

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-121981

(P2020-121981A)

(43) 公開日 令和2年8月13日(2020.8.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z N A H 4 C O 7 6
A 6 1 K 47/59 (2017.01)	A 6 1 K 47/59	4 C O 8 4
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/54	4 C O 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 K 39/35 (2006.01)	A 6 1 K 39/35	

審査請求 有 請求項の数 47 O L 外国語出願 (全 224 頁) 最終頁に続く

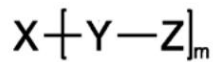
(21) 出願番号	特願2020-66391 (P2020-66391)	(71) 出願人	506067039
(22) 出願日	令和2年4月2日 (2020.4.2)		エコール・ポリテクニク・フェデラル・
(62) 分割の表示	特願2016-570196 (P2016-570196)		ドゥ・ローザンヌ (ウペエフエル)
	の分割		Ecole Polytechnique
原出願日	平成27年2月20日 (2015.2.20)		Federale de Lausan
(31) 優先権主張番号	61/942, 942		ne (EPFL)
(32) 優先日	平成26年2月21日 (2014.2.21)		スイス、ツェーハー1015ローザンヌ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		、ウペエフエル・イノベーション・パルク
			・ジ、ウペエフエル・テテオ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖標的化治療剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 移植拒絶、自己免疫疾患、食物アレルギー、および治療薬に対する免疫応答の治療において有用である薬学的に許容可能な組成物の提供。

【解決手段】 式1の化合物を含む組成物：



式1

ここで：mは約1から100の整数であり；Xは、患者が望ましくない免疫応答を発症する抗原、もしくはその免疫寛容誘導部分を含み；またはXは、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含み、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与し；Yは、リンカー部分を含み；かつZは、肝臓標的化部分を含む。

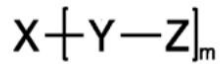
【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 1 の化合物を含む組成物であって：

【化 1】



式 1

ここで：

10

m が約 1 から 100 の整数であり；

X が、患者が望ましくない免疫応答を発症する抗原、もしくはその免疫寛容誘導部分を含み；または

X が、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含み、該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与し；

Y が、リンカー部分を含み；かつ

Z が、肝臓標的化部分を含む、組成物。

【請求項 2】

20

Z が、ガラクトース、ガラクトサミンまたは N-アセチルガラクトサミンを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

Y にその C 1、C 2 または C 6 でコンジュゲートされた Z を含む、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

Y が、N-ヒドロキシスクシンイミジルリンカー、マレイミドリンカー、ビニルスルホンリンカー、ピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）リンカー、ピリジルジチオールリンカー、n-ニトロフェニルカーボネートリンカー、NHS-エステルリンカー、およびニトロフェノキシポリ（エチレングリコール）エステルリンカーから選択される、請求項 1 に記載の組成物。

30

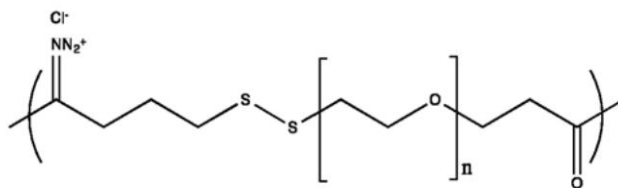
【請求項 5】

Y が：

X に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドまたは他のリガンド；
ジスルファニルエチルエステル；

式 Y a から Y p の 1 つにより表される構造を含み：

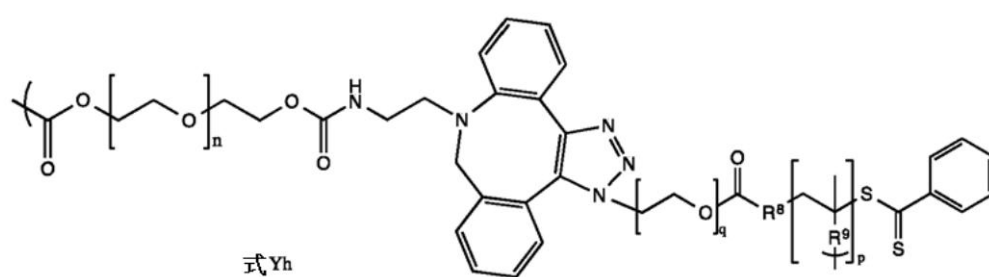
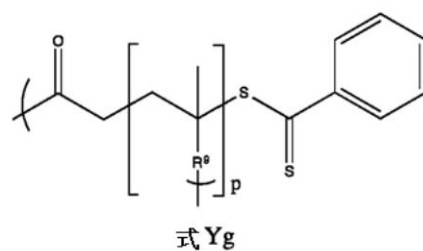
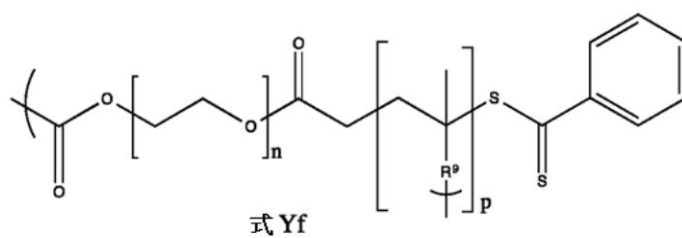
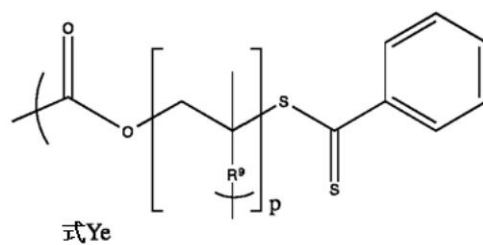
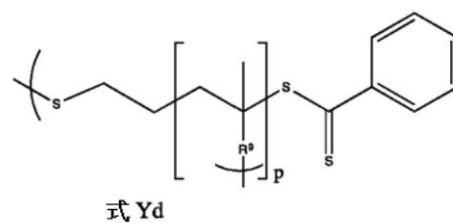
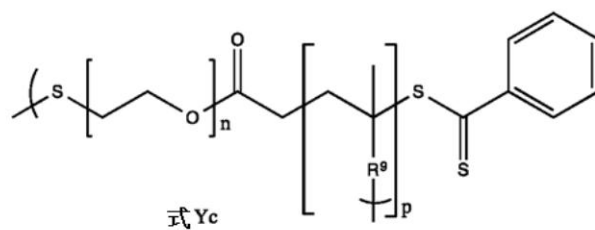
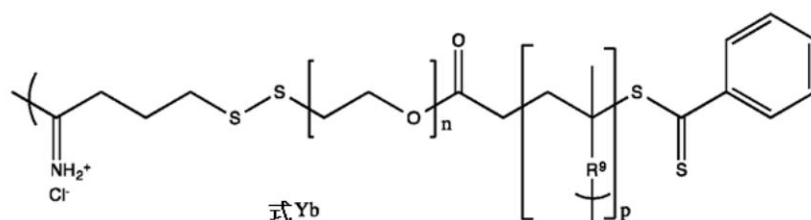
【化 2】



式 Ya

40

【化 3】



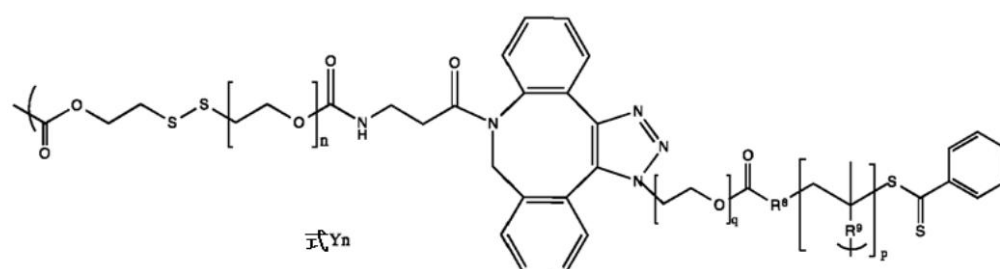
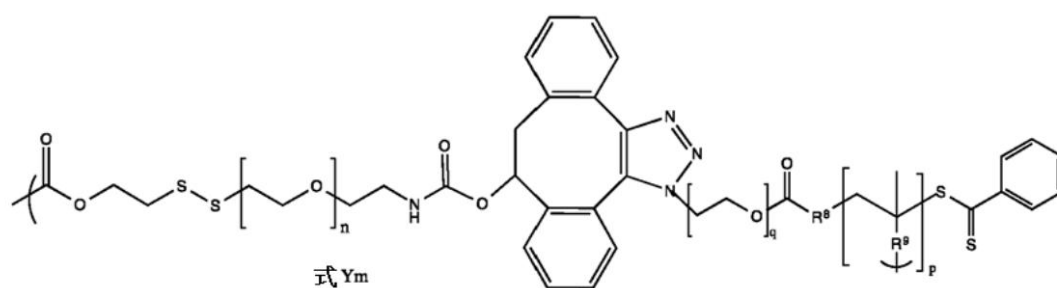
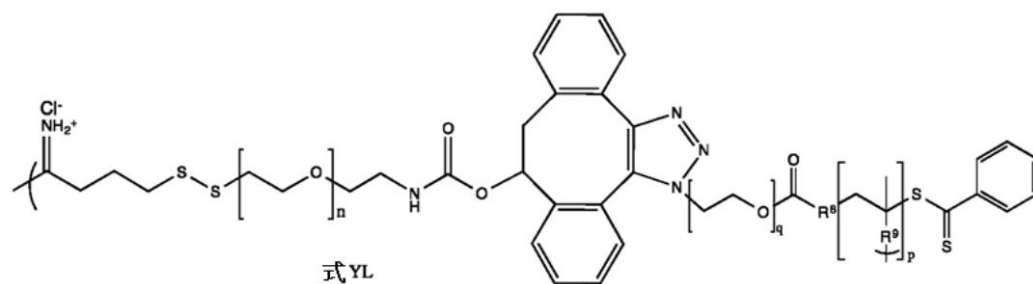
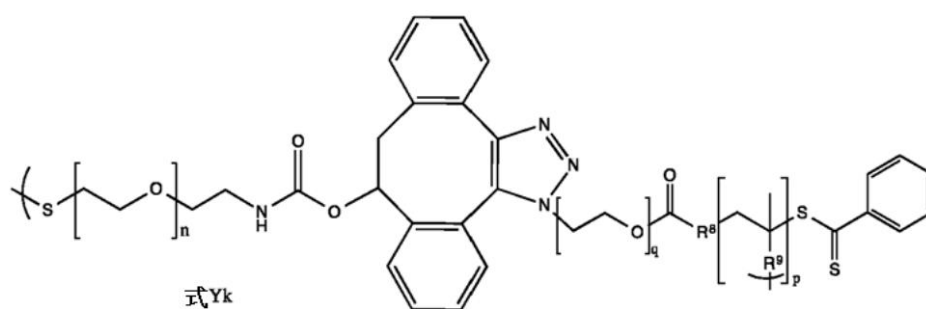
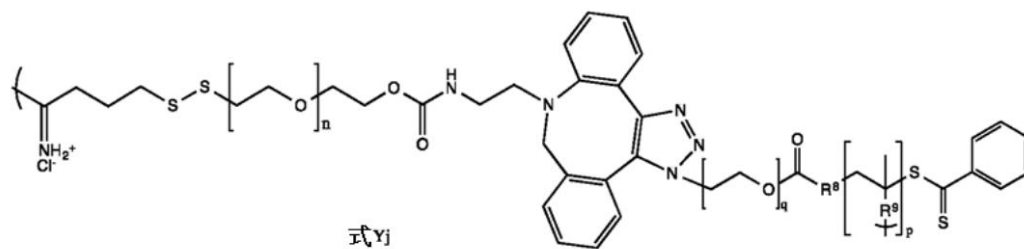
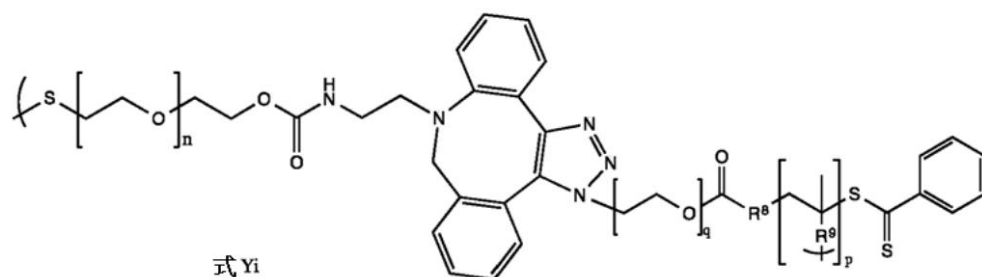
10

20

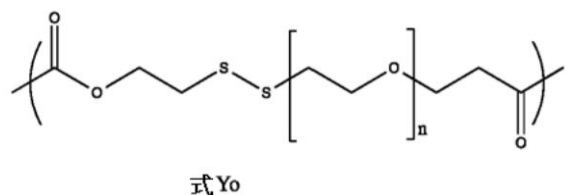
30

40

【化 4】

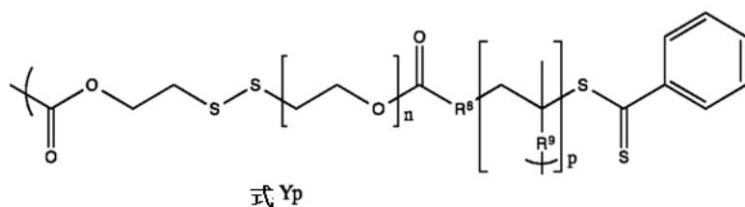


【化 5】



および

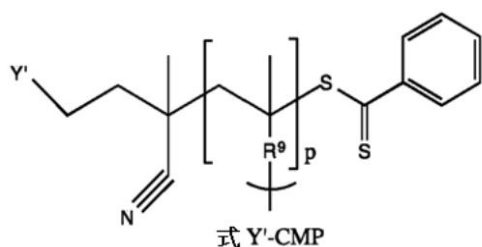
【化 6】



10

または式 Y' - C M P により表される部分を有し：

【化 7】



20

ここで：

左の括弧“(”は、X および Y 間の結合を示し；

右または下の括弧および“(”は、Y および Z 間の結合を示し；

n は約 1 から 100 の整数であり；

p は約 2 から 150 の整数であり；

q は約 1 から 44 の整数であり；

R⁸ は、-CH₂- または -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)- であり；R⁹ は、直接結合または -CH₂-CH₂-NH-C(O)- であり；かつ

Y' は Y の残存部分を表す、

請求項 1 に記載の組成物。

30

【請求項 6】

n が約 40 から 80 であり；

p が約 10 から 100 であり；

q が約 3 から 20 であり；

R⁸ が -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)- であり；かつR⁹ が -CH₂-CH₂-NH-C(O)- である場合に、Z が、その C1 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N-アセチルガラクトサミンである、

請求項 5 に記載の組成物。

40

【請求項 7】

Y が、式 Y_a、式 Y_b、式 Y_h、式 Y_i、式 Y_k、式 Y_m または式 Y_n を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

Y が、式 Y_a、式 Y_b、式 Y_m または式 Y_n を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 9】

Y が、式 Y_a、式 Y_b、式 Y_m または式 Y_n を含む、請求項 6 に記載の組成物。

50

【請求項 10】

Xが：

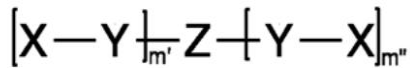
移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原；
 患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原；
 患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の治療薬；もしくは
 患者が望ましくない免疫応答を発症する内在性型に対する合成自己抗原、または
 それらの免疫寛容誘導部分
 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

式 2 の化合物を含む組成物であって：

10

【化 8】



式 2

ここで：

$m' + m''$ が 1 に等しく、かつ Z が DOM 26h-196-61 である場合、X はインターフェロン、リバビリン、ネクサバル／ソラフェニブ、アービタックス／セツキシマブ、アバスタチン／ベバシズマブまたはハーセプチン／トラスツズマブではないという条件で、

20

m' はゼロまたは約 1 から 10 の整数であり、 m'' はゼロまたは約 1 から 10 の整数であり、かつ $m' + m''$ の総和は約 1 から 10 の整数であるが、少なくとも 1 であり；

それぞれ X は、外来性抗原、もしくは患者が望ましくない免疫応答を発症する自己抗原、またはその免疫寛容誘導部分を含み；

それぞれ Y は、リンカー部分もしくは直接結合、または X に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは他のリガンドを含み；かつ

Z は肝臓標的化部分を含む、

組成物。

30

【請求項 12】

Z が ASGPR 標的化抗体、ASGPR 標的化抗体フラグメント、ASGPR 標的化ペプチド、ASGPR 標的化 scFv、または別の ASGPR リガンドを含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

X が、患者が望ましくない免疫応答を発症する関連抗原の群またはその免疫寛容誘導フラグメントの群を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 14】

Xが：

インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ 65 GAD-67、グルコース-6-ホスファターゼ 2、インスリノーマー関連タンパク質 2、インスリノーマー関連タンパク質 2β、ICA69、ICA12、カルボキシペプチダーゼ H、Imogen 38、GLIMA38、クロモグラニン A、HSP-60、カルボキシペプチダーゼ E、ペリフェリン、2 型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓／膵臓の関連タンパク質、S100β、グリアル線維性酸性タンパク質、再生遺伝子 I1、膵臓十二指腸ホメオボックス 1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット-関連タンパク質、および SST G タンパク質共役型受容体 1-5 の 2 つ以上；

40

ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエリンプロテオリピドタンパク質、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：

50

14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17の2つ以上；ならびに配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、および配列番号：27の2つ以上を含む群から選択される、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

Yが免疫プロテアソーム切断部位を有するリンカーである、請求項11に記載の組成物。

【請求項16】

Xが：

移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原；

患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原；

患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の治療薬；もしくは

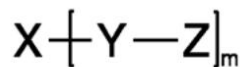
患者が望ましくない免疫応答を発症する内在性型に対する合成自己抗原、またはそれらの免疫寛容誘導部分

を含む、請求項11に記載の組成物。

【請求項17】

かかる治療を必要とする哺乳類に、有効量の、式1の化合物を含む組成物を投与することによる、抗原に対する望ましくない免疫応答のための治療方法であって：

【化9】



式1

ここで：

mは約1から100の整数であり；

Xは、患者が望ましくない免疫応答を発症する抗原、もしくはその免疫寛容誘導部分を含み；または

Xは、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含み、該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに

