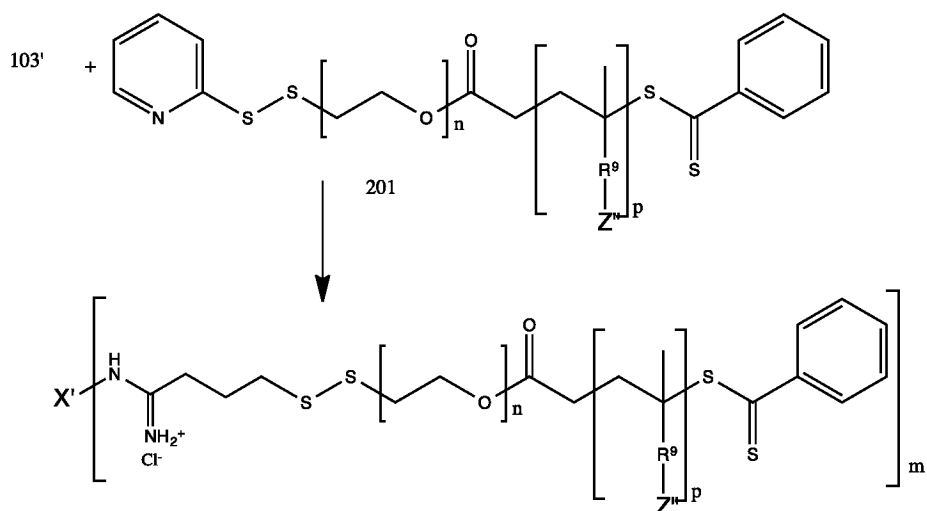
соответственно, для продуктов, полученных с применением промежуточного продукта согласно формулам 106A-D.

[0137] Обращаясь к схемам реакций 2-14 и для целей номенклатуры, используемой в связи с ними, за исключением случаев, когда явно заявлено иное, *Z'* относится к N-ацетилгалактозамину, конъюгированному по C2:



или к галактозе, галактозамину или N-ацетилгалактозамину, конъюгированным по C1. Следует отметить, что конъюгированные по C1 композиции должны быть защищены в ходе синтеза, например, путем циклизации амина с C3-гидроксилом, и подвергнуты снятию защиты с последующим включением защищенного галактозамина в соседнюю часть линкера.

[0138] Поли(галактоза-метакрилатные) реактивы формул 201, 401, 501, 601, 701, 803 и 1401 можно быть получать с помощью присоединения метакрилатной группы к галактозе, например, путем приведения в контакт галактозамина и ангидрида метакрилвой кислоты, с последующей полимеризацией путем обратимого присоединения и фрагментирования (RAFT) с помощью соответствующего RAFT-средства в присутствии азобисизобутиронитрила (AIBN) в подходящем растворителе, начиная с циклов замораживания-оттаивания с последующим нагреванием до приблизительно 60-80°C, предпочтительно 70°C в течение 5-8, предпочтительно приблизительно 6 часов. Полимер можно осаждать в низшем алканоле, предпочтительно метаноле.

[0139] Схема реакции 2

[0140]

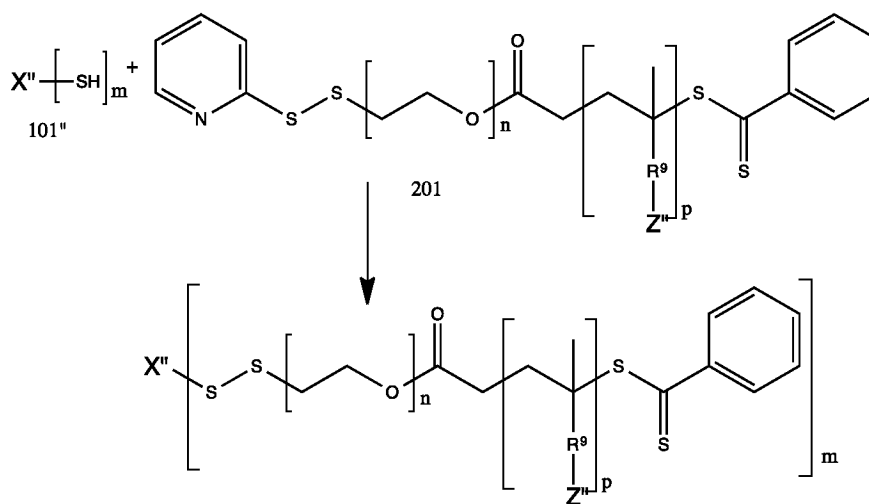
Формула 1b

[0141] Как проиллюстрировано на схеме реакции 2, полученный антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд со свободной поверхностной тиольной группой(ами), например, как описано со ссылкой на схему реакции 1, стадия 1 (формула 103'), приводят в контакт с избытком (соответствующем значению m) пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) формулы 201 в течение 1 часа с получением соответствующего продукта согласно формуле 1b.

[0142] Композиции формулы 1b можно называть следующим образом:

«F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NacGAL» или «F1b-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z».

Например, композиция 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-m₁-n₄-p₄-2NacGAL» 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-2H-пиран-3-ил)карбамоил)-13,16,19,22-тетраокса-2,25,26-тритаатриаконтан-30-иминий».

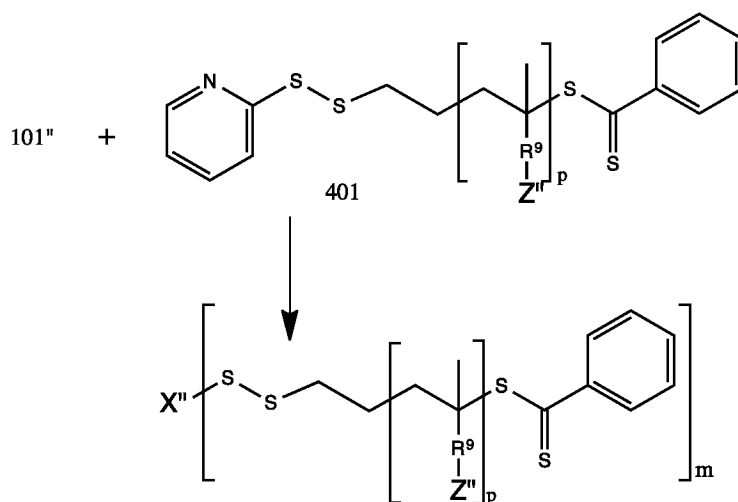
[0143] Схема реакции 3**[0144]**

Формула 1с

[0145] Как проиллюстрировано на схеме реакции 3, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной тиольной 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 поверхностной тиольной группы(групп)] приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) пиридил-дителиол-поли(этиленгликоля) формулы 201 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1с.

[0146] Композиции, соответствующие формуле 1с, можно называть следующим образом:

«F1c- X' - m_m - n_n - p_p -2NacGAL» или «F1c- X' - m_m - n_n - p_p -EtAcN-Z».

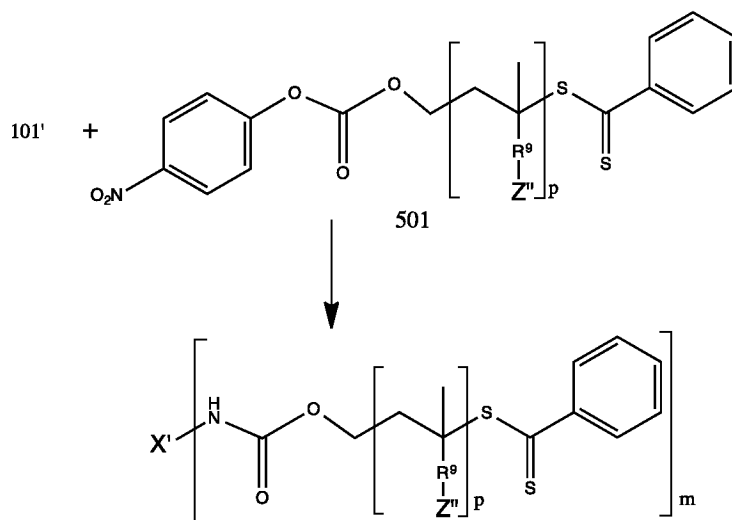
[0147] Схема реакции 4**[0148]**

Формула 1d

[0149] Как проиллюстрировано на схеме реакции 4, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной тиольной группой(группами) формулы 101'' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) пиридил-дитиола формулы 401 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1d.

[0150] Композиции, соответствующие формуле 1d, можно называть следующим образом:

«F1d- X' - m_m - p_p -2NacGAL» или «F1d- X' - m_m - p_p -EtAcN-Z».

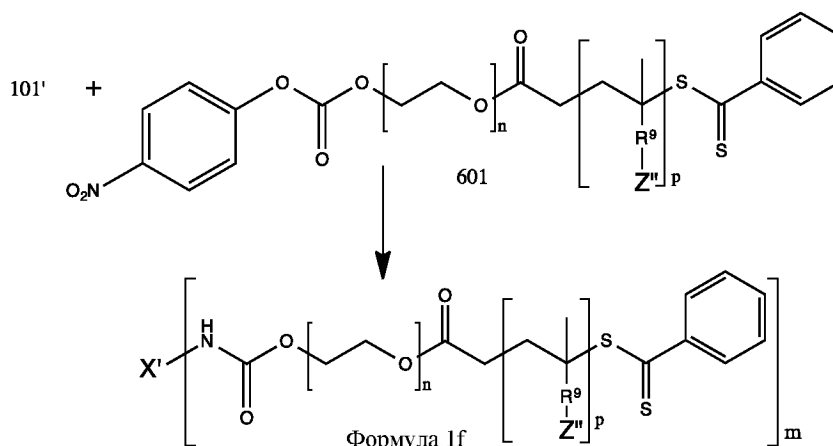
[0151] Схема реакции 5**[0152]**

Формула 1e

[0153] Как проиллюстрировано на схеме реакции 5, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) n -нитрофенилкарбоната формулы 501 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1e.

[0154] Композиции, соответствующие формуле 1e, можно называть следующим образом:

«F1e-X'- m_m -pp-2NacGAL» или «F1e-X'- m_m -pp-EtAcN-Z».

[0155] Схема реакции 6**[0156]**

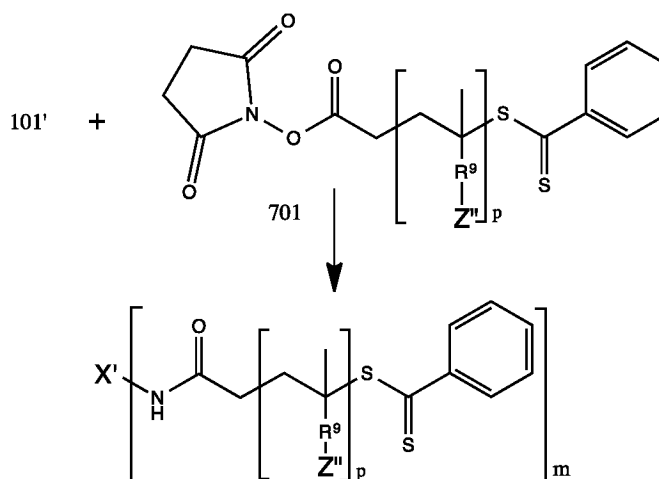
Формула 1f

[0157] Как проиллюстрировано на схеме реакции 6, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной 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.

[0158] Композиции, соответствующие формуле 1f, можно называть следующим образом:

«F1f-X'- m_m - n_n - p_p -2NacGAL» или «F1f-X'- m_m - n_n - p_p -EtAcN-Z».

[0159] Схема реакции 7



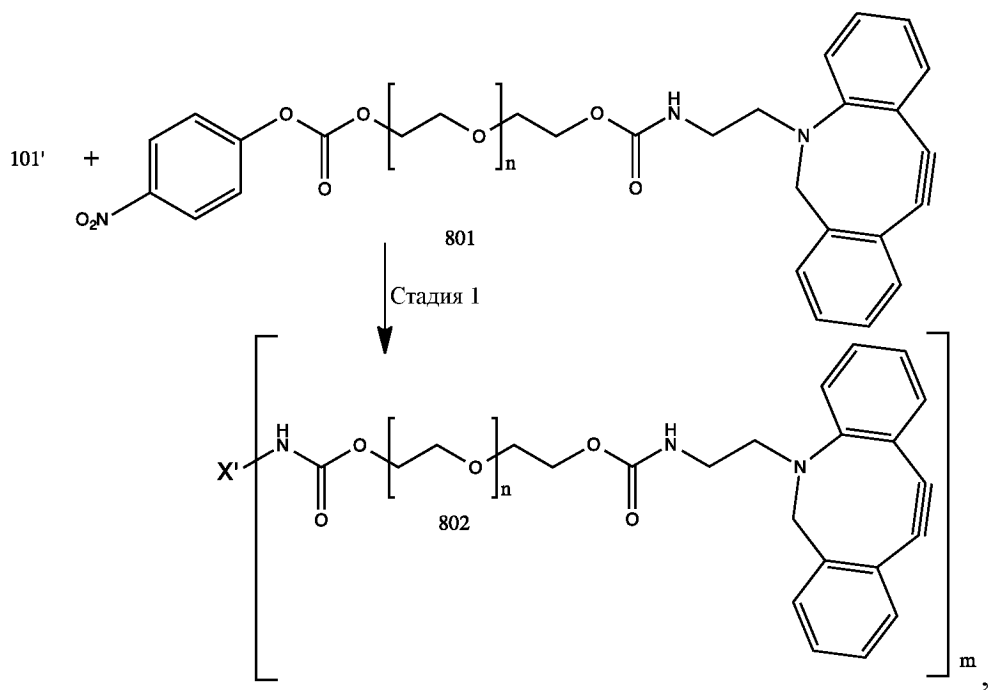
[0160]

Формула 1g

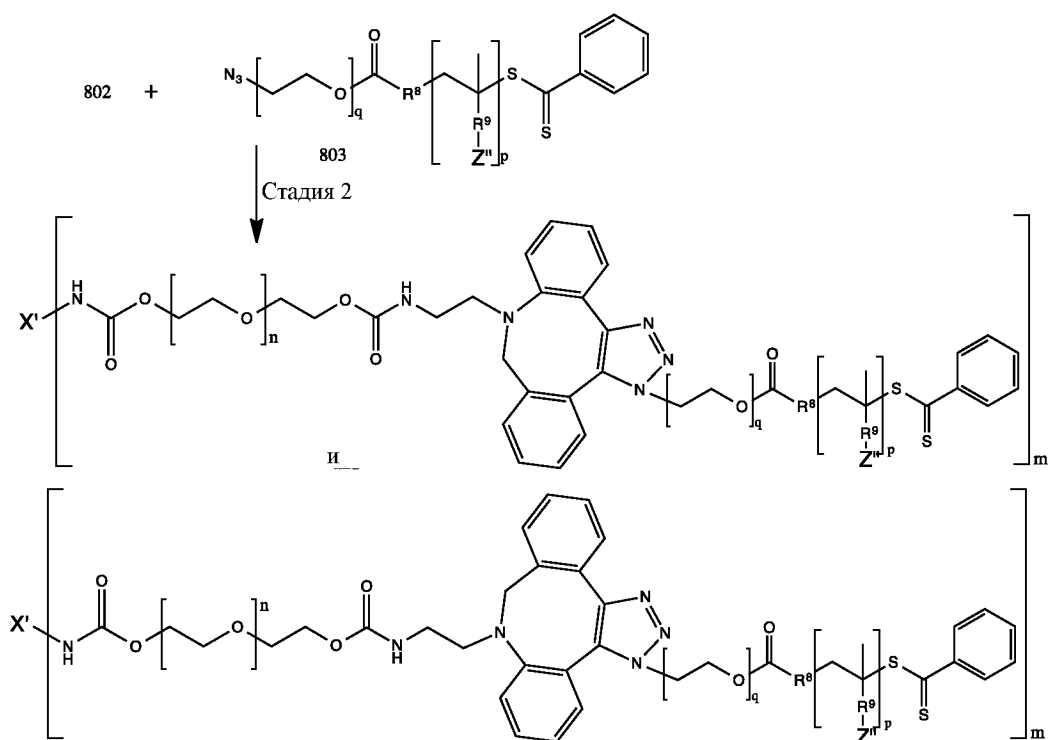
[0161] Как проиллюстрировано на схеме реакции 7, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) сложного эфира NHS и поли(этиленгликоля) формулы 701 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1g.

[0162] Композиции, соответствующие Формуле 1g могут быть названы следующим образом:

«F1g-X'- m_m - p_p -2NacGAL» или «F1g-X'- m_m - p_p -EtAcN-Z»

[0163] Схема реакции 8

[0164]



[0165]

[0166] Как проиллюстрировано на схеме реакции 8, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком

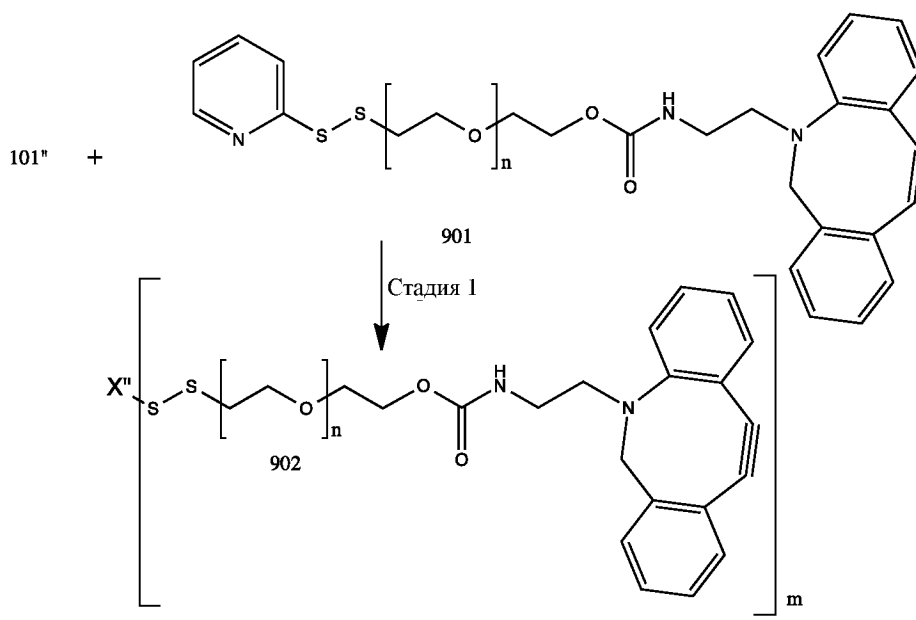
(соответствующим значению m) реагирующего с амином линкера для реакции клик-химии формулы 801 с получением соответствующего продукта согласно формуле 802.

[0167] 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 $Y_h - Y_n$, но не будет показана в каждом случае.