原因的に関与し；

Yはリンカー部分を含み；かつ

Zは肝臓標的化部分を含む、

治療方法。

【請求項18】

Xが、患者が望ましくない免疫応答を発症する抗原、もしくはその免疫寛容誘導部分を含み；かつ

Yが：

Xに特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドまたは他のリガンド；

ジスルファニルエチルエステル；

式Y aからY pの1つにより表される構造を含み；

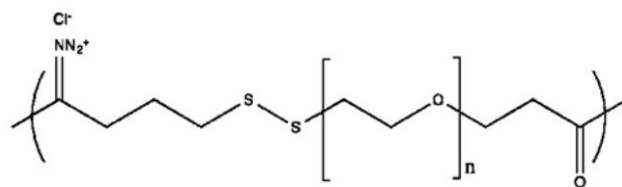
10

20

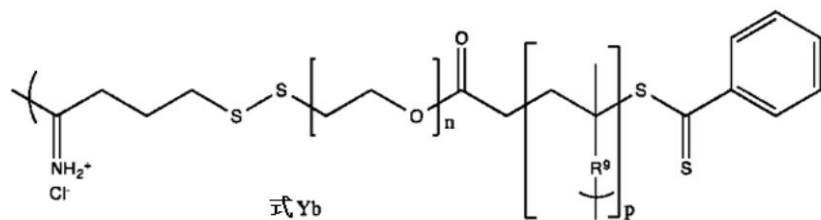
30

40

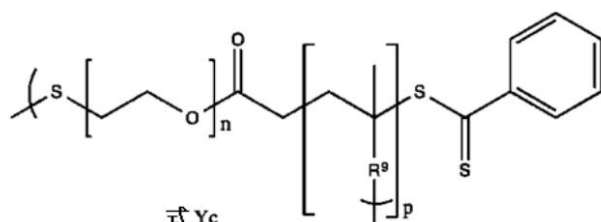
【化 10】



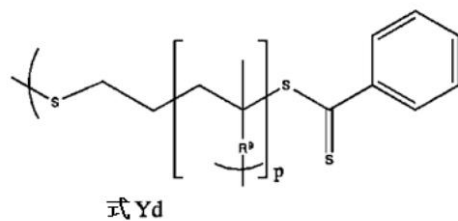
式 Yc



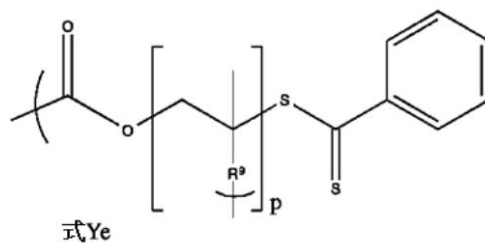
式 Yb



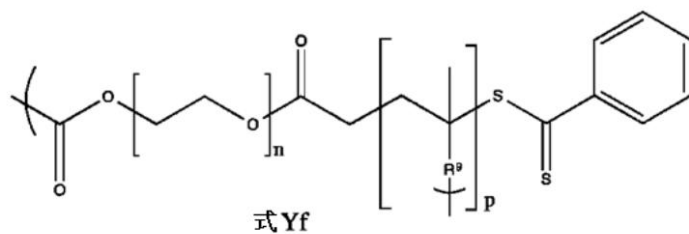
式 Yd



式 Yf



式 Ye



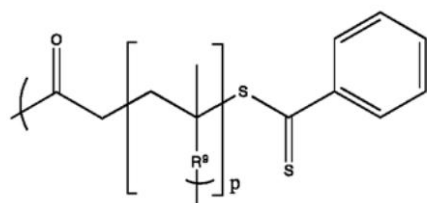
式 Yg

10

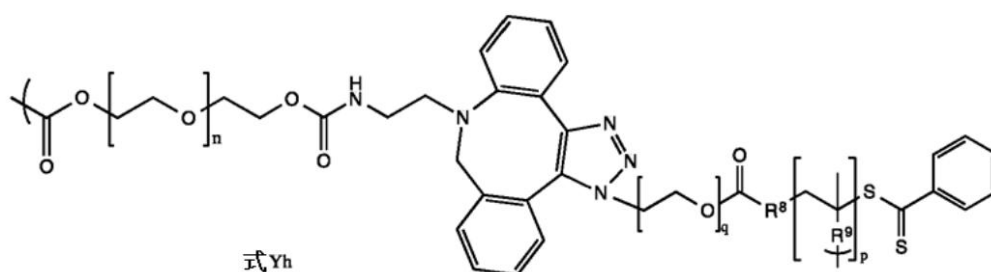
20

30

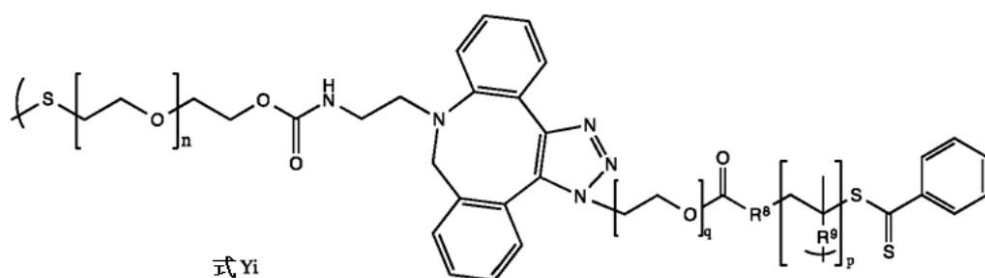
【化 1 1】



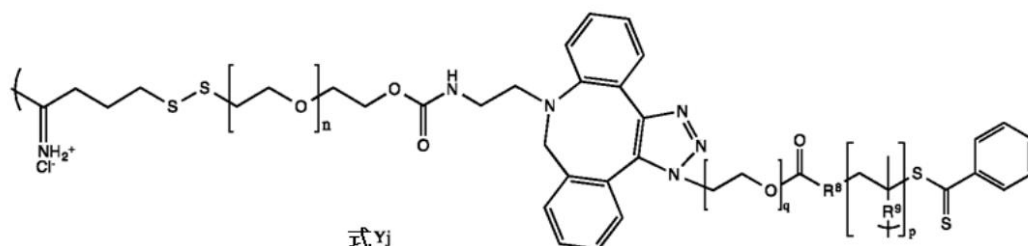
式 Yg



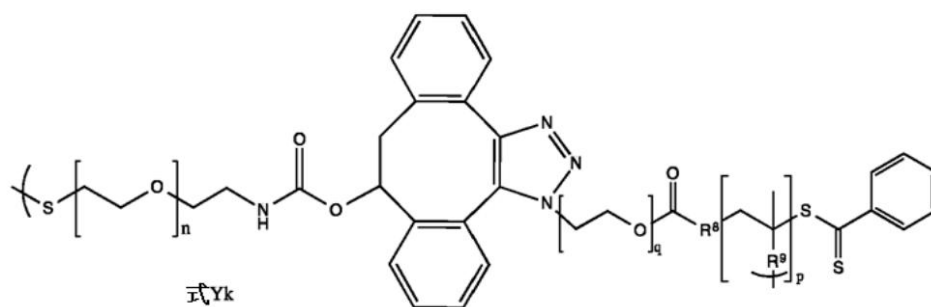
式 Yh



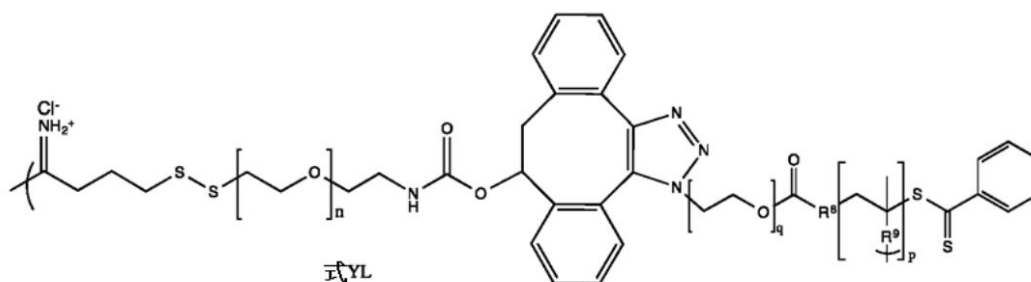
式 Yi



式 Yj



式 Yk



式 YL

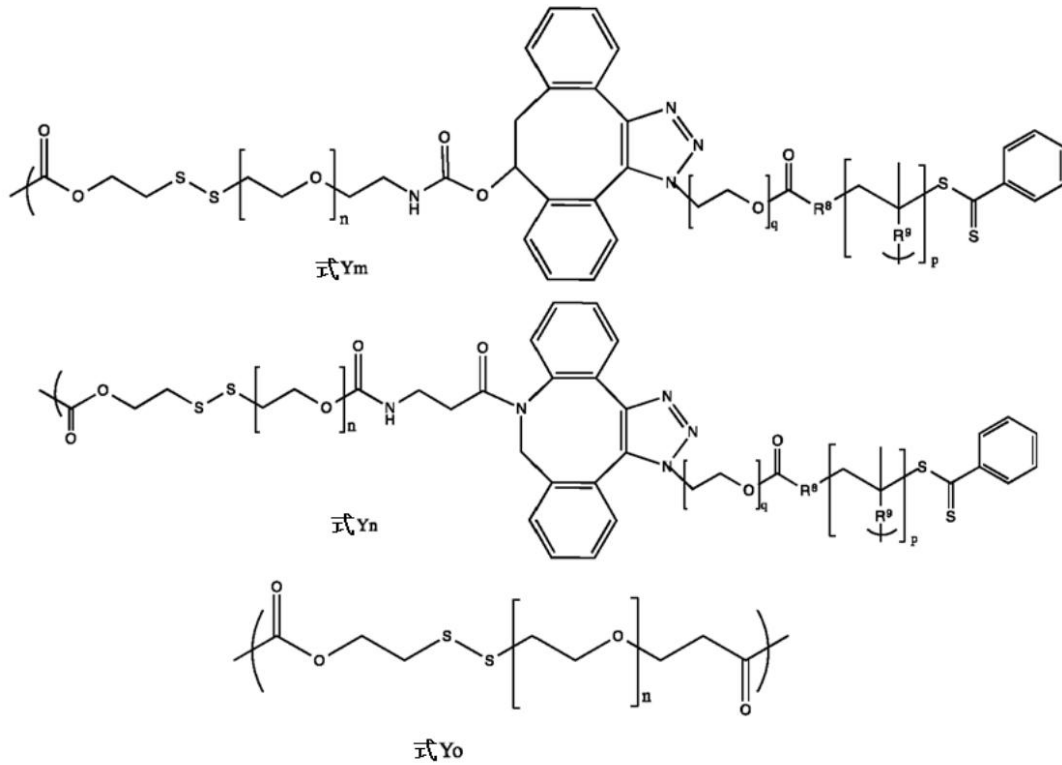
10

20

30

40

【化 1 2】

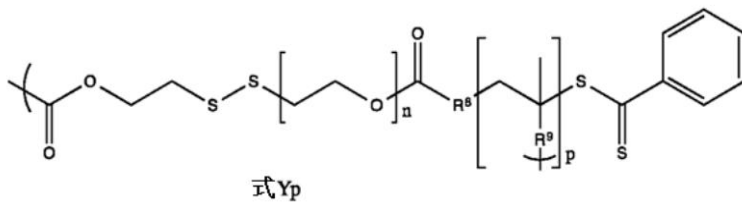


10

20

および

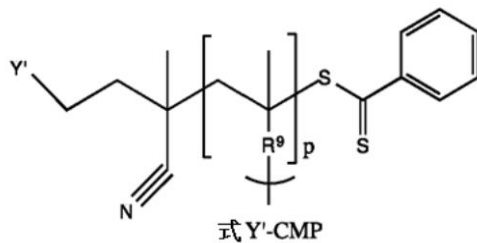
【化 1 3】



30

または式 Y' - CMP により表される部分を有し：

【化 1 4】



40

ここで：

左の括弧“(”は、X および Y 間の結合を示し；

右または下の括弧および“(”は、Y および Z 間の結合を示し；

n は約 1 から 100 の整数であり；

p は約 2 から 150 の整数であり；

q は約 1 から 44 の整数であり；

R⁸ は、-CH₂- または -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)- であり；R⁹ は、直接結合または -CH₂-CH₂-NH-C(O)- であり；ならびに

Y' は Y の残存部分を表す、

請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

50

Xが、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含み、かつ前記組成物を、Xに特異的に結合する、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体のクリアランスのため投与し、該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与する、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

Xが、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含み、かつ移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／またはアレルギーに原因的に関与する抗体の濃度を、投与後約12から約48時間の間の時間で測定される、患者の血中で少なくとも50% w/wまで減少させるように、前記組成物を有効量で投与する、請求項17に記載の方法。

10

【請求項21】

前記組成物を抗原部分Xに関する患者の寛容化のために投与する、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

Xが：

移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原；

患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原；

患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の治療薬；もしくは

患者が望ましくない免疫応答を発症する内在性型に対する合成自己抗原、または

20

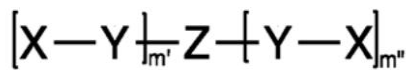
それらの免疫寛容誘導部分

を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

かかる治療を必要とする哺乳類に、有効量の、式2を含む組成物を投与することによる、抗原に対する望ましくない免疫応答のための治療方法であって：

【化15】



式2

30

ここで：

$m' + m''$ が1に等しく、かつZがDOM 26h-196-61である場合、Xはインターフェロン、リバビリン、ネクサバル／ソラフェニブ、アービタックス／セツキシマブ、アバスタチン／ベバシズマブまたはハーセプチン／トラストズマブではないという条件で、

m' はゼロまたは約1から10の整数であり、 m'' はゼロまたは約1から10の整数であり、かつ $m' + m''$ の総和は約1から10の整数であるが、少なくとも1であり；

それぞれXは抗原部分であり；

それぞれYは、リンカー部分もしくは直接結合、またはXに特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは他のリガンドであり；かつ

40

Zは肝臓標的化部分である、

方法。

【請求項24】

抗原部分Xに特異的に結合する、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体のクリアランスのために前記組成物を投与し、該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／またはアレルギー

50

に原因的に関与する抗体の濃度を、投与後約 12 から約 48 時間の間の時間で測定される患者の血中で少なくとも 50 % w/w まで減少させるように、前記組成物を有効量で投与する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記組成物を抗原部分 X に関する患者の寛容化のために投与する、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 27】

Z が A S G P R 標的化抗体、A S G P R 標的化抗体フラグメント、A S G P R 標的化ペプチド、A S G P R 標的化 s c F v、または別の A S G P R リガンドを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

X が、患者が望ましくない免疫応答を発症する関連抗原の群またはその免疫寛容誘導フラグメントの群を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

X が：

インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ 65 G A D-67、グルコース-6-ホスファターゼ 2、インスリノーマー関連タンパク質 2、インスリノーマー関連タンパク質 2 β、I C A 69、I C A 12、カルボキシペプチダーゼ H、I m o g e n 38、G L I M A 38、クロモグラニン A、H S P-60、カルボキシペプチダーゼ E、ペリフェリン、2 型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓/膵臓の関連タンパク質、S 100 β、グリアル線維性酸性タンパク質、再生遺伝子 I I、膵臓十二指腸ホメオボックス 1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット-関連タンパク質、および S S T G タンパク質共役型受容体 1-5 の 2 つ以上；

ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエリンプロテオリピドタンパク質、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17 の 2 つ以上；ならびに配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、および配列番号：27 の 2 つ以上を含む群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

望ましくない免疫応答を治療する、請求項 1-10 または 11-16 のいずれかの組成物の使用。

【請求項 31】

X に対する患者の寛容化のための、ここで、X は、患者が望ましくない免疫応答を発症する抗原、もしくはその免疫寛容誘導部分を含むものであり、または移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および/またはアレルギーに原因的に関与する循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体のクリアランスのための、ここで、X は循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含むものである、：

請求項 1-10 のいずれかの組成物の使用。

【請求項 32】

前記組成物を抗原部分 X に関する患者の寛容化のために投与する、請求項 11-16 のいずれかの組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、出典明示により本明細書に組み込まれる“糖標的化治療剤 (G L Y C O T A R G E T I N G T H R A P E U T I C S)”と題される同時係属中の 2014 年 2 月 21 日に出願された米国仮出願番号第 61/942,942 号の優先権を主張する。

10

20

30

40

50

【0002】

本開示の分野

本開示の分野は、移植拒絶、自己免疫疾患、食物アレルギー、および治療薬に対する免疫応答の治療において有用である薬学的に許容可能な組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

本開示の背景

米国出願第2012/0039989号、米国出願第2012/0178139号およびWO2013/121296号は、寛容化のための抗原提示における赤血球の役割を活用する、赤血球への抗原の標的化を記載する。このアプローチでこれまで生じた肯定的な結果にもかかわらず、代替アプローチの可能性への関心が依然としてある。

10

【発明の概要】

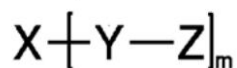
【課題を解決するための手段】

【0004】

本開示の概要

本開示の態様は、式1の化合物を含む組成物を提供する：

【化1】



20

式1

ここで：

mは約1から100の整数であり；

Xは、患者が望ましくない免疫応答を発症する抗原、もしくはその免疫寛容誘導部分を含み；または

Xは、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドを含み、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与し；

30

Yは、リンカー部分を含み；かつ

Zは、肝臓標的化部分を含む。

【0005】

Zはまた、例えば、YにそのC1、C2またはC6でコンジュゲートされたガラクトース、ガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを含みうる。

【0006】

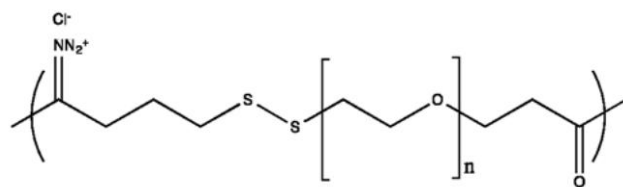
Yは、N-ヒドロキシスクシンイミジルリンカー、マレイミドリンカー、ビニルスルホンリンカー、ピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）リンカー、ピリジルジチオールリンカー、n-ニトロフェニルカーボネートリンカー、NHS-エステルリンカー、およびニトロフェノキシポリ（エチレングリコール）エステルリンカーから選択される。

40

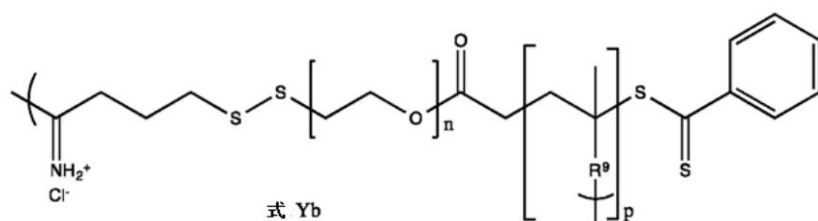
【0007】

Yはさらに、Xに特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは他のリガンド；ジスルファニルエチルエステル；式Y_aからY_pの1つにより表される構造を含むことができ；

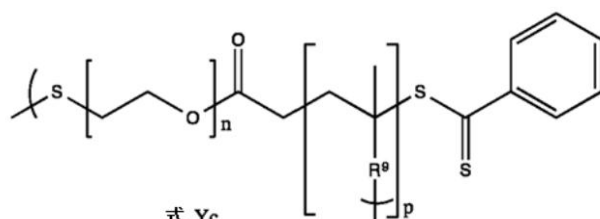
【化 2】



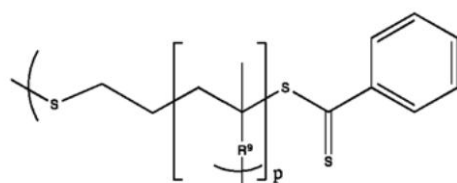
式 Ya



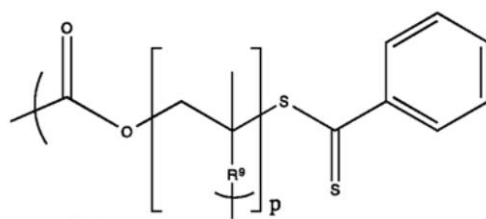
式 Yb



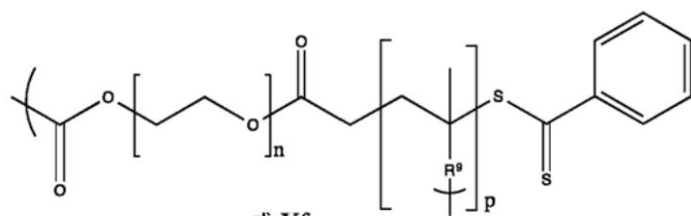
式 Yc



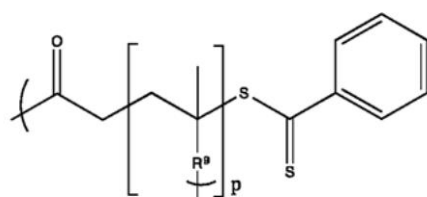
式 Yd



式 Ye



式 Yf



式 Yg

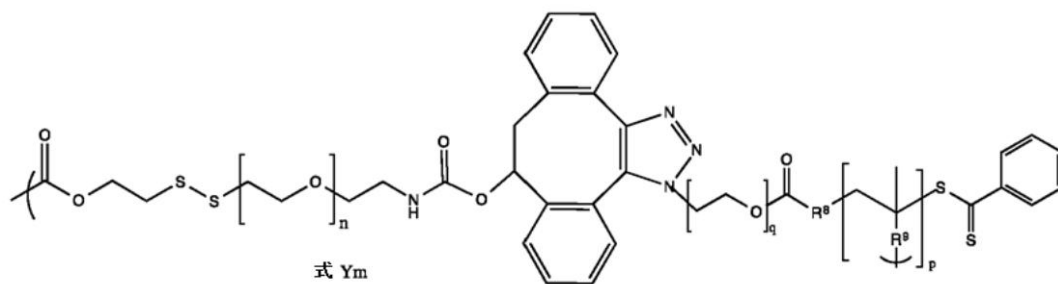
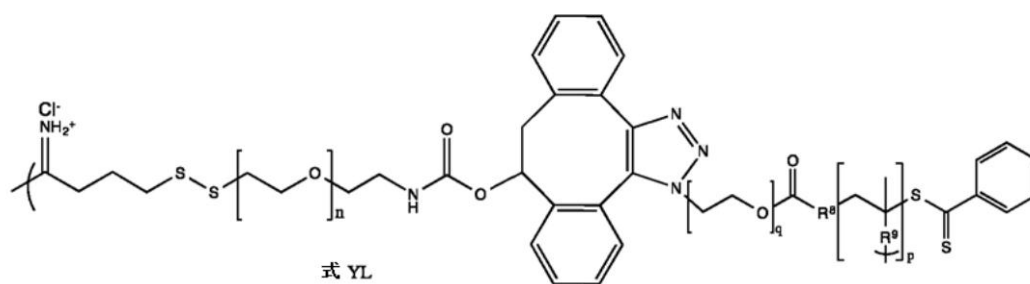
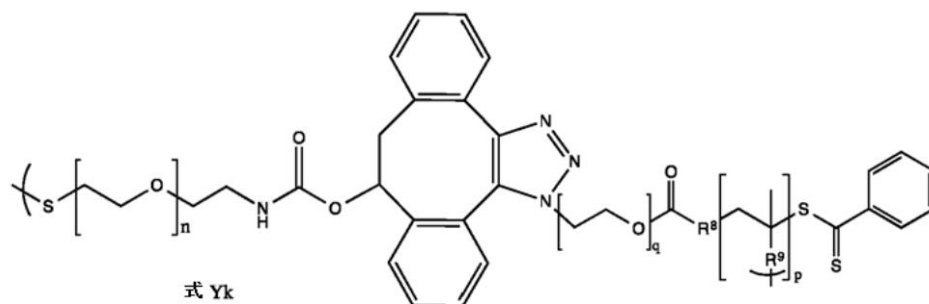
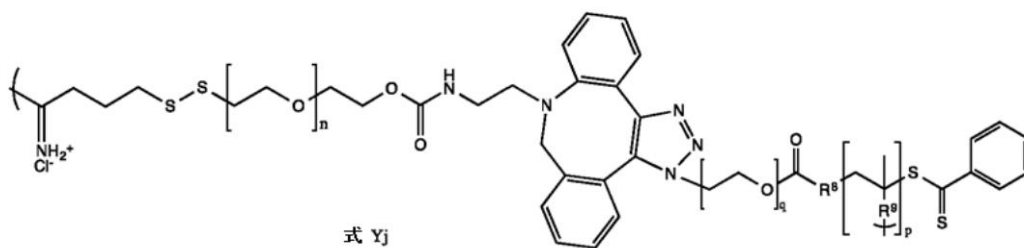
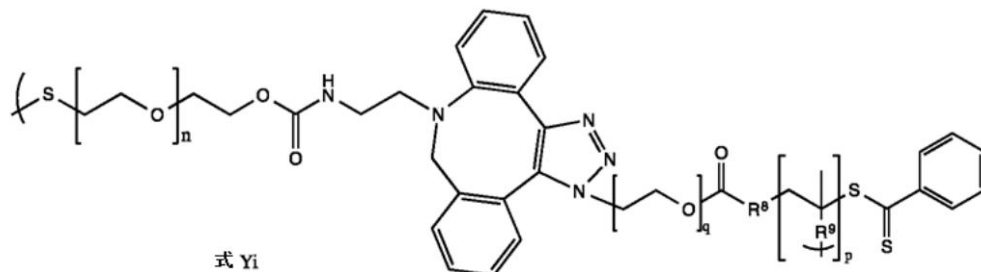
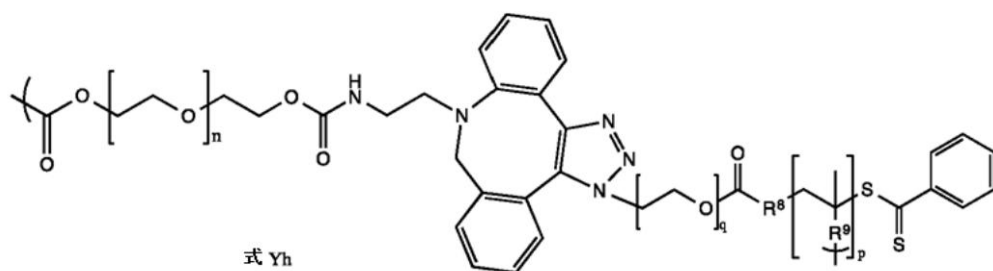
10

20

30

40

【化 3】



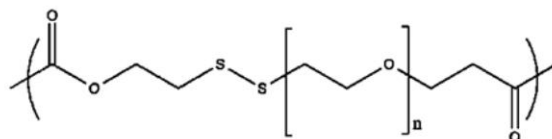
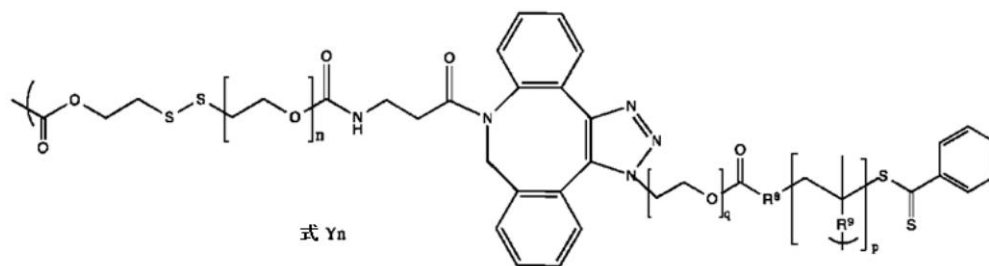
10

20

30

40

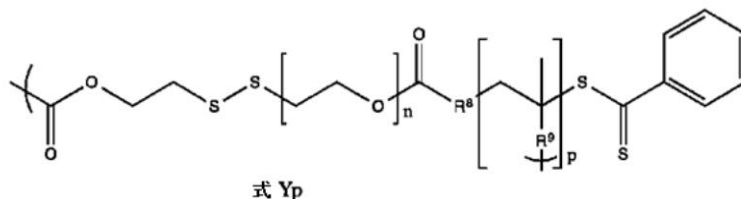
【化 4】



10

および

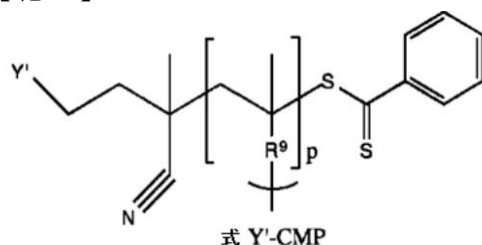
【化 5】



20

または式 Y' - CMP により表される部分を有する：

【化 6】



30

ここで：左の括弧“(”は、XおよびY間の結合を示し；右または下の括弧および“(”は、YおよびZ間の結合を示し；nは約1から100の整数であり；pは約2から150の整数であり；qは約1から44の整数であり；R⁸は、-CH₂-または-CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-であり；R⁹は、直接結合または-CH₂-CH₂-NH-C(O)-であり；かつY'は、Yの残存部分を表す。

【0008】

上記の別の態様では、nは約40から80であり、pは約10から100であり、qは約3から20であり、R⁸は、-CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-であり；かつR⁹が-CH₂-CH₂-NH-C(O)-である場合に、Zは、そのC1でコンジュゲートされたガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンである。

40

【0009】

上記のさらに別の態様では、Yは、式Ya、式Yb、式Yh、式Yi、式Yk、式Ymまたは式Yn、特に式Ya、式Yb、式Ymまたは式Ynを含む。

【0010】

Xは：移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原；患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原；患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の治療薬；もしくは患者が望ましくない免疫応答を発症する内在性型に対する合成自己抗原、またはそれらの免疫寛容誘導部分をさらに含む。

【0011】

50

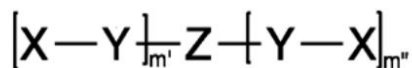
本開示はまた、かかる治療を必要とする哺乳類に、有効量の、上述の式 1 の化合物を含む組成物を投与することによる、抗原に対する望ましくない免疫応答のための治療方法に関連する。かかる方法において、抗原部分 X に特異的に結合する、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体のクリアランスのために当該組成物は投与でき、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与する。当該組成物は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／またはアレルギーに原因的に関与する抗体の濃度を患者の血中で少なくとも 50 % w / w まで減少させるように有効量で投与でき、投与後約 12 から約 48 時間の間の時間で測定される。当該組成物は抗原部分 X に関する患者の寛容化のために投与されうる。

10

【0012】

本開示のさらに別の態様は、式 2 の化合物を含む組成物を提供する：

【化 7】



式 2

ここで：m' + m'' が 1 に等しく、かつ Z が DOM 26h-196-61 である場合、X はインターフェロン、リバビリン、ネクサバル／ソラフェニブ、アービタックス／セツキシマブ、アバスタチン／ベバシズマブまたはハーセプチン／トラスツズマブではないという条件で、m' はゼロまたは約 1 から 10 の整数であり、m'' はゼロまたは約 1 から 10 の整数であり、かつ m' + m'' の総和は約 1 から 10 の整数であるが、少なくとも 1 であり；それぞれ X は、患者が望ましくない免疫応答を発症する、外来性抗原もしくは自己抗原、またはそれらの免疫寛容誘導部分であり；それぞれ Y は、リンカー部分もしくは直接結合、または X に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは他のリガンドであり；かつ Z は肝臓標的化部分である。

20

【0013】

式 2 を伴う上記態様では、Z は ASGPR 標的化抗体、ASGPR 標的化抗体フラグメント、ASGPR 標的化ペプチド、ASGPR 標的化 scFv、または別の ASGPR リガンドを含みうる。Y は免疫プロテアソーム切断部位を有するリンカーでありうる。X は、患者が望ましくない免疫応答を発症する関連抗原の群またはその免疫寛容誘導フラグメントの群を含みうる。例えば、X は、以下を含む群から選択されうる：

30

- ・ インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65 GAD-67、グルコース-6-ホスファターゼ 2、インスリノーマー関連タンパク質 2、インスリノーマー関連タンパク質 2β、ICA69、ICA12、カルボキシペプチダーゼ H、Imogen 38、GLIMA38、クロモグラニン A、HSP-60、カルボキシペプチダーゼ E、ペリフェリン、2 型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓／膵臓の関連タンパク質、S100β、グリア線維性酸性タンパク質、再生遺伝子 II (regenerate gene II)、膵臓十二指腸ホメオボックス 1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット-関連タンパク質、および SST G タンパク質共役型受容体 1-5 の 2 つ以上；

40

- ・ ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエリンプロテオリピドタンパク質、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、および配列番号：17 の 2 つ以上；

- ・ 配列番号：24、配列番号：25、配列番号：26、および配列番号：27 の 2 つ以上。

【0014】

50

本開示はまた、かかる治療を必要とする哺乳類に、有効量の、上述の式2の化合物を含む組成物を投与することによる、抗原に対する望ましくない免疫応答のための治療方法に関連する。かかる方法において、抗原部分Xに特異的に結合する、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体のクリアランスのために当該組成物は投与でき、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与する。当該組成物は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／またはアレルギーに原因的に関与する抗体の濃度を患者の血中で少なくとも50%w/wまで減少させるように有効量で投与でき、投与後約12から約48時間の間の時間で測定される。当該組成物は抗原部分Xに関する患者の寛容化のために投与されうる。

10

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、ガラクトースコンジュゲーション[F1aA-OVA-m₄-n₈₀(Gal-OVA)]が、以下を含む肝臓の細胞へOVAを優先的に標的化することを示す一連のグラフである：(A.)類洞内皮細胞(LSEC)、(B.)クッパー細胞(KC)、(C.)肝細胞、および(D.)他の抗原提示細胞(APC)。

【0016】

【図2】図2は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀(Gal-OVA)、OVAまたは生理食塩水(すなわちナイーブ(naive))で処置されたマウスにおけるOTI CD8⁺T細胞の増殖を示すグラフである。

20

【0017】

【図3】図3は、生理食塩水、OVAまたはF1aA-OVA-m₄-n₈₀(Gal-OVA)で処置された増殖性T細胞の世代におけるOTI CD8⁺T細胞提示表面マーカー(A.)PD-1⁺および(B.)アネキシンV⁺の割合を示す一連のグラフである。

【0018】

【図4】図4は、ガラクトースコンジュゲーション[F1aA-OVA-m₄-n₈₀(Gal-OVA)]がOVA-特異抗体力価により決定されるOVAの免疫原性を減少させることを示すグラフである(Ab力価log⁻¹で示される)。

【0019】

【図5】図5は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀(Gal-OVA)が血清からOVA-特異的な抗体を枯渇させることができることを示す。

30

【0020】

【図6】図6は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀(mGal-OVA)、F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄(pGal-OVA)、およびN'-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C'(DOM-OVA)が、OVAおよびアジュバントLPSでの皮内チャレンジ後の流入領域リンパ節におけるOVA-特異的な免疫応答軽減することができることを示す。

【0021】

【図7】図7は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀およびF1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄の特性評価を示す。(A.)F1aA-OVA-m₄-n₈₀(マゼンタ)、F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄(青)およびコンジュゲートされていないOVA(黒色)の、サイズ排除HPLCの形跡。左へのシフトは、分子量の増加を表す。(B.)OVAコンジュゲーション後の増加した分子量を示すポリアクリルアミドゲル：(1.)コンジュゲートされていないOVA、(2.)F1aA-OVA-m₄-n₈₀および(3.)F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄。

40

【0022】

【図8】図8は、静脈内急速投与として注射後のマウスの循環におけるN-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C(OVA)、N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C(DOM-OVA)、またはN-OVA-Gly₃Ser-D

50

OM-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA DOM) の標準化された量を示すグラフである。

【0023】

【図9】図9は、生理食塩水、DOMおよびOVA、DOM-OVA、またはOVA-DOMでの処置後の個々のマウスの循環における抗OVA IgG抗体の力価を示す一連のグラフである。OVA単独(a)またはOVAおよびCpG-B(b)の静脈内注射により抗OVA IgGの生産が誘導された。処置時間は垂直の破線により示される。力価は、検出可能な抗OVA IgGを有する血漿の最大倍希釈のlog₁₀として計算される。

【0024】

10

詳細な説明

2つの公知のアシアロ糖タンパク質受容体(“ASGPR”)は、肝細胞および肝臓類洞内皮細胞(または“LSEC”)上に発現される。他のガラクトース／ガラクトサミン／N-アセチルガラクトサミン受容体は、複数の細胞タイプ[例えば、樹状細胞、肝細胞、LSEC、およびクッパー細胞]上に様々な形態で確認されうる。樹状細胞は、“プロフェッショナルな抗原提示細胞”と考えられ、それは、それらの主要な機能が、免疫応答を生成するための免疫系に抗原を提示することだからである。肝臓内のいくつかの細胞は、抗原を提示することができると知られているが、肝臓が免疫寛容誘導に関与していることはより知られている。肝臓は、免疫寛容誘導臓器であると理解されている。例えば、移植臓器の1つが肝臓である場合、複数の臓器移植の事例では、より低い拒絶の発生率が報告されている。LSECの事例は、当該文献よりも新しく；結果的に、免疫寛容誘導および／または炎症性免疫応答の緩和におけるそれらの役割は、未だ広く認められておらず、またはあまり理解されていない。しかしながら、それらはまた、抗原特異的な寛容の誘導において重要な役割を果たしうるということが明らかになってきている。

20

【0025】

赤血球表面の特有の特徴の1つは、その糖鎖付加、すなわち、かなりの数のグリコシル化タンパク質の存在である。実際に、グリコホリン(例えば、グリコホリンA)は、赤血球結合のための標的として利用されてきた。グリコホリンは、共有結合で付着した多くの糖鎖を有するタンパク質であり、終末端はシアル酸である。赤血球が古くなり、かつクリアランスの機が熟すと、そのグリコホリンの末端シアル酸は、失われる傾向があり、遊離末端でN-アセチルガラクトサミンを残す。N-アセチルガラクトサミンは肝細胞関連ASGPRにより選択的に受け取られるリガンドであり、肝細胞によるN-アセチルガラクトサミン含有物質の結合、ならびに肝臓におけるそれらの引き続く取り込みおよびプロセッシングにつながる。

30

【0026】

これまでに、肝臓の標的化をもたらす様式での治療薬の糖鎖付加は、治療薬の乏しい循環半減期をもたらす肝臓による初回通過クリアランスのために回避されるべきであると当業者に理解されている。同様に、いくつかのモノクローナル抗体は、それらのFc受容体への最適な結合のために、ASN297で特異的にグリコシル化される必要がある。驚いたことに、ガラクトシル化は免疫寛容誘導を誘導する様式で使

40

【0027】

本開示は、肝臓、特に肝細胞、LSEC、クッパー細胞および／または星状細胞、より特には肝細胞および／またはLSECへの送達のため(および、それらによる取り込みのため)に標的化されるある特定の治療用組成物、ならびに、さらにより特には、特異的にASGPRに結合するある特定の治療用組成物を提供する。肝臓標的化は、治療の2つの機構：寛容化およびクリアランスを容易にする。寛容化は、アポトーシス細胞をクリアランスする際および免疫系により“自己(self)”として認識されるそれらのタンパク質をプロセッシングする際の肝臓の役割、並びに免疫寛容のための周辺タンパク質をサンプリングする際の肝臓の役割を活用する。クリアランスは、毒素、ポリペプチド等を急速に

50

除去および分解することによる血液精製における肝臓の役割を活用する。肝臓へのこれらの組成物の標的化は、ガラクトシル化部分（例えば、ガラクトース、ガラクトサミンおよびN-アセチルガラクトサミン、特にC1、C2またはC6でコンジュゲートされる）により、別の肝臓標的化部分（例えば、モノクローナル抗体、またはそのフラグメントもしくはscFv）により、またはかかる肝臓標的化が望ましいポリペプチドを脱シアル化することにより達成される。ガラクトシル化または他の肝臓標的化部分は、抗原に化学的にコンジュゲートされ、または組換えにより融合されうる一方で、脱シアル化は抗原ポリペプチド上のガラクトース様部分を晒す。当該抗原は、内在性（自己抗原）または外因性（外来性抗原）であり得、限定されないが：移植患者が望ましくない免疫応答（例えば、移植拒絶）を発症する外来性の移植抗原、患者が望ましくない免疫（例えば、アレルギー性または過敏症）応答を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、過敏症および／または減少治療活性）を発症する治療薬、患者が望ましくない免疫応答（例えば、自己免疫疾患）を発症する自己抗原、またはこれらの免疫寛容誘導部分（例えば、フラグメントまたはエピトープ）；を含み；これらの組成物は、抗原に対する寛容化を誘導するために有用である。あるいは、ガラクトシル化または他の肝臓標的化部分は、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドにコンジュゲートでき、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、および／またはアレルギー（上述されるように）に原因的に関与し；これらの組成物は、循環タンパク質、ペプチドまたは抗体をクリアランスするために有用である。従って、本開示の組成物は、望ましくない免疫応答、例えば、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、および／またはアレルギー治療するために使用されうる。少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤と混合される治療有効量の本開示の組成物を含有する医薬組成物もまた提供される。別の態様では、本開示は、移植拒絶、治療薬に対する応答、自己免疫疾患またはアレルギーなどの望ましくない免疫応答の治療のための方法を提供する。

【0028】

定義

【0029】

本明細書中で使用されるように、以下の単語および語句は使用される文脈が他のことを示す場合を除き、下記に記載される意味を有すると一般に意図される。

【0030】

文脈が明らかに別段の指示をしない限り、単数形“a”、“an”および“the”は、複数の対象を含む。

【0031】

“約”という用語は、数値に関連して使用される場合、典型的により低い限界、すなわち、例えば、指示される数値より5-10%小さい値を有し、かつ高い限界、すなわち、例えば、指示される数値より5-10%大きい値を有する範囲以内の数値を包含することを意味する。

【0032】

“抗原”は、T細胞受容体、B細胞受容体または抗体などの適応免疫応答の受容体のための標的として機能する任意の物質である。抗原は体内から由来してもよい（“自己（self）”、“自己（auto）”または“内在性の”）。例えば、吸入、摂取、注射、または移植により入り込み、抗原が体外から由来してもよい（“非自己”、“外来性の（foreign）”または“外因性の（endogenous）”）。外来性抗原は、食物抗原、動物抗原、植物抗原、環境抗原、治療薬、同種移植において存在する抗原を含むが、これらに限定されない。

【0033】

本明細書で使用される“抗原結合分子”は、分子、特に免疫グロブリン分子などのタンパク質に関し、エピトープへの特異的な結合を提供している抗体可変領域を含有する。抗

10

20

30

40

50

体可変領域は、例えば、完全な抗体、抗体フラグメント、ならびに抗体もしくは抗体フラグメントの組換え誘導体中に存在しうる。本明細書で使用される抗体の“抗原結合フラグメント”（または“結合部分”）という用語は、標的配列に特異的に結合する能力を保持する1つ以上の抗体のフラグメントを指す。抗体可変領域を含有する抗原結合フラグメントは、“Fv”、“Fab”、および“F(ab')₂”領域、“単ドメイン抗体(s dAb)”、“ナノボディー”、“一本鎖Fv(scFv)”フラグメント、“直列型のscFvs”(VHA-VLA-VHB-VLB)、“ダイアボディー(diabodies)”、“トリアボディー(triabodies)”または“トリボディー(tribodies)”、“一本鎖ダイアボディー(scDb)”、および“二重特異的なT細胞エンゲージャー(bi-specific T-cell engagers)(BiTEs)”を含む（限定なし）。

10

【0034】

“化学改変”は、ポリペプチドの1つ以上のアミノ酸の天然に存在する化学構造における変化を指す。かかる改変は側鎖または末端にすることができ、例えば、アミノ末端またはカルボキシル末端を変化させる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドを他の材料に連結させ、または治療薬に付着させるために都合よく使用されうる化学基を作製するために、改変は有用である。

【0035】

“含む(including)”、“含有する”、または“により特徴づけられる”と同義の“含む(comprising)”という用語は、包括的もしくは非限定的であり、かつ付加的な列挙されていない要素または方法工程を除外しない。“からなる”という語句は、任意の要素、工程、または特定されない成分を除外する。“本質的に～からなる”という語句は、特定される材料もしくは工程の主題が記載される範囲を限定し、かつそれらは、その基礎および新規の特徴に実質的に影響しない。

20

【0036】

“保存的变化”は、活性を変化させずに一般にアミノ酸配列に対してなすことができる。これらの変化は、“保存的置換”または“変異”と称され；すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の群に属するアミノ酸を別のアミノ酸と置換することができる。アミノ酸配列についての置換物は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択することができる。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、およびチロシンを含む。極性の中性のアミノ酸はグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンを含む。正電荷の（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。負電荷の（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。かかる置換は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または等電点により決定される見かけ上の分子量に実質的に影響すると予想されない。保存的置換はまた、配列の光学異性体を他の光学異性体に置換すること、具体的には配列の1つ以上残基についてDアミノ酸をLアミノ酸に置換することを含む。さらに、配列中のアミノ酸がDからLへの異性体置換を受けうる。例示的保存的置換は、正電荷を維持するArgをLysへ、およびその逆；負電荷を維持するAspをGluへ、およびその逆；ThrをSerへ、結果、遊離OHが維持される；ならびに遊離NH₂を維持するAsnをGlnへの置換を含むが、これらに限定されない。化学誘導体化のための要求が生じるならば、保存的置換のさらに別のタイプは、望ましい化学反応性を有するアミノ酸が化学的コンジュゲーション反応のための反応性部位を付与するために導入される場合を構成する。かかるアミノ酸は、Cys（スルフヒドリル基を挿入する）、Lys（第一級アミンを挿入する）、AspおよびGlu（カルボン酸基を挿入する）、またはケトン、アジド、アルキン、アルケン、およびテトラジン側鎖を含有する特殊な非標準アミノ酸を含むが、これらに限定されない。遊離NH₂またはSHを有するアミノ酸の保存的置換または付加は、式1のリンカーおよびガラクトシル化部分との化学的コンジュゲーションのために特に有利でありうる。さらに、ポリペプチド配列または対応する核酸配列の点変異、欠失、および挿

30

40

50

入は、いくつかの場合において、ポリペプチドまたは核酸フラグメントの機能の喪失なく作製されうる。置換は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50以上の残基を含みうる。本発明において使用可能な変異体は、200まで（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、または200まで）の総数のアミノ酸配列における変化（すなわち交換、挿入、欠失、N末端切断（t r u n c a t i o n）、および／またはC末端切断）を示してもよい。本明細書に記載されるアミノ酸残基は、標準ポリペプチド命名法、J. B i o l. C h e m. , (1 9 6 9) , 2 4 3 , 3 5 5 2 - 3 5 5 9 に合わせて一文字アミノ酸表記または三文字略称のいずれかを利用する。全てのアミノ酸残基配列は、アミノ末端からカルボキシ末端の従来の方向における左右配向を有する式により本明細書に表される。

【0037】

“有効量”または“治療有効量”という用語は、かかる治療を必要とする哺乳類に投与される場合に下記に規定される治療を達成するために十分な本開示の組成物の量を指す。この量は、治療される対象および疾患状態、対象の体重および年齢、疾患状態の重症度、選択される特定の本開示の組成物、投与のタイミング、投与の様式等に従う投薬レジメンに、依存して変動するだろう。そして、それら全ては当業者により容易に決定されうる。

【0038】

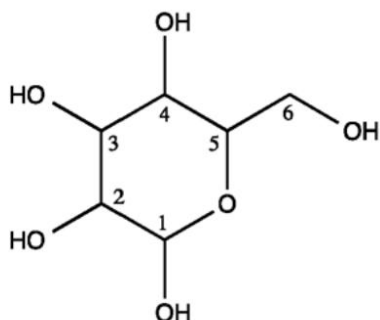
抗原決定基としても知られている“エピトープ”は、巨大分子、例えばタンパク質のセグメントであり、適応免疫系により、例えば抗体、B細胞、またはT細胞により認識される。エピトープは、抗体またはその抗原結合フラグメントに結合することが可能な巨大分子の部分またはセグメントである。この文脈において、“結合”という用語は、特に、特異的な結合に関する。本発明の文脈において、“エピトープ”という用語は、免疫系により認識されるタンパク質またはポリタンパク質のセグメントをことが好ましい。

【0039】

ガラクトースという用語は、当該技術分野でよく知られており、かつ開鎖型および環状型で両方存在し、D-およびL-異性体を有する単糖を指す。環状型では2つのアノマー、すなわちアルファおよびベータがある。アルファ型において、C1アルコール基はアキシアル位にあり、一方でベータ型において、C1アルコール基はエクアトリアル位にある。特に、“ガラクトース”は、環状六員環ピラノース、より特にはD-異性体、およびさらにより特にはアルファ-D-型（ α -D-ガラクトピラノース）を指す。ガラクトースの構造および付番は下記に示される。

【0040】

【化8】



【0041】

“ガラクトシル化部分”という用語は、肝臓標的化部分の特定のタイプを指す。ガラクトシル化部分はガラクトース、ガラクトサミンおよび／またはN-アセチルガラクトサミン残基を含むが、これらに限定されない。

【0042】

“肝臓標的化部分”という用語は、例えばポリペプチドを肝臓に導く能力を有する部分を指す。肝細胞、類洞上皮細胞、クッパー細胞、星状細胞、および／または樹状細胞を含むが、これらに限定されない異なる細胞タイプを、肝臓は含む。典型的には、肝臓標的化部分は、これらの細胞の1つ以上へポリペプチドを導く。それぞれの肝細胞の表面上で、受容体は存在し、肝臓標的化部分を認識し、および肝臓標的化部分に特異的に結合する。肝臓標的化は、ガラクトシル化部分への抗原もしくはリガンドの化学的コンジュゲーション、潜在的なガラクトシル部分を晒すための抗原もしくはリガンドの脱シアル化、ASGPR-結合部分への抗原もしくはリガンドの組換え体の融合もしくは化学的コンジュゲーション、または抗原またはリガンドへの内在性の抗体の特異的な結合により達成でき、こ

10

【0043】

様々な置換基のために提供される“数値”および“範囲”は、記載の範囲内の全ての整数を包含するように意図される。例えば、約1から100、特に約8から90、およびより特に約40から80のエチレングリコール基を含む混合物であって、典型的に $n \pm 約10\%$ （または1から約25、 ± 3 より小さい整数について）として特定される整数を包含する混合物を表す整数として n を規定する場合、 n は、約1から100の整数（例えば、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または110）とすることができ、かつ開示される混合物は、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および107-113エチレングリコール基などの範囲を包含すると理解されるべきである。併用の用語“約”および“ $\pm 10\%$ ”または“ ± 3 ”は、どこで使用されても同等の範囲のための特異的な裏付けを開示し、および提供すると理解されるべきである。

20

【0044】

“任意の”または“任意に”という用語は、引き続いて記載される事象もしくは状況が起こっても起こらなくてもよいこと、ならびに、当該記載は事象もしくは状況が起こる実例、およびそれが起こらない実例を含むことを意味する。

30

【0045】

特定の標的に特異的に結合するペプチドは、その標的に対する“リガンド”と称される。

【0046】

翻訳後修飾（例えば、リン酸化または糖鎖付加）ならびに／または付加的なポリペプチドを有する複合体形成、ならびに／または核酸および／もしくは炭水化物、または他の分子とのマルチサブユニット複合体への合成に関係なく、“ポリペプチド”は、アミノ酸残基の鎖を指す用語である。従ってプロテオグリカンまたは本明細書でポリペプチドと称される。長いポリペプチド（約50アミノ酸超を有する）は、“タンパク質”と称される。短いポリペプチド（約50アミノ酸以下を有する）は、“ペプチド”と称される。サイズ、アミノ酸組成および三次元構造に依存して、ある特定のポリペプチドは、“抗原結合分子”、“抗体”、“抗体フラグメント”または“リガンド”と称されうる。ポリペプチドは、多くの方法により産生でき、その多くは当該技術分野でよく知られている。例えば、ポリペプチドを、抽出により（例えば、単離細胞から）、ポリペプチドをコードする組換え核酸の発現により、または化学合成により、得ることができる。ポリペプチドは、例えば、組換え技術、およびコードされるポリペプチドの発現のために宿主細胞へ導入される（例えば、形質転換または遺伝子導入により）ポリペプチドをコードする発現ベクターに

40

50

より産生されうる。

【0047】

本明細書で使用される、“薬学的に許容可能な担体”または“薬学的に許容可能な賦形剤”は、任意の、および全ての溶媒、分散媒、被膜、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤等を含む。薬学的に活性な物質のためのかかる媒質および薬剤の使用は、当該技術分野でよく知られている。任意の従来の媒質もしくは薬剤が活性成分と不適合である限りを除いて、治療用組成物におけるその使用が想定される。補助的な活性成分はまた、当該組成物に組み込まれうる。

【0048】

ポリペプチドに関して本明細書で使用される“精製”という用語は、化学合成されており、従って他のポリペプチドにより実質的に汚染されていないポリペプチド、またはほとんどの自然に付随する他の細胞成分（例えば、他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、または細胞成分）から分離され、または単離されているポリペプチドを指す。精製ポリペプチドの例は、乾燥重量で少なくとも70%で、自然に伴うタンパク質および天然に存在する有機物分子からフリーであるポリペプチドである。従って精製ポリペプチドの調製は、例えば、乾燥重量で少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも99%ポリペプチドでありうる。ポリペプチドはまた、精製または標識（例えば、親和性マトリックスへの取り込み、顕微鏡での可視化）を容易にするタグ配列（例えば、ポリヒスチジンタグ、mycタグ、FLAG（登録商標）タグ、または他の親和性タグ）を含有するように設計されうる。従って別段の指示がない限り、ポリペプチドを含む精製組成物は精製ポリペプチドを指す。“単離され”という用語は、本開示のポリペプチドまたは核酸がそれらの自然環境中ではないことを示す。従って本開示の単離産物は、培養上清に含有され、部分的に濃縮され、異種由来から産生され、ベクターにクローニングされ、またはビヒクルを用いて製剤化等されうる。

【0049】

“配列同一性”という用語は、ポリペプチド配列比較に関して使用される。この表現は特に配列同一性の割合を指し、例えばそれぞれの参照ポリペプチドまたはそれぞれの参照ポリヌクレオチドと少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性の割合を指す。問題とするポリペプチドおよび参照ポリペプチドは、特に、一続きの20、30、40、45、50、60、70、80、90、100以上のアミノ酸に渡ってまたは参照ポリペプチドの全長に渡って示される配列同一性を示す。

【0050】

生物学の分野で一般に使用されるように、“特異的な結合”という用語は非標的組織と比較して相対的に高い親和性で標的に結合する分子を指し、例えば静電相互作用、ファンデルワールス相互作用、水素結合等の複数の非共有結合性の相互作用を一般に伴う。特異的な結合の相互作用は、抗体－抗原結合、酵素－基質結合、およびある特定のタンパク質－受容体相互作用を特徴づける；一方で、かかる非標的結合が重要でない程度まで随時、それらの特異的な標的加えて組織に、かかる分子は結合するかも知れない、高親和性結合対はまだ、特異的な結合の定義内に入りうる。

【0051】

“治療（treatment）”または“治療（treating）”という用語は、哺乳類における疾病または障害の任意の治療を意味し：

疾病もしくは障害を予防することもしくは保護すること、すなわち、臨床症状が発症しないようにすること；

疾病もしくは障害を阻害すること、すなわち、臨床症状の発症を抑止もしくは抑制すること；ならびに／または

10

20

30

40

50

疾病もしくは障害を軽減すること、すなわち、臨床症状の退縮を引き起こすことを含む。

【0052】

“望ましくない免疫応答”という用語は、対象の免疫系による反応を指し、それは所定の状況で望ましくない。もしかかる反応が疾病または障害の予防、減少、または治癒につながらず、代わりに障害または疾病を引き起こし、増強または悪化させるならば、当該免疫系の反応は望ましくない。典型的には、もし免疫系の反応が不適当な標的に対して向けられるならば、免疫系の反応は、疾病を引き起こし、増強または悪化させる。例示的に、望ましくない免疫応答は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、ならびにアレルギー性もしくは過敏症を含むが、これらに限定されない。

10

【0053】

“変異体”という用語は、その長さ、配列、または構造における1つ以上の変化により由来されるタンパク質と比較して異なるタンパク質として理解されている。タンパク質変異体が由来するポリペプチドはまた、親ポリペプチドまたはポリヌクレオチドとしてよく知られている。“変異体”という用語は、親分子の“フラグメント”または“誘導体”を含む。典型的には、“フラグメント”は、長さまたはサイズにおいて親分子より小さく、一方で“誘導体”は、親分子と比較してそれらの配列または構造における1つ以上差異を示す。改変分子はまた、例えば翻訳後修飾タンパク質（例えばグリコシル化、リン酸化、ユビキチン化、パルミトイル化、もしくはタンパク分解的切断タンパク質）およびメチル化DNAなどの改変核酸が包含されるが、これらに限定されない。RNA-DNAハイブリッドなどの異なる分子の混合物はまた、“変異体”という用語により包含されるが、限定されない。天然に存在する、および人工的に構築された変異体は、本明細書で使用される“変異体”という用語により包含されると理解されている。さらに、変異体が親分子の少なくとも1つの生物学的活性を示す、すなわち、機能的に活性であるという条件で、本発明において使用可能な変異体はまた、親分子の相同体、オルソログ、もしくはパラログ、または人工的に構築された変異体に由来してもよい。変異体は、それが由来する親ポリペプチドへのある特定の配列同一性の割合により特徴づけられうる。より正確には、本開示の文脈におけるタンパク質変異体は、その親ポリペプチドへの少なくとも80%の配列同一性を示してもよい。好ましくは、タンパク質変異体の配列同一性は一続きの20、30、40、45、50、60、70、80、90、100以上のアミノ酸に渡る。

20

30

【発明を実施するための形態】

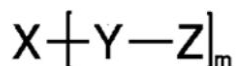
【0054】

組成物

【0055】

本開示の一態様は、式1により表される組成物、医薬品製剤、およびかかる組成物を利用する治療方法に関し：

【化9】



40

式1

ここで：

mは約1から100の整数であり、特に約1から20、およびもっとも特には1から約10であり；

Xは抗原部分、特に外来性抗原、もしくは患者が望ましくない免疫応答を発症する自己抗原、またはかかる抗原部分の免疫寛容誘導部分（例えば、フラグメントまたはエピートープ）であり；

Yはリンカー部分もしくは直接結合、またはXに特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは他のリガンドであり；かつ

50

Zは肝臓標的化部分、特にガラクトシル化部分である。

それぞれの抗原、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドがリンカーまたはガラクトシル化部分が結合されうる部位（主にN末端のアミン、リジン残基およびシステイン残基）の個々の数および密度を有するとされる中で、式1におけるmについての値は、Xの性質に依存するだろう。リジンまたはシステイン残基を加えることにより、かかる部位の限定数を有する抗原は、例えばNまたはC末端で、誘導体化されうる（任意に切断可能なリンカー、特に免疫プロテアソーム切断部位を有するリンカーを介して）。一般に、式1の組成物におけるガラクトシル化の十分な度合を提供することは、肝細胞による取り込みを容易にするために好ましい。本開示の医薬品製剤および方法は、それぞれ異なるX部分（例えば、特定の望ましくない免疫応答に関連するいくつかのエピトープ）を担う式1の組成物の混合物を利用することができる。

10

【0056】

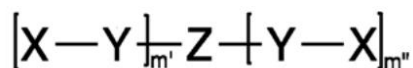
式1の組成物は、反応式に関して下記に記載される式1aから1pにより説明されるように、Xが移植患者が望ましくない免疫応答（例えば、移植拒絶）を発症する外来性の移植抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、アレルギー性または過敏症）を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、過敏症および／または減少治療活性）を発症する外来性の治療薬、または患者が望ましくない免疫応答（例えば、自己免疫疾患）を発症する自己抗原であり；Yが式YaからYpのリンカーであり；かつ／または、Zがガラクトース、ガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンである、亜属を含む。