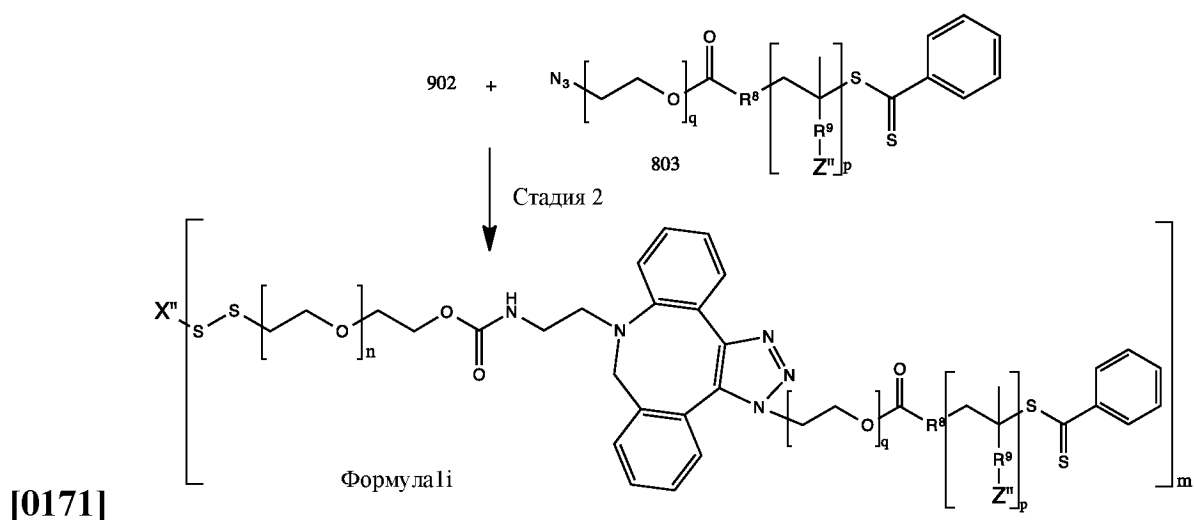
[0168] Композиции, соответствующие формуле 1h, можно называть следующим образом:

«F1h-X'- m_m - n_n - p_p - q_q -2NacGAL» или «F1h-X'- m_m - n_n - p_p - q_q -EtAcN-Z».

[0169] Схема реакции 9



[0170]



[0172] Как проиллюстрировано на схеме реакции 9, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной тиольной группой(ами) 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''.

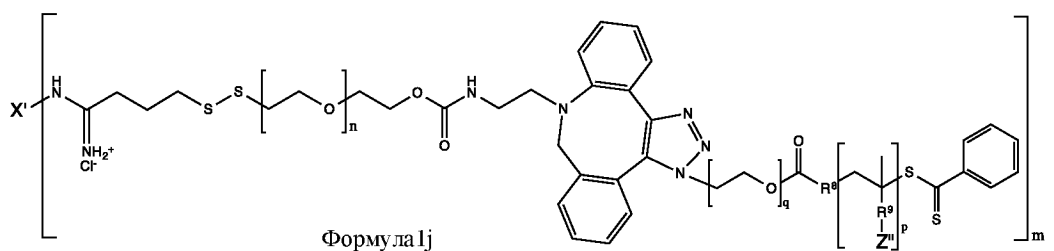
[0173] На схеме реакции 9, стадия 2, затем продукт формулы 902'' приводят в контакт с эквивалентным количеством (снова, соответствующим значению m) галактоз(аминного) полимера формулы 803 с получением соответствующего изомерного продукта согласно формуле 1i.

[0174] Композиции, соответствующие формуле 1i, можно называть следующим образом:



[0175] Действуя согласно процедурам, описанным в отношении схемы реакции 9, но заменяя исходный материал 101'' соединением формулы 103' (дериватизированным с помощью реагента Траута), получают соответствующий изомерный продукт формулы 1j, как показано ниже.

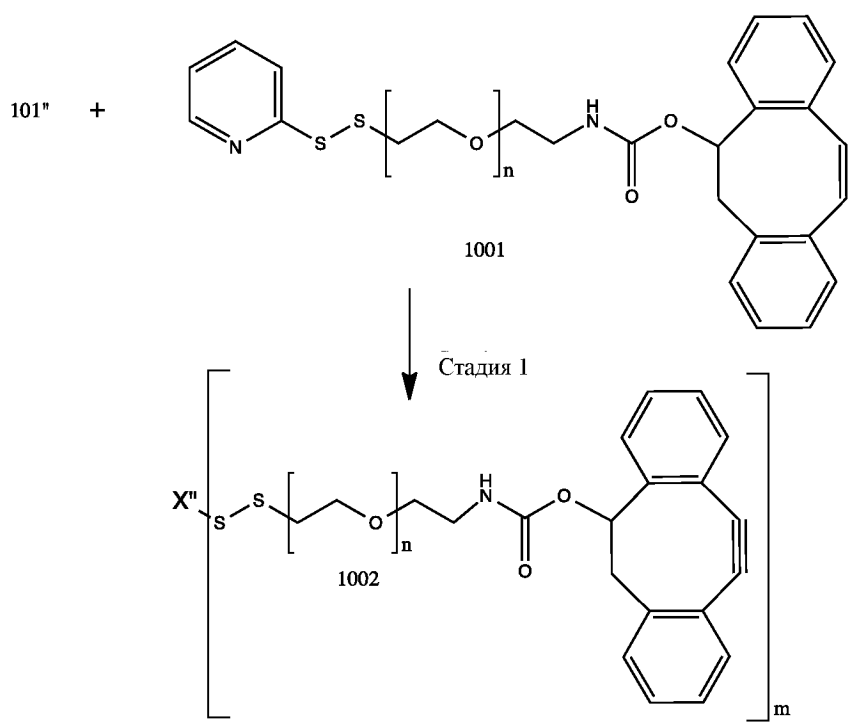
[0176]



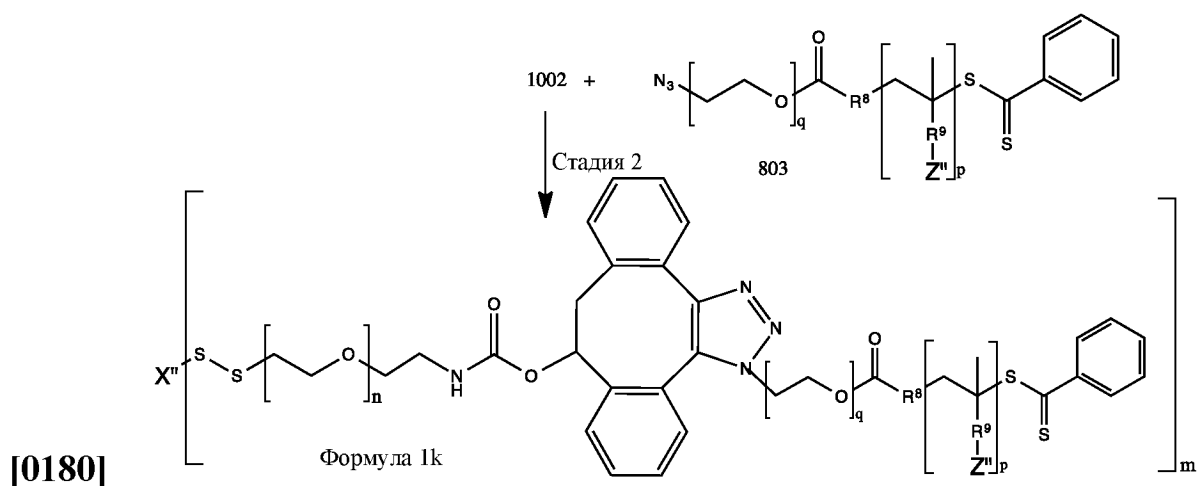
[0177] Композиции, соответствующие формуле 1j, можно называть следующим образом:

«F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL» или «F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z».

[0178] Схема реакции 10



[0179]



[0181] Как проиллюстрировано на схеме реакции 10, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной тиольной 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.

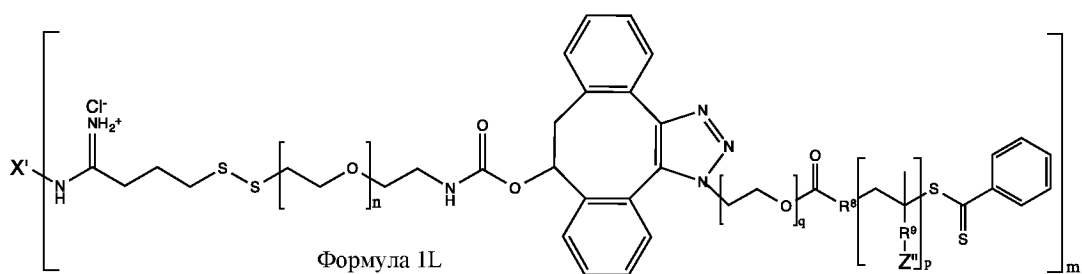
[0182] На схеме реакции 10, стадия 2, затем продукт формулы 1002 приводят в контакт с эквивалентным количеством (снова, соответствующим значению m) галактоз(аминного) полимера формулы 803 с получением соответствующего изомерного продукта согласно формуле 1k.

[0183] Композиции, соответствующие формуле 1k, можно называть следующим образом:

«F1k-X'- m_m - n_n - p_p - q_q -2NacGAL» или «F1k-X'- m_m - n_n - p_p - q_q -EtAcN-Z».

[0184] 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.

[0185]

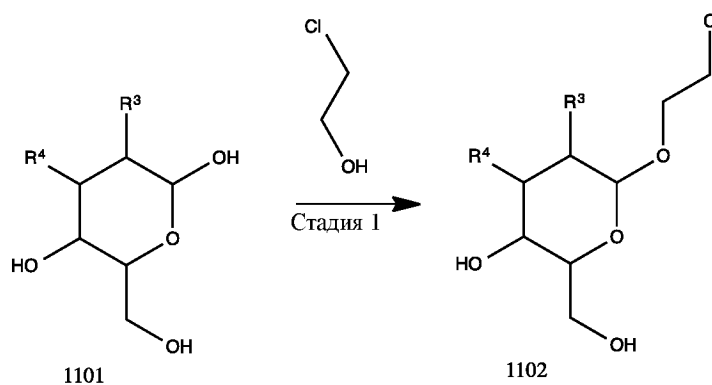


[0186] Композиции, соответствующие формуле 1L, можно называть следующим образом:

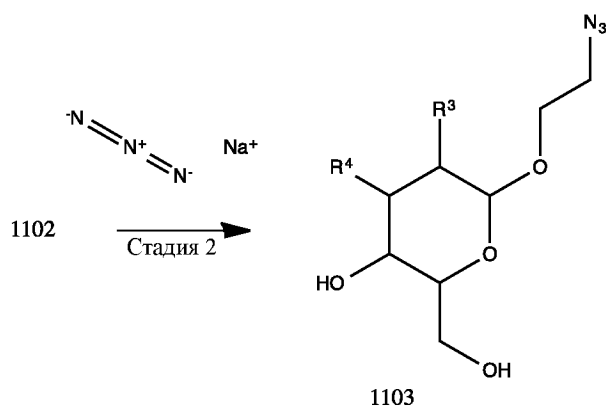
«F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL» или «F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z».

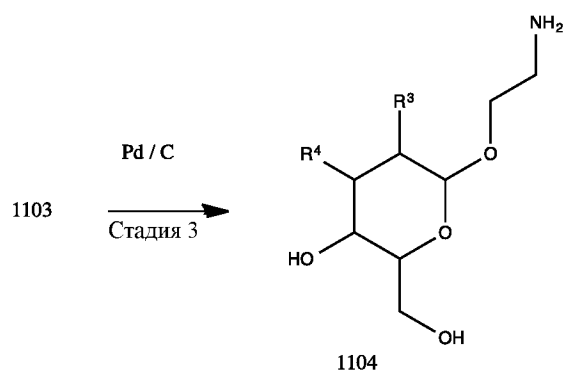
[0187] Схема реакции 11

[0188]

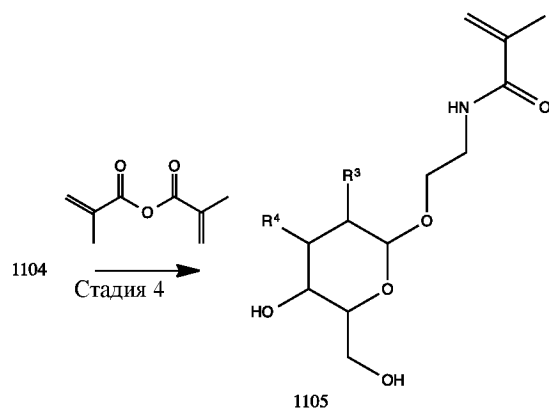


[0189]

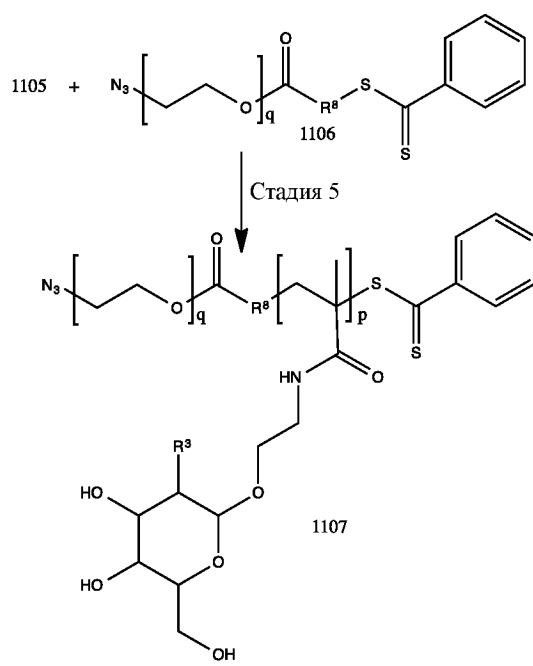




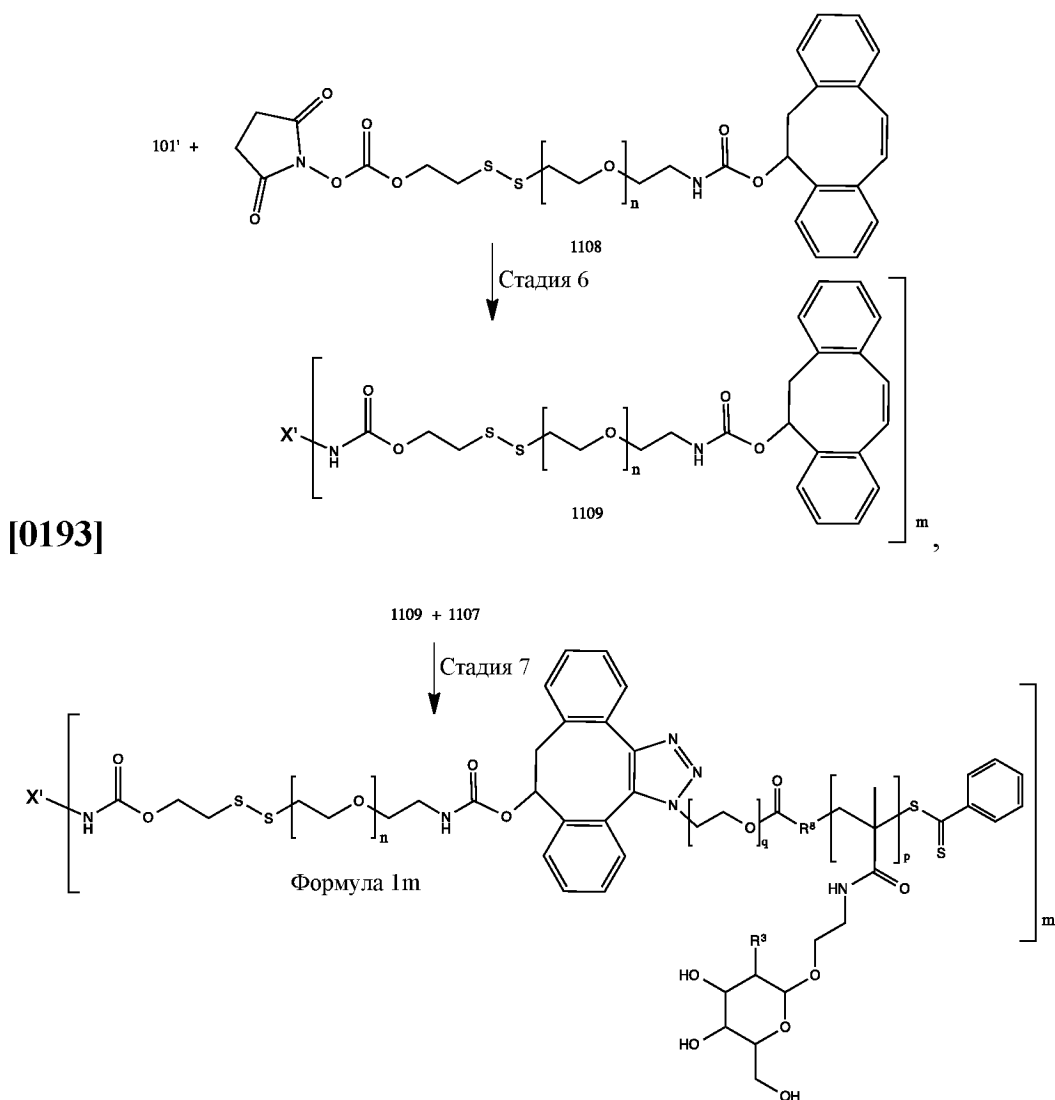
[0190]



[0191]



[0192]



[0195] Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 1, галактоза, защищенный галактозамин или N-ацетил-D-галактозамин (формула 1101, где R³ и R⁴ представляют собой OH, R³ представляет собой NH-защитную группу (например, циклизированную с R⁴) или R³ представляет собой NHAc и R⁴ 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.

[0196] Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 2, продукт формулы 1102 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 1103.

[0197] 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.

[0198] 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.

[0199] Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 5, азид-модифицированное uRAFT-средство (формула 1106) добавляли к раствору продукта формулы 1105 с азобисизобутиронитрилом, подвергали 4 циклам замораживание-откачка-размораживание и затем перемешивали при 70°C. Через несколько часов соответствующий полимерный продукт формулы 1107 осаждали путем добавления низшего алканола с последующим удалением растворителя. Если R^3 представляет собой NH-защитную группу (например, циклизированную с R^4) защитную группу(ы) в этот момент удаляют.

[0200] Как проиллюстрировано на схеме реакции 11, стадия 6, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной 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 час непрореагировавшее соединение формулы 1108 удаляют и полученный продукт формулы 1109 применяют без дополнительной очистки.

[0201] 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 часов избыток соединения формулы 1107 удаляют с получением соответствующего изомерного продукта формулы 1m.