20

【0057】

本開示はさらに、式2により表される薬学的に許容可能な組成物を提供し：

【化10】



式2

ここで：

30

m'はゼロまたは約1から10の整数であり、m''はゼロまたは約1から10の整数であり、かつm'+m''の総和は約1から10の整数であるが、少なくとも1であり；

Xは抗原部分、特に外来性抗原、もしくは患者が望ましくない免疫応答を発症する自己抗原、またはかかる抗原部分の免疫寛容誘導部分（例えば、フラグメントまたはエピトープ）であり；

Yはリンカー部分もしくは直接結合、またはXに特異的に結合する、抗体、抗体フラグメント、ペプチドもしくは他のリガンドであり；かつ

Zは肝臓標的化部分、特にASGPR標的化抗体、ASGPR標的化抗体フラグメント、ASGPR標的化ペプチド、ASGPR標的化scFv、または別のASGPRリガンドであり、

40

かかる組成物は、任意に単離および精製を容易にするアミノ酸配列〔例えば、配列：HHHHHH（配列番号：1）を有する“Hisタグ”もしくは“6xHis”〕ならびに付加的なリンカー〔例えば、配列：GGGS（配列番号：2）を有する“Gly₃Ser”〕を含む。m'+m''が、1より大きい式2の組成物において、X部分は、同一もしくは異なるものとすることができ、ならびにY部分は、同一もしくは異なるものとすることができる。m'+m''についての値は、Xが完全タンパク質である場合、より小さく（例えば、3以下）、またはXがペプチドである場合、より大きい（約10まで）。リンカー“Y”は切断部位、特に免疫プロテアソーム切断部位を有利に含む。

【0058】

式2の組成物は、Xが移植患者が望ましくない免疫応答（例えば、移植拒絶）を発症す

50

る外来性の移植抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、アレルギー性または過敏症）を発症する外来性の食物、動物、植物もしくは環境の抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、過敏症および／または減少治療活性）を発症する外来性の治療薬、または患者が望ましくない免疫応答（例えば、自己免疫疾患）を発症する自己抗原である、亜属を含む。

【0059】

あるいは、式1および／または式2の組成物において、Xは、循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドとすることができ、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、過敏症および／もしくはアレルギーに原因的に関与する。

10

【0060】

式2の組成物は融合タンパク質として調製でき、かつそれらの調製および精製において有用ないくつかの成分、例えば、特異的な輸送経路へ発現ポリペプチドを導き、かつ引き続いてポリペプチドから切断されるシグナル配列もしくはリーダー配列などを含みうる；従ってシグナル配列は、発現されるタンパク質およびそれをコードするDNAのパーツでありうるが、最終的な組成物の部分ではない。発現系において使用される哺乳類のシグナル配列の一例は、Igκ鎖配列であり、タンパク質分泌を導く：METDTLLLVVLLLVVPGSTG（配列番号：3）である。同様に、発現系において使用される一般的な細菌性のシグナル配列の一例は、pelBシグナル配列であり、発現タンパク質を細菌のペリプラズムへ導く：MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA（配列番号：4）である。

20

【0061】

抗原

【0062】

式1の組成物および／または式2におけるXとして利用される抗原は、タンパク質またはペプチドとすることができ、例えば抗原は、完全なもしくは部分的な治療薬、完全長の移植タンパク質もしくはそのペプチド、完全長の自己抗原もしくはそのペプチド、完全長のアレルゲンもしくはそのペプチド、ならびに／または核酸、または上述の抗原の模倣体であってもよい。

30

【0063】

本開示の実行において利用される抗原は、以下の1つ以上でありうる：

- ・ 抗体フラグメント、ならびに抗体および抗体フラグメントとの融合タンパク質を含む、タンパク質、ペプチド、抗体および抗体様分子である治療薬。これらは、ヒト、非ヒト（マウスなど）および非天然（すなわち、設計された）タンパク質、抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ならびに例えばフィブロネクチン、DARPin、ノッチン等の非抗体結合スキファールドを含む。
- ・ 移植患者が望ましくない免疫応答を発症するヒト同種移植抗原。
- ・ 望ましくない自己免疫応答を引き起こす自己抗原。自己抗原は、自己免疫疾患患者における内在性の起源のものである一方で、本開示の組成物において利用されるポリペプチドは、典型的に外因的に合成される（発生源から精製され、濃縮されることとは対照的に）と当業者は認識するだろう。
- ・ 患者が望ましくない免疫応答を経験する食物、動物、植物および環境の抗原などの外来性抗原。治療用のタンパク質はまた、その外因的起源に起因する外来性抗原と考えらる一方で、本開示の記載を明確にするために、かかる治療剤は別々の群として記載されていると当業者は認識するだろう。同様に、植物または動物抗原は食すことができ、かつ食物抗原と考えられ、かつ環境抗原は植物から由来してもよい。それらは、しかしながら、全て外来性抗原である。簡潔性の観点で、当業者が、特に詳細な説明および実施例に照らして、本開示の組成物において利用されうる抗原を認識できるかかる潜在的に重複する群の全てを区別し、および規定するように記載する試みはなされないだろう。

40

50

抗原は、完全タンパク質、完全タンパク質の部分、ペプチド等とすることができ、かつリンカーおよび／もしくはガラクトシル化部分への付着のために誘導体化でき（上述のように）、変異体とすることができ、および／もしくは特に配列同一性を維持して保存的置換を含有することができ、ならびに／または脱シアル化することができる。

【0064】

抗原が治療用のタンパク質、ペプチド、抗体または抗体様分子である実施形態では、特異的な抗原は以下から選択されうる：アバタセプト、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデノシンデアミナーゼ、アドートラスツズマブエムタンシン、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスロイキン、アルグルセラゼ、アルグルコシダーゼアルファ、 α -1-プロテアーゼ阻害剤、アナキンラ、アニストレプラーゼ（アニソイル化プラスミノージェンストレプトキナーゼ活性化複合体）、アンチトロニン I I I、抗胸腺細胞グロブリン、アルテプラーゼ、ベバシズマブ、ビバリルジン、ボツリヌス毒素A型、ボツリヌス毒素B型、C1エステラーゼ阻害剤、カナキヌマブ、カルボキシペプチダーゼG2（グルカルピダーゼおよびV o r a x a z e）、セルトリズマブ ペゴル、セツキシマブ、コラゲナーゼ、マムシ類（C r o t a l i d a e）免疫F a b、ダルベポエチン α 、デノスマブ、ジゴキシン免疫F a b、ドルナーゼアルファ、エクリズマブ、エタネルセプト、活性化第V I I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X I因子、第X I I I因子、フィブリノーゲン、フィルグラスチム、ガルスルファーゼ、ゴリムマブ、酢酸ヒストレリン、ヒアルロニダーゼ、イデュルスルファーゼ、イミグルセラゼ、インフリキシマブ、インスリン〔組換え体ヒトインスリン（“ r H u インスリン”）およびウシインスリンを含む〕、インターフェロン α 2 a、インターフェロン α 2 b、インターフェロン β 1 a、インターフェロン β 1 b、インターフェロン γ 1 b、イピリムマブ、L-アルギナーゼ、L-アスパラギナーゼ、L-メチオニナーゼ（m e t h i o n a s e）、ラクターゼ、ラロニダーゼ、レピルジン／ヒルジン、メカセルミン、メカセルミンリンファパート、メトキシナタリズマブ、オクトレオチド、オフアツムマブ、オブレルベキン、膵臓アミラーゼ、膵臓リパーゼ、パバイン、P e g -アスパラギナーゼ、P e g -ドキシソルビシン H C I、P E G -エポエチン β 、ペグフィルグラスチム、P e g -インターフェロン α 2 a、P e g -インターフェロン α 2 b、ペグロチカーゼ、ペグビソマント、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（P A L）、プロテインC、ラスブリカーゼ（ウリカーゼ）、サクロシダーゼ、サケカルシトニン、サルグラモスチム、ストレプトキナーゼ、テネクテプラーゼ、テリバラチド、トシリズマブ（アトリズマブ）、トラスツズマブ、1型アルファインターフェロン、ウステキヌマブ、v W因子。治療用のタンパク質は天然の供給源から獲得され（例えば、濃縮され、かつ精製される）、または例えば、組換えにより合成される得、ならびに典型的にはI g G モノクローナルもしくはフラグメントまたは融合物である抗体治療剤を含む。

【0065】

様々な形式のアブシキシマブ、アダリムマブ、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスロイキン、アルグルコシダーゼアルファ、第V I I I因子、第I X因子、インフリキシマブ、インスリン（r H u インスリンを含む）、L-アスパラギナーゼ、ラロニダーゼ、ナタリズマブ、オクトレオチド、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（P A L）、またはラスブリカーゼ（ウリカーゼ）および一般にI g G モノクローナル抗体を、特定の治療用のタンパク質、ペプチド、抗体もしくは抗体様分子を含む。

【0066】

別の特定の群は、止血剤（第V I I I因子および第I X因子）、インスリン（r H u インスリンを含む）、ならびに非ヒト治療ウリカーゼ、P A Lおよびアスパラギナーゼを含む。

【0067】

血液学および移植において望ましくない免疫応答は、自己免疫性再生不良性貧血、移植拒絶（一般に）、および移植片対宿主病（骨髄移植拒絶）を含む。抗原がヒト同種移植抗原である実施形態では、特定の配列は：様々なM H CクラスIおよびM H CクラスI Iハ

プロタイプタンパク質（例えば、組織の交差適合試験において同定されるドナー／レシピエント差異）のサブユニットならびにRhCE、Kell、Kidd、DuffyおよびSsを含む少数の血液型抗原上の単一アミノ酸多型から選択されうる。かかる組成物は、所定のドナー／レシピエントの対のために個々に調製されうる。

【0068】

抗原が自己抗原である実施形態では、特異的な抗原（およびそれらが関連する自己免疫疾患）は以下から選択されうる：

- ・ 1型糖尿病において、いくつかの主要な抗原は：インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65（GAD-65またはグルタミン酸デカルボキシラーゼ2）、GAD-67、グルコース-6-ホスファターゼ2（IGRPまたは膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質）、インスリノーマー関連タンパク質2（IA-2）、およびインスリノーマー関連タンパク質2（IA-2）と同定されており；他の抗原は、ICA69、ICA12（SOX-13）、カルボキシペプチダーゼH、Imogen38、GLIMA38、クロモグラニンA、HSP-60、カルボキシペプチダーゼE、ペリフェリン、2型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓／膵臓の関連タンパク質、S100β、グリアル線維性酸性タンパク質、再生遺伝子II、膵臓十二指腸ホメオボックス1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット-関連タンパク質、およびSST Gタンパク質共役型受容体1-5を含む。インスリンは自己抗原および治療用のタンパク質抗原の両方として特徴づけられうる抗原の一例であることに留意すべきである。例えば、rHu インスリンおよびウシインスリンは治療用のタンパク質抗原（望ましくない免疫攻撃の対象である）であり、一方で内在性ヒトインスリンは自己抗原（望ましくない免疫攻撃の対象である）である。内在性ヒトインスリンは、医薬組成物において利用されるためには入手可能ではないので、組換え型が本開示の組成物において利用される。

- ・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含むヒトインスリンは、以下の配列（UNIPROT P01308）を有する：

```

MALWMRLRLPL LALLALWGPDPAAAFVNQHLLCGSHLVE
ALYLVCGERGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPG
AGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSI CSLYQLENYCN
（配列番号：5）。

```

- ・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含むGAD-65は、以下の配列（UNIPROT Q05329）を有する：

```

MASPGSGFWSFGSEDSGSDSENPGTARAWCQVAQKFT
GGIGNKLCALLYGDAEKPAESGGSQPPRAAARKAAC
ACDQKPCSCSKVDVNAYFLHATDLLPACDGERPTLAF
LQDVMNILLQYVVKSFDRSTKVIDFHYPNE LLQEYN
WELA DQPQNLEEILMHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QL
STGLDMVG LAADWLTSTA NTNMFITYEIA PVFVLLLEYV
T LKKMREIIGWPGGSGDGI FSPGGAISNMYA MMIAR
FKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH SHFSLKKGAA A
LGIGTDSVI LIKCDERGMKIPSDLERRIL EAKQKGFV
PFLVSATAGTTV YGAFDPL LAVADICKKYKI W MHVD
AAWGGG LLSMRKHKKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV
PLQCSALLVR EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSY
DTG DKALQCGRHV DVFKLWLMWR AKGTTGF EAH VDK
CLELA EY LYNIIKNREG YEMVFDGK PQ HTNVC FWYIP
PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA PVIKARMM EY GTTMVS
YQPL GDKVNF FRMV ISNPAATHQD IDFLIEEIER LG
QDL（配列番号：6）。

```

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含む I G R P は、以下の配列 (U N I P R O T Q N 9 Q R 9) を有する：

M D F L H R N G V L I I Q H L Q K D Y R A Y Y T F L N F M S N V G D P R N I F F
I Y F P L C F Q F N Q T V G T K M I W V A V I G D W L N L I F K W I L F G H R P
Y W W V Q E T Q I Y P N H S S P C L E Q F P T T C E T G P G S P S G H A M G A S
C V W Y V M V T A A L S H T V C G M D K F S I T L H R L T W S F L W S V F W L I
Q I S V C I S R V F I A T H F P H Q V I L G V I G G M L V A E A F E H T P G I Q
T A S L G T Y L K T N L F L F L F A V G F Y L L R V L N I D L L W S V P I A K
K W C A N P D W I H I D T T P F A G L V R N L G V L F G L G F A I N S E M F L L
S C R G G N N Y T L S F R L L C A L T S L T I L Q L Y H F L Q I P T H E E H L F
Y V L S F C K S A S I P L T V V A F I P Y S V H M L M K Q S G K K S Q (配列番号
： 7) 。

10

・ 橋本甲状腺炎およびグレーブス病を含む甲状腺の自己免疫疾患において、主要な抗原は、チログロブリン (T G)、甲状腺ペルオキシダーゼ (T P O) および甲状腺刺激ホルモン受容体 (T S H R) を含み；他の抗原は、ナトリウムヨウ素共輸送体 (N I S) およびメガリンを含む。甲状腺関連眼疾患および皮膚症において、T S H R を含む甲状腺自己抗原に加えて、抗原はインスリン様成長因子 1 受容体である。副甲状腺機能低下症において、主要な抗原はカルシウム感受性受容体である。

・ アジソン病において、主要な抗原は、2 1-ヒドロキシラーゼ、1 7-ヒドロキシラーゼ、および P 4 5 0 側鎖切断酵素 (P 4 5 0 s c c) を含み；他の抗原は、A C T H 受容体、P 4 5 0 c 2 1 および P 4 5 0 c 1 7 を含む。

20

・ 早期卵巣機能不全において、主要な抗原は、F S H 受容体および-エノラーゼを含む。

・ 自己免疫性下垂体炎または下垂体自己免疫疾患において、主要な抗原は、下垂体特異的タンパク質因子 (P G S F) 1 a および 2 を含み；別の抗原は、2 型ヨードチロニンデヨージナーゼを含む。

・ 多発性硬化症において、主要な抗原は、ミエリン塩基性タンパク質 ("M B P")、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 ("M O G") およびミエリンプロテオリピドタンパク質 ("P L P") を含む。

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含む M B P は、以下の配列 (U N I P R O T P 0 2 6 8 6) を有する：

30

M G N H A G K R E L N A E K A S T N S E T N R G E S E K K R N L G E L S R T T S
E D N E V F G E A D A N Q N N G T S S Q D T A V T D S K R T A D P K N A W Q D A
H P A D P G S R P H L I R L F S R D A P G R E D N T F K D R P S E S D E L Q T I
Q E D S A A T S E S L D V M A S Q K R P S Q R H G S K Y L A T A S T M D H A R H
G F L P R H R D T G I L D S I G R F F G G D R G A P K R G S G K D S H H P A R T
A H Y G S L P Q K S H G R T Q D E N P V V H F F K N I V T P R T P P P S Q G K G
R G L S L S R F S W G A E G Q R P G F G Y G G R A S D Y K S A H K G F K G V D A
Q G T L S K I F K L G G R D S R S G S P M A R R (配列番号： 8) 。

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含む M O G は、以下の配列 (U N I P R O T Q 1 6 6 5 3) を有する：

40

M A S L S R P S L P S C L C S F L L L L L L Q V S S S Y A G Q F R V I G P R H P
I R A L V G D E V E L P C R I S P G K N A T G M E V G W Y R P P F S R V V H L Y
R N G K D Q D G D Q A P E Y R G R T E L L K D A I G E G K V T L R I R N V R F S
D E G G F T C F F R D H S Y Q E E A A M E L K V E D P F Y W V S P G V L V L L A
V L P V L L L Q I T V G L I F L C L Q Y R L R G K L R A E I E N L H R T F D P H
F L R V P C W K I T L F V I V P V L G P L V A L I I C Y N W L H R R L A G Q F L
E E L R N P F (配列番号： 9) 。

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含む P L P は、以下の配列 (U N I P R O T P 6 0 2 0 1) を有する：

50

M G L L E C C A R C L V G A P F A S L V A T G L C F F G V A L F C G C G H E A L
T G T E K L I E T Y F S K N Y Q D Y E Y L I N V I H A F Q Y V I Y G T A S F F F
L Y G A L L L A E G F Y T T G A V R Q I F G D Y K T T I C G K G L S A T V T G G
Q K G R G S R G Q H Q A H S L E R V C H C L G K W L G H P D K F V G I T Y A L T
V V W L L V F A C S A V P V Y I Y F N T W T T C Q S I A F P S K T S A S I G S L
C A D A R M Y G V L P W N A F P G K V C G S N L L S I C K T A E F Q M T F H L F
I A A F V G A A A T L V S L L T F M I A A T Y N F A V L K L M G R G T K F (配列
番号：10)。

・ 多発性硬化症を治療するための本開示の組成物において有用なペプチド／エピ
トープは、式1の組成物において個々に、式1の組成物の混合物においてともに、または
1つ以上の式2の組成物において融合される、いくつかの、または全ての以下の配列を含
む：

・ M B P 1 3 - 3 2 : K Y L A T A S T M D H A R H G F L P R H (配列番号：
11)；

・ M B P 8 3 - 9 9 : E N P W H F F K N I V T P R T P (配列番号：12)；

・ M B P 1 1 1 - 1 2 9 : L S R F S W G A E G Q R P G F G Y G G (配列番号：
13)；

・ M B P 1 4 6 - 1 7 0 : A Q G T L S K I F K L G G R D S R S G S P M A R
R (配列番号：14)；

・ M O G 1 - 2 0 : G Q F R V I G P R H P I R A L V G D E V (配列番号：1
5)；

・ M O G 3 5 - 5 5 : M E V G W Y R P P F S R W H L Y R N G K (配列番号：
16)；および

・ P L P 1 3 9 - 1 5 4 : H C L G K W L G H P D K F V G I (配列番号：17
)。

・ 関節リウマチにおいて、主要な抗原は、コラーゲンII、免疫グロブリン結合
タンパク質、免疫グロブリンGのフラグメント結晶化領域、二本鎖DNA、ならびに関節
リウマチの病態において関与されるタンパク質の自然なおよびシトルリン化形態を含み、
フィブリン／フィブリノーゲン、ビメンチン、コラーゲンIおよびII、ならびにアルフ
ァーエノラーゼを含む。

・ 自己免疫性胃炎において、主要な抗原は、H⁺、K⁺-ATPaseである。

・ 悪性貧血において、主要な抗原は、内因子である。

・ セリアック病において、主要な抗原は、組織トランスグルタミナーゼならびに
、自然なおよび脱アミドされるグルテンまたはアルファ、ガンマー、およびオメガグ
リアジン、グルテニン、ホルデイン、セカリン、ならびにアベニンなどのグルテン様
タンパク質の形態である。例えば、セリアック病の主要な抗原は、アルファグリアジンであ
ると同時に、アルファグリアジンは、組織グルタミナーゼが、アルファグリアジンのグル
タミンをグルタミン酸に変換することによる脱アミドを通じて、体において、より免疫原
性になると当業者は認識するだろう。従って、アルファグリアジンが最初の外来性食物
抗原であると同時に、一度体において改変されてより免疫原性になると、それは自己抗原
として特徴づけられうる。

・ 白斑において、主要な抗原は、チロシナーゼ、ならびにチロシナーゼ関連タン
パク質1および2である。

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含むMART1、T細胞
1により認識されるメラノーマ抗原、メラニンAは、以下の配列(UNIPROT Q1
6655)を有する：

M P R E D A H F I Y G Y P K K G H G H S Y T T A E E A A G I G I L T V I L G V L
L L I G C W Y C R R R N G Y R A L M D K S L H V G T Q C A L T R R C P Q E G F D
H R D S K V S L Q E K N C E P V V P N A P P A Y E K L S A E Q S P P P Y S P (配
列番号：18)。

10

20

30

40

50

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含むチロシナーゼは、以下の配列（UNIPROT P14679）を有する：

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSSKNLMEKECCPPWS
GDRSPCGQLSGRGSCQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESW
PSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCTERRLLVR
RNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMK
NGSTPMFNDINIIYDLFVWMHYVVSMDALLGGSEIWRDIDF
AHEAPAFLLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRD
AEKCDICTDEYMGGQHPTNPNLLSPASSFFSSWQIVCSRLE
EYN SHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPLRPSSADVEF
CLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFASPLTG I ADASQS
SMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLHHA FVDSIFEQW
LRRHRPLQEVYPEANAPIGHNRESYMPVPIPLYRNGDFFI
SSKDLGYDYSYLQDSDPD S FQDYIKSYLEQASRIWSWLLG
AAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKKQLPEEKQPLLMEKED
YHSLYQSHL（配列番号：19）。

10

・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含むメラニン形成細胞タンパク質PMEL、gp100は、以下の配列（UNIPROT P40967）を有する：

MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPARNQDWLGVSRQLR
TKAWNRQLYPEWTEAQRLLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGA
NASFSIALNFPGSQKVL PDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQP
VYPQETDDACIFPDGGPCPSGSSWSQKRSFVYVWKTWGQYW
QVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSYVPL
AHSSSAFTITDQVPFSVSVS QLRALDGGNKHFLRNQPLTF
ALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDS SGT LISRALVVTHTY
LEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSSPVPGTTDGHRTAEAP
NTTAGQVPPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTTSVQVPPTTEVIS
TAPVQMPTAEESTGMTPEKVPVSEVMGTTTLAEMSTPEATGM
TPAEVSVIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELP I PEPEGPD
ASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRY
GSF SVTLDIVQGIESA EILQAVPSGEGDAFELTVSCQGG
PKEACMEISSPGCQPPAQRLLCQPVLPSPACQLVLHQILKG
GSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIV
GILLVLMVVLASLIYRRRLMKQDFSV PQLPHSSSHWLRL
PRIFCSCPIGENSPLL S GQQV（配列番号：20）。

20

30

・ 重症筋無力症において、主要な抗原はアセチルコリン受容体である。

・ 尋常性天疱瘡およびバリエント型において、主要な抗原はデスモグレイン3、1および4であり；他の抗原は、ペンファキシン（p em p h a x i n）、デスモコリン、プラコグロビン、ペルプラキン（p e r p l a k i n）、デスモブラキン、およびアセチルコリン受容体を含む。

40

・ 水疱性類天疱瘡において、主要な抗原は、BP180およびBP230を含み；他の抗原は、プレクチンおよびラミニン5を含む。

・ ジューリング疱疹状皮膚炎において、主要な抗原は、筋内膜および組織トランスグルタミナーゼを含む。

・ 後天性表皮水疱症において、主要な抗原は、コラーゲンVIIである。

・ 全身性硬化症において、主要な抗原は、マトリックスメタロプロテイナーゼ1および3、コラーゲン—特異的分子シャペロン熱ショックタンパク質47、フィブリリン—1、ならびにPDGF受容体を含み；他の抗原は、Sc1—70、U1 RNP、Th/T0、Ku、Jo1、NAG—2、セントロメアタンパク質、トポイソメラーゼI、核

50

小体タンパク質、RNAポリメラーゼ I、II および III、PM-Slc、フィブリリン、ならびに B23 を含む。

- ・ 混合性結合組織病において、主要な抗原は UlsnRNP である。
- ・ シェーグレン症候群において、主要な抗原は核抗原 SS-A および SS-B であり；他の抗原は、フォドリン、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼおよびトポイソメラーゼ、ムスカリン受容体、ならびに Fc- γ 受容体 IIIb を含む。
- ・ 全身性エリテマトーデスにおいて、主要な抗原は、“スミス抗原”、SS-A、ハイモビリティ・グループ・ボックス 1（HMGB1）、ヌクレオソーム、ヒストンタンパク質および二本鎖 DNA を含む核タンパク質（これらに対して、疾病過程において自己抗体が作製される）を含む。

- ・ グッドパスチャー症候群において、主要な抗原は、コラーゲン IV を含む糸球体基底膜タンパク質を含む。

- ・ リウマチ性心疾患において、主要な抗原は、心筋ミオシンである。
- ・ 多腺性自己免疫症候群 1 型において、抗原は、芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ、ヒスチジンデカルボキシラーゼ、システインスルフィン酸デカルボキシラーゼ、トリプトファンヒドロキシラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、肝臓 P450 チトクローム P450 1A2 もしくは 2A6、SOX-9、SOX-10、カルシウム感知受容体タンパク質、ならびに 1 型インターフェロンのインターフェロンアルファ、ベータおよびオメガを含む。

- ・ 視神経脊髄炎において、主要な抗原は、AQP4 である。
- ・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含むアクアポリン 4 は、以下の配列（UNIPROT P55087）を有する：

```
MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTA
EFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMLVLSLCFGLS
IATMVQCFGHI SGGHINPAVTVMVC TRKISIAKSVFYIA
AQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHGL
LVELIITFQLVFTIFASCD SKRTDVTGSI ALAIGFSSVAIG
HLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGPIIG
AVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEV
EDNRSQVETDDLILKPGVVHV IDVDRGEEKKGKDQSGEVL
SSV（配列番号：21）。
```

- ・ ぶどう膜炎において、主要な抗原は、網膜 S-抗原または“S-アレスチン”および光受容体間レチノイド結合タンパク（IRBP）またはレチノール結合タンパク質 3 を含む。

- ・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含む S-アレスチンは、以下の配列（UNIPROT P10523）を有する：

```
MAASGKTSKS EPNHVIFFKKI SRDKSVTIYL GNRDYID
HVS QVQPVDGVVL VDPDLVKGKK VYVTLTCAFR YGQ
EDIDVIG LTFRRDLYFS RVQVYPPVGA ASTPTKLQES
LLKKLGSNTY PFLLTFPDYL PCSVMLQPAP QDSGKS
CGVD FEVKAFATDS TDAEEDKIPK KSSVRL LIRK VQ
HAPLEMGP QPRAEAAWQF FM SDKPLHLA VSLNKEIYF
H GEP I PVTVTV TNNT EKT VKK I KAFVEQVAN VVLYS
SDYYV KPVAMEEAQE KVP PNSTLTK TLTLLPLL AN N
RERRGIALD GKIKHEDTNL ASSTIIKEGI DRTVLGIL
VS YQIKVKLTVS GFLGELTSSE VATEVPFRLM HPQP
EDPAKE SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAE EGKRDK
NDVDE（配列番号：22）。
```

- ・ 本開示の組成物において有用な外因的に得られる形態を含む IRBP は、以下の配列（UNIPROT P10745）を有する：

MMREWVLLMSVLLCGLAGPTHLFQPSLVLDMAKVLLLDNYC
 FPENLLGMQEA IQQA IKSHE ILS ISDPQTLASVLTAGVQS
 SLNDPRLV I SYEPSTPEPPPQVPALTSLSSEEEL LAWLQRG
 LRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLM
 GTSALVLDLRHCTGGQVSGIPYI ISYLHPGNTILHVDTIY
 NRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDVVLTSSSQTRGVAE
 DIAHILKQMRRAI VVGERTGGGALDLRKLRIGESDFFFTV
 PVSRS LGLGGGSQTWEGSGVLP CVGT PAEQALEKALAIL
 TLRSA L PGV VHCLQEVLKDY YTLVDRVPTLLQHLASMDFS
 TVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSWPA 10
 PDAAAEDSPGVAPELPEDEAIRQALVDSVFQVSVLPGNVG
 YLRFDSFADASV LGVLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRH
 NPGGPSSSAVPLLLSYFQGPEAGPVHLFTTYDRRTNITQEH
 FSHMELPGPRYSTQRGVYLLTSHRTATAAEFEAFMLMQSLG
 WATLVGEITAGNLLHTRTVPLLDTPEGSLALTVPVLT FID
 NHGEAWLGGGVVPDAIVLAE EALDKAQEVLEFHQSLGALV
 EGTGHLLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGA YRTAVDLE
 SLASQLTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPPAV
 PSPEELTYLIEALFKTEVLP GQLGYLRFDAMAELETVKAV
 GPQLVRLVWQQQLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIPLLCSYF 20
 FEAEP RQHLYSVFDRA TSKVTEVWTL PQVAGQRYGSHKDL
 YILMSHTSGSAAEAFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALS VG
 IYQVGSSPLYASMP TQMAMSATTGKA WDLAGVEPDITVPM
 SEAL SIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAK
 MATKLSGLQSRYSRV TSEVALAEILGADLQMLS G DPHLKA
 AHIPENAKDRIPGIVPMQIPSP EVFEELIKFSFHTNVLED
 NIGYLRFD MF GDGELLTQVSRLLVEHIWKKIMHTDAMIID
 MRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPVLLDKIYSRPDDSVS
 ELWTHAQVVGERYGSKKSMVILTSSSVTAGTAE EFTYIMKR
 LGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLT IPTARSVGA 30
 SDGSSWEGVGVT PHVVVPAEEALARA KEMLQHNQLRVKRS
 PGLQDHL (配列番号：23)。

【0069】

抗原が、望ましくない免疫応答が発症しうる、食物抗原などの外来性抗原である実施形態では、特異的な抗原は、以下でありうる：

- ・ ピーナッツ由来のもの：コンアラキン (Ara h 1)、アレルゲン I I (Ara h 2)、ピーナッツアグルチニン、コングルチン (Ara h 6)；
- ・ コンアラキンは、例えばUNIPROT Q6PSU6として同定される配列を有する
- ・ リンゴ由来のもの：31kdaの主要アレルゲン／疾病寛容タンパク質相同体 (Mal d 2)、脂質転移タンパク質前駆物質 (Mal d 3)、主要アレルゲン Mal d 1.03D (Mal d 1)；
- ・ 乳由来のもの：α-ラクトアルブミン (ALA)、ラクトトランスフェリン；
- ・ キウイ由来のもの：アクチニジン (Act c 1、Act d 1)、フィトシスタチン、タウマチン様タンパク質 (Act d 2)、キウエリン (Act d 5)；
- ・ 卵白由来のもの：オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、およびリゾチーム；
- ・ 卵黄由来のもの：リベチン、アポビチリン (apovitillin)、およびボスベチン (vosvetin)；
- ・ カラシナ由来のもの：2S アルブミン (Sin a 1)、11S グロブ 50

リン (S i n a 2)、脂質転移タンパク質 (S i n a 3)、プロフィリン (S i n a 4) ;

- ・ セロリ由来のもの : プロフィリン (A p i g 4)、高分子量糖タンパク質 (A p i g 5) ;

- ・ エビ由来のもの : P e n a 1 アレルゲン (P e n a 1)、アレルゲン P e n m 2 (P e n m 2)、トロポミオシン速筋型アイソフォーム ;

- ・ コムギおよび／または他の穀物由来のもの : 高分子量グルテニン、低分子量グルテニン、アルファー、ガンマーおよびオメガーグリアジン、ホルデイン、セカリンおよび／またはアベニン ;

- ・ セリアック病を治療するための本開示の組成物において有用なペプチド／エプトープは、式 1 の組成物において個々に、式 1 の組成物の混合物においてともに、または 1 つ以上の式 2 の組成物において融合される、いくつかの、または全ての以下の配列を含む :

- ・ D Q - 2 関連、天然型 (n a t i v e) アルファーグリアジン “ 3 3 - m e r ” :

L Q L Q P F P Q P Q L P Y P Q P Q L P Y P Q P Q L P Y P Q P Q P F (配列番号 : 2 4)

- ・ D Q - 2 関連、脱アミド化アルファーグリアジン “ 3 3 - m e r ” :

L Q L Q P F P Q P E L P Y P Q P E L P Y P Q P E L P Y P Q P Q P F (配列番号 : 2 5)

- ・ D Q - 8 関連、アルファーグリアジン :

Q Q Y P S G Q G S F Q P S Q Q N P Q (配列番号 : 2 6)

- ・ D Q - 8 関連、オメガーグリアジン (コムギ、U 5 U A 4 6) :

Q P F P Q P E Q P F P W (配列番号 : 2 7)

- ・ イチゴ由来のもの : 主要イチゴアレルギー F r a a 1 - E (F r a a 1) ; および

- ・ バナナ由来のもの : プロフィリン (M u s x p 1) 。

【 0 0 7 0 】

抗原が、望ましくない免疫応答が発症する、動物、植物および環境の抗原などの外来性抗原である実施形態では、特異的な抗原は例えば、以下の由来のタンパク質またはペプチドを含むネコ、マウス、イヌ、ウマ、ハチ、ホコリ、樹木およびセイタカアワダチソウでありうる :

- ・ クサ (w e e d) (ブタクサアレルゲン a m b a 1、2、3、5、および 6、ならびに A m b t 5 ; アカザ (p i g w e e d) C h e a 2 および 5 ; ならびに他のクサアレルゲン P a r j 1、2、および 3、ならびに P a r o 1 を含む) ;

- ・ クサ (g r a s s) (主要アレルゲン C y n d 1、7、および 1 2 ; D a c g 1、2、および 5 ; H o l I 1. 0 1 2 0 3 ; L o l p 1、2、3、5、および 1 1 ; M e r 1 ; P h a 1 ; P o a p 1 および 5 を含む) ;

- ・ ブタクサおよび他のクサ由来の花粉 (ナガバギシギシ (c u r l y d o c k)、シロザ (l a m b s q u a r t e r s)、アカザ、オオバコ、ヒメスイバ、およびヤマヨモギを含む)、クサ (g r a s s) (バミューダグラス、ジョンソングラス、ケンタッキーグラス、オーチャードグラス、ハルガヤ、およびオオアワガエリを含む)、および樹木 (キササゲ、ニレ、ヒッコリー、オリーブ、ペカン、アメリカスズカケノキ、およびクルミを含む) ;

- ・ ホコリ (ヤケヒョウヒダニ種由来の、例えば D e r p 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 4、1 5、1 8、2 0、2 1、および 2 3 ; コナヒョウヒダニ種由来の、例えば D e r f 1、2、3、6、7、1 0、1 1、1 3、1 4、1 5、1 6、1 8、2 2、および 2 4 ; 熱帯タマニクダニ種由来の、例えば B l o t 1、2、3、4、5、6、1 0、1 1、1 2、1 3、1 9、および 2 1 の主要アレルゲン

10

20

30

40

50

を含み；さらに、シワチリダニ (*Euroglyphus maynei*) 由来のアレルゲン Eur m 2、ケナガコダニ由来のアレルゲン Tyr p 13、ならびにアレルゲン Bla g 1、2、および4；ゴキブリ由来の Per a 1、3、および7を含む)；

- ・ ペット（ネコ、イヌ、げっ歯類、および家畜を含み；主要ネコアレルゲンは、Fel d 1から8、ネコ Ig A、BLa g 2、およびネコアルブミンを含み；主要イヌアレルゲンは、Can f 1から6、およびイヌアルブミンを含む）；

- ・ 主要アレルゲン Api m 1から12を含む、ハチの針；ならびに

- ・ アスペルギルス属およびペニシリウム属の種、並びにアルテルナリア・アルテルナータ (*Alternaria alternata*)、ダビディエラ・タシアナ (*Davidiella tassiana*)、および紅色白癬菌種由来のアレルゲンを含む、真菌。

【0071】

当業者によって理解されるように、患者を試験して、望ましくない免疫応答を発症したことがある抗原を同定することができ、かつタンパク質、ペプチド等を当該抗原に基づいて開発でき、本開示の組成物におけるXとして組み込むことができる。

【0072】

シアル化抗原、抗体、抗体フラグメント

【0073】

以下は、糖鎖付加が特異的にASGPRを標的とするようにしておくために除去されうるシアル化を有する抗原、抗体、抗体フラグメントの例である：卵胞刺激ホルモン (FSH)、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG)、黄体形成ホルモン (LH)、オステオポンチン、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ (FABRAZYME (登録商標)；ジェンザイム)、エポエチンアルファおよびエポエチンベータ、フォリトロピンアルファ (GONAL-F (登録商標)；メルク/セローノ) およびフォリトロピンベータ (FOLLISTIM (登録商標)；シェリング・ブラウ)、インスリン成長因子結合タンパク質6 (IGFBP-6)、ルトロピンアルファ (LUVERIS (登録商標)；メルク/セローノ)、トランスフォーミング増殖因子 β 1、アンチトロンビン (ATryn (登録商標) / TROMBATE-III (登録商標)；ジェンザイム/タレクリス・バイオセラピューティクス)、甲状腺刺激ホルモンアルファ (THYROGEN (登録商標)；ジェンザイム)、レノグラスチム、サルグラモスチム (LEUKINE (登録商標)；ジェンザイム)、インターロイキン-3、プロウロキナーゼ、リンホトキシン、C1-エステラーゼ阻害剤 (Berinert (登録商標)；CSL)、IgG-様抗体、インターフェロンベータ、活性化凝固第VII因子 (NOVO SEVEN (登録商標)；ノボ・ノルディスク)、活性化凝固第VII因子 (モロクトコグアルファ)、活性化凝固第IX因子 (ノナコグアルファ) (BENEFIX (登録商標)；ワイス)、ならびにp55腫瘍壊死受容体融合タンパク質。(Byrne et al., Drug Discovery Today, Vol 12, No. 7/8, pages 319-326, Apr. 2007 and Sola et al., BioDrugs. 2010; 24 (1): 9-21を参照されたい)。以前に高グリコシル化され、かつ肝細胞-ASGPR標的化のために脱シアル化されうる薬学的に関連するタンパク質は：インターフェロンアルファおよびガンマ、黄体形成ホルモン、Fv抗体フラグメント、アスパラギナーゼ、コリンエステラーゼ、ダルベポエチンアルファ (Aranesp (登録商標)；アムジェン)、トロンボポエチン、レプチン、FSH、IFN- α 2、血清アルブミン、およびコリフォリトロピンアルファを含む。

【0074】

細菌または酵母において産生されるタンパク質 (アルギナーゼ、いくつかのインスリン、およびウリカーゼなど) を含む、シアル酸で正常に終わらないグリカンを含むタンパク質は、脱シアル化の影響を受けないだろう。

【0075】

10

20

30

40

50

公的に入手可能な U N I P R O T などの参照は、全てではないがほとんどの目的の抗原、抗体、抗体フラグメントおよびリガンド上での脱シアル化のための部位の、存在および位置を開示すると当業者は認識するだろう。

【0076】

抗体およびペプチドリガンド

【0077】

抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを利用する実施形態では、かかる部分は、標的とされる循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合するために選択され、かつ循環している標的とされる部分の肝臓の取り込みをもたらし、おそらく標的化部分を有する付加物として、究極的に、循環している標的とされる部分のクリアランスおよび不活性化をもたらす。例えば、肝臓標的化第 V I I I 因子は、循環第 V I I I 因子抗体に結合し、かつクリアランスするだろう。当業者は、かかる部分の同定のための手順を熟知しているだろう。

10

【0078】

リンカー

【0079】

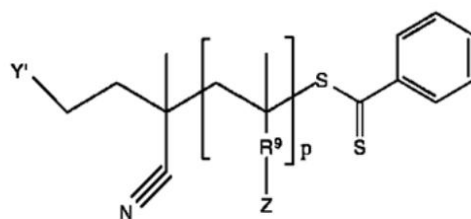
本開示の組成物において利用されるリンカー（式 1 における “ Y ”）は、N-ヒドロキシスクシンイミジルリンカー、マレイミドリリンカー、ビニルスルホンリンカー、ピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）リンカー、ピリジルジチオールリンカー、n-ニトロフェニルカーボネートリンカー、NH S-エステルリンカー、ニトロフェノキシポリ（エチレングリコール）エステルリンカー等を含みうる。

20

【0080】

リンカーの 1 つの特定の基は下記の式 Y ' - C M P（ここで、Y ' は、リンカーの残存部分を示し、かつ R ⁹ および Z は規定されているとおりである）。より特には、式 Y ' - C M P を含むリンカーの基において、R ⁹ 置換基は、エチルアセトアミド基、ならびにさらにより特には、N-アセチルガラクトサミンの C 1 とコンジュゲートされたエチルアセトアミドである。

【化 1 1】



式 Y'-CMP

30

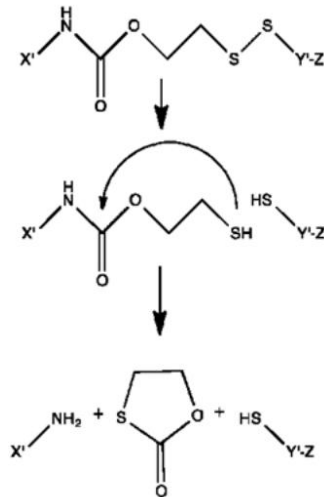
【0081】

ジチオールを含有するリンカー、とりわけ特には、ジスルファニルエチルカルバミン酸を含有するリンカー（X の遊離アミンを含む名称、そうでなければ X の遊離アミンを含まない “ジスルファニルエチルエステル” と命名される）は、例えば下記に説明されるように（ここで、Y ' は、リンカーの残存部分を示し、かつ X ' および Z は規定されているとおりである）、いったん細胞の内側に入るとその最初の形態において抗原を切断し、かつ解放する能力を有するので、本開示の組成物において特に有利である。

40

【0082】

【化 1 2】



10

【0083】

特に式 Y a から式 Y p において下記に説明されるリンカーに関して：

左の括弧 “ (” は、X および Y 間の結合を示し；

右または下の括弧 “) ” は、Y および Z 間の結合を示し；

n は、約 1 から 100、特に約 8 から 90（例えば、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 または 95）、より特には、約 40 から 80（例えば、39、40、43、45、46、48、50、52、53、55、57、60、62、65、66、68、70、73、75、78、80 または 81）のエチレングリコール基を含む混合物を表す整数であり、ここで、混合物は典型的に、 $n \pm 10\%$ として特定される整数を包含し；

20

p は、約 2 から 150、特に約 20 から 100（例えば、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 または 105）およびより特には、約 30 から 40（例えば、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 または 44）を含む混合物を表す整数であり、ここで、混合物は典型的に、 $p \pm 10\%$ として特定される整数を包含し；

30

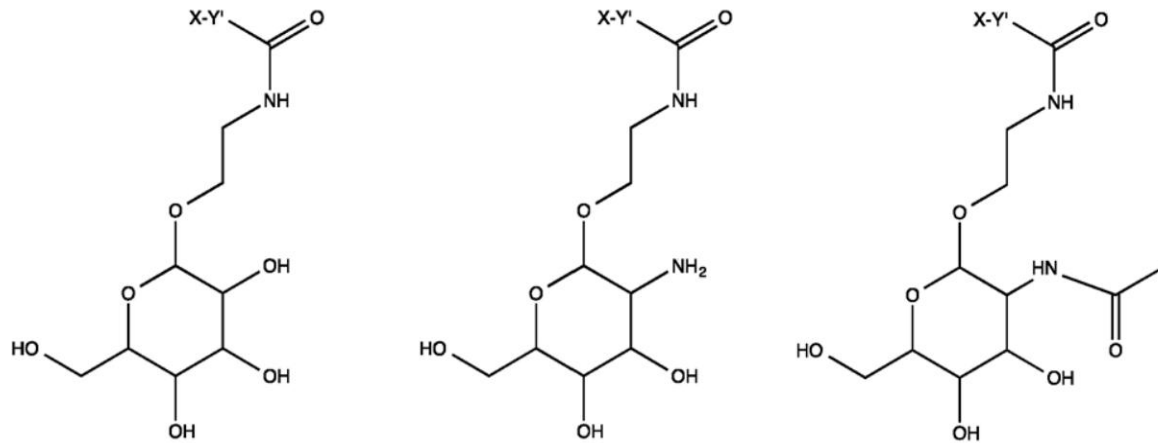
q は、約 1 から 44、特に約 3 から 20（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 または 22）およびより特には、約 4 から 12（例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12 または 13）を含む混合物を表す整数であり、ここで、混合物は典型的に、 $q \pm 10\%$ として特定される整数を包含し；かつ

R⁸ は、 $-\text{CH}_2-$ （“メチル”）または $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ （“1-シアノ-1-メチルプロピル”または“CMP”）である。

式 1 の以下の構造：

40

【化 1 3】



10

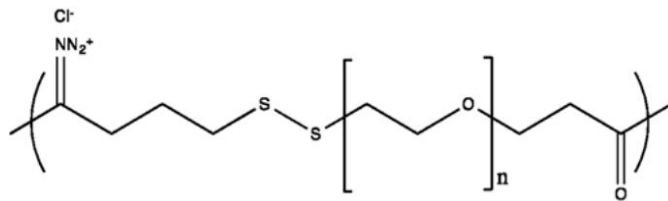
において説明されるように、 R^9 は、直接結合または $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$ (エチルアセトアミド基または“EtAcN”)、(ここで、EtAcN 基が示され、かつリンカーの残りは、 Y' と称される) であり：