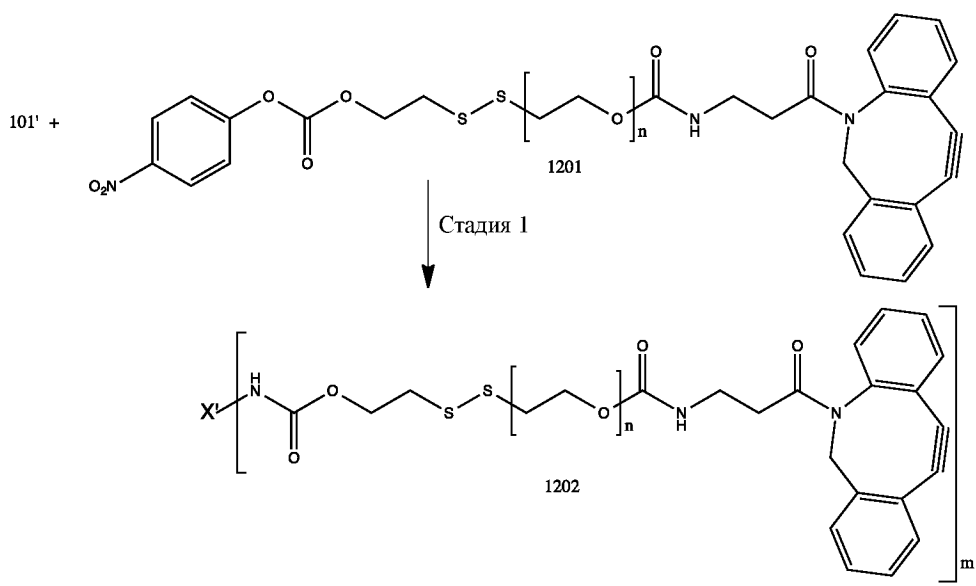
[0202] Путем замещения *N*-(2,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-3-ил)метакриламида продуктом формулы 1105 на стадии 5 и продолжения стадиями 6 и 7 получают соответствующий изомерный продукт формулы 1m, где Z'' представляет собой N-ацетилгалактозамин, конъюгированный по C2.

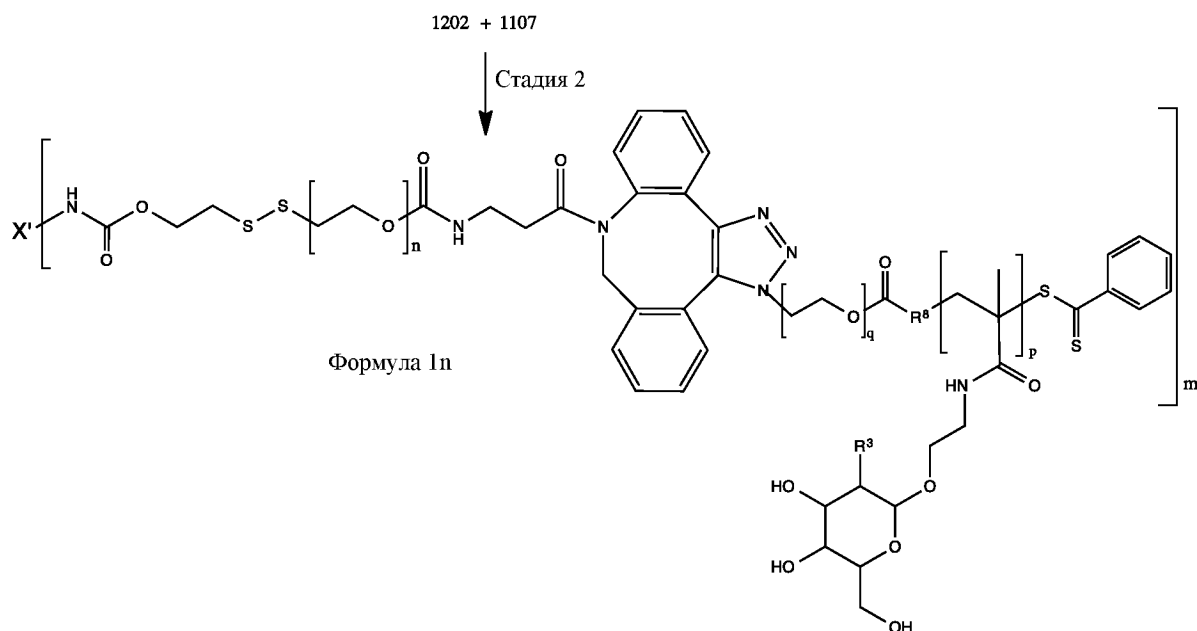
[0203] Композиции, соответствующие формуле 1m, можно называть следующим образом:

«F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z'', где Z'' представляет собой 1GAL, 1NGAL или 1NAcGAL, или

«F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL».

[0204] Схема реакции 12





[0205] Способ синтеза из схемы реакции 12 особенно пригоден для гидрофобных антигенов, антител, фрагментов антител и лигандов (например, инсулина) в связи с применением органических растворителей.

[0206] Как проиллюстрировано на схеме реакции 12, стадия 1, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной 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 выделяют в виде осадка

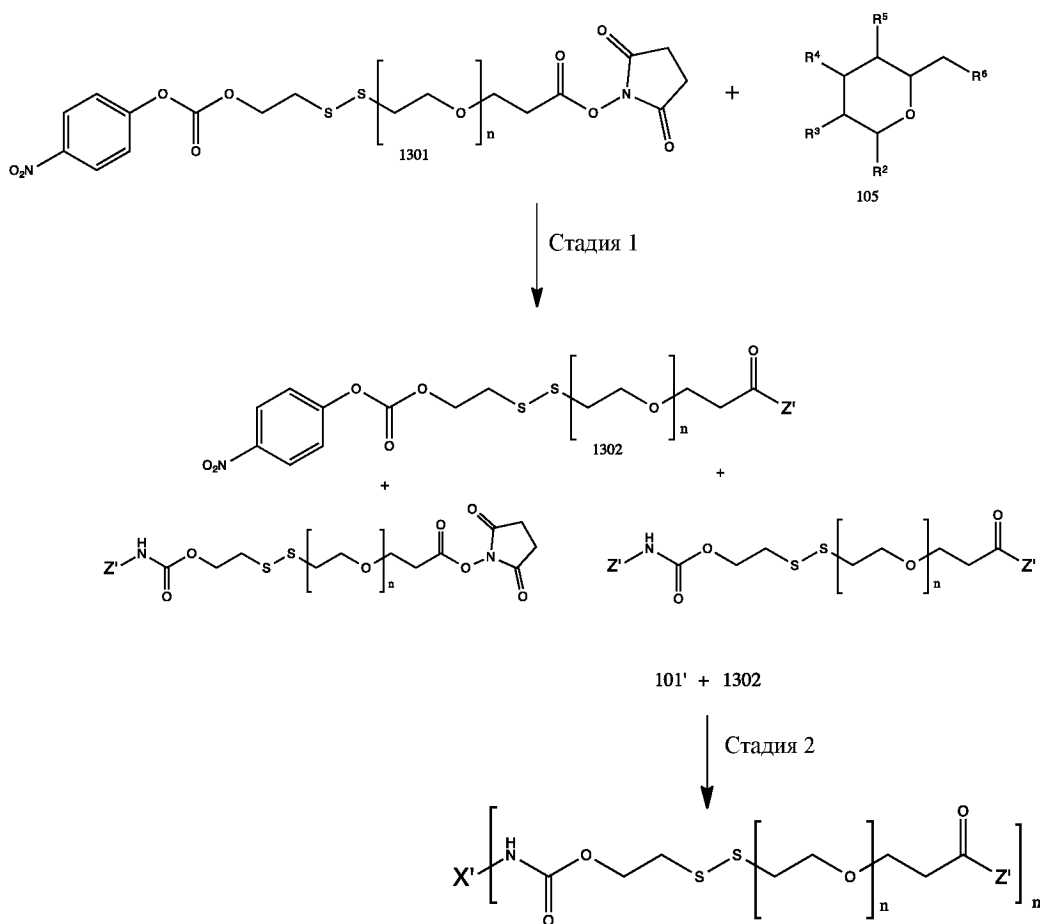
[0207] Продукт формулы 1202 ресуспендируют в органическом растворителе и добавляют некоторое количество (соответствующее значению m) соединения формулы 1107 (полученного, например, как описано со ссылкой на схему реакции 11) с последующим перемешиванием. Продукт реакции осаждали посредством добавления 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.

[0208] 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 или 1NAcGAL, или

«F1m-X'-n_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL».

[0209] Схема реакции 13



[0210]

[0211]

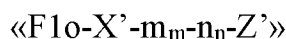
Формула 1o

[0212] На схеме реакции 13, стадия 1, сложный эфир нитрофеноксикарбонил-оксиалкил-дитиол-поли(этиленгликоля) и NHS (формула 1301) приводят в контакт с галактозой, галактозамином или N-ацетилгалактозамином (формула 105) с получением соответствующего продукта формулы 1302 вместе с двумя другими проиллюстрированными продуктами, из которых, прежде чем перейти

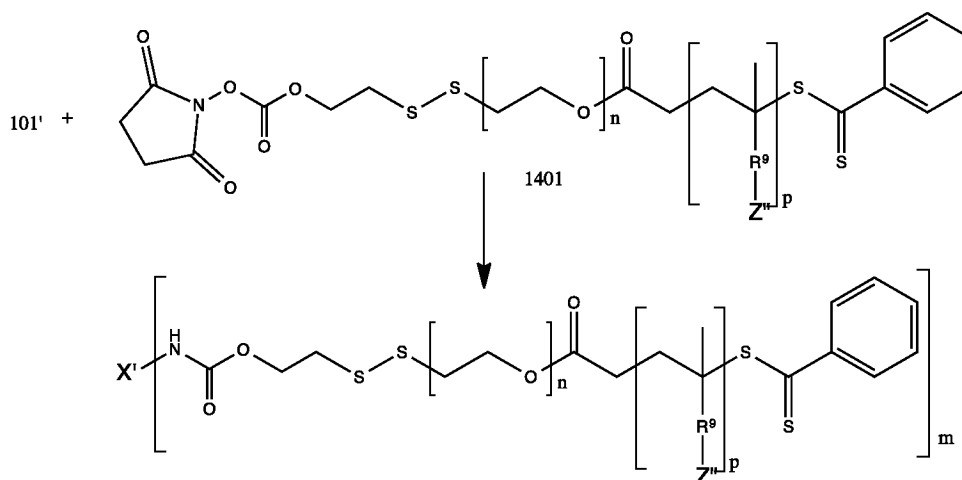
к следующей стадии, выделяли необходимые нитрофеноксикарбонил-дитиол-поли(этиленгликоль)-карбоксиэтилгалактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин формулы 1302.

[0213] Как проиллюстрировано на схеме реакции 13, стадия 2, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной аминогруппой(ами) формулы 101' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) продукта формулы 1302 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1о.

[0214] Композиции, соответствующие формуле 1о, можно называть следующим образом:



[0215] Схема реакции 14



[0216]

Формула 1p

[0217] Как проиллюстрировано на схеме реакции 14, антиген, антитело, фрагмент антитела или лиганд с нативной свободной поверхностной аминогруппой(ами) (формула 101') приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) сложного эфира пиридил-дитиол-поли(этиленгликоля) и NHS формулы 1401 с получением соответствующего продукта согласно формуле 1p.

[0218] Композиции, соответствующие формуле 1p, можно называть следующим образом:

«F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NacGAL» или «F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z».

[0219] Получение слитых белков

[0220] Слитый белок композиций формулы 2 можно экспрессировать с помощью принятой в данной области методики с использованием коммерчески доступных векторов экспрессии для клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей или насекомых и опубликованных, обнаруженных или сконструированных генных последовательностей. Последовательности, кодирующие X, Y и Z вместе с последовательностями меток можно клонировать в вектор экспрессии, например, в вектор экспрессии у млекопитающих pSecTag A, где слитый белок встраивают на С-конце относительно лидерной последовательности для секреции к-цепи Ig. Можно использовать другие различные методики клонирования, в том числе сайт-направленный мутагенез и вариации протокола QuikChange (Geiser, *et al.*), и известные специалистам в данной области. Слитые белки можно временно экспрессировать в клетках млекопитающих [например, в клетках эмбриональной почки (HEK293) или клетках яичника китайского хомячка (CHO)] с помощью временной трансфекции описанными выше векторами с применением полиэтиленимина. Трансфицированные клетки культивируют в подходящей среде (например, среде FreeStyle 293, Life Technologies), дополненной, например, вальпроевой кислотой или DMSO, в течение приблизительно 7 дней, после чего клетки удаляют центрифугированием и надосадочные жидкости культуры собирают и стерилизуют с помощью фильтрации.

[0221] В качестве альтернативы, слитые белки можно стабильно экспрессировать путем создания стабильно трансфицированных линий клеток млекопитающих. Кроме того, векторы экспрессии можно применять для получения слитых белков в бактериях, таких как *Escherichia coli*, *Corynebacterium* или *Pseudomonas fluorescens* с использованием совместимых

сред (например, LB, 2XYT, SOB, SOC, TB и других бульонов), добавок (например, глицерина, глюкозы и других добавок) и соответствующих условий для роста и экспрессии. При использовании систем экспрессии в дрожжах обычно можно применять *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, или другие организмы родов *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* и *Yarrowia*, и реже применять организмы, такие как нитчатые грибы *Aspergillus*, *Trichoderma* или *Myceliophthora thermophila* C1. При использовании систем экспрессии в насекомых можно применять клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом, или нелитическую экспрессию в клетках насекомых для достижения уровней экспрессии белка с высоким количеством; при этом наиболее распространенные клетки насекомых включают без ограничений Sf9 и Sf21 (из *Spodoptera frugiperda*), Hi-5 (из *Trichoplusia ni*) и Schneider 2 и 3 (из *Drosophila melanogaster*).

[0222] Экспрессированные продукты в виде слитого белка можно очистить из надосадочных жидкостей культуры с помощью аффинной хроматографии (например, с применением колонки HisTrap с Ni^{2+} -сефарозой, GE Healthcare, для слитого белка с His-меткой), с последующими другими стадиями хроматографической доочистки, такими как эксклюзионная хроматография (например, с применением колонки Superdex 75, GE Healthcare) или ионообменной хроматографии. Чистоту белка можно проверить, например, с помощью окраски гелей SDS-PAGE кумасси бриллиантовым синим и вестерн-блоттинга (например, вестерн-блоттинг в отношении 6xHis-метки в случае слитого белка с His-меткой). Концентрацию белка можно определять с помощью закона Ламберта-Бера, для чего можно измерить поглощение при 280 нм, например, с применением NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Молекулярную массу и коэффициент экстинкции можно оценивать на основании аминокислотной последовательности белка, например, с использованием инструмента ExPASy ProtParam. Уровни эндотоксина можно измерять, например, с использованием репортерной клеточной линии HEK-Blue TLR4 (Invivogen) в соответствии с инструкциями производителя.

[0223] Получение десиалированных антигенов, антител, фрагментов антител и лигандов

[0224] Десиалированные белки можно получать с помощью принятой в данной области методики с применением коммерчески доступного фермента нейраминидазы (также известного как ацетил-нейраминил-гидролаза или сиалидаза) или серной кислоты. Для ферментативного десиалирования белка, представляющего интерес, белок можно инкубировать вместе с нейраминидазой при 37°C в течение 1 часа или дольше, в случае необходимости. Для химического десиалирования путем кислотного гидролиза белок, представляющий интерес, можно обработать 0,025 н. серной кислотой при 80°C в течение 1 часа или дольше, в случае необходимости. Затем десиалированный белок можно очищать из реакционной смеси с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным ионом металла (например, с применением колонки HisTrap с Ni²⁺-сефарозой, GE Healthcare), с последующей эксклюзионной хроматографией (например, с использованием колонки Superdex 75, GE Healthcare). Чистоту белка можно проверить, например, с помощью окраски гелей SDS-PAGE кумасси бриллиантовым синим и вестерн-блоттинга в отношении 6xHis-метки. Десиалирование можно проверить, например, посредством обнаружения с помощью лектина присутствия сиаловой кислоты в составе белка в вестерн-блотах или колориметрической количественной оценки содержания сиаловой кислоты с применением коммерчески доступных наборов (например Abcam, ProZyme или Sigma). Концентрацию десиалированного белка можно определять с помощью закона Ламберта-Бера, для чего можно измерить поглощение при 280 нм, например, с применением NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Молекулярную массу и коэффициент экстинкции можно оценивать на основании аминокислотной последовательности белка, например, с использованием инструмента ExPASy ProtParam. Уровни эндотоксина можно измерять, например, с использованием репортерной клеточной линии HEK-Blue TLR4 (Invivogen) в соответствии с инструкциями производителя.

[0225] Конкретные способы и последние стадии

[0226] Соединение формулы 103' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 106 с получением соответствующего продукта формулы 1a.

[0227] Соединение формулы 103' приводят в контакт с избытком (соответствующим значению m) соединения формулы 201 с получением соответствующего продукта формулы 1b.

[0228] 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.

[0229] 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.

[0230] 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.

[0231] Конкретные композиции

[0232] В качестве неограничивающего примера конкретной группой, предпочтительной для композиций, фармацевтических составов, способов получения и применения по настоящему раскрытию, 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, адотрастузумаб-энтанзина, агалсидазы-альфа, агалсидазы-бета, альдеслейкина, алглүоцеразы, алглүокозидазы-альфа, ингибитора α -1-протеиназы, анакинры, анистреплазы (анизоилированный активаторный комплекс плазминогена и стрептокиназы), антитромбина III, антитимоцитарного глобулина, атеплазы, бевацизумаба, бивалирудина, ботулинического токсина типа А, ботулинического токсина типа В, C1-ингибитора эстеразы, канакинумаба, карбоксипептидазы G2 (глүокарпидазы и вораксазы), цертолизумаб-пегола, цетуксимаба, коллагеназы, иммунного Fab к Crotalidae, дарбэпоэтина- α , 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, имиглүоцеразы, инфликсимаба, инсулина (в том числе гHu-инсулина и бычьего инсулина), интерферона- α 2a, интерферона- α 2b, интерферона- β 1a, интерферона- β 1b, интерферона- γ 1b, ипилимумаба, L-аргиназы, L-аспарагиназы, L-метионазы, лактазы, ларонидазы, лепирудина/гирудина, меказермина, меказермин-ринфабата, метоксифатумумаба, натализумаба, октреотида, опрелвекина, панкреатической амилазы, панкреатической липазы, папаина, Пэг-аспарагиназы, Пэг-доксорубицина HCl, ПЭГ-эпоэтина- β , пэгфилграстима, Пэг-интерферона- α 2a, Пэг-интерферона- α 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 конархин (Ara h 1)
 - Из пшеницы, в том числе альфа-глиадин «33-мерный» нативный (SEQ ID NO:24), альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25), альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) и омега-глиадин (SEQ ID NO:27).
 - От кошки, в том числе Fel d 1A (UNIPROT P30438) и кошачий альбумин (UNIPROT P49064).