かつ Z は $C1$ でコンジュゲートされたガラクトース、ガラクトサミンまたは N -アセチルガラクトサミンである。

【0084】

【化 1 4】

20

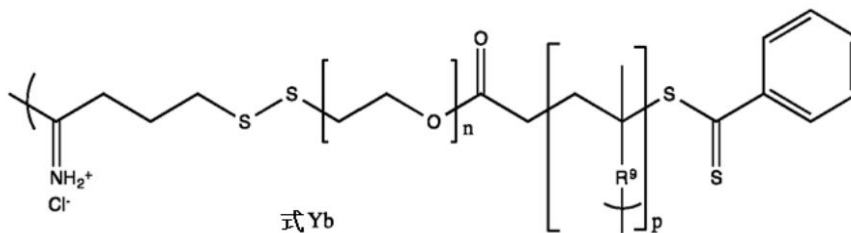


式 Ya

【0085】

【化 1 5】

30

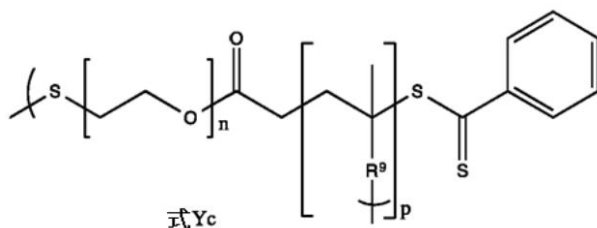


式 Yb

【0086】

【化 1 6】

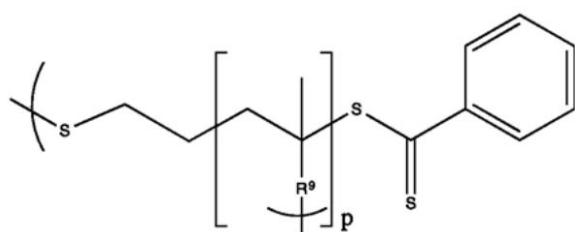
40



式 Yc

【0087】

【化 1 7】

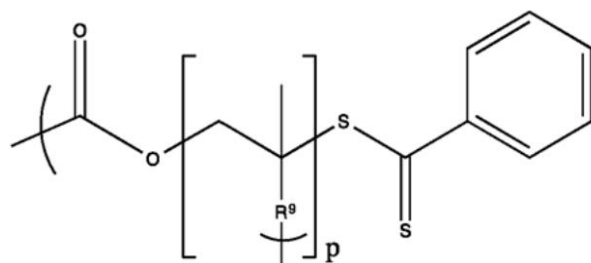


式Yd

【 0 0 8 8】

10

【化 1 8】

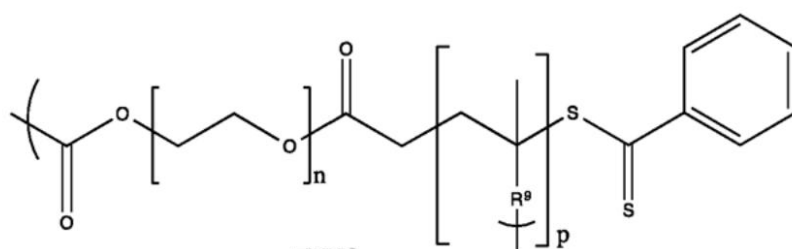


式Ye

20

【 0 0 8 9】

【化 1 9】

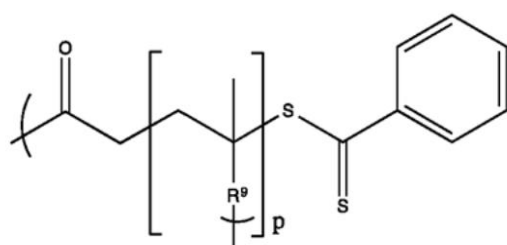


式Yf

30

【 0 0 9 0】

【化 2 0】

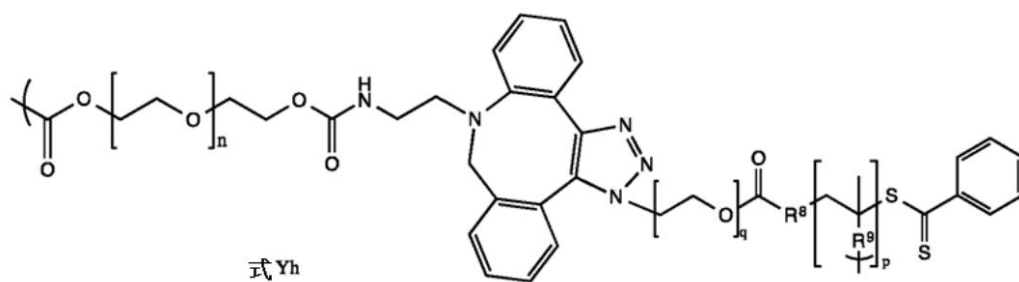


式Yg

40

【 0 0 9 1】

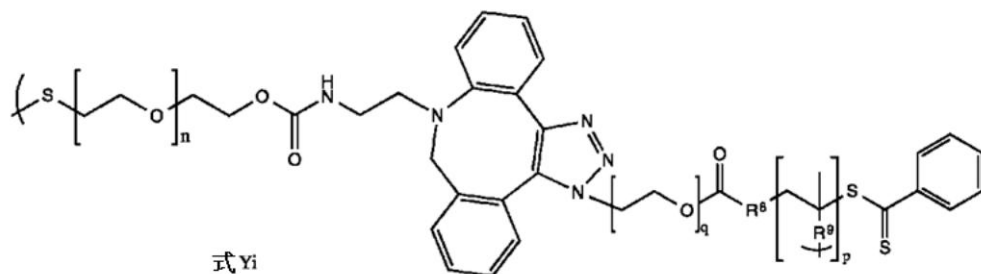
【化 2 1】



【 0 0 9 2】

10

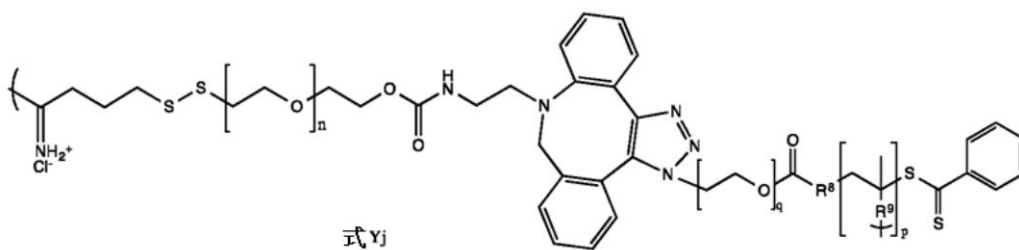
【化 2 2】



【 0 0 9 3】

20

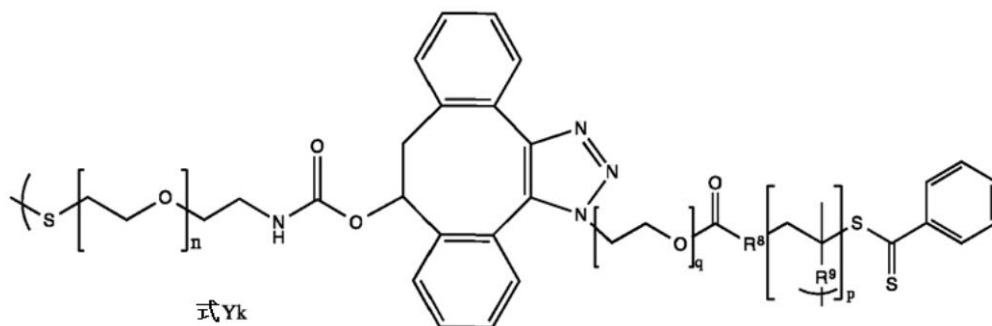
【化 2 3】



【 0 0 9 4】

30

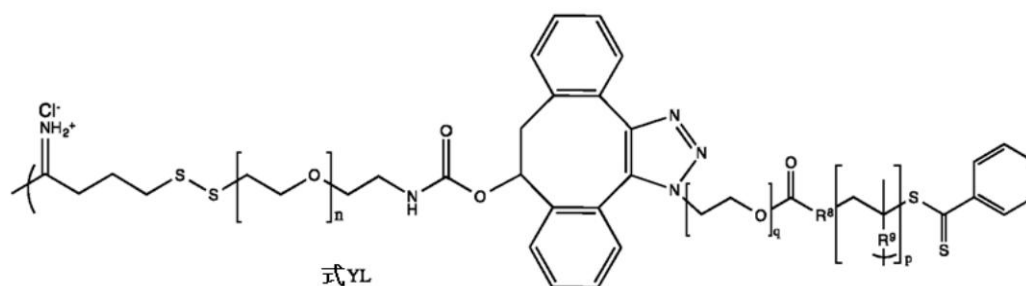
【化 2 4】



【 0 0 9 5】

40

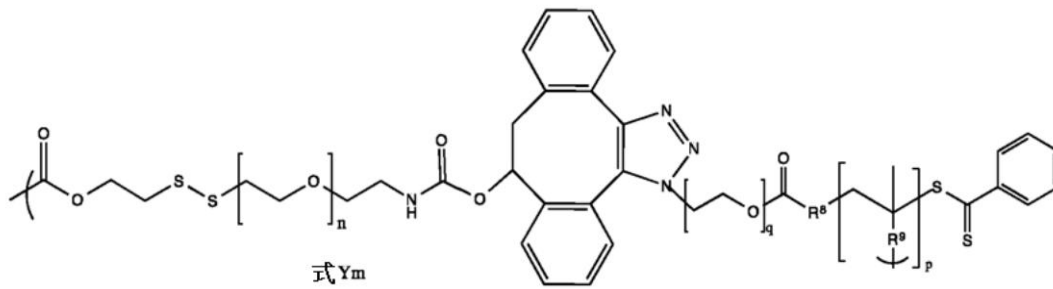
【化 2 5】



【 0 0 9 6】

50

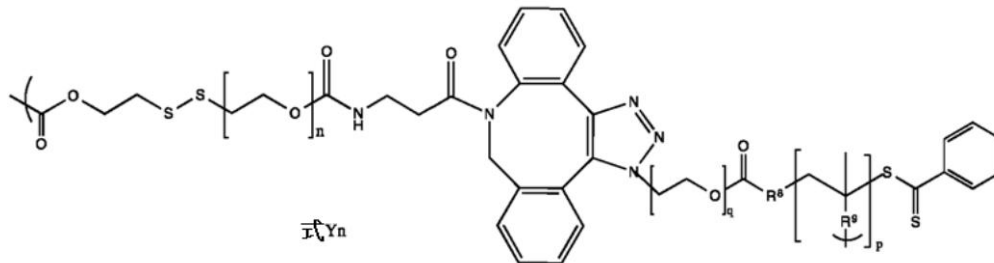
【化 2 6】



【 0 0 9 7】

10

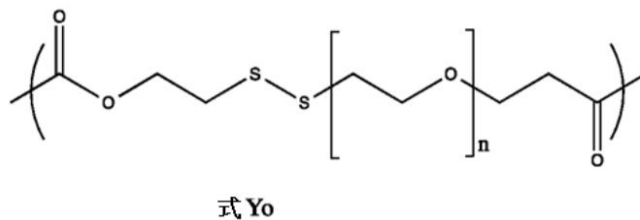
【化 2 7】



(式 Y_n のリンカーは、疎水性抗原へのコンジュゲーションに特に適切な Y_n を与えるある特定の前駆物質を介して合成されうる。) 20

【 0 0 9 8】

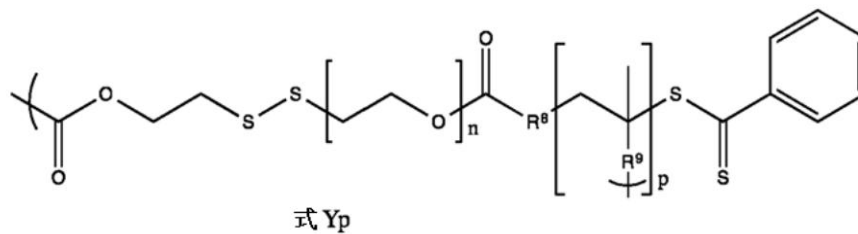
【化 2 8】



30

【 0 0 9 9】

【化 2 9】

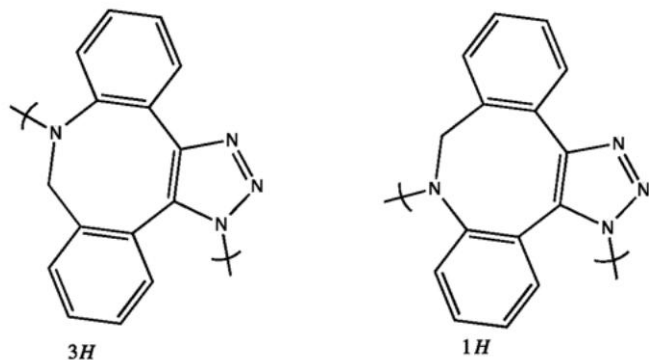


【 0 1 0 0】

40

式 Y_h から Y_n として上記に示されるリンカーは、分離せずに利用される異性体として合成される。例えば、式 Y_h、Y_i、Y_j および Y_n のリンカーは、下記に説明される 8、9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ [b, f] [1、2、3] トリアゾロ [4、5-d] アゾシン-8 イルおよび 8、9-ジヒドロ-3H-ジベンゾ [b, f] [1、2、3] トリアゾロ [4、5-d] アゾシン-8 イル構造の混合物だろう：

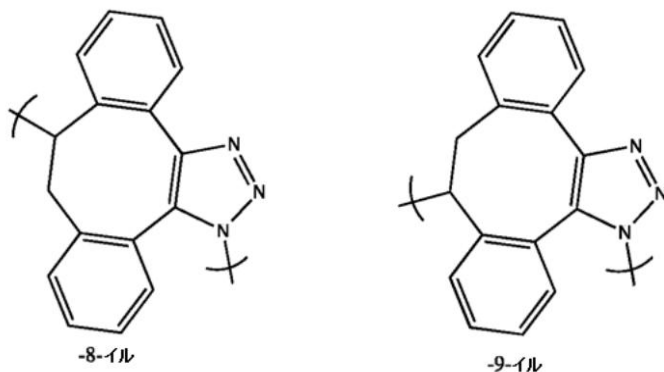
【化 30】



10

式 Yk、YL および Ym のリンカーは、下記に説明される 8、9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ [3、4:7、8] シクロオクタ [1、2-d] [1、2、3] トリアゾール-8-イルおよび 8、9-ジヒドロ-1H-ジベンゾ [3、4:7、8] シクロオクタ [1、2-d] [1、2、3] トリアゾール-9-イル構造の混合物だろう：

【化 31】



20

かかる異性体の混合物の存在は、かかるリンカーを利用する組成物の機能性を損なわない。

【0101】

30

ガラクトシル化部分

【0102】

本開示の組成物において利用されるガラクトシル化部分は、組成物を肝細胞へ標的とするのに（例えば、特異的に肝細胞に結合すること）役立ち、かつ以下から選択されうる：ガラクトース、ガラクトサミンまたは N-アセチルガラクトサミン。ガラクトースの C3/C4-ジオールアンカー側のいずれかを改変しながら、ASGPR 親和性が保持されることが報告されており（Mamidyala, Sreeman K., et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1978-1981）、従ってコンジュゲーションの箇所は、特に C1、C2 および C6 である。

【0103】

40

特定のガラクトシル化部分は、C1 もしくは C6 でコンジュゲートされたガラクトース、C2 でコンジュゲートされたガラクトサミン、ならびに C6 でコンジュゲートされた N-アセチルガラクトサミンを含む。他の特定のガラクトシル化部分は、C2 でコンジュゲートされた、より特には、CH₂ である R⁹ 置換基を有するリンカーにコンジュゲートされた N-アセチルガラクトサミンを含む。さらに他の特定のガラクトシル化部分は、C1 でコンジュゲートされる、より特には、エチルアセトアミド基である R⁹ 置換基を有するリンカーにコンジュゲートされたガラクトース、ガラクトサミンまたは N-アセチルガラクトサミンを含む。

【0104】

ASGPR 標的化抗体

50

【0105】

本開示の組成物において利用されるASGPR-特異的な抗体はまた、本開示の組成物を肝細胞へ標的化するのに役立ち、かつ商業的に入手可能な産物から選択されうる、例えば：アブカム・ピーエルシー、ケンブリッジ、イギリス由来の抗アジアロ糖タンパク質受容体1抗体（ab42488）およびサントクルズ・バイオテクノロジー株式会社、ダラス、テキサス由来のASGPR¹/2（FL-291）（sc28977）。あるいは、かかる抗体は、Dom26h-196-61、などの多くの公開されている配列、単ドメイン抗ASGPR抗体：

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYYAMAWVRQAPGKGLEWVSRIISARGVTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGT LVT VSS
(配列番号：6)

[Coulstock E, et al., (2013) "Liver-targeting of interferon- α with tissue-specific domain antibodies." PLoS One. 8 (2): e57263および米国第2013/0078216号]、または保存的置換を有するかかる配列のいずれかを使って発現されうる。上記に参照される米国特許出願は、ある特定の治療剤「肝疾患の治療のためのインターフェロン（インターフェロンアルファ2、インターフェロンアルファ5、インターフェロンアルファ6、またはコンセンサスインターフェロン）、リバビリン、ネクサバル/ソラフェニブ、アービタックス/セツキシマブ、アバスタチン/ベバシズマブ、およびハーセプチン/トラストズマブを含む」を送達するための、DOM26h-196-61などの肝臓標的化分子を開示する。DOM26h-196-61または米国第2013/0078216号において記載される別の肝臓標的化分子を利用する、式2に対応する物質の組成物は、それらの範囲内でインターフェロン（インターフェロンアルファ2、インターフェロンアルファ5、インターフェロンアルファ6、またはコンセンサスインターフェロン）、リバビリン、ネクサバル/ソラフェニブ、アービタックス/セツキシマブ、アバスタチン/ベバシズマブ、およびハーセプチン/トラストズマブを含む。

【0106】

ASGPRを特異的に標的とする抗体、抗体フラグメント、またはペプチドのための新規配列は、当業者によく知られている様々な方法を使って発見されうる。これらの方法は、ワクチン接種技術、ハイブリドーマ技術、ライブラリーディスプレイ技術（細菌性およびファージプラットフォームを含む）、内在性レパートリースクリーニング技術、定向進化（directed evolution）および合理的設計を含みうるが、これらに限定されない。

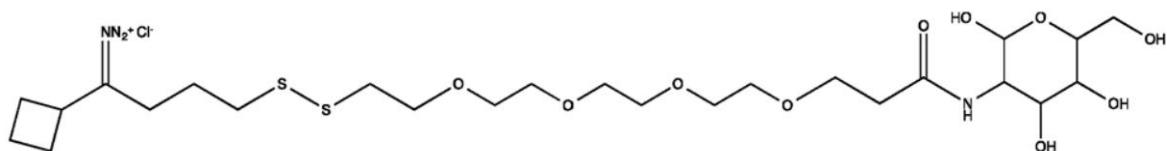
【0107】

命名法

【0108】

式1の組成物は、IUPACおよび慣用名の組み合わせを使って命名されうる。例えば、式1に対応する化合物、ここでXはシクロブチル部分（例示の目的のための抗原の代わりに示される）であり、Yは式Yaであり、mは1であり、nは4であり、かつZはN-アセチルガラクトサミン-2-イルである：

【化32】



は、(Z)-(21-シクロブチル-1-オキソ-1-((2,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)アミノ)-4,7

、10、13-テトラオキサ-16、17-ジチアヘンイコサン-21-イリデン) トリアズ-1-イン-2-イウムクロライドと命名でき、それ故にXが組織トランスグルタミナーゼである、対応する本開示の組成物は、(Z)-(21-(組織トランスグルタミナーゼ)-1-オキソ-1-((2、4、5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)アミノ)-4、7、10、13-テトラオキサ-16、17-ジチアヘンイコサン-21-イリデン) トリアズ-1-イン-2-イウムクロライドと命名されうる。X'が組織トランスグルタミナーゼであり、mが2であり、nが4であり、かつZ'がN-アセチルガラクトサミン-2-イルである、対応する本開示の組成物は、(3Z)-((組織トランスグルタミナーゼ)-1、3-ジルビス(1-オキソ-1-((2、4、5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)アミノ)-4、7、10、13-テトラオキサ-16、17-ジチアヘンイコサン-21-イル-21-イリデン))ビス(トリアズ-1-イン-2-イウム)クロライドと命名されうる。

10

【0109】

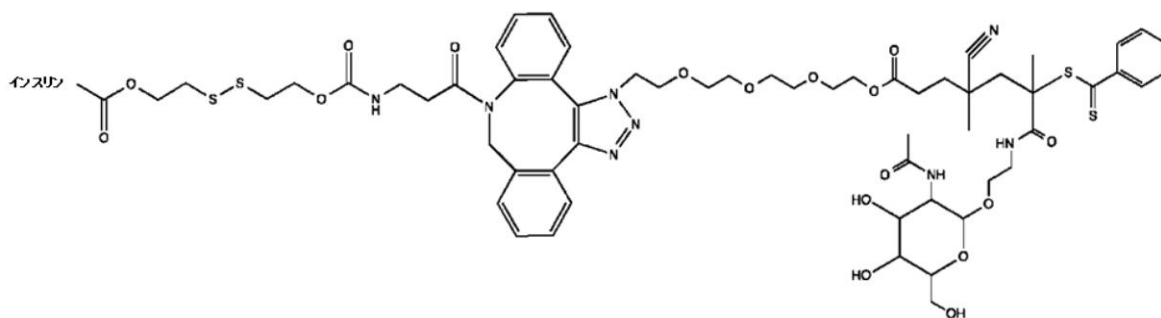
簡潔性の観点で、式1の組成物は、Xおよび式1aから1pの1つに対応する物(反応式において説明される)と、それに続く変数m、n、pおよび/もしくはq、R⁸、R⁹ならびに、それがコンジュゲートされたガラクトシル化部分および位置の同定のための整数の記載を参照することにより、代替命名系を使って命名されうる。この系のもとでは、Xがオボアルブミンであり、mが2であり、nが4であり、かつZがN-アセチルガラクトサミン-2-イルである式1aの組成物は、“F1a-OVA-m₂-n₄-2NacGal”と命名されうる。

20

【0110】

同様に、以下の式1の組成物

【化33-1】



30

は、

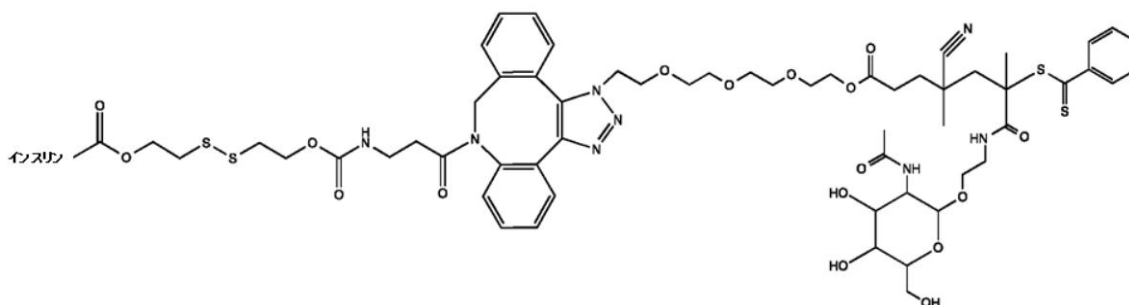
【化33-2】

”2-((2-(((3-(3-(22-((3-アセトアミド-4、5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)oxy)-16-シアノ-16、18-ジメチル-13、19-ジオキソ-18-((フェニルカルボノチオイル)チオ)-3、6、9、12-テトラオキサ-20-アザドコシル)-3、9-ジヒドロ-8H-ジベンゾ[b,f][1,2,3]トリアゾロ[4,5-d]アゾシン-8-イル)-3-オキソプロピル)カルバモイル)オキシ)エチル)ジスルファニル)エチルインスリンカルボン酸塩”

と命名されうる。異性体：

40

【化34-1】



は、

50

【化 3 4 - 2】

"2-((2-(((3-(1-(22-((3-アセトアミド-4, 5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)-16-シアノ-16, 18-ジメチル-13, 19-ジオキソ-18-((フェニルカルボノチオイル)チオ)-3, 6, 9, 12-テトラオキサ-20-アザドコシル)-1, 9-ジヒドロ-8H-ジベンゾ[b, f][1, 2, 3]トリアゾロ[4, 5-d]アゾシン-8-イル)-3-オキソプロピル)カルバモイル)-オキシ)エチル)ジスルファニル)エチルインスリンカルボン酸塩"

と命名されうる（正式名称との差異を同定する際に、便宜のために太字のハイライトが加えられる）。本開示のための採用された命名系を利用すると、異性体の両方は、“F1n-インスリン-m₁-n₁-p₁-q₄-CMP-EtAcN-1NAcGAL”と命名でき、ここで、CMPは、R⁸が、1-シアノ-1-メチルプロピルであることを示し、EtAcNは、R⁹が、エチルアセトアミドであることを示し、かつ1NAcGALは、Z”がC1でコンジュゲートされたN-アセチルガラクトサミンであることを示す。Zの名称の前の略称EtAcNの非存在は、R⁹が直接結合であることを示すだろう。

10

【0111】

式2の組成物において、左から右への配向は、反対の特段の表示がない、NからCの順番を特定すると解釈されるべきではない。例えば、m'が1であり、m”が0であり、Xがオボアルブミンであり、YがGly₃Serであり、かつZが抗ASGPR Dom26h-196-61である、式2の化合物は、OVA-Gly₃Ser-DOMと命名でき、かつ以下の両方を網羅するとして読まれる：

N-OVA-Gly₃Ser-DOM-C

および

N-DOM-Gly₃Ser-OVA-C

例えばm'が1であり、m”が0であり、Xがオボアルブミンであり、YがGly₃Serであり、かつZが抗ASGPR Dom26h-196-61である式2の組成物（付加的なリンカーを介して付着される精製タグを有する）は、以下の通り命名されうる：

N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C

または

N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C

ここで、C'末端Gly₃Ser-6xHis基は、単離および精製を容易にするアミノ酸配列を表す。

20

【0112】

m'が1であり、m”が1であり、それぞれXが第VII因子であり、それぞれYがGly₃Serであり、かつZが抗ASGPR Dom26h-196-61である式2の組成物（付加的なリンカーを介して付着される精製タグを有する）は、FVII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVII-Gly₃Ser-6xHisと命名でき、かつ以下の両方を包含する：

N-FVII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVII-Gly₃Ser-6xHis-C

および

N-6xHis-Gly₃Ser-FVII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVII-C。

30

40

【0113】

m'が3であり、m”が0、1であり、3つのX抗原がそれぞれ、脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）、アルファグリアジン（配列番号：26）およびオメガグリアジン（配列番号：27）であり、それぞれYが、免疫プロテアソーム切断部位を有するリンカー（“IPC”）、ならびにZが抗ASGPR Dom26h-196-61である式2の組成物は：

脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”-IPC-アルファグリアジン-IPC-オメガグリアジン-IPC-DOMと命名されうる。

【0114】

本開示の組成物の調製

50

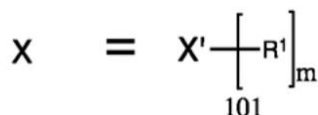
【0115】

例えば、Zhu, L., et al., Bioconjugate Chem. 2010, 21, 2119-2127において記載される手順を適応させることにより、式1の組成物は調製される。ある特定の式1の組成物の合成はまた、反応式1から14に関して下記に記載される。他の合成アプローチは、当業者にとって明らかだろう。

【0116】

式101（下記）は、Xの代替表示であり、

【化35】



10

ここで、 R^1 は、リンカーへのコンジュゲーションのための到達できるようにするためにXの三次元構造上に位置する遊離表面アミノ（ $-NH_2$ ）もしくはチオール（ $-SH$ ）部分であり、かつ X' は、同定される遊離アミノ基を除くXの残りを表す〔 X'' は、遊離チオール基を除くXの残りを表す反応式において使用される〕。Xの正体（identity）に依存して、少なくとも1つの（N末端のアミン）が存在するだろう、そして、約1から100の整数である、より典型的には、1もしくは約4から20、ならびにもっとも典型的には1から約10であるmにより表されるように、複数の R^1 基（主にリジン残基またはジスルフィド結合に参与するシステイン残基に由来する）が存在できる。

20

【0117】

反応式において利用される変数は、上記に規定されているとおりであり、加えて以下を含み、それらは特定の反応式または工程に関してでなければ、任意の特異的な指標のこれらの意味が存在しないと理解されるべきである。

- ・ R^2 は、OHまたは保護基であり；
 - ・ R^3 は、OH、 NH_2 、 $NHAc$ 、保護基またはNH-保護基であり；
 - ・ R^4 は、OHまたは保護基であり；
 - ・ R^5 は、OHまたは保護基であり；
 - ・ R^6 は、OHまたは保護基であり；
 - ・ Z' はC1またはC6でコンジュゲートされたガラクトース、C2でコンジュゲートされたガラクトサミン、またはC6でコンジュゲートされたN-アセチルガラクトサミンであり；
 - ・ R^8 は、 $-CH_2$ または $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$ であり；
- および
- ・ R^9 は直接結合であり、かつ Z'' はC2でコンジュゲートされたN-アセチルガラクトサミンであり；
 - ・ R^9 はエチルアセトアミド基であり、かつ Z'' はC1でコンジュゲートされたガラクトース、ガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンである。

30

【0118】

合成反応パラメータ

40

【0119】

“溶媒”、“不活性有機溶媒”または“不活性溶媒”という用語は、それらと組み合わせて記載されている反応の条件のもとでは不活性な溶媒〔例えば、ベンゼン、トルエン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン（“THF”）、ジメチルホルムアミド（“DMF”）、クロロホルム、メチレンクロライド（またはジクロロメタン）、ジエチルエーテル、メタノール、ピリジン等を含む〕を意味する。もし反対に特定されなければ、本開示の反応において使用される溶媒は、不活性有機溶媒である。

【0120】

“q.s.”という用語は、述べられた機能を達成する、例えば、溶液を望ましい容積（すなわち、100%）へともたらすのに十分な量を加えることを意味する。

50

【0121】

所望であれば、例えば、濾過、抽出、結晶化、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーもしくは厚層クロマトグラフィー、遠心性サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶、昇華、高速タンパク質液体クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはこれらの手順組み合わせなどの、任意の適切な分離または精製手順により、本明細書に記載される化合物および中間体の単離および精製が影響されうる。適切な分離および単離手順の特定の例示を、下記の実施例の出典明示により得ることができる。しかしながら、他の同等の分離または単離手順はまた、やはり、使用されうる。

【0122】

10

別段の特定がない限り（実施例を含む）、全ての反応は、標準大気圧（約1気圧）ならびに周囲の（もしくは室温の）温度（約20℃）、約pH7.0-8.0で行われる。

【0123】

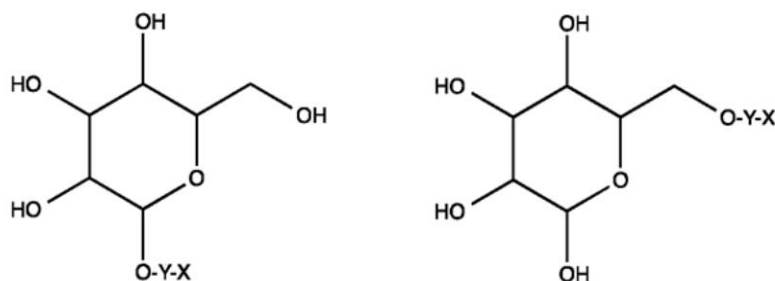
反応産物の特性評価は、通例の手段、例えば、プロトンおよびカーボンNMR、質量分析法、サイズ排除クロマトグラフィー、赤外分光法、ゲル電気泳動により行われる。

【0124】

反応式1は、Zがガラクトース、ガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンでありうる式1の組成物の調製を説明する。その点において、および上記に規定されているように、反応式1において利用されるようなZ'が、C1およびC6でコンジュゲートされ、かつ式1による以下の構造に対応するガラクトース：

20

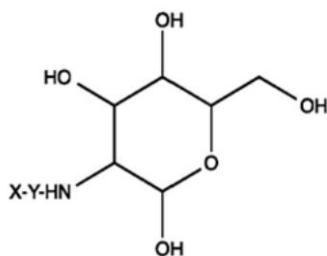
【化36】



30

、C2でコンジュゲートされ、かつ式1による以下の構造に対応するガラクトサミン：

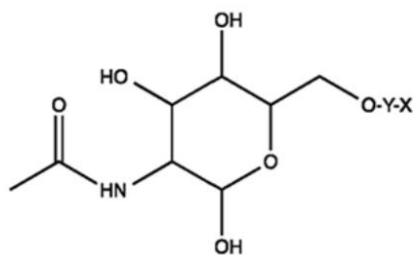
【化37】



40

、ならびにC6でコンジュゲートされ、かつ式1による以下の構造に対応するN-アセチルガラクトサミン：

【化 3 8】



を包含する。

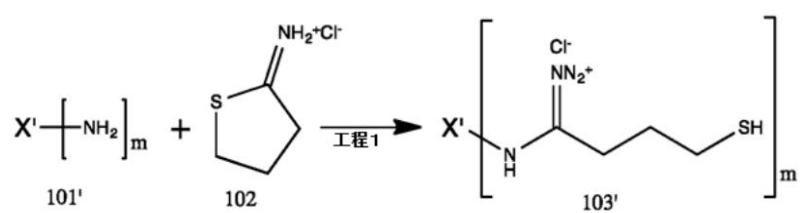
10

【0 1 2 5】

反応式 1

【0 1 2 6】

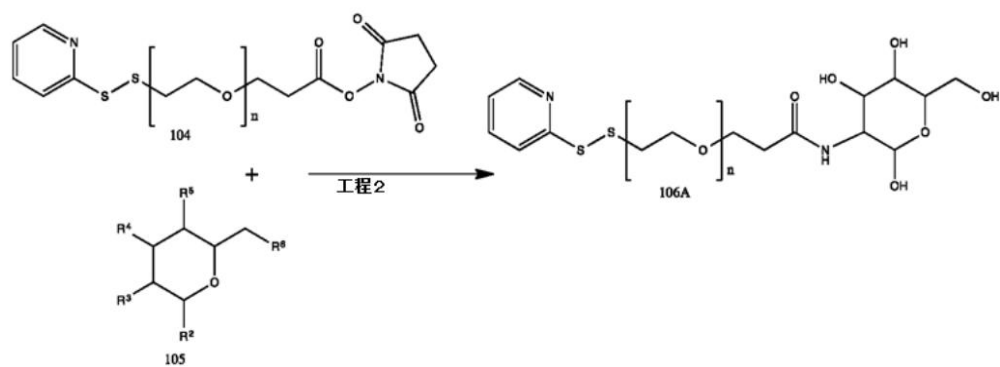
【化 3 9】



20

【0 1 2 7】

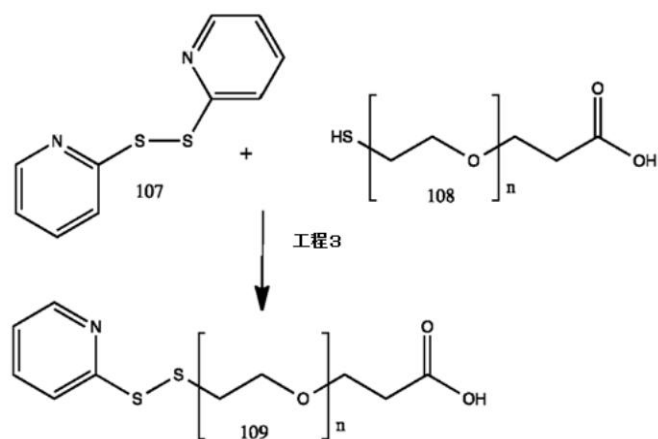
【化 4 0】



30

【0 1 2 8】

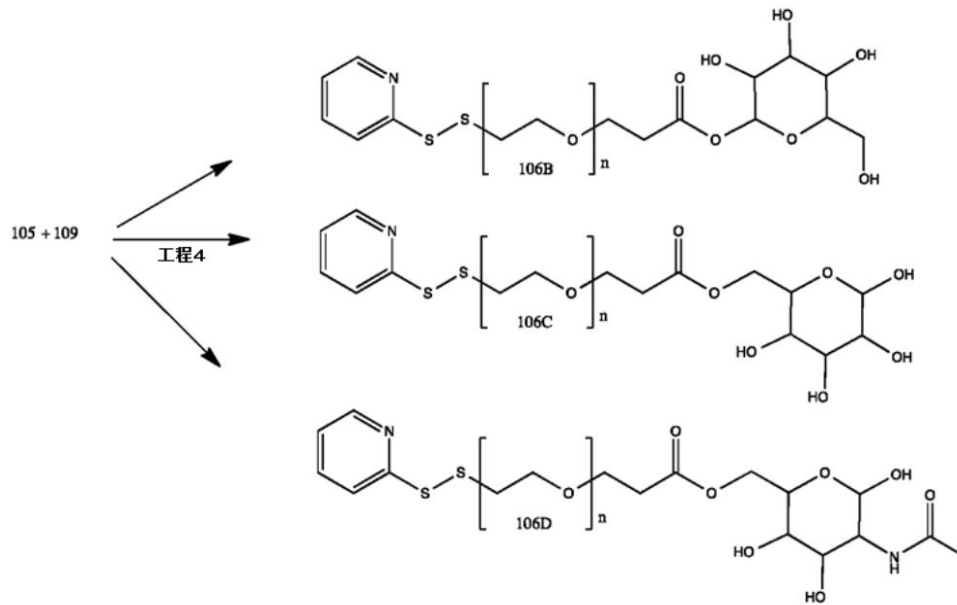
【化 4 1】



40

【0 1 2 9】

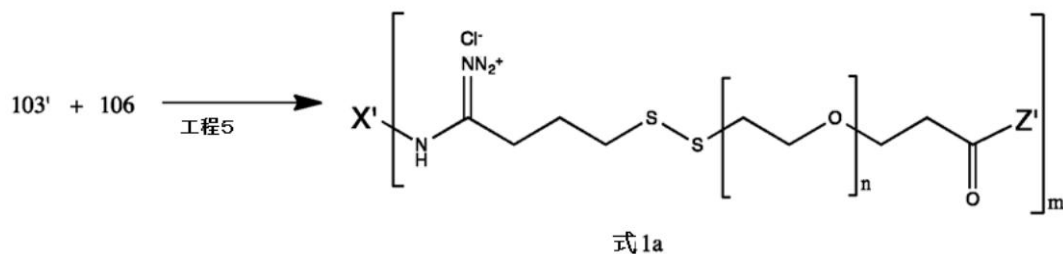
【化 4 2】



10

【0 1 3 0】

【化 4 3】



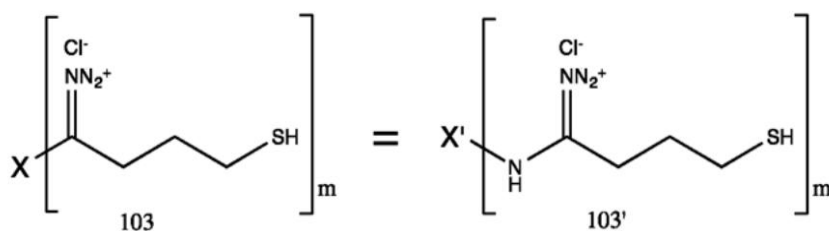
20

【0 1 3 1】

反応式 1、工程 1 において上記で説明されるように、pH 約 8.0、約 1 時間でトラウト試薬（式 102）との接触により遊離表面アミノ基（式 101'）を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンド上に表面チオール基が生成でき、例えば、遠心性サイズ排除クロマトグラフィーを介して、未反応のトラウト試薬が除去されている式 103' を与える。下記に示される 2 つの構造は、反応式 1、工程 1 の産物を説明し、それぞれ X 上に最初に確認される遊離表面アミノ基を示し（すなわち、式 103'、ここで X' は同定される遊離表面アミノ基を除く X の残りを表す）、および遊離表面アミノ基を省略する（すなわち、式 103）。これは、X および式 101 間として説明される区別に似ている。慣習がその後の反応式において続いた。

30

【化 4 4】



40

【0 1 3 2】

反応式 1、工程 2 において、ピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）-NH S エステル（式 104）を、ガラクトサミン（式 105、ここで R³ は、NH₂ および R²、R⁴、R⁵ および R⁶ は、OH である）と約 pH 8、約 1 時間で攪拌しながら、接触させて式 106 A の対応するピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）-糖を与

50

ええ、さらに精製せずに使用することができる。

【0133】

反応式1、工程3において、4、4'-ジチオジピリジン（式107）を、チオールポリ（エチレングリコール）プロパン酸（式108）と接触させて、対応するピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）プロパン酸（式109）を与える。

【0134】

反応式1、工程4において、式109の酸を、 R^2 が、OHであり、ならびに R^3 、 R^4 、 R^5 および R^6 が保護基（“PG”）であり、ここで R^6 が、OHであり、かつ R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 がPGであり、または、ここで R^6 が、N-アセチルであり、かつ R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 がPGである式105の保護されるガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミン、と接触させて、式106B、106Cおよび106Dの対応するピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）-糖を与え、脱保護後に用いることができる。

10

【0135】

反応式1、工程5において、工程1の産物（式103'）の攪拌溶液に、過剰（mの値に対応する）の、工程2または工程4（式106、すなわち、106A、106B、106Cまたは106D）の産物を約1時間加え、それに続いて遠心性サイズ排除クロマトグラフィーで任意の遊離残存反応物を除去して、式1a、それぞれ、式1aA、式1aB、式1aCおよび式1aDによる対応産物を得る。

【0136】

20

式1aに対応する組成物は、それぞれ、例えば以下の通りに命名されうる：

“F1aA-X'- m_m-n_n ”または“F1a-X'- $m_m-n_n-2NGAL$ ”

“F1aB-X'- m_m-n_n ”または“F1a-X'- m_m-n_n-1GAL ”

“F1aC-X'- m_m-n_n ”または“F1a-X'- m_m-n_n-6GAL ”

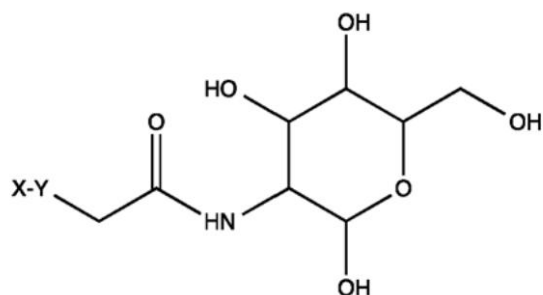
“F1aD-X'- m_m-n_n ”または“F1a-X'- $m_m-n_n-6NacGAL$ ”
それぞれ、式106A-Dによる中間体を利用する産物として作製される。

【0137】

反応式2-14に移り、それらと利用される命名法の目的のため、特に明記されている場合を除き、Z”はC2でコンジュゲートされたN-アセチルガラクトサミン：

【化45】

30



またはC1でコンジュゲートされたガラクトース、ガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンを指す。組成物にコンジュゲートされるC1は、例えばC3ヒドロキシルでアミンを環化することにより、および続いて隣接性のリンカーの部分への保護されるガラクトサミンの組み込みを脱保護することにより、合成の間、保護される必要があるということに留意すべきである。

40

【0138】

ガラクトースをメタクリル酸化することにより、例えば、ガラクトサミンおよびメタクリル酸無水物を接触させ、それに続いて適切な溶媒においてアゾビスイソブチロニトリル（AIBN）の存在下で、凍結融解サイクルで開始し、それに続いて約60-80℃、好ましくは70℃で約5-8、好ましくは約6時間加熱する、対応するRAFT剤との可逆的付加-開裂連鎖移動（RAFT）重合により、式201、401、501、601、701、803および1401のポリ（ガラクトースメタクリル酸）反応物を調製すること

50

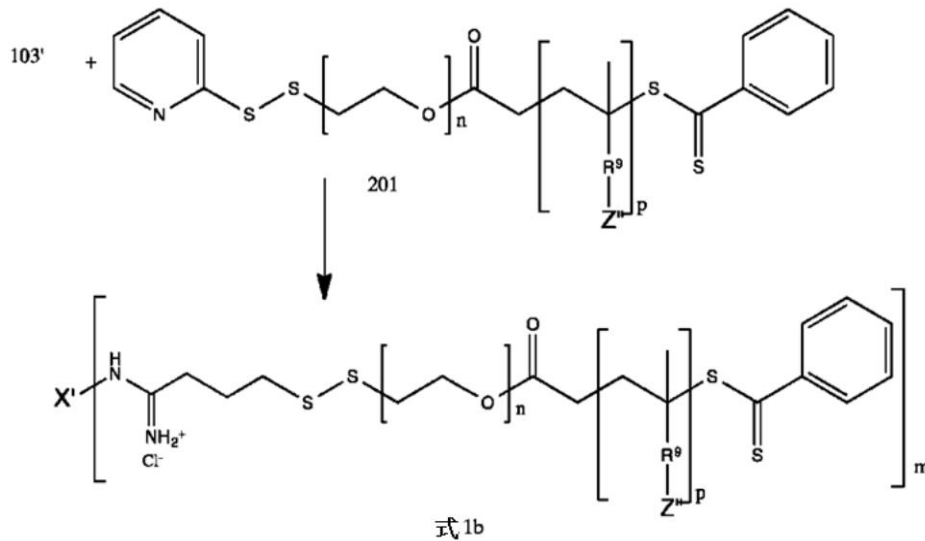
ができる。低級アルカノール、好ましくはメタノールにおいて、ポリマーを沈殿することができる。

【0139】

反応式 2

【0140】

【化 4 6】



【0141】

反応式 2 において説明されるように、例えば、反応式 1、工程 1（式 103'）に関して記載される、調製される遊離表面チオール基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、過剰（m の値に対応する）の式 201 のピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）と約 1 時間接触させて式 1b による対応産物を得る。

【0142】

式 1b の組成物は以下の通り命名されうる：

“ F 1 b - X ' - m_m - n_n - p_p - 2 N A c G A L ” または “ F 1 b - X ' - m_m - n_n - p_p - E t A c N - Z ”。

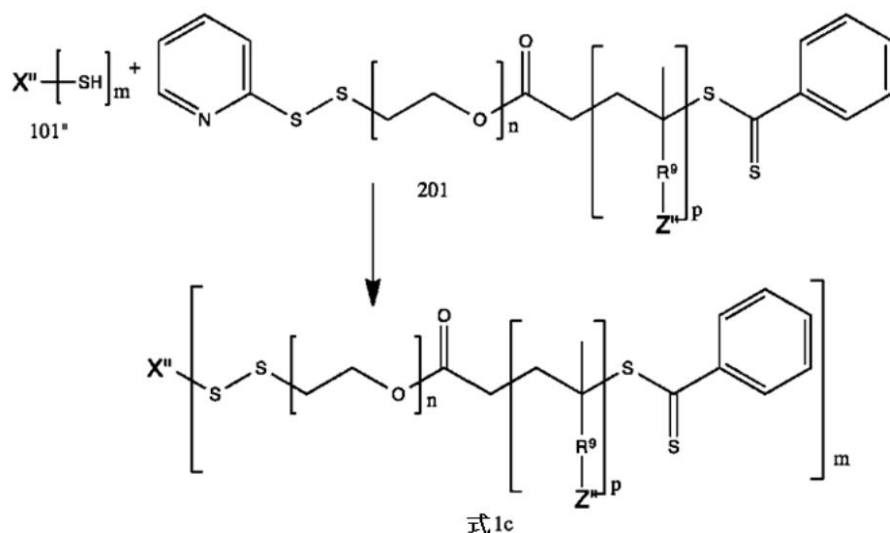
例えば、X' がウリカーゼであり、m が 1 であり、n が 4 であり、p が 4 であり、かつ Z が C 2 でコンジュゲートされた N-アセチルガラクトサミンである式 1b の組成物は、“ F 1 b - ウリカーゼ - m₁ - n₄ - p₄ - 2 N A c G A L ” または “ 30 - （ウリカーゼ） - 3、5、7、9 - テトラメチル - 12 - オキソ - 1 - フェニル - 1 - チオキソ - 3、5、7、9 - テトラキス（（2、4、5 - トリヒドロキシ - 6 - （ヒドロキシメチル）テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル）カルバモイル） - 13、16、19、22 - テトラオキサ - 2、25、26 - トリチアトリアコンタン - 30 - イミニウム ” と命名されうる。

【0143】

反応式 3

【0144】

【化 4 7】



10

【0 1 4 5】

反応式 3 において説明されるように、天然型の遊離表面チオール基（システイン）を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンド [式 1 0 1 に対応し、かつここで当該用語が引き続いて利用されるように、 X'' は、同定される遊離表面チオール基を除く X を表すことを説明する式 1 0 1 "] を、過剰 (m の値に対応する) の式 2 0 1 のピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）と接触させて式 1 c による対応産物を得る。

20

【0 1 4 6】

式 1 c に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

“ F 1 c - X' - m_m - n_n - p_p - 2 N A c G A L ” または “ F 1 c - X' - m_m - n_n - p_p - E t A c N - Z ”。

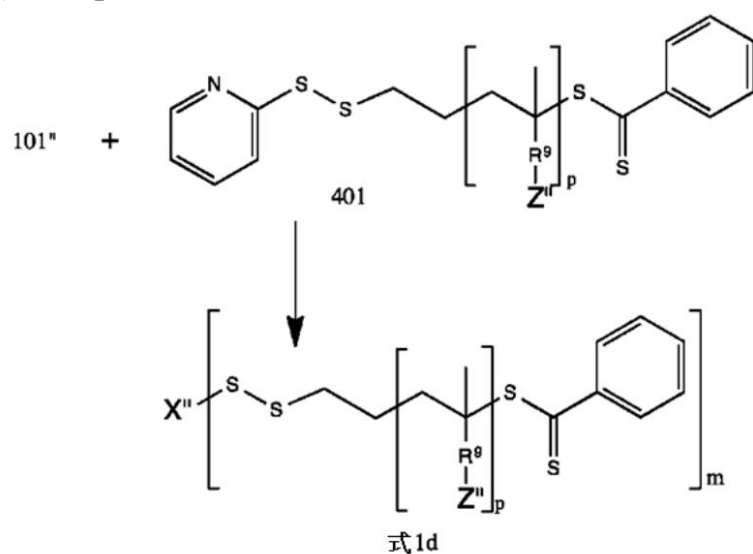
【0 1 4 7】

反応式 4

【0 1 4 8】

【化 4 8】

30



40

【0 1 4 9】

反応式 4 において説明されるように、式 1 0 1 " の天然型の遊離表面チオール基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、過剰 (m の値に対応する) の式 4 0 1 のピリジルジチオールと接触させて式 1 d による対応産物を得る。

【0 1 5 0】

50

式 1 d に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

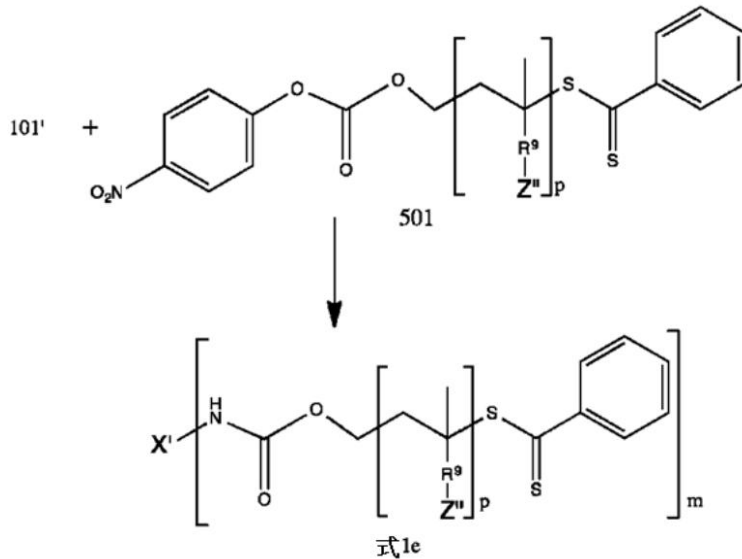
“ F 1 d - X ' - m_m - p_p - 2 N A c G A L ” または “ F 1 d - X ' - m_m - p_p - E t A c N - Z ”。

【 0 1 5 1 】

反応式 5

【 0 1 5 2 】

【 化 4 9 】



【 0 1 5 3 】

反応式 5 において説明されるように、式 1 0 1 ' の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、過剰（m の値に対応する）の式 5 0 1 の n - ニトロフェニルカーボネートと接触させて式 1 e による対応産物を得る。

【 0 1 5 4 】

式 1 e に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

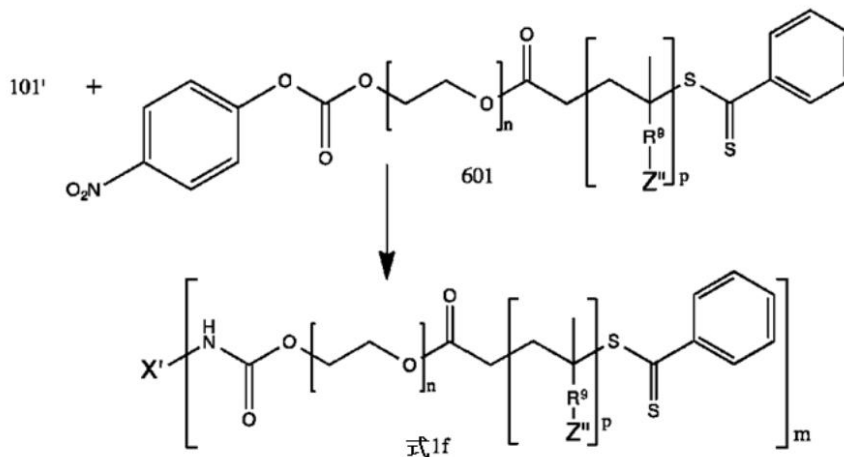
“ F 1 e - X ' - m_m - p_p - 2 N A c G A L ” または “ F 1 e - X ' - m_m - p_p - E t A c N - Z ”。

【 0 1 5 5 】

反応式 6

【 0 1 5 6 】

【 化 5 0 】



【 0 1 5 7 】

反応式 6 において説明されるように、式 1 0 1 ' の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、過剰（m の値に対応する）の式 6 0 1

の n -ニトロフェニルカーボネートポリ（エチレングリコール）エステルと接触させて式 1 f による対応産物を得る。

【0158】

式 1 f に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

“ F 1 f - X' - m_m - n_n - p_p - 2 N A c G A L ” または “ F 1 f - X' - m_m - n_n - p_p - E t A c N - Z ”。

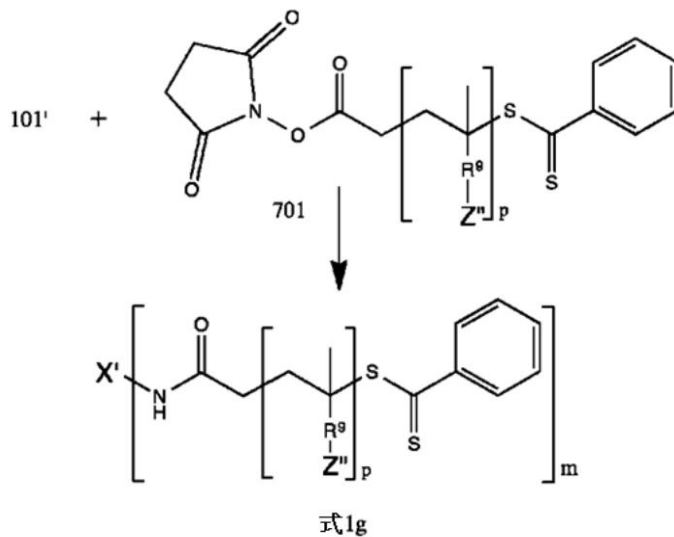
【0159】

反応式 7

【0160】

【化 5 1】

10



20

【0161】

反応式 7 において説明されるように、式 1 0 1' の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、過剰（ m の値に対応する）の式 7 0 1 の N H S - エステルポリ（エチレングリコール）エステルと接触させて式 1 g による対応産物を得る。

30

【0162】

式 1 g に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

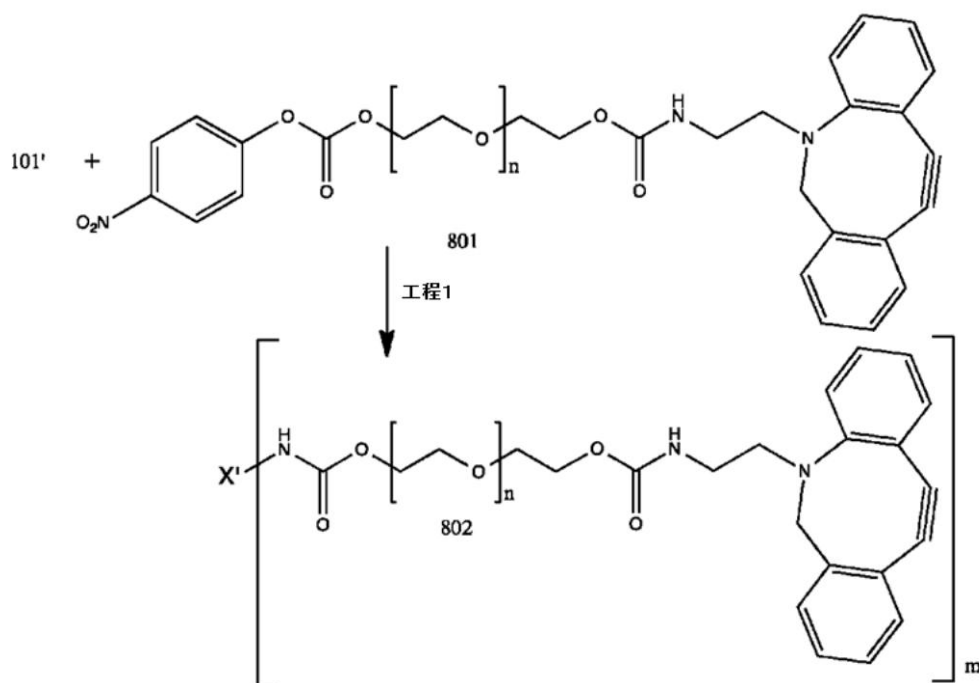
“ F 1 g - X' - m_m - p_p - 2 N A c G A L ” または “ F 1 g - X' - m_m - p_p - E t A c N - Z ”