- От собаки, в том числе Can f 1 (UNIPROT O18873) 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 Yr.
 - 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 ± 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 ± 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 ± 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 ± 3 .
 - В частности, где Z конъюгирован с Y через этилацетамидную группу.

- Более конкретно, где Z конъюгирован с Y по его C1.
 - Более конкретно, где R⁸ представляет собой CMP.
- Более конкретно, где R⁸ представляет собой CMP.
 - В частности, где R⁸ представляет собой CMP.
- 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.

[0233] Каждая из описанных выше групп и подгрупп являются предпочтительными по отдельности и могут быть объединены для описания дополнительных предпочтительных аспектов настоящего раскрытия, 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 Yh, формулы Yi, формулы Yk, формулы Ym, формулы Yn, формулы Yo и формулы Yr.

- 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 ± 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 ± 3 .
- В особенности, где Y представляет собой формулу Y_a , формулу Y_b , формулу Y_m или формулу Y_n .
 - 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 ± 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 ± 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 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 особенности, где 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 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 ± 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 ± 3 .
 - В частности, где Y представляет собой формулу Ya, формулу Yb, формулу Ym или формулу Yn.
 - Более конкретно, где n равняется от 8 до $90 \pm 10\%$, p равняется от 20 до $100 \pm 10\%$, и q равняется от 3 до 20 ± 3 .
 - Более предпочтительно, где n равняется от 40 до $80 \pm 10\%$, p равняется от 30 до $40 \pm 10\%$, 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.
- m равняется целому числу 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 равняется целому числу, представляющему 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.
- p равняется целому числу, представляющему совокупность, включающую от приблизительно 2 до 150.
 - p 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 p равняется целому числу, представляющему совокупность, включающую от приблизительно 1 до 100.
 - В частности, p 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 p равняется от приблизительно 8 до 90.
 - Более конкретно, p 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 p 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, p 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, p 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.

[0234] В качестве неограничивающего примера конкретной группой, предпочтительной для композиций, фармацевтических составов, способов получения и применения по настоящему раскрытию, являются следующие комбинации и сочетания групп заместителей формулы 2 (разделенные на подгруппы, соответственно, в порядке возрастания предпочтения):

- X представляет собой терапевтический белок, в отношении которого у пациентов развивается нежелательный иммунный ответ, выбранный из: абатацепта, абциксимаба, адалимумаба, аденозиндезаминазы, адотрастузумаб-эмтанзина, агалсидазы-альфа, агалсидазы-бета, альдеслейкина, алглюцеразы, алглюкозидазы-альфа, ингибитора α -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, дарбэпозтина- α , 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, интерферона- α 2a, интерферона- α 2b, интерферона- β 1a, интерферона- β 1b, интерферона- γ 1b, ипилимумаба, L-аргиназы, L-аспарагиназы, L-метионазы, лактазы, ларонидазы, лепирудина/гирудина, меказермина, меказермина-ринфабата, метоксифатумумаба, натализумаба, октреотида, опрелвекина, панкреатической амилазы, панкреатической липазы, папаина, Пэг-аспарагиназы, Пэг-доксорубицина HCl, ПЭГ-эпоэтина- β , пэгфилграстима, Пэг-интерферона- α 2a, Пэг-интерферона- α 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; при условии, что интерферон (интерферон-альфа 2, интерферон-альфа 5, интерферон-альфа 6 или консенсусный интерферон), рибавирин, нексавар/сорафениб, эрбитус/цетуксимаб, авастатин/бевацизумаб или герцептин/трастузумаб исключаются из объема формулы 2, когда $m' + m''$ равняется 1 и Z представляет собой DOM 26h-196-61 или другие молекулы для адресной доставки в печень, описанные в патенте США 2013/0078216.

- 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 конархин (Ara h 1)
 - Из пшеницы, в том числе альфа-глиадин «33-мерный» нативный (SEQ ID NO:24), альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25), альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) и омега-глиадин (SEQ ID NO:27).
 - От кошки, в том числе Fel d 1A (UNIPROT P30438) и кошачий альбумин (UNIPROT P49064).
 - От собаки, в том числе Can f 1 (UNIPROT O18873) 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 Gly₃Ser.
- Z представляет собой последовательность антитела к ASGPR, Dom26h-196-61, или последовательность, содержащую консервативную замену.
- m' + m'' равняется 1 или 2, а X представляет собой полноразмерный белок, в том числе белковые терапевтические средства.
- m' + m'' равняется 1 или 2, где m' равняется 1, и m'' равняется 0 или 1.
- m' + m'' равняется от 2 до приблизительно 10, где X представляет собой группу пептидов (эпитопов) собственных антигенов, которые, как известно, ассоциированы с конкретным аутоиммунным заболеванием, или которые служат для лечения генетически различных целевых популяций.
 - m' + m'' равняется от приблизительно 4 до 7, где аутоиммунное заболевание представляет собой рассеянный склероз, и X независимо выбран из: MBP13-32 (SEQ ID NO:11), MBP83-99 (SEQ ID NO:12), MBP111-129 (SEQ ID NO:13), MBP146-170 (SEQ ID NO:14), MOG1-20 (SEQ ID NO:15), MOG35-55 (SEQ ID NO:16) и PLP139-154 (SEQ ID NO:17).
 - m' + m'' равняется 7 и X представляет собой, соответственно, MBP13-32 (SEQ ID NO:11), MBP83-99 (SEQ ID NO:12), MBP111-129 (SEQ ID NO:13), MBP146-170 (SEQ ID NO:14), MOG1-20 (SEQ ID NO:15), MOG35-55 (SEQ ID NO:16) и PLP139-154 (SEQ ID NO:17).

[0235] Как и в случае приведенного выше обсуждения в отношении формулы 1, каждая из описанных выше групп и подгрупп для формулы 2, являются предпочтительными по отдельности и могут быть объединены для описания дополнительных предпочтительных аспектов настоящего раскрытия.

[0236] Применимость, тестирование и введение**[0237] Общая применимость**

[0238] Композиции по настоящему раскрытию 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.

[0239] В предпочтительном варианте осуществления композиции по настоящему раскрытию применяют для модуляции, в частности понижающей регуляции, антиген-специфичного нежелательного иммунного ответа.

[0240] Композиции по настоящему раскрытию применимы 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 анафилаксии.

[0241] В настоящем раскрытии антигены адресно доставляются в печень для презентации с помощью антиген-презентирующих 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.

[0242] В настоящем раскрытии 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).

[0243] 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; псориатический артрит; ревматоидный артрит; атопический дерматит; аутоиммунную апластическую анемию; аутоиммунный гастрит; аутоиммунный гепатит; аутоиммунный гипопизит; аутоиммунный оофорит; аутоиммунный орхит; аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа; аутоиммунный полиэндокринный синдром 2 типа; аутоиммунный тиреоидит; болезнь Бехчета; облитерирующий бронхиолит; буллезный пемфигоид; целиакию; синдром Черджа-Строса; хроническую воспалительную демиелинизирующую полиневропатию; рубцующийся пемфигоид; болезнь Крона; миокардит Коксаки; герпетиформный дерматит Дюринга; сахарный диабет (тип 1); 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; пузырьчатку 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.

[0244] Конкретная группа аутоиммунных болезненных состояний, которые можно лечить с применением способов и композиций, представленных в данном документе, включает без ограничений: острый некротический геморрагический лейкоэнцефалит; аддисонову болезнь; псориатический артрит; ревматоидный артрит; аутоиммунную апластическую анемию; аутоиммунный гипофизит; аутоиммунный гастрит; аутоиммунный полиэндокринный синдром 1 типа; буллезный пемфигоид; целиакию; миокардит Коксаки; герпетиформный 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; нейромиелит зрительного нерва; пернициозную анемию; пузырчатку обыкновенная и варианты; аутоиммунное заболевание гипофиза; преждевременное угасание функции яичников; ревматическую болезнь сердца; системную склеродермию; синдром Шегрена; системную красную волчанку и витилиго.

[0245] 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.

[0246] 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 раскрытию на основе этого антигена.

[0247] Тестирование

[0248] При установлении применимости композиций и способов по настоящему раскрытию, 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 раскрытию. 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 часов, 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 раскрытию показаны более высокие уровни концентрации в антиген-презентирующих клетках печени по сравнению с неконъюгированным PE или носителем.

[0249] Эффективность иммуномодуляции можно протестировать путем измерения пролиферации OT-I CD8⁺ клеток (трансплантированных в мышей-хозяев) в ответ на введение композиции по настоящему раскрытию, включающей известный антиген, такой как овальбумин («OVA»), по сравнению с введением антигена отдельно или только носителя. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему раскрытию показано увеличение пролиферации клеток OT1 по сравнению с антигеном отдельно или носителем, что демонстрирует увеличение перекрестного примирования CD8⁺ Т-клеток. Для различения Т-клеток, подвергающихся экспансии и развитию в фенотип функционального эффектора, от клеток, подвергающихся экспансии и делеции, пролиферирующие OT-I CD8⁺ Т-клетки можно анализировать

фенотипически в отношении молекулярных сигнатур истощения [таких как белок программируемой гибели-1 (PD-1), FasL и другие], а также аннексина-V в качестве отличительного признака апоптоза и, таким образом, делеции. ОТ-I CD8⁺ Т-клетки можно также оценивать в отношении их способности реагировать на антигенную стимуляцию с адьювантом, 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 раскрытию в мышей-хозяев с последующей антигенной стимуляцией. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему раскрытию показаны очень низкие (например, фоновые) уровни воспалительных ответов с ОТ-I CD8⁺ Т-клетками в отношении OVA, что демонстрирует, таким образом, иммунную толерантность.

[0250] Гуморальный иммунный ответ можно тестировать путем введения композиции по настоящему раскрытию, 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 раскрытию 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.

[0251] 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 раскрытию группу субъектов стимулировали путем введения антигена отдельно, с последующим измерением уровней антител к антигену. При тестировании подобным образом для композиций по настоящему раскрытию 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.

[0252] 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 EAE (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.)

[0253] Введение

[0254] Композиции по настоящему раскрытию вводят в терапевтически эффективной дозировке, например, в дозировке, достаточной для обеспечения лечения болезненных состояний, описанных ранее. Введения соединений по настоящему раскрытию или их фармацевтически приемлемых солей можно осуществить с помощью любых общепринятых способов введения средств, которые служат для подобных применений.

[0255] Хотя уровни дозировки для человека еще должны быть оптимизированы для соединений по настоящему раскрытию, их можно изначально экстраполировать на основании от приблизительно 10 мкг 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 массы тела и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,3 до 1,0 мг/кг массы 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 может осуществляться 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.

[0256] Композиции по настоящему раскрытию можно вводить либо отдельно, либо в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Хотя предполагаются все типичные способы введения, 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 раскрытию 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 раскрытию, 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.

[0257] 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 раскрытию, оставшаяся 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.

[0258] Пригодные для введения жидкие фармацевтические композиции можно получать, например, растворением, диспергированием и т. д. активной композиции по настоящему раскрытию (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 галактоз), 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, эмульгирующие средства, стабилизирующие средства, солюбилизующие средства, pH-буферные средства и т. п., например, ацетат натрия, цитрат натрия, производные циклодекстрина, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинацетат и триэтаноламинолеат 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, 22nd Edition, 2012. Композиция или состав, подлежащий введению, будет в любом случае содержать активное вещество в количестве, эффективном для лечения симптомов субъекта, подлежащего лечению.

ПРИМЕРЫ

[0259] Следующие примеры служат для более полного описания способа применения описанного выше раскрытия, а также изложения самых лучших режимов, предусмотренных для выполнения различных аспектов настоящего

раскрытия. Понятно, что эти примеры никоим образом не служат для ограничения истинного объема настоящего раскрытия, а скорее представлены в иллюстративных целях. Все источники, упоминаемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[0260] Пример 1

F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (или F1a-OVA-m₄-n₈₀-2NGAL)

[0261] 1A. Формула 103', где X' представляет собой OVA и m равняется 4

[0262] 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 час избыток реагента Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением соответствующего продукта формулы 103'.

[0263] 1B. Формула 106A, где n равняется 80

[0264] 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 час полученный пиридил-дитиол-поли(этиленгликоль)-N-ацетилгалактозамин (формула 106A) был готов к применению без дополнительной очистки.

[0265] 1C. Формула 1aA, где X' представляет собой OVA, m равняется 4, n равняется 80 (и Z' представляет собой C2-галактозамин)

[0266] Очищенный конъюгат OVA-реагент Траута формулы 103', полученный в примере 1A, добавляли непосредственно к перемешиваемому продукту формулы 106A, полученному в примере 1B. Через 1 час 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.)

[0267] 1D. Другие соединения формулы 103'

[0268] 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:5),
- GAD-65 (SEQ ID NO:6),
- IGRP (SEQ ID NO:7)
- MBP (SEQ ID NO:8),
- MOG (SEQ ID NO:9),
- PLP (SEQ ID NO:10),
- MBP13-32 (SEQ ID NO:11),
- MBP83-99 (SEQ ID NO:12),
- MBP111-129 (SEQ ID NO:13),
- MBP146-170 (SEQ ID NO:14),
- MOG1-20 (SEQ ID NO:15),
- MOG35-55 (SEQ ID NO:16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO:17),
- MART1 (SEQ ID NO:18),
- тирозиназой (SEQ ID NO:19),
- PMEL (SEQ ID NO:20),
- аквапорином-4 (SEQ ID NO:21),
- S-аррестинном (SEQ ID NO:22),
- IRBP (SEQ ID NO:23),

- конархином (UNIPROT Q6PSU6),
- альфа-глиадином «33-мерным» нативным (SEQ ID NO:24),
- альфа-глиадином «33-мерным» деамидированным (SEQ ID NO:25),
- альфа-глиадином (SEQ ID NO:26),
- омега-глиадином (SEQ ID NO:27),
- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT O18873),
- собачьим альбумином (UNIPROT P49822), и
- примером 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 агаласидазу-альфа и m равняется 14,
- X представляет собой агаласидазу-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:5) и m равняется 2,
- X представляет собой GAD-65 (SEQ ID NO:6) и m равняется 8,
- X представляет собой IGRP (SEQ ID NO:7) и m равняется 7,
- X представляет собой MBP (SEQ ID NO:8) и m равняется 6,
- X представляет собой MOG (SEQ ID NO:9) и m равняется 5,
- X представляет собой PLP (SEQ ID NO:10) и m равняется 8,
- X представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO:11) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO:12) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO:13) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO:14) и m равняется 2,
- X представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO:15) и m равняется 1,
- X представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO:16) и m равняется 2,
- X представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO:17) и m равняется 3,
- X представляет собой MART1 (SEQ ID NO:18) и m равняется 4,
- X представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO:19) 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:23) и m равняется 21,
- X представляет собой конархин и m равняется 21,
- X представляет собой альфа-глиадин «33-мерный» нативный (SEQ ID NO:24) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) 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,
- X представляет собой собачий альбумин и m равняется 23, и
- X представляет собой пример RhCE и m равняется 10.

[0269] 1E. Другие соединения Формулы 1aA

[0270] 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:

- F1aA-абциксимаб-m₁₀-n₈₀,
- F1aA-адалимуаб-m₁₁-n₈₀,

- F1aA-агаласидаза-альфа-m₁₄-n₈₀,
- F1aA-агаласидаза-бета-m₁₄-n₈₀,
- F1aA-альдеслейкин-m₆-n₈₀,
- F1aA-алглюкозидаза-альфа-m₁₃-n₈₀,
- F1aA-фактор VIII-m₁₀₀-n₈₀,
- F1aA-фактор IX-m₁₈-n₈₀,
- F1aA-L-аспарагиназа-m₅-n₈₀,
- F1aA-ларонидаза-m₇-n₈₀,
- F1aA-октреотид-m₁-n₈₀,
- F1aA-фенилаланин-аммиак-лиаза-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-расбуриказа-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-инсулин-m₂-n₈₀,
- F1aA-GAD-65-m₈-n₈₀,
- F1aA-IGRP-m₇-n₈₀,
- F1aA-MBP-m₆-n₈₀,
- F1aA-MOG-m₅-n₈₀,
- F1aA-PLP-m₈-n₈₀,
- F1aA-MBP13-32-m₁-n₈₀,
- F1aA-MBP83-99-m₁-n₈₀,
- F1aA-MBP111-129-m₁-n₈₀,

- F1aA-MBP146-170-m₂-n₈₀,
- F1aA-MOG1-20-m₁-n₈₀,
- F1aA-MOG35-55-m₂-n₈₀,
- F1aA-PLP139-154-m₃-n₈₀,
- F1aA-MART1-m₄-n₈₀,
- F1aA-тирозиназа-m₈-n₈₀,
- F1aA-PMEL-m₅-n₈₀,
- F1aA-аквапорин-4-m₄-n₈₀,
- F1aA-S-аррестин-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-IRBP-m₂₁-n₈₀,
- F1aA-конархин-m₂₁-n₈₀,
- F1aA-альфа-глиадин «33-мерный» нативный-m₁-n₈₀,
- F1aA-альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-m₁-n₈₀,
- F1aA-альфа-глиадин-m₁-n₈₀,
- F1aA-омега-глиадин-m₁-n₈₀,
- F1aA-Fel d 1-m₄-n₈₀,
- F1aA-кошачий альбумин-m₁₆-n₈₀,
- F1aA-Can f 1-m₆-n₈₀,
- F1aA-собачий альбумин-m₂₃-n₈₀ и
- F1aA-RhCE-m₁₀-n₈₀.

[0271] 1F. Другие соединения Формулы 106А

[0272] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 1В, 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 106А, 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,

[0273] 1G. Другие соединения Формулы 1aA

[0274] 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-m₂-n₁₂,
- F1aA-инсулин-m₂-n₃₃,
- F1aA-инсулин-m₂-n₄₀,
- F1aA-инсулин-m₂-n₄₃,
- F1aA-инсулин-m₂-n₅₀,
- F1aA-инсулин-m₂-n₆₀,
- F1aA-инсулин-m₂-n₇₅ и
- F1aA-инсулин-m₂-n₈₄.

[0275] Пример 2

[0276] F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL

[0277] 2A. Формула 103', где X' представляет собой овальбумин и m равняется 1

[0278] 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 час непрореагировавший реагент Траута удаляли с использованием

колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 103’.

[0279] 2B. Формула 1b, где X’ представляет собой овальбумин, m равняется 1, n равняется 4, p равняется 34, R⁹ представляет собой прямую связь и Z’’ представляет собой 2NAcGAL

[0280] В микроцентрифужной пробирке поли(галактозамин-метакрилат)-(пиридил дисульфид) (формула 201) (20,0 мг, 0,0020 ммоль) солюбилизировали 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 часа. 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).

[0281] 2C. Другие соединения Формулы 1b

[0282] 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-m₁₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-адалимуаб-m₁₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-агаласидаза-альфа-m₁₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-агаласидаза-бета-m₁₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-альдеслейкин-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-алглюкозидаза-альфа-m₁₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-фактор VIII-m₁₀₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL,

- F1b-фактор IX-m₁₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-L-аспарагиназа-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-ларонидаза-m₇-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-октреотид-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-фенилаланин-аммиак-лиаза-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-расбуриказа-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-инсулин-m₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-GAD-65-m₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-IGRP-m₇-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MOG-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PLP-m₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP13-32-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP83-99-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP111-129-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP146-170-m₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MOG1-20-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MOG35-55-m₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PLP139-154-m₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MART1-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,

- F1b-тирозиназа-m₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PMEL-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-аквапорин-4-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-S-аррестин-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-IRBP-m₂₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-конархин-m₂₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-альфа-глиадин «33-мерный» нативный-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-альфа-глиадин-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-омега-глиадин-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Fel d 1-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-кошачий альбумин-m₁₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Can f 1-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-собачий альбумин-m₂₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL и
- F1b-RhCE-m₁₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL.

[0283] Пример 3

[0284] F1f-OVA-m₁-n₄-p₃₃-2NAcGAL

[0285] 3A. Формула 1f, где X' представляет собой овальбумин и m равняется 1, n равняется 4, p равняется 33, R⁹ представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL

[0286] 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 часа. 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.

[0287] Пример 4

[0288] F1g-PVA-m₁-p₉₀-2NacGAL

[0289] 4A. Формула 1g, где X' представляет собой овальбумин и m равняется 1, p равняется 90, R⁹ представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NacGAL

[0290] 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. Смесь оставляли перемешиваться в течение 2 часов. 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.

[0291] Пример 5

[0292] F1h-OVA-m₂-n₄₅-p₅₅-q₄-2NacGAL

[0293] 5A. Формула 802', где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2 и n равняется 45

[0294] В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (3,0 мг, 0,0000714286 ммоль) добавляли к 150 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 мМ

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 часа. Избыток дибензоциклооктин-PEG-(*p*-нитрофенилкарбоната) удаляли с применением колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 802'.

[0295] 5В. Формула 1h, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 45, p равняется 55, q равняется 4, R⁸ представляет собой CH₂, R⁹ представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL

[0296] Поли(галактозамин-метакрилат)-N3 (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 час полученный продукт формулы 1h очищали с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии.

[0297] Пример 6

[0298] F1j-OVA-m₁₀-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL

[0299] 6А. Формула 103', где X' представляет собой овальбумин и m равняется 10

[0300] В не содержащей эндотоксинов пробирке OVA (5,0 мг, 0,00019 ммоль) добавляли к 150 мкл PBS, pH 8,0, содержащего 5 мМ 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 час непрореагировавший реагент Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 103'.

[0301] 6В. Формула 902", где X' представляет собой овальбумин, m равняется 10 и n равняется 45

[0302] 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 часа. Избыток дибензоциклооктин-PEG-(пиридил-дисульфида) удаляли с применением центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 902".

[0303] 6С. Формула 1j, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 10, n равняется 45, p равняется 55, q равняется 4, R⁸ представляет собой CH₂, R⁹ представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL

[0304] Поли(галактозамин метакрилат)-N3 (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 час полученный продукт формулы 1j очищали (избыток p(GMA)-N3 удаляли) с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта.

[0305] Пример 7

[0306] F1L-OVA-m₂-n₈₀-p₅₅-q₄-2NAcGAL

[0307] 7А. Формула 1002, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2 и n равняется 80

[0308] 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 часа. Избыток дибензоциклооктин-

PEG-(пиридил-дисульфида) удаляли с применением центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 1002.

[0309] 7B. Формула 1L, где X' представляет собой овальбумин, m равняется 2, n равняется 80, p равняется 55, q равняется 4, R⁸ представляет собой CH₂, R⁹ представляет собой прямую связь и Z'' представляет собой 2NAcGAL

[0310] Поли(галактозамин метакрилат)-N3 (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 7A при перемешивании. Через 1 час полученный продукт формулы 1L очищали (избыток поли(галактозамин-метакрилат)-N3 удаляли) с помощью центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта.

[0311] Пример 8

[0312] Получение поли(галактозамин-метакрилатных) полимеров

[0313] 8A. Галактозамин-метакрилат

[0314] К перемешиваемому галактозамина гидрохлориду (2,15 г, 10,0 ммоль) добавляли 0,5 М метоксида натрия (22 мл, 11,0 ммоль). Через 30 минут добавляли ангидрид метакриловой кислоты (14,694 г, 11,0 ммоль) и продолжали перемешивание в течение 4 часов. Полученный галактозамин-метакрилат загружали на силикагель на роторном испарителе и очищали с помощью колоночной хроматографии с использованием DCM:MeOH (85:15).

[0315] 8B. Формула 201, где n равняется 4 и p равняется 30

[0316] 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 сосуда Шленка. Реакционную смесь подвергали 4 циклам

замораживания-оттаивания и затем перемешивали при 70°C в течение 6 часов. Необходимый полимерный продукт формулы 201 осаждали в 12 мл метанола, а избыток растворителя удаляли при пониженном давлении.

[0317] Пример 9

[0318] Получение F1aA-PE-m₃-n₈₀

[0319] 9A. Формула 103', где X' представляет собой фикоэритрин

[0320] В не содержащей эндотоксинов пробирке фикоэритрин («PE») (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 PE при непрерывном перемешивании. Через 1 час избыток реагента Траута удаляли с использованием колонки для центробежной эксклюзионной хроматографии с получением продукта формулы 103'.

[0321] 9B. Формула 106A, где n равняется 80

[0322] 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 час полученный продукт формулы 106A был готов к применению без дополнительной очистки.

[0323] 9C. Формула 1a, где X' представляет собой фикоэритрин, m равняется 3, n равняется 80 и Z' представляет собой галактозамин

[0324] Очищенные конъюгаты PE-реагент Траута, полученные в примере 9A, добавляли непосредственно к перемешиваемому продукту формулы 106A,

полученному в примере 9B. Через 1 час полученный продукт формулы 1a очищали пропусканием реакционной смеси через колонку для центробежной эксклюзионной хроматографии. Определение характеристик (UHPLC SEC, гель-электрофорез) подтверждало идентичность продукта.

[0325] Пример 10

[0326] OVA-DOM

[0327] 10A. Получение вектора экспрессии

[0328] Вектор экспрессии для клеток млекопитающих pSecTag A был приобретен у Life Technologies. Ген, кодирующий домен антитела к ASGPR, Dom26h-196-61, в настоящем документе называется «DOM», приобретен у поставщика GenScript в виде кодон-оптимизированной последовательности для экспрессии белка в клетках человека. Последовательности, кодирующие OVA, DOM, гибкий линкер Gly₃Ser и 6xHis-метку, клонировали в вектор экспрессии для клеток млекопитающих, pSecTag A, на С-конце относительно лидерной последовательности для секреции κ-цепи Ig с помощью сайт-направленного мутагенеза, следуя вариации протокола QuikChange (Geiser, *et al.*).

[0329] 10B. Экспрессия и очистка соединения формулы 2, где m' равняется 1, m'' равняется 0, X представляет собой овальбумин, Y представляет собой Gly₃Ser, Z представляет собой антитело к ASGPR, Dom26h-196-61

[0330] Клетки HEK293 подвергали временной трансфекции модифицированными векторами pSecTag A, полученными, например, как описано в примере 10A, с использованием полиэтиленимина. Трансфицированные клетки культивировали в среде FreeStyle 293 (Life Technologies), дополненной вальпроевой кислотой, в течение 7 дней, после чего клетки удаляли центрифугированием, а надосадочные жидкости культуры собирали и стерилизовали с помощью фильтрации. Слитые белки OVA/DOM формулы 2 очищали из надосадочных жидкостей культуры с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным ионом металла с применением

колонки HisTrap с Ni^{2+} -сефарозой (GE Healthcare), с последующей эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex 75 (GE Healthcare), они имели следующую обобщенную структуру:

N- OVA- Gly₃Ser- DOM- Gly₃Ser- 6xHis –C

и следующую аминокислотную последовательность:

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQI
NKVVRFDKLPFGDSIEAQCGTSNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYA
EERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVL
QPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMY
QIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTE
WTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGSSAE
SLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAGVDAASVCM.FRADHPFLFCIKHIAT
NAVLFFGRCVSPGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAW
VRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLLTVSSGGGSHHHHHH (SEQ ID
NO:28)

[0331] Чистоту белка проверяли с помощью окраски гелей SDS-PAGE кумасси бриллиантовым синим и вестерн-блоттинга в отношении 6xHis-метки. Концентрацию белка определяли с помощью закона Ламберта-Бера, для чего измеряли поглощение при 280 нм с применением NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), а молекулярную массу (57,3 кДа) и коэффициент экстинкции ($57090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) оценивали на основании аминокислотной последовательности белка с использованием инструмента ExPASy ProtParam. Уровни эндотоксина измеряли с помощью репортерной клеточной линии HEK-BLUE TLR (Invivogen) в соответствии с инструкциями производителя.

[0332] 10С. Другие композиции формулы 2

[0333] Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 10А и 10В, и проводя соответствующие замены в векторах pSecTag А, получали следующие слитые белки формулы 2:

N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis-C

со следующей аминокислотной последовательностью:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRIS
 ARGVTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEH
 TRFDSWGQGTLVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAI
 MSALAMVYLGA KDSTRTQINKVVRFDKLPGF GDSIEAQCGTSVNVHSSLRDIL
 NQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKEL YRGGLEPINFQTAADQA
 RELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQ
 AMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLP
 DEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLM
 A MGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAAS
 VC_M.FRADHPFLFCIKHIATNAVLF FGR CVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:29);
 и

N- OVA- Gly₃Ser- DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis -C

со следующей аминокислотной последовательностью:

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA KDSTRTQI
 NKVVRFDKLPGF GDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYA
 EERYPILPEYLQCVKEL YRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVL
 QPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMY
 QIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTE
 WTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAE
 SLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVC_M.FRADHPFLFCIKHIAT
 NAVLFFGR CVSPGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAW
 VRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA
 EDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFK

ELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPFGDSIE
 AQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKEL
 YRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAI
 VFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKI
 LELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLP
 RMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINE
 AGREVVGSAEAGVDAASVC_m.FRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGS
 HHHHHH (SEQ ID NO:30).

[0334] 10D. Другие композиции формулы 2

[0335] Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 10А и 10В, и заменяя Gly₃Ser в векторах линкером с сайтом расщепления для иммунопротеасомы («IPC»), и OVA в векторах на:

MBP13-32 (SEQ ID NO:11),

MBP83-99 (SEQ ID NO:12),

MBP111-129 (SEQ ID NO:13),

MBP146-170 (SEQ ID NO:14),

MOG1-20 (SEQ ID NO:15),

MOG35-55 (SEQ ID NO:16), и

PLP139-154 (SEQ ID NO:17),

или в векторах на:

альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25)

альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) и

омега-глиадин (SEQ ID NO:27),

получали следующие слитые белки формулы 2:

- MBP13-32-IPC-MBP83-99-IPC-MBP111-129-IPC-MBP146-170-IPC-MOG1-20-IPC-MOG35-55-IPC-PLP139-154-IPC-DOM и
- альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-IPC-альфа-глиадин-IPC-омега-глиадин-IPC-DOM.

[0336] Пример 11

[0337] Деснализированный OVA

[0338] 11A. Получение вектора экспрессии

[0339] Вектор экспрессии для клеток млекопитающих pSecTag A был приобретен у Life Technologies. Последовательности, кодирующие OVA, гибкий линкер Gly3Ser и 6xHis-метку, клонировали в pSecTag A на С-конце относительно лидерной последовательности для секреции к-цепи Ig с помощью сайт-направленного мутагенеза, следуя вариации протокола QuikChange (Geiser, et al.).

[0340] 11B. Экспрессия и очистка OVA

[0341] Клетки НЕК293 подвергали временной трансфекции модифицированным вектором pSecTag A, полученным, например, как описано в примере 10A, с использованием полиэтиленимина. Трансфицированные клетки культивировали в среде FreeStyle 293 (Life Technologies), дополненной вальпроевой кислотой, в течение 7 дней, после чего клетки удаляли центрифугированием, а надосадочные жидкости культуры собирали и стерилизовали с помощью фильтрации. Белок OVA очищали из надосадочной жидкости культуры с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным ионом металла с применением колонки HisTrap с Ni²⁺-сефарозой (GE Healthcare), с последующей эксклюзионной хроматографией с использованием колонки Superdex 75 (GE Healthcare), они имели следующую структуру:

N'-OVA Gly3Ser 6xHis -C',

и следующую аминокислотную последовательность:

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQI
NKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYA
EERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVL
QPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMY
QIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTE
WTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAE
SLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIAT
NAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:31)

[0342] Чистоту белка проверяли с помощью окраски гелей SDS-PAGE кумасси бриллиантовым синим и вестерн-блоттинга в отношении 6xHis-метки. Концентрацию белка определяли с помощью закона Ламберта-Бера, для чего измеряли поглощение при 280 нм с применением NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), а молекулярную массу (43,8 кДа) и коэффициент экстинкции (31525 M⁻¹ см⁻¹) оценивали на основании аминокислотной последовательности белка с использованием инструмента ExPASy ProtParam.

[0343] 11С. Десиалирование

[0344] OVA десиалировали путем инкубации с нейраминидазой в течение 1 часа при 37°C (New England Biolabs). Десиалированный OVA очищали из реакционной смеси с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным ионом металла (например, с применением колонки HisTrap с Ni²⁺-сефарозой, GE Healthcare), с последующей эксклюзионной хроматографией (например, с использованием колонки Superdex 75, GE Healthcare).

[0345] Чистоту белка проверяли с помощью окраски гелей SDS-PAGE кумасси бриллиантовым синим и вестерн-блоттинга в отношении 6xHis-метки. Десиалирование проверяли с помощью обнаружения, основанного на лектине *Sambucus nigra*, присутствия сиаловой кислоты в составе белка в вестерн-блотах

(Vector Biolabs) или с помощью анализа флуоресценции, опосредованной сиаловой кислотой (ProZyme). Концентрацию десиализованного белка определяли с помощью закона Ламберта-Бера, как описано выше для белка перед десиализацией. Уровни эндотоксина измеряли с использованием репортерной клеточной линии HEK-Blue TLR4 (Invivogen) в соответствии с инструкциями производителя.

[0346] Пример 12

[0347] Распределение в печени

[0348] 12A. F1aA-PE-m₃-n₈₀ получали, например, как описано в примере 9. Для инъекций готовили 30 мкг/100 мкл раствор в стерильном физиологическом растворе.

[0349] Раствор F1aA-PE-m₃-n₈₀ (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 три часа после введения печень и селезенку этих животных собирали и определяли уровень клеточной флуоресценции в этих органах с помощью проточной цитометрии в качестве показателя содержания PE в клетках.

[0350] Как показано на фиг. 1, синусоидальные эндотелиальные клетки (LSEC), гепатоциты, клетки Купфера (KC) и другие антиген-презентирующие клетки (APC) из печени мышей, которых обрабатывали с помощью F1aA-PE-m₃-n₈₀, 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-m₃-n₈₀ обладал достаточной специфичностью для связывания с антиген-презентирующими клетками в печени.

[0351] 12B. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 12A, и заменяя F1aA-PE-m₃-n₈₀ соединениями F1b-PE-m₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL, F1f-PE-m₃-n₄-p₃₃-2NAcGAL, F1g-PE-m₃-p₉₀-2NAcGAL, F1h-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL, F1j-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL, F1L-PE-m₃-n₈₀-p₅₅-q₄-2NAcGAL, F1m-PE-m₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, F1m-PE-m₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, F1n-PE-m₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc и F1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH, полученными, например, как описано со ссылкой на пример 9 путем замены X в примерах 2B, 3, 4, 5B, 6B, 7B, 19G, 19L, 20B и 20F, соответственно, было подтверждено, что соединения, в которых F1aA-PE-m₃-n₈₀ заменили соединениями F1b-PE-m₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL, F1f-PE-m₃-n₄-p₃₃-2NAcGAL, F1g-PE-m₃-p₉₀-2NAcGAL, F1h-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL, F1j-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL, F1L-PE-m₃-n₈₀-p₅₅-q₄-2NAcGAL, F1m-PE-m₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, F1m-PE-m₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, F1n-PE-m₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc и F1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH, обладали достаточной специфичностью для связывания с антиген-презентирующими клетками в печени.

[0352] Пример 13

[0353] Пролиферация антиген-специфичных OT1 CD8⁺ Т-клеток

[0354] 13A. F1aA-OVA-m₄-n₈₀, синтезированный, например, как описано в примере 1, получали для инъекций при концентрации 10 мкг/100 мкл в физиологическом растворе. В день 0 10⁶ OT-1 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-m₄-n₈₀, OVA или физиологический раствор путем инъекции в хвостовую вену. В день 6 животных умерщвляли и определяли % пролиферирующих OT-1 клеток в селезенке с помощью клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

[0355] Результаты этого исследования (см. фиг. 2) показывают, что процентная доля пролиферирующих OT1 Т-клеток у мышей, обработанных с помощью F1aA-OVA-m₄-n₈₀ («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 воздействия» на фиг. 2). Повышение пролиферации OTI-клеток демонстрирует повышенное перекрестное примирения CD8 + T-клеток у животных, которых обрабатывали с помощью F1aA-OVA-m₄-n₈₀, по сравнению с другими средствами обработки. Совместно с результатами из примера 12 эти результаты означают, что способность F1aA-OVA-m₄-n₈₀ адресно доставлять антигены в печень повышает презентацию OVA антиген презентирующими клетками в печени OVA-специфичным OTI T-клеткам.

[0356] 13B. Для различения T-клеток, подвергающихся экспансии и развитию в фенотип функционального эффектора, от клеток, подвергающихся экспансии и делеции, пролиферирующие OTI CD8⁺ T-клетки анализировали в отношении 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. 3, F1aA-OVA-m₄-n₈₀ («Gal-OVA» на фиг. 3) индуцировал намного более высокие количества аннексин-V⁺ и PD-1⁺ пролиферирующих OTI CD8⁺ T-клеток, чем растворимый OVA.

[0357] 13C. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 13A и 13B, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈ 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⁺ и PD-1⁺ пролиферирующих OTI CD8⁺ T-клеток, чем растворимый OVA.

[0358] 13D. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 13A и 13B, и путем заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈ соединениями формул 1 и 2, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 10D, 19I,

19L, 20B, 20D и 20F индуцируют намного более высокое количество аннексин- V^+ и PD-1 $^+$ пролиферирующих OTI CD8 $^+$ Т-клеток, чем растворимый антиген X.

[0359] Пример 14

F1aA-OVA-m₄-n₈ не индуцирует ответ с OVA-специфичными антителами

[0360] 14A. Для оценки гуморального иммунного ответа на F1aA-OVA-m₄-n₈ мышей обрабатывали с помощью еженедельных i.v. инъекций либо F1aA-OVA-m₄-n₈, либо OVA, а затем измеряли уровни OVA-специфичных антител в крови. В день 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-m₄-n₈; 3) 30 мкг OVA; 4) 30 мкг F1aA-OVA-m₄-n₈, 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-m₄-n₈ («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.

[0361] 14B. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 14A, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈ соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 19G, было показано, что для мышей, обработанных соединениями из примеров 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 19G, характерны титры OVA-специфичного антитела, аналогичные таковым у мышей, обработанных физиологическим раствором.

[0362] 14C. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 14A, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈ соединениями формул 1 и 2, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что для мышей, обработанных соединениями из примеров 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, характерны титры антиген X-специфичных антител, аналогичные таковым у мышей, обработанных физиологическим раствором.

[0363] **Пример 15**

[0364] **F1aA-OVA-m₄-n₈ истощает OVA-специфичные антитела**

[0365] 15A. Мышей, которые имели различные титры OVA-антител в крови (каждая мышь имела титр от 0 до 4,5), обрабатывали с помощью i.v. инъекции 20 мкг F1aA-OVA-m₄-n₈, растворенного в 100 мкл физиологического раствора. Мыши получали i.v. инъекции F1aA-OVA-m₄-n₈ в дни 0, 5, 7, 12 и 14 (инъекции F1aA-OVA-m₄-n₈ обозначены как «Gal-OVA» и показаны в виде зеленые стрелок на оси абсцисс на фиг. 5). Для определения способности F1aA-OVA-m₄-n₈ истощать OVA-специфичные антитела сыворотки у мышей брали кровь в день -1, чтобы установить начальный титр антител, а затем проводили последующие заборы крови после каждой инъекции F1aA-OVA-m₄-n₈ в дни 2, 6, 9, 13 и 16. Титр антител у каждой мыши определяли с помощью ELISA. Результаты этого исследования показывают, что F1aA-OVA-m₄-n₈ способен истощать уровни антител сыворотки у мышей. Например, через один день после первой инъекции F1aA-OVA-m₄-n₈ (т.е. день 2), мыши с положительными титрами антител к OVA проявляли от 5 до 100-кратного снижения уровней антител сыворотки (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-m₄-n₈ были эффективны в снижении этих кратковременных повышений титров антител. Эти результаты демонстрируют, что F1aA-OVA-m₄-n₈

характеризуется специфичностью связывания OVA-специфичных антител сыворотки и кинетикой, необходимой для истощения OVA-специфичных антител сыворотки.

[0366] 15B. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 15A, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈ 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 характеризуются специфичностью связывания OVA-специфичных антител сыворотки и кинетикой, необходимой для истощения OVA-специфичных антител сыворотки.

[0367] 15C. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 15A, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈ соединениями формул 1 и 2, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F характеризуются специфичностью связывания антиген X-специфичных антител сыворотки и кинетикой, необходимой для истощения антиген X-специфичных антител сыворотки.

[0368] **Пример 16**

[0369] **Модель от стимуляции OT-1 до развития толерантности**

[0370] 16A. Путем применения стандартной модель от стимуляции OTI до развития толерантности (Liu, Iyoda, et al., 2002) продемонстрировали способность F1aA-OVA-m₄-n₈ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ (pGal-OVA) и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (Dom-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-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C или растворимого OVA вводили

внутривенно в 100 мкл физиологического раствора в 1 и 6 дни с последующим adoptивным переносом OTI CD8⁺ (CD45.2⁺) Т-клеток мышам CD45.1⁺ (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 адьювантом 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.

[0371] 16B. Внутривенное введение F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C приводило к значительному сокращению популяций OTI CD8⁺ 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. 6 показано, что дренирующие лимфатические узлы от мышей, обработанных с помощью одного из F1aA-OVA-m₄-n₈ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ (pGal-OVA) и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (Dom-OVA), содержали более чем в 9 раз меньше OTI CD8⁺ 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; ответы в клетках селезенки были сходными. Эти результаты демонстрируют, что F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C ослабляли OVA-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью OVA с адьювантом.

[0372] 16C. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 16A и B, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C 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 ослабляют OVA-

специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью OVA с адьювантом.

[0373] 16D. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 16A и B, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C соединениями формул 1 и 2, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F ослабляют антиген X-специфичный иммунный ответ после стимуляции с помощью антигена X с адьювантом.

[0374] Пример 17

[0375] Фармакокинетика

[0376] 17A. OVA и слитые белки N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C и N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C (полученные, например, как описано в примере 10) метили с помощью IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Непореагировавший краситель удаляли с использованием колонок для обессоливания Zeba (Thermo Scientific). Меченые белки, 50 мкг в 100 мкл PBS на дозу, вводили *i.v.* или *s.c* мышам C57BL/6 (5 мышей на группу). В момент времени = 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 и 96 часов после инъекции собирали образцы крови из кончика хвоста в покрытые гепарином капиллярные пробирки. Образцы хранили при температуре 4°C, в защищенном от света месте, до проведения анализа.

[0377] В день анализа образцы крови центрифугировали для удаления клеточных компонентов. Плазму переносили в свежие капиллярные пробирки и сканировали с применением системы визуализации в инфракрасном свете Odyssey (LI-COR Biosciences). Сигнал обнаруживали на канале 800 нм. С помощью программы обработки изображений ImageJ (US National Institutes of Health) каждый образец аппроксимировали в виде линии шириной 2 и

определяли среднюю интенсивность вдоль линии как относительную меру количества циркулирующего белка в этот момент времени.

[0378] Сигналы флуоресценции (нормализованные по флуоресценции в момент времени = 0) в зависимости от времени введения OVA и слитых белков DOM-OVA и OVA-DOM, вместе с построенными кривыми в виде би-экспоненциального уменьшения на фигуре 8 свидетельствуют о том, клиренс ASGPR-нацеленных слитых белков OVA из кровотока происходил быстрее, чем в случае немодифицированного OVA.

[0379] 17B. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 17A, и заменяя слитый белок N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis–C и OVA асиалированным фактором VIII и фактором VIII, соответственно, было показано, что клиренс асиалированного фактора VIII из кровотока происходит быстрее, чем в случае немодифицированного фактора VIII.

[0380] Пример 18

[0381] Биораспределение

[0382] 18A. OVA и слитый белок N–DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis–C (полученный, например, как описано в примере 10) метили с помощью Alexa Fluor 647 (Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Непрореагировавший краситель удаляли с использованием колонок для обессоливания Zeba (Thermo Scientific). Меченые белки, 50 мкг в 100 мкл PBS на дозу, вводили *i.v.* или *s.c* мышам C57BL/6 (5 мышей на группу). Через два часа после инъекции мышей умерщвляли путем удушения с помощью CO₂. Кровь, сердце, кишечник, почки, печень, легкие, желудок, селезенку и остальные части организма визуализировали с использованием системы визуализации IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). Данные получали и анализировали с помощью программного обеспечения Living Image (Caliper Life Sciences). Получали суспензии из отдельных клеток печени и селезенки и окрашивали конъюгированными с флуоресцентными метками антителами к МНС II класса,

CD1d, CD3, CD4, CD8 α , CD11b, CD11c, CD14, CD19, CD45, CD123 и/или Lin в PBS с 0,1% (вес/объем) BSA. Образцы анализировали с помощью проточного цитометра LSR II и программного обеспечения FACS Diva (BD Biosciences).

[0383] На гистограмме с плотностями сигнала флуоресценции (фотоны/вес) для каждого органа и каждого белка показано, что у животных, которым вводили слитый белок N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis-C, самый сильный сигнал флуоресценции наблюдался в печени в сравнении с обработанными с помощью немодифицированного OVA.

[0384] На гистограмме с процентными долями N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis-C- и OVA-положительных клеток показано, что животные, которым вводили слитые белки N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis-C, характеризуются значительно более высокой процентной долей положительных гепатоцитов по сравнению с обработанными с помощью немодифицированного OVA.

[0385] 18B. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 18A, и заменяя слитый белок N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis-C и OVA асиалированным фактором VIII и фактором VIII, соответственно, было показано, что животные, которым вводили асиалированный фактор VIII, характеризовались значительно более высокой процентной долей положительных гепатоцитов по сравнению с обработанными с помощью немодифицированного фактора VIII.

[0386] 18C. Действуя согласно процедурам, описанным в примере 18A, и заменяя слитый белок N-DOM- Gly₃Ser- OVA- Gly₃Ser- 6xHis-C соединениями формулы 1, полученными, например, как описано в примерах 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 19G, было показано, что животные, которым вводили соединения из примеров 3A, 4A, 5B, 6C, 7B и 19G, характеризовались значительно более высокой процентной долей положительных гепатоцитов по сравнению с обработанными с помощью OVA.

[0387] 18D. Действуя согласно процедурам, описанным в примерах 18A и B, и заменяя F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, и N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C соединениями формул 1 и 2, полученными, например, как описано в примерах 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, и заменяя OVA антигенами, соответствующими X (или X', или X''), соответственно, было показано, что животные, которым вводили соединения из примеров 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D и 20F, характеризовались значительно более высокой процентной долей положительных гепатоцитов по сравнению с обработанными с помощью антигена X.

[0388] Пример 19

[0389] F1m-OVA-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc

[0390] 19A. Формула 1102, где R³ представляет собой NHAc и R⁴ представляет собой OH

[0391] *N*-ацетил-D-галактозамин (формула 1101, где R³ представляет собой NHAc и R⁴ 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 часа непрореагировавший хлорэтанол удаляли при пониженном давлении. К неочищенному продукту добавляли 100 мл этанола и полученный раствор перемешивали в присутствии углерода в течение 2 часов. Раствор фильтровали и растворитель удаляли при пониженном давлении. Соответствующий продукт формулы 1102, *N*-(2-(2-хлорэтоксид)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-3-ил)ацетамид, использовали без дополнительной очистки.

[0392] 19B. Формула 1103, где R³ представляет собой NHAc и R⁴ представляет собой OH

[0393] *N*-(2-(2-хлорэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-3-ил)ацетамид, полученный в примере 19А (2 г, 7,4 ммоль), добавляли к перемешиваемому раствору DMF (100 мл) и азиды натрия (4 г, 61,5 ммоль). Раствор нагревали при температуре 90°C в течение 12 часов 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-2*H*-пиран-3-ил)ацетамида.

[0394] 19С. Формула 1104, где R³ представляет собой NHAc и R⁴ представляет собой OH

[0395] *N*-(2-(2-азидоэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-3-ил)ацетамид, полученный в примере 19В (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 часов. 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-2*H*-пиран-3-ил)ацетамида, который использовали без дополнительной очистки.

[0396] 19D. Формула 1105, где R³ представляет собой NHAc и R⁴ представляет собой OH

[0397] *N*-(2-(2-аминоэтокси)-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-3-ил)ацетамид, полученный в примере 19С (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 часов при комнатной температуре. Через 2 часа избыток растворителя удаляли при пониженном давлении и соответствующий продукт формулы 1105, *N*-(2-((3-ацетамидо-4,5-дигидрокси-6-

(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)этил)метакриламид, выделяли с помощью флэш-хроматографии.

[0398] 19E. Формула 1107, где p равняется 30, q равняется 4, R^3 представляет собой NHAc, R^4 представляет собой OH и R^8 представляет собой CMP

[0399] Азид-модифицированное средство uRAFT формулы 1106, где q равняется 4 (28 мг), добавляли к раствору *N*-(2-(((3-ацетамидо-4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2*H*-пиран-2-ил)окси)этил)метакриламида, полученного в примере 19D (579 мг, 1,74 ммоль), и азобисизобутиронитрила (2,2 мг, 0,0116 ммоль) в DMF. Реакционную смесь подвергали 4 циклам замораживание-откачка-размораживание и затем перемешивали при 70°C. Через 12 часов, 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.

[0400] 19F. Формула 1109, где X' представляет собой OVA, m равняется 2 и n равняется 80

[0401] 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 час 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.

[0402] 19G. Формула 1m, где X' представляет собой OVA, m равняется 2, n равняется 80, p равняется 30, q равняется 4, R^3 представляет собой NHAc и R^8 представляет собой CMP

[0403] Раствор, полученный в примере 19F, добавляли к 100 мкл буфера на основе фосфата натрия (pH 8,0), который содержал 10 мг продукта формулы

1107, полученного в примере 19E. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 2 часов 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 R³ обозначен в названии указанного в заголовке соединения как 2NHAc.

[0404] 19H. Другие соединения Формулы 1109

[0405] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19F, и заменяя OVA следующим:

- абциксимабом,
- адалимумабом,
- агаласидазой-альфа,
- агаласидазой-бета,
- альдеслейкином,
- алглюкозидазой-альфа,
- фактором VIII,
- фактором IX,
- L-аспарагиназой,
- ларонидазой,
- октреотидом,
- фенилаланин-аммиак-лиазой,

- расбуриказой,
- инсулином (SEQ ID NO:5),
- GAD-65 (SEQ ID NO:6),
- IGRP (SEQ ID NO:7)
- MBP (SEQ ID NO:8),
- MOG (SEQ ID NO:9),
- PLP (SEQ ID NO:10),
- MBP13-32 (SEQ ID NO:11),
- MBP83-99 (SEQ ID NO:12),
- MBP111-129 (SEQ ID NO:13),
- MBP146-170 (SEQ ID NO:14),
- MOG1-20 (SEQ ID NO:15),
- MOG35-55 (SEQ ID NO:16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO:17),
- MART1 (SEQ ID NO:18),
- тирозиназой (SEQ ID NO:19),
- PMEL (SEQ ID NO:20),
- аквапорином-4 (SEQ ID NO:21),
- S-аррестинном (SEQ ID NO:22),
- IRBP (SEQ ID NO:23),

- конархином (UNIPROT Q6PSU6),
- альфа-глиадином «33-мерным» нативным (SEQ ID NO:24),
- альфа-глиадином «33-мерным» деамидированным (SEQ ID NO:25),
- альфа-глиадином (SEQ ID NO:26),
- омега-глиадином (SEQ ID NO:27),
- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT O18873),
- собачьим альбумином (UNIPROT P49822), и
- примером 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:5) и m равняется 2,
- X представляет собой GAD-65 (SEQ ID NO:6) и m равняется 8,
- X представляет собой IGRP (SEQ ID NO:7) и m равняется 7,
- X представляет собой MBP (SEQ ID NO:8) и m равняется 6,
- X представляет собой MOG (SEQ ID NO:9) и m равняется 5,
- X представляет собой PLP (SEQ ID NO:10) и m равняется 8,
- X представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO:11) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO:12) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO:13) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO:14) и m равняется 2,
- X представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO:15) и m равняется 1,
- X представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO:16) и m равняется 2,
- X представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO:17) и m равняется 3,
- X представляет собой MART1 (SEQ ID NO:18) и m равняется 4,
- X представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO:19) 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:23) и m равняется 21,
- X представляет собой конархин и m равняется 21,
- X представляет собой альфа-глиадин «33-мерный» нативный (SEQ ID NO:24) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) 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,
- X представляет собой собачий альбумин и m равняется 23, и
- X представляет собой пример RhCE и m равняется 10.

[0406] 19I. Другие соединения формулы 1m

[0407] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19G, и заменяя соединения формулы 1109, например, теми, которые получены в примере 19H, получали следующие соответствующие соединения формулы 1m:

- F1m-абциксимаб-m₁₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

- F1m-адалимумаб-m₁₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-агалсидаза-альфа-m₁₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-агалсидаза-бета-m₁₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-альдеслейкин-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-аглюкозидаза-альфа-m₁₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-фактор VIII-m₁₀₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-фактор IX-m₁₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-L-аспарагиназа-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-ларонидаза-m₇-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-октреотид-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-фенилаланин-аммиак-лиаза-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-расбуриказа-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-инсулин-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-GAD-65-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-IGRP-m₇-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MBP-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MOG-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-PLP-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MBP13-32-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MBP83-99-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

- F1m-MBP111-129-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MBP146-170-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MOG1-20-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MOG35-55-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-PLP139-154-m₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-MART1-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-тирозиназа-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-PMEL-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-аквапорин-4-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-S-аррестин-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-IRBP-m₂₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-конархин-m₂₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-альфа-глиадин «33-мерный» нативный-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-альфа-глиадин-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-омега-глиадин-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Fel d 1-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-кошачий альбумин-m₁₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Can f 1-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

- F1m-собачий альбумин-m₂₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, и
- F1m-RhCE-m₁₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc.

[0408] 19J. Формула 1107, где p равняется 30, q равняется 8, R³ представляет собой OH, R⁴ представляет собой OH и R⁸ представляет собой CMP

[0409] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19A, и заменяя N-ацетил-D-галактозамин галактозой, и следуя процедурам, описанным в примере 19E, за исключением использования азид-модифицированного средства uRAFT формулы 1106, где q равняется 8, получали соединение формулы 1107, где где p равняется 30, q равняется 8, R³ представляет собой OH, R⁴ представляет собой OH и R⁸ представляет собой CMP.

[0410] 19K. Формула 1109, где n равняется 62 и где X' и m такие же, как в примере 19H

[0411] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19F, заменяя OVA соединениями, описанными в примере 19H, и используя соединение формулы 1108, где n равняется 62, получали соответствующие соединения формулы 1109, где n равняется 62.

[0412] 19L. Другие соединения формулы 1m

[0413] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19G, и заменяя соединение формулы 1107 соединениями, полученными в примере 19J, и заменяя соединение формулы 1109 соединениями, полученными в примере 19K, получали соответствующие соединения формулы 1m:

- F1m-абциксимаб-m₁₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-адалимумаб-m₁₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-агалсидаза-альфа-m₁₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-агалсидаза-бета-m₁₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

- F1m-альдеслейкин-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-аглюкозидаза-альфа-m₁₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-фактор VIII-m₁₀₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-фактор IX-m₁₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-L-аспарагиназа-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-ларонидаза-m₇-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-октреотид-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-фенилаланин-аммиак-лиаза-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-расбуриказа-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-инсулин-m₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-GAD-65-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-IGRP-m₇-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MBP-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MOG-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-PLP-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MBP13-32-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MBP83-99-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MBP111-129-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MBP146-170-m₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MOG1-20-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

- F1m-MOG35-55-m₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-PLP139-154-m₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-MART1-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-тирозиназа-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-PMEL-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-аквапорин-4-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-S-аррестин-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-IRBP-m₂₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-конархин-m₂₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-альфа-глиадин «33-мерный» нативный-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-альфа-глиадин-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-омега-глиадин-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Fel d 1-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-кошачий альбумин-m₁₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Can f 1-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-собачий альбумин-m₂₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, and
- F1m-RhCE-m₁₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH.

[0414] Пример 20

[0415] F1n-инсулин-m₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc

[0416] 20A. Формула 1202, где X' представляет собой инсулин, m равняется 2 и n равняется 1

[0417] 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 (полученный из ???), и реакционную смесь оставляли перемешиваться. Через 1 час добавляли 1,3 мл трет-бутил-метилового эфира для выделения соответствующего продукта формулы 1202, который выпадал в виде осадка. Остаточный DMF и трет-бутил-метиловый 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.

[0418] 20B. Формула 1n, где X' представляет собой инсулин, m равняется 2, n равняется 1, p равняется 30, q равняется 4 и R⁸ представляет собой CMP

[0419] Продукт формулы 1202, полученный в примере 20A, ресуспендировали в 100 мкл DMF. Добавляли полимерный продукт формулы 1107, полученный в примере 19E (10 мг), и реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение 1 часа. Через 1 час 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.

[0420] 20С. Другие соединения формулы 1202

[0421] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19F, и заменяя OVA и инсулин 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:6),
- IGRP (SEQ ID NO:7)
- MBP (SEQ ID NO:8),

- MOG (SEQ ID NO:9),
- PLP (SEQ ID NO:10),
- MBP13-32 (SEQ ID NO:11),
- MBP83-99 (SEQ ID NO:12),
- MBP111-129 (SEQ ID NO:13),
- MBP146-170 (SEQ ID NO:14),
- MOG1-20 (SEQ ID NO:15),
- MOG35-55 (SEQ ID NO:16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO:17),
- MART1 (SEQ ID NO:18),
- тирозиназой (SEQ ID NO:19),
- PMEL (SEQ ID NO:20),
- аквапорином-4 (SEQ ID NO:21),
- S-аррестинном (SEQ ID NO:22),
- IRBP (SEQ ID NO:23),
- конархином (UNIPROT Q6PSU6),
- альфа-глиадином «33-мерным» нативным (SEQ ID NO:24),
- альфа-глиадином «33-мерным» деамидированным (SEQ ID NO:25),
- альфа-глиадином (SEQ ID NO:26),
- омега-глиадином (SEQ ID NO:27),

- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- кошачьим альбумином (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT O18873),
- собачьим альбумином (UNIPROT P49822), и
- примером 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:6) и m равняется 8,
- X представляет собой IGRP (SEQ ID NO:7) и m равняется 7,
- X представляет собой MBP (SEQ ID NO:8) и m равняется 6,
- X представляет собой MOG (SEQ ID NO:9) и m равняется 5,
- X представляет собой PLP (SEQ ID NO:10) и m равняется 8,
- X представляет собой MBP13-32 (SEQ ID NO:11) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP83-99 (SEQ ID NO:12) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP111-129 (SEQ ID NO:13) и m равняется 1,
- X представляет собой MBP146-170 (SEQ ID NO:14) и m равняется 2,
- X представляет собой MOG1-20 (SEQ ID NO:15) и m равняется 1,
- X представляет собой MOG35-55 (SEQ ID NO:16) и m равняется 2,
- X представляет собой PLP139-154 (SEQ ID NO:17) и m равняется 3,
- X представляет собой MART1 (SEQ ID NO:18) и m равняется 4,
- X представляет собой тирозиназу (SEQ ID NO:19) 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:23) и m равняется 21,
- X представляет собой конархин и m равняется 21,

- X представляет собой альфа-глиадин «33-мерный» нативный (SEQ ID NO:24) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный (SEQ ID NO:25) и m равняется 1,
- X представляет собой альфа-глиадин (SEQ ID NO:26) 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,
- X представляет собой собачий альбумин и m равняется 23, и
- X представляет собой пример RhCE и m равняется 10.

[0422] 20D. Другие соединения Формулы 1n

[0423] Действуя согласно процедурам, описанным в примере В, и заменяя соединения формулы 1202, например, теми, которые получены в примере 20С, получали следующие соответствующие соединения формулы 1m:

- F1n-абциксимаб-m₁₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-адалимумаб-m₁₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-агалсидаза-альфа-m₁₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-агалсидаза-бета-m₁₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-альдеслейкин-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-аглюкозидаза-альфа-m₁₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

- F1n-фактор VIII-m₁₀₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-фактор IX-m₁₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-L-аспарагиназа-m₅-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-ларонидаза-m₇-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-октреотид-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-фенилаланин-аммиак-лиаза-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-расбуриказа-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-GAD-65-m₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-IGRP-m₇-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MOG-m₅-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PLP-m₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP13-32-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP83-99-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP111-129-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP146-170-m₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MOG1-20-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MOG35-55-m₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PLP139-154-m₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MART1-m₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

- F1n-тирозиназа-m₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PMEL-m₅-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-аквапорин-4-m₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-S-аррестин-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-IRBP-m₂₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-конархин-m₂₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-альфа-глиадин «33-мерный» нативный-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-альфа-глиадин-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-омега-глиадин-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Fel d 1-m₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-кошачий альбумин-m₁₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Can f 1-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-собачий альбумин-m₂₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, и
- F1n-RhCE-m₁₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc.

[0424] 20Е. Формула 1202, где n равняется 33 и где X' и m такие же, как в примере 20С

[0425] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 19F, заменяя инсулин соединениями, описанными в примере 20С, и используя соединение формулы 1201, где n равняется 33, получали соответствующие соединения формулы 1202, где n равняется 33.

[0426] 20F. Другие соединения формулы 1n

[0427] Действуя согласно процедурам, описанным в примере 20B, и заменяя соединение формулы 1107 соединениями, полученными в примере 19J, и заменяя соединение формулы 1202 соединениями, полученными в примере 20E, получали следующие соответствующие соединения формулы 1n:

- F1n-абциксимаб-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-адалимуаб-m₁₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-агалсидаза-альфа-m₁₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-агалсидаза-бета-m₁₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-альдеслейкин-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-аглюкозидаза-альфа-m₁₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-фактор VIII-m₁₀₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-фактор IX-m₁₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-L-аспарагиназа-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-ларонидаза-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-октреотид-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-фенилаланин-аммиак-лиаза-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-расбуриказа-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-GAD-65-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-IGRP-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-MBP-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,

- F1n-MOG-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PLP-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP13-32-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP83-99-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP111-129-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP146-170-m₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MOG1-20-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MOG35-55-m₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PLP139-154-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MART1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-тирозиназа-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PMEL-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-аквапорин-4-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-S-аррестин-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-IRBP-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-конархин-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-альфа-глиадин «33-мерный» нативный-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-альфа-глиадин «33-мерный» деамидированный-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-альфа-глиадин-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

- F1n-омега-глиадин-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-Fel d 1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-кошачий альбумин-m₁₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-Can f 1-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН,
- F1n-собачий альбумин-m₂₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН, and
- F1n-RhCE-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2ОН.

[0428] Пример 21

[0429] Клиренс OVA-специфичных антител из кровотока

[0430] Для индукции выработки OVA-специфичных антител для последующего истощения мышам C57BL/6 вводили *i.v.* до пяти доз по 10 мкг OVA до тех пор, пока титр IgG против OVA в плазме, определяемый с помощью ELISA, не достигал 3 (фигура 9A). Образцы плазмы получали путем центрифугирования крови, собранной в покрытые EDTA пробирки, при 2000 $\times g$ в течение 10 минут при комнатной температуре и хранили при -20°C до проведения анализа. Титр определяли как $\log_{10}$ максимального кратного разведения плазмы с детектируемым IgG против OVA. В данном случае образцы плазмы анализировали при 10-, 50-, 100-, 500-, 1000-, 5000-, 10000- и 50000-кратных разведениях с получением потенциальных значений титра 0, 1, 1,7, 2, 2,7, 3, 3,7, 4 и 4,7. Мышам с титрами ниже 3 после пяти доз по 10 мкг OVA давали две дополнительные дозы по 10 мкг OVA с адьювантом, состоящим из 10 мкг CpG-B, для выработки IgG к OVA и, следовательно, количества циркулирующих IgG к OVA, доступных для истощения (фигура 9B).

[0431] Для оценки эффективности OVA, нацеленного на ASGPR гепатоцитов, в отношении клиренса антител к OVA мышам с циркулирующими IgG к OVA вводили *i.v.* физиологический раствор или физиологический раствор, содержащий молярные эквиваленты DOM и OVA, DOM-OVA или OVA-DOM. В

частности, мышей обрабатывали с помощью молярных эквивалентов 10, 50, 100 или 200 мкг OVA, как указано на фигуре 9. В моменты времени $t = -1$ день, +3 часа, +1 день и +7 дней относительно времени обработки с помощью инъекции собирали образцы крови для оценки количества IgG к OVA в кровотоке посредством анализа плазмы с помощью ELISA. Клиренс IgG к OVA из кровотока, как ожидается, снижает количество IgG к OVA в плазме и, следовательно, снижает титр IgG к OVA в плазме, определяемый с помощью ELISA. У мышей, иммунизированных с помощью только OVA и обработанных с помощью DOM-OVA или OVA-DOM, титры IgG к OVA снижались на 3 или 2, соответственно, что представляет снижение количества циркулирующих IgG к OVA в 1000- или 100-раз, что является до 50-раз более эффективным, чем контрольная обработка с применением физиологического раствора или DOM и OVA (фигура 9A). У мышей, иммунизированных с помощью OVA с адьювантом CpG-B, клиренс циркулирующих IgG к OVA не наблюдался (фигура 9B).

[0432] Пример 22

[0433] NOD-мышь

[0434] Мышь с диабетом без ожирения (NOD) склонна 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.

[0435] Для оценки эффективности лечения сахарного диабета NOD-мышей разделяли на контрольную или тестируемую группы, начиная с 6-недельного возраста, и обрабатывали, соответственно, с помощью еженедельных внутривенных инъекций тестируемого состава (10 мкг) или неактивного контроля, такого как физиологический раствор. Инъекции продолжали в течение 18 недель подряд.

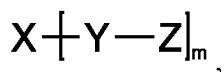
[0436] Концентрацию глюкозы в крови мышей измеряли еженедельно. Мышей, у которых поддерживается концентрация глюкозы в крови на уровне менее 300 мг/мл в ходе эксперимента, считали не имеющими диабет. Кроме того, в конце исследования собирали поджелудочные железы мышей и определяли инфильтрацию Т-клеток в поджелудочную железу с помощью иммуногистохимии в качестве оценки инсулита. Индукцию толерантности оценивали по истощению CD8 Т-клеток, специфичных к аутоантигену, в сравнении с мышами, которых обрабатывали с помощью физиологического раствора и у которых развивался диабет. Наличие CD8 Т-клеток, специфичных к аутоантигену, определяли с помощью анализа ELISpot.

[0437] При проведении тестирования, как описано выше, композиции формул 1 и 2, где X представляет собой инсулин, такие как F1m-инсулин-m2-n1-p30-q4-2NacGAL, демонстрировали эффективность в лечении сахарного диабета.

[0438] В то время как настоящее раскрытие 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 истинной сущности и объема настоящего раскрытия. Кроме того, многие модификации можно осуществить, чтобы адаптировать конкретную ситуацию, материал, смесь веществ, способ, технологическую стадию или стадии к цели, сущности и объему настоящего раскрытия. Все такие модификации предусматриваются в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Все патенты и публикации, процитированные выше, настоящим включены посредством ссылки.

Формула изобретения

1. Композиция, предусматривающая соединение формулы 1:



Формула 1

где:

m равняется целому числу 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;

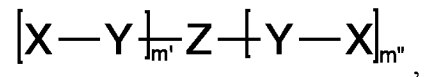
Y предусматривает линкерный компонент; и

Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень.

2. Композиция по п. 1, где Z предусматривает галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин.

3. Композиция по п. 1, 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 нитрофенокси-поли(этиленгликоля).

4. Композиция, предусматривающая соединение формулы 2:



Формула 2

где:

m' равняется нулю или целому числу от приблизительно 1 до 10, m'' равняется нулю или целому числу от приблизительно 1 до 10, а сумма $m' + m''$ равняется целому числу от приблизительно 1 до 10, но составляет по меньшей мере 1;

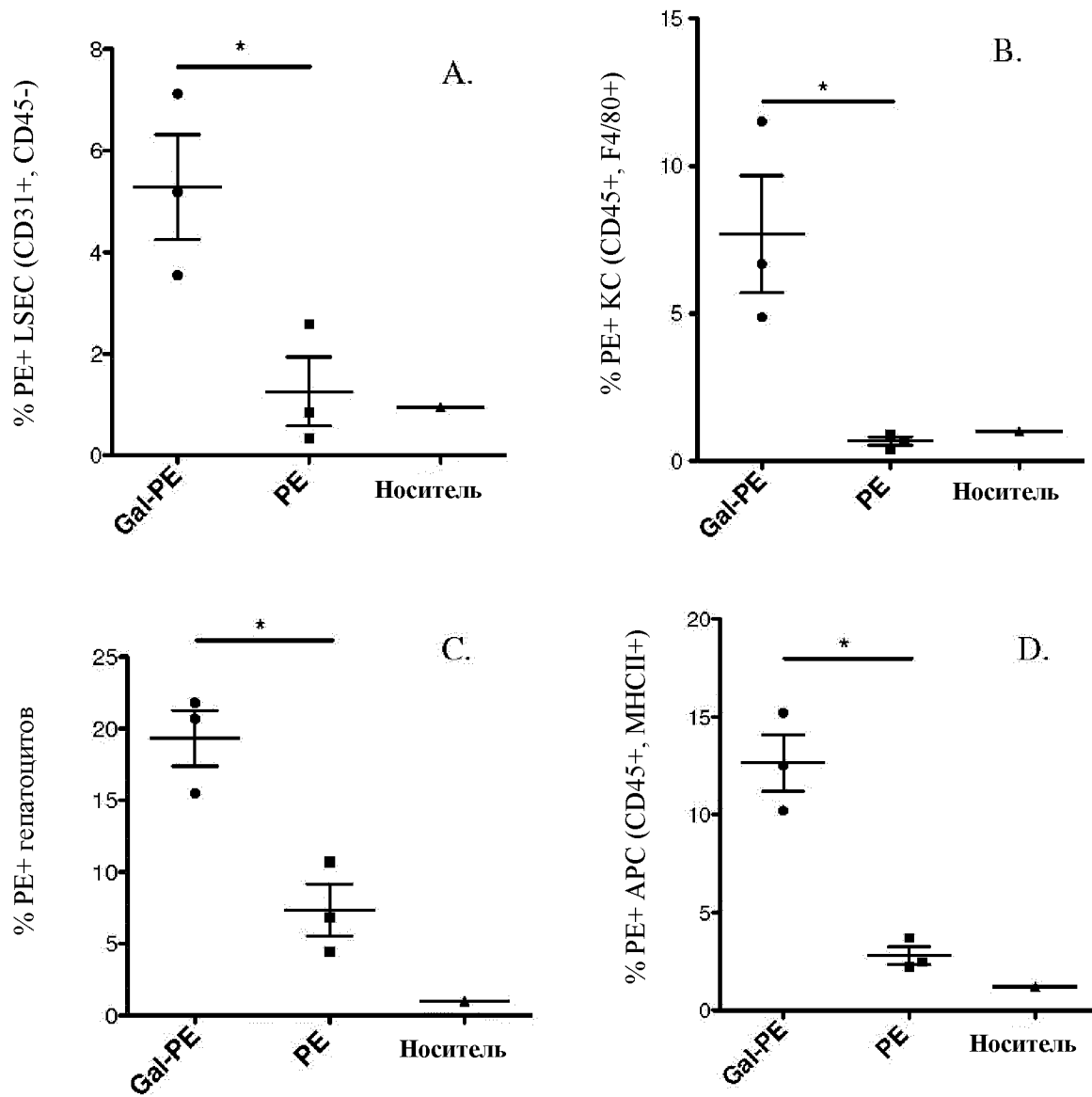
каждый X предусматривает чужеродный антиген или собственный антиген, против которого у пациента развивается нежелательный иммунный ответ, или его толерогенную часть;

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

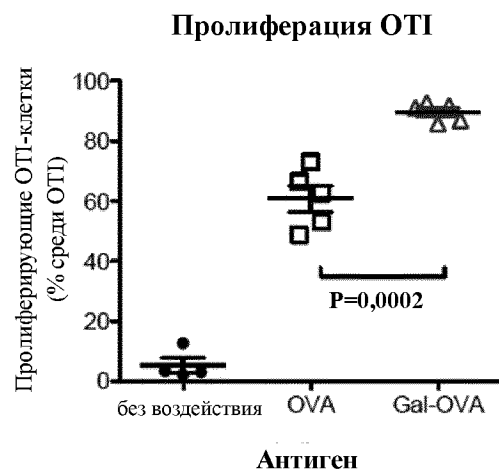
Z предусматривает компонент для адресной доставки в печень,

при условии, что X не представляет собой интерферон, рибавирин, нексавар/сорафениб, эрбитус/цетуксимаб, авастатин/бевацизумаб или герцептин/трастузумаб, когда $m' + m''$ равняется 1 и Z представляет собой DOM 26h-196-61.

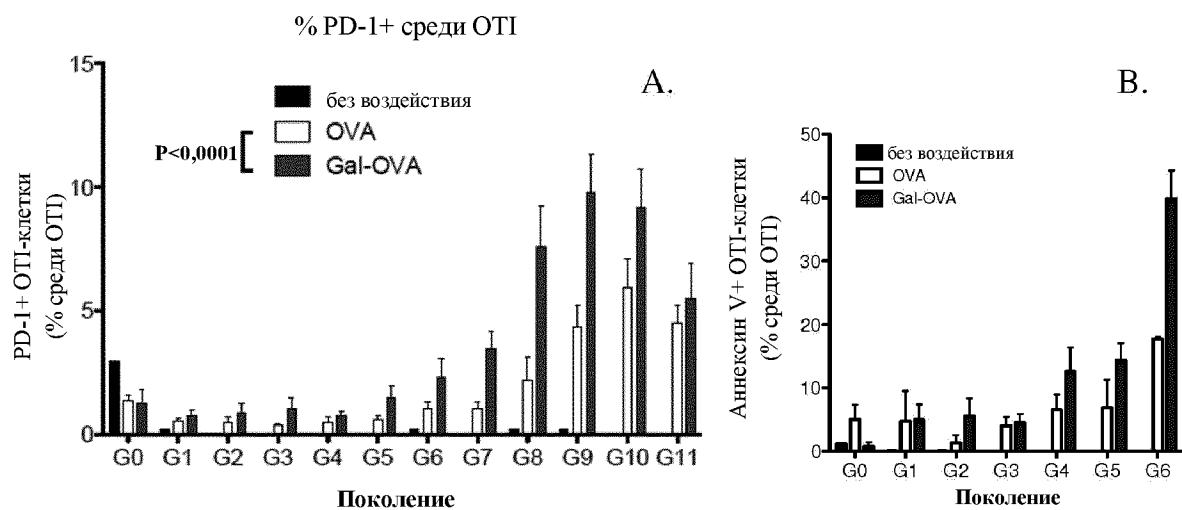
5. Композиция по п. 4, где Z предусматривает ASGPR-нацеленное антитело, фрагмент ASGPR-нацеленного антитела, ASGPR-нацеленный пептид, ASGPR-нацеленный scFv или другой лиганд для ASGPR.



Фиг. 1

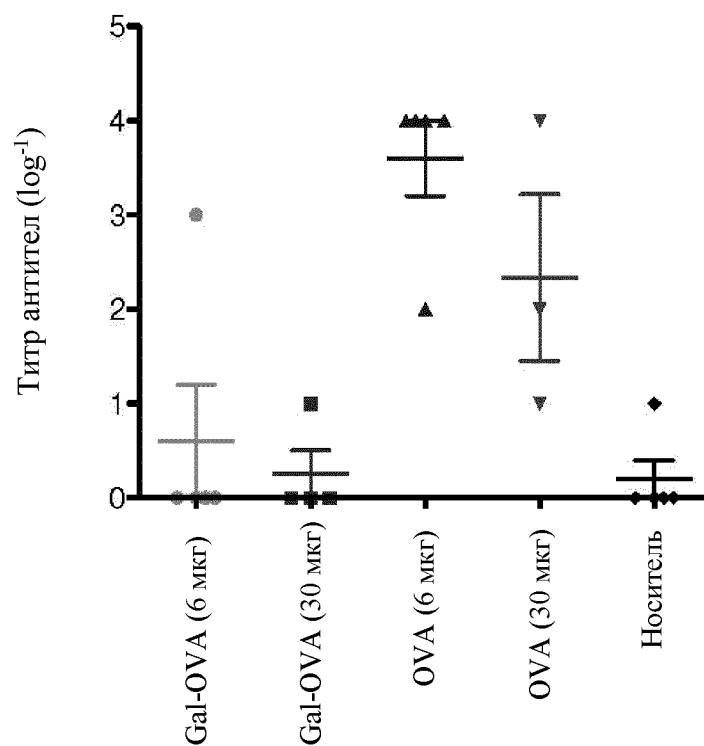


Фиг. 2

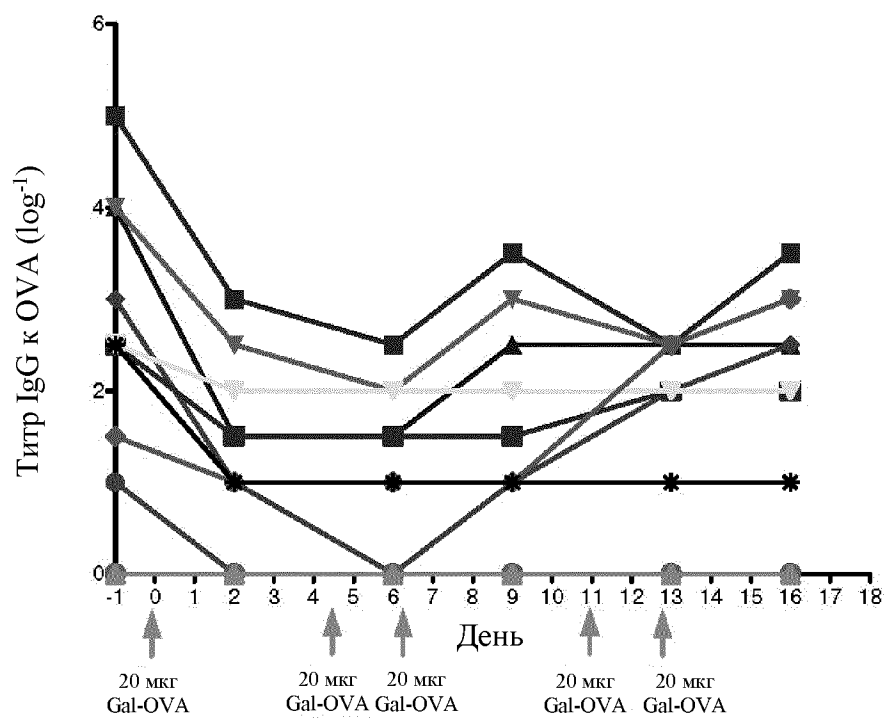


Фиг. 3

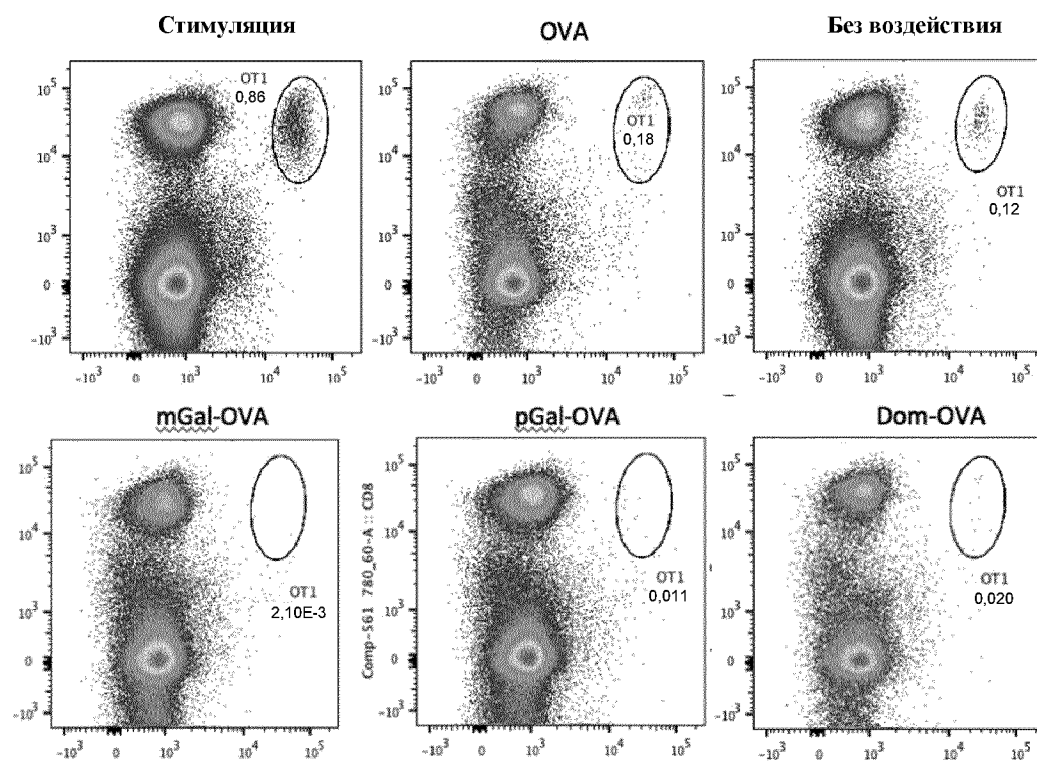
День 19



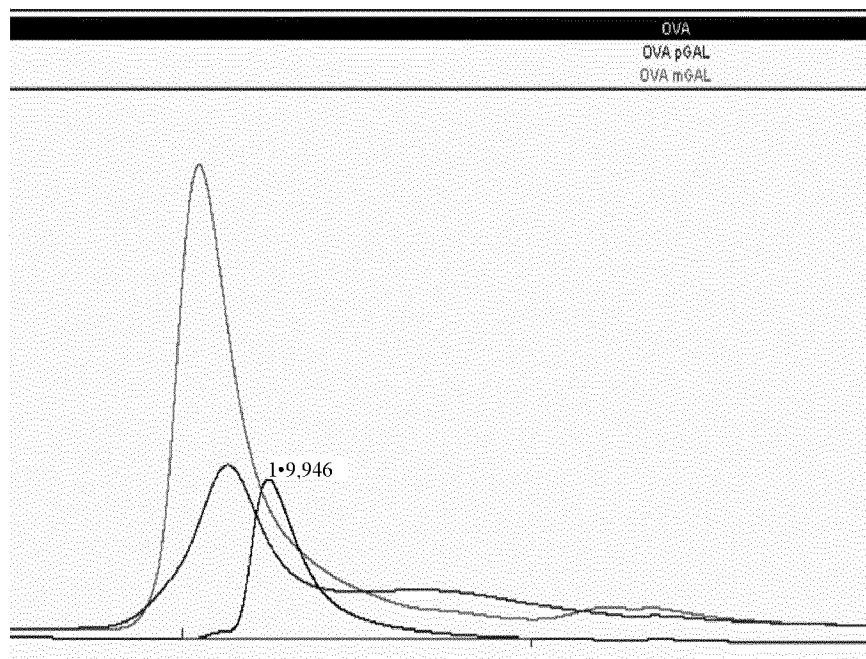
Фиг. 4



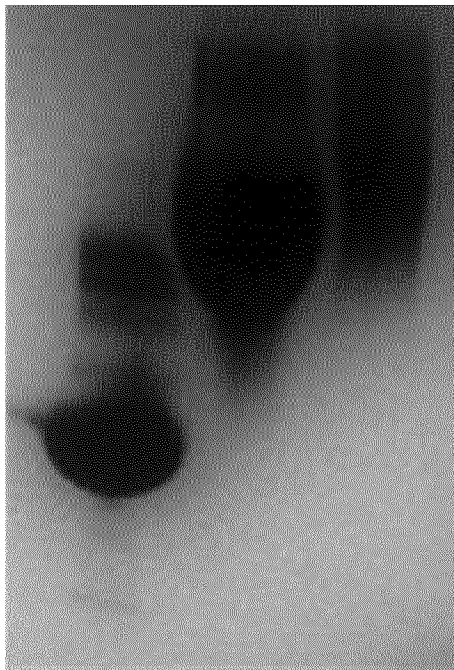
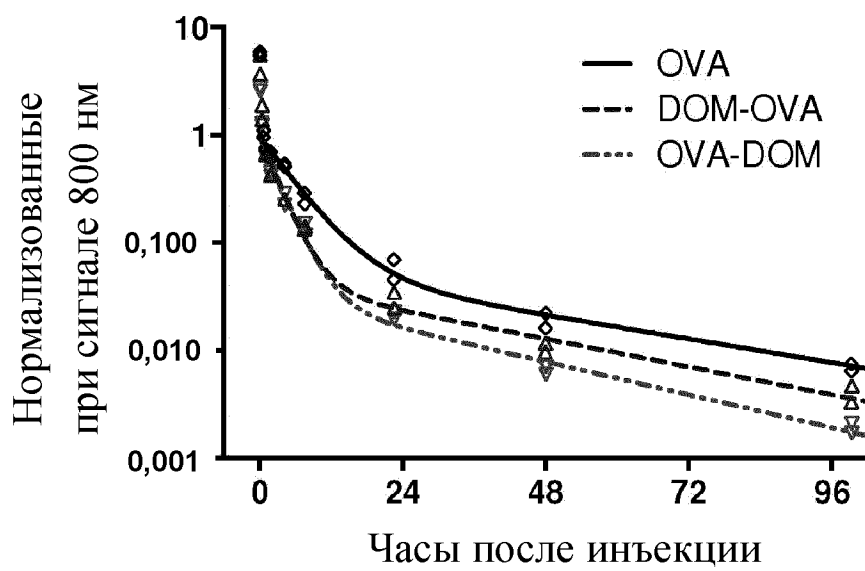
Фиг. 5



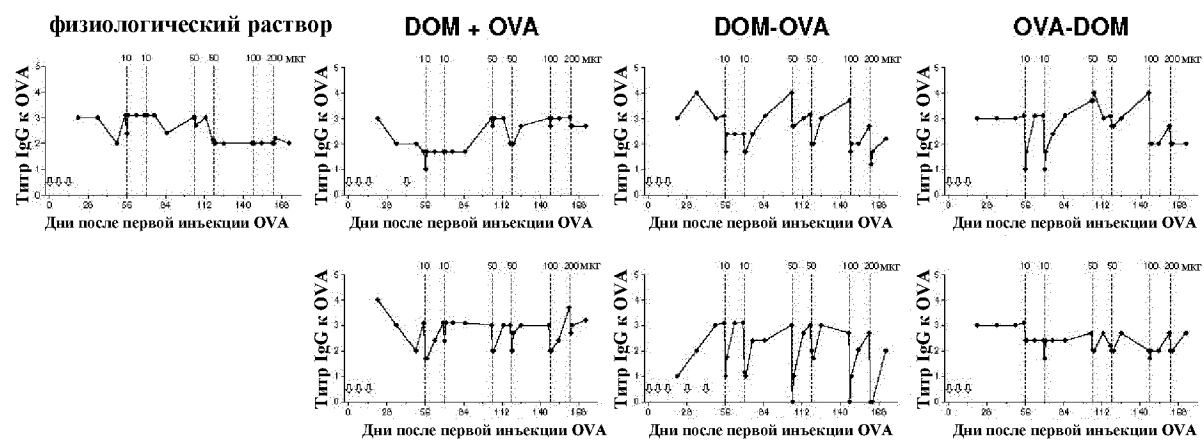
Фиг. 6



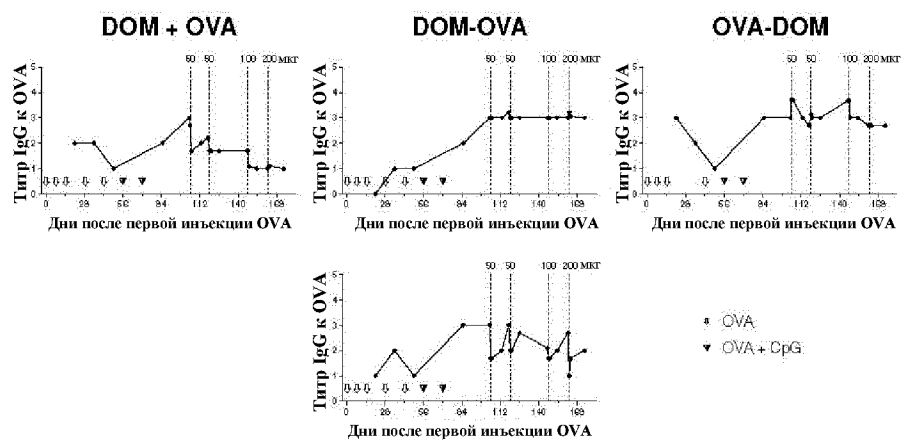
Фиг. 7А

**Фиг. 7В****Фиг. 8**

(a)



(b)



Фиг. 9

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2968.10WO01	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2015/001145	International filing date (<i>day/month/year</i>) 20 February 2015 (20-02-2015)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 February 2014 (21-02-2014)
Applicant ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE (EPFL)		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 2

☒

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2015/001145

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2015/001145

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61K47/48
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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 ----- -/-	14,21, 26,29, 31,32



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 October 2015

Date of mailing of the international search report

12/11/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/001145

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/121296 A1 (ECOLE POLYTECH [CH]) 22 August 2013 (2013-08-22) page 4, line 33 - page 5, line 9 page 13, lines 8-14 page 13, lines 16-19 page 15, line 8 - page 16, line 18 page 17, line 26 - page 18, line 4 page 32, lines 4-5 example 12 page 39, lines 13-15 page 43, line 31 - page 44, line 14 page 36, line 11 - page 37, line 27 -----	14,21, 26,29, 31,32
X	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, XP055224623, US 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 -----	19,20, 24,25
X	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 -----	11-13,16
X	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 abstract page 406, left-hand column, paragraph 1 page 410, right-hand column, paragraph 2 ----- -/--	1,10-13, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/001145

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/083185 A2 (ARROWHEAD RES CORPORATIONS [US]; ROZEMA DAVID B [US]; LEWIS DAVID L [U]) 21 June 2012 (2012-06-21) page 18, lines 15-31 claim 13 claim 1 page 12, line 24 - page 13, line 17 -----	1-11,15, 18
X	WO 2014/023709 A1 (ROCHE GLYCART AG [CH]) 13 February 2014 (2014-02-13)	1,10-13, 16,17, 22,23, 27,28,30
Y	page 1, lines 2-7 page 5, line 22 - page 6, line 3 page 14, lines 21-28 page 6, lines 11-32 -----	14,21, 26,29, 31,32
X	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] -----	1,10-13, 16,17, 22,23, 27,28,30
Y	abstract	14,21, 26,29, 31,32
X	WO 2011/086143 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; DUNLEVY GRAINNE [GB]; HOLMES STEVEN [GB]; HONG Z) 21 July 2011 (2011-07-21) -----	1,10-13, 16,17, 22,23, 27,28,30
Y	page 11, paragraph 6 page 11, paragraph 3 claims 34,35 pages 52-58; example 8 page 65 -----	14,21, 26,29, 31,32
A	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 ----- -/-	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/001145

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	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 -----	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/001145

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013121296	A1	22-08-2013	
		AU 2013220079 A1	04-09-2014
		CA 2864432 A1	22-08-2013
		CN 104271148 A	07-01-2015
		EA 201491524 A1	30-12-2014
		EP 2814500 A1	24-12-2014
		HK 1202051 A1	18-09-2015
		JP 2015508770 A	23-03-2015
		KR 20150010699 A	28-01-2015
		WO 2013121296 A1	22-08-2013
WO 2012083185	A2	21-06-2012	
		AU 2011343532 A1	09-05-2013
		AU 2015210397 A1	03-09-2015
		CA 2816042 A1	21-06-2012
		CN 103547272 A	29-01-2014
		EP 2651420 A2	23-10-2013
		JP 2014507392 A	27-03-2014
		KR 20140012624 A	03-02-2014
		NZ 611662 A	27-03-2015
		PE 01802014 A1	21-02-2014
		RU 2013117285 A	27-01-2015
		SG 189945 A1	28-06-2013
		US 2012165393 A1	28-06-2012
		US 2013281658 A1	24-10-2013
		WO 2012083185 A2	21-06-2012
WO 2014023709	A1	13-02-2014	
		CA 2878626 A1	13-02-2014
		CN 104704001 A	10-06-2015
		EP 2882775 A1	17-06-2015
		JP 2015525792 A	07-09-2015
		KR 20150041626 A	16-04-2015
		US 2015299324 A1	22-10-2015
		WO 2014023709 A1	13-02-2014
WO 2011086143	A2	21-07-2011	
		CA 2786660 A1	21-07-2011
		CN 102791293 A	21-11-2012
		EP 2523686 A2	21-11-2012
		JP 2013516967 A	16-05-2013
		US 2013078216 A1	28-03-2013
		WO 2011086143 A2	21-07-2011