【0163】

反応式 8

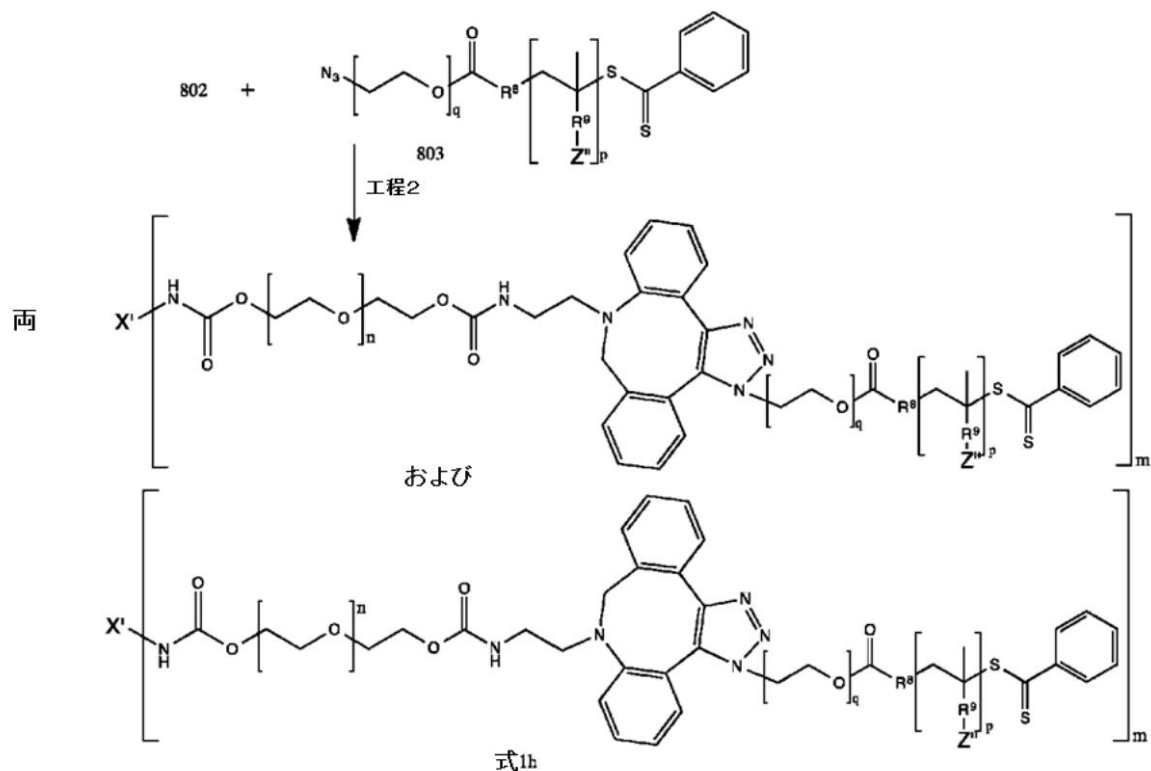
【0164】

【化 5 2】



【 0 1 6 5】

【化 5 3】



【 0 1 6 6】

反応式 8、工程 1 において説明されるように、式 101' の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、式 801 のクリックケミストリーのための過剰 (m の値に対応する) のアミン-反応性リンカーと接触させて式 802 による対応産物を得る。

【 0 1 6 7】

反応式 8、工程 2 において、式 802 の産物を、その後式 803 のガラクトース (アミン) ポリマーの同等量 (再度 m の値に対応する) と接触させて式 1h による対応する異性

体産物を得る。上記に説明される2つの異性体は、式802の三重結合を有する式803のアジドの非特異的な環化を生じる。かかる非特異的な環化は、他の組成物の合成において起こり、ここでYは式YhからYnから選択されるが、それぞれの実例において説明されないだろう。

【0168】

式1hに対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

“F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”または“F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

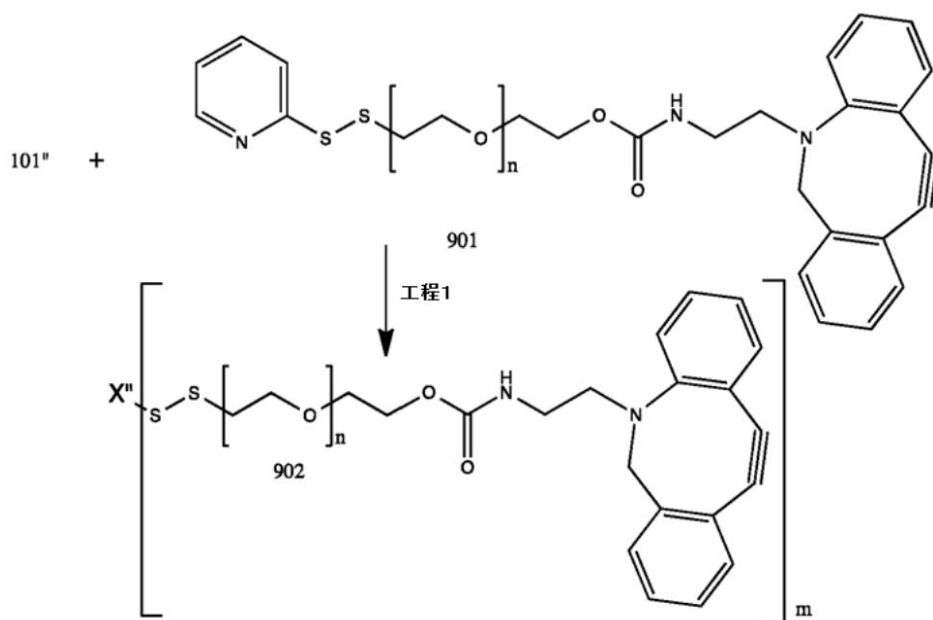
【0169】

反応式9

10

【0170】

【化54】

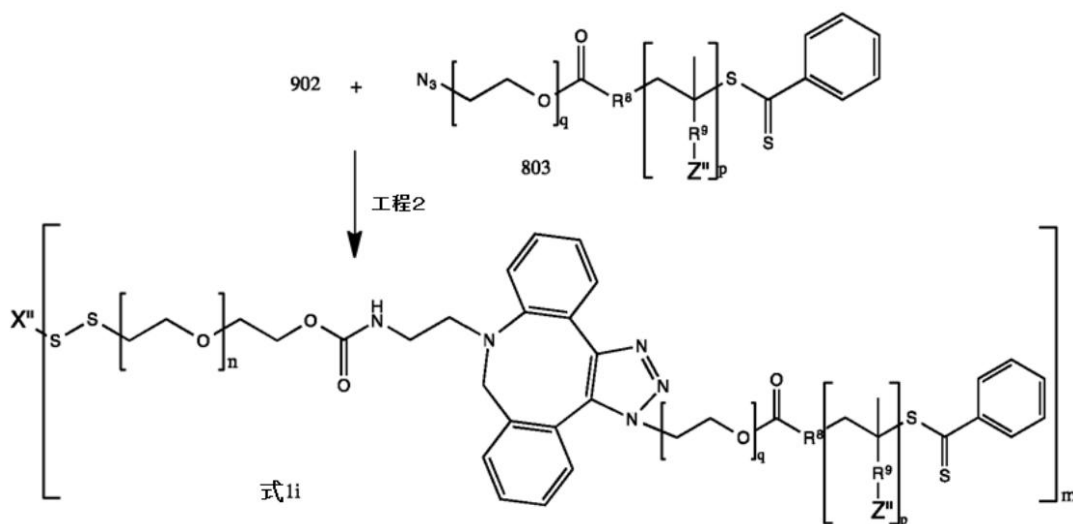


20

【0171】

30

【化55】



40

【0172】

反応式9、工程1において説明されるように、式101''の天然型の遊離表面チオール基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、式901のクリックケミストリーのための過剰（mの値に対応する）のチオール反応性リンカーと接触させて式902''による対応産物を得る。

50

【0173】

反応式 9、工程 2 において、式 902” の産物を、その後式 803 のガラクトース（アミン）ポリマーの同等量（再度 m の値に対応する）と接触させて式 1 i による対応する異性体産物を得る。

【0174】

式 1 i に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

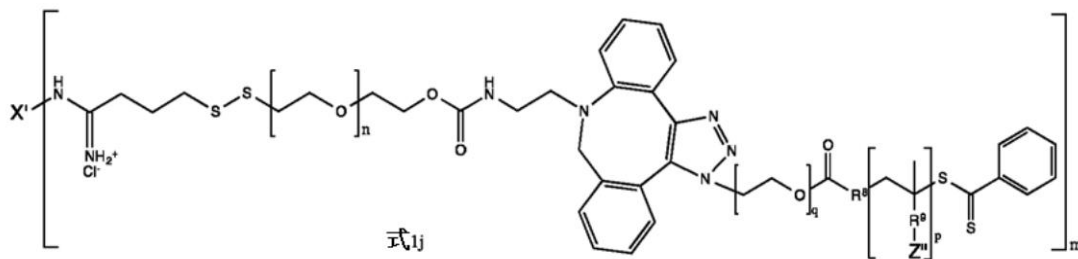
“ F 1 i - X' - m_m - n_n - p_p - q_q - 2 N A c G A L ” または “ F 1 i - X' - m_m - n_n - p_p - q_q - E t A c N - Z ”。

【0175】

反応式 9 に関して記載される手順に従い、出発物質 101” を式 103’ の化合物（トラウト試薬で誘導体化される）に置換することにより、下記に示されるように式 1 j の対応する異性体産物が得られる。

【0176】

【化 56】



【0177】

式 1 j に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

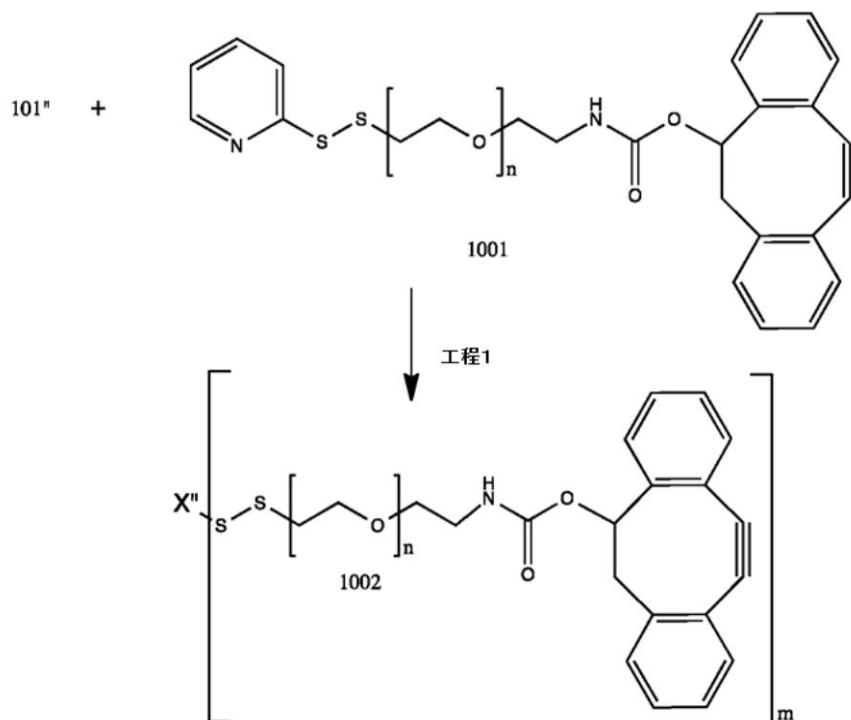
“ F 1 j - X' - m_m - n_n - p_p - q_q - 2 N A c G A L ” または “ F 1 j - X' - m_m - n_n - p_p - q_q - E t A c N - Z ”。

【0178】

反応式 10

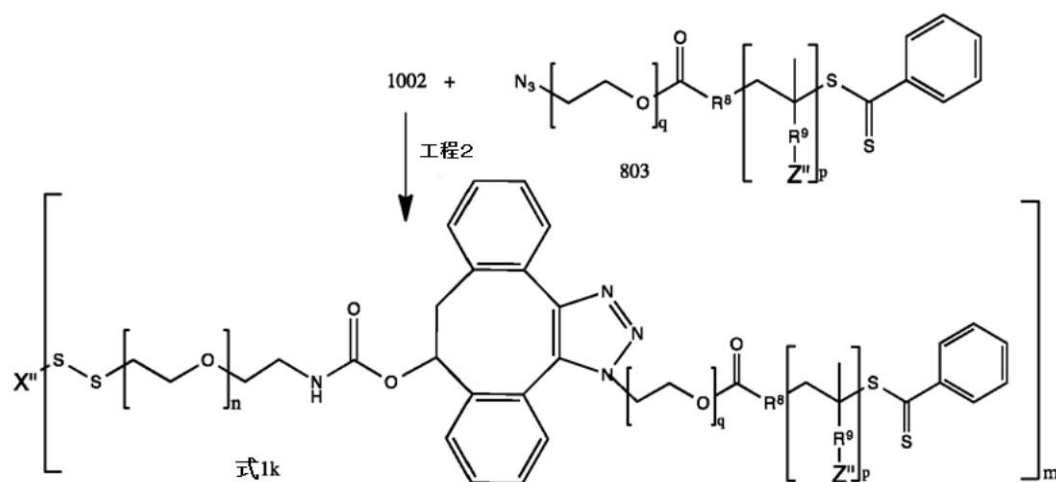
【0179】

【化 57】



【0180】

【化 5 8】



10

【0181】

反応式10、工程1において説明されるように、式101”の天然型の遊離表面チオール基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、式1001のクリックケミストリーのための過剰（mの値に対応する）のチオール反応性リンカーと接触させて式1002による対応産物を得る。

20

【0182】

反応式10、工程2において、式1002の産物を、その後式803のガラクトース（アミン）ポリマーの同等量（再度mの値に対応する）と接触させて式1kによる対応する異性体産物を得る。

【0183】

式1kに対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

“ F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL ”または“ F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z ”。

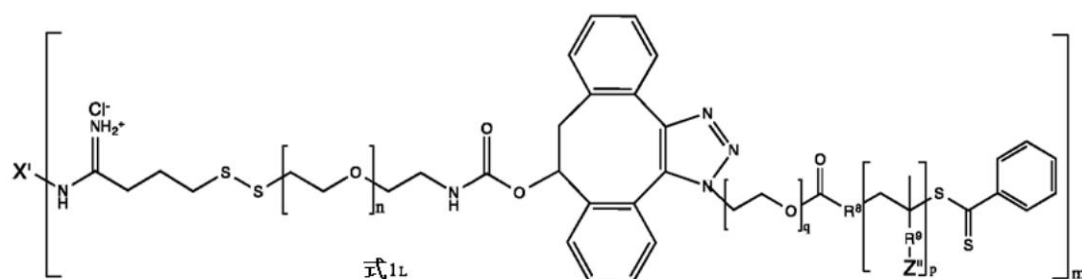
【0184】

反応式10に関して記載される手順に従い、出発物質101”を式103’の化合物（トラウト試薬で誘導体化される）に置換することにより、下記に示されるように式1Lの対応する異性体産物が得られる。

30

【0185】

【化 5 9】



40

【0186】

式1Lに対応する組成物は以下の通り命名されうる：

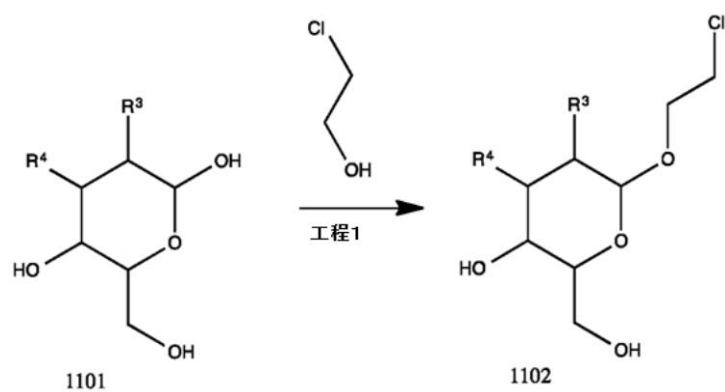
“ F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL ”または“ F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z ”。

【0187】

反応式11

【0188】

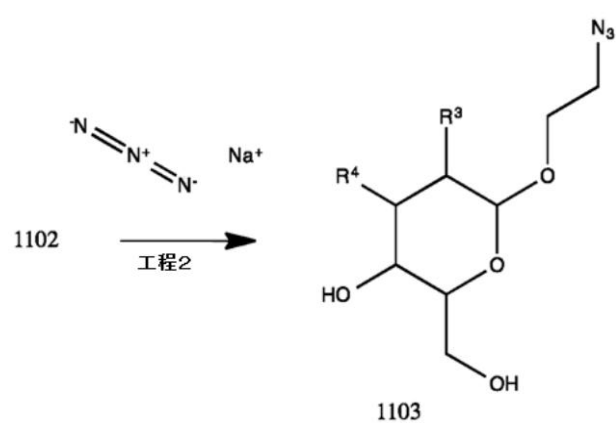
【化 6 0】



10

【 0 1 8 9】

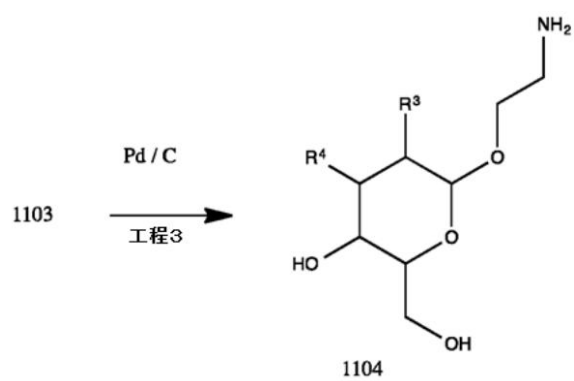
【化 6 1】



20

【 0 1 9 0】

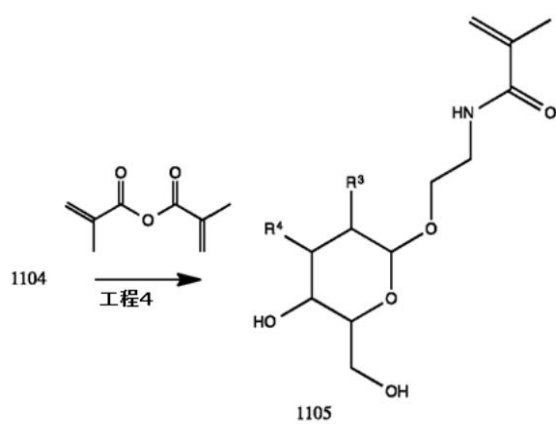
【化 6 2】



30

【 0 1 9 1】

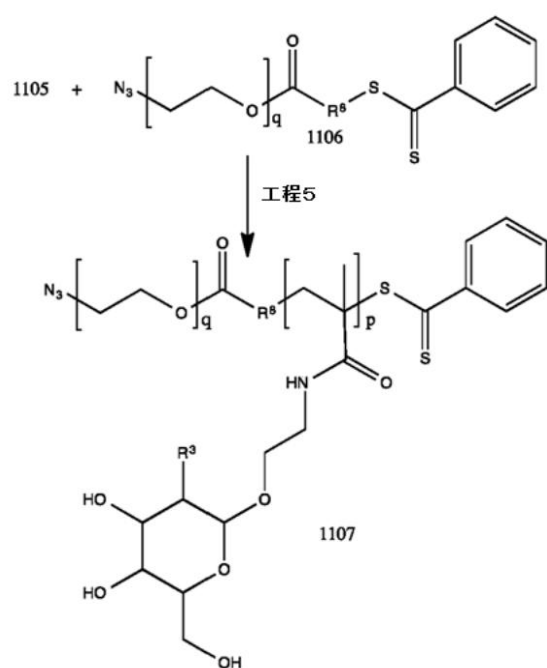
【化 6 3】



10

【 0 1 9 2 】

【化 6 4】

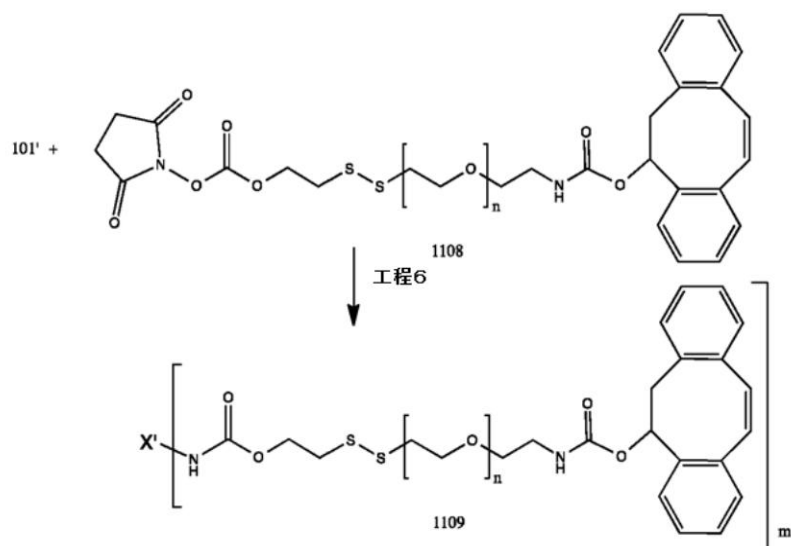


20

30

【 0 1 9 3 】

【化 6 5】

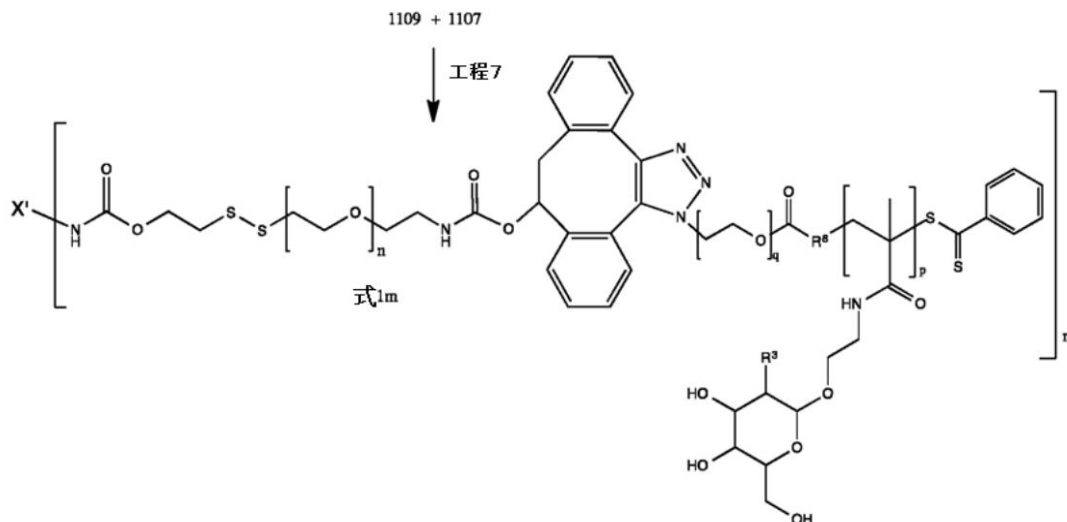


40

50

【0194】

【化66】



10

【0195】

反応式11、工程1において説明されるように、ガラクトース、保護されるガラクトサミンまたはN-アセチル-D-ガラクトサミン（式1101、ここでそれぞれ R^3 および R^4 は、OHであり、 R^3 は、NH-保護基（例えば、 R^4 で環化される）であり、または R^3 は、NHAcでありかつ R^4 は、OHである）を、2-クロロエタン-1-オールと接触させて、それに続いて冷却およびアセチルクロライドを滴下する。当該溶液を室温に加熱し、かつその後70℃に数時間加熱した。エタノールを粗産物に加え、かつ得られる溶液を炭素存在下で攪拌し、その後濾過し、それに続いて溶媒除去し式1102の対応産物を得る。

20

【0196】

反応式11、工程2において説明されるように、式1102の産物を、過剰のアジ化ナトリウムに加え、かつ90℃に数時間加熱し、その後濾過し、それに続いて溶媒除去し式1103の対応産物を得る。

【0197】

反応式11、工程3において説明されるように、式1103の産物を炭素およびエタノールのパラジウムの溶液に加え、かつ水素ガス（3気圧）のもとで数時間攪拌し、その後濾過し、それに続いて溶媒除去し式1104の対応産物を得る。

30

【0198】

反応式11、工程4において説明されるように、式1104の産物をメタクリル酸無水物の溶液に加え、トリエチルアミンを加えて、かつ反応を2時間攪拌し、それに続いて溶媒除去および単離により式1105の対応産物を得る。

【0199】

反応式11、工程5において説明されるように、アジド-改変uRAFT剤（式1106）を、アゾビスイソブチロニトリルを有する式1105の産物の溶液に加えて、4凍結脱気サイクルに供し、かつその後70℃で攪拌する。数時間後、式1107の対応するポリマー産物を低級アルカノールの添加により沈殿させ、それに続いて溶媒除去する。ここで R^3 は、NH-保護基（例えば、 R^4 で環化される）であり、保護基はこの箇所では除去される。

40

【0200】

反応式11、工程6において説明されるように、式101'の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドをpH8.0緩衝液に加え、かつ過剰（mの値に対応する）の式1108のジオキソピロリジンと攪拌しながら接触させる。1時間後、未反応の式1108を除去し、かつ得られる式1109の産物はさらに精製せずに使用される。

50

【0201】

反応式11、工程7において説明されるように、式1107の産物をpH8.0緩衝液に加え、そして式1109の産物に加える。2時間攪拌後、過剰の式1107を除去し、式1mの対応する異性体産物を得る。

【0202】

工程5において式1105の産物をN-(2,4,5-トリヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)メタクリルアミドに置換し、かつ工程6および7を続行することにより、Z”がC2でコンジュゲートされたN-アセチルガラクトサミンである式1mの対応する異性体産物が得られる。

【0203】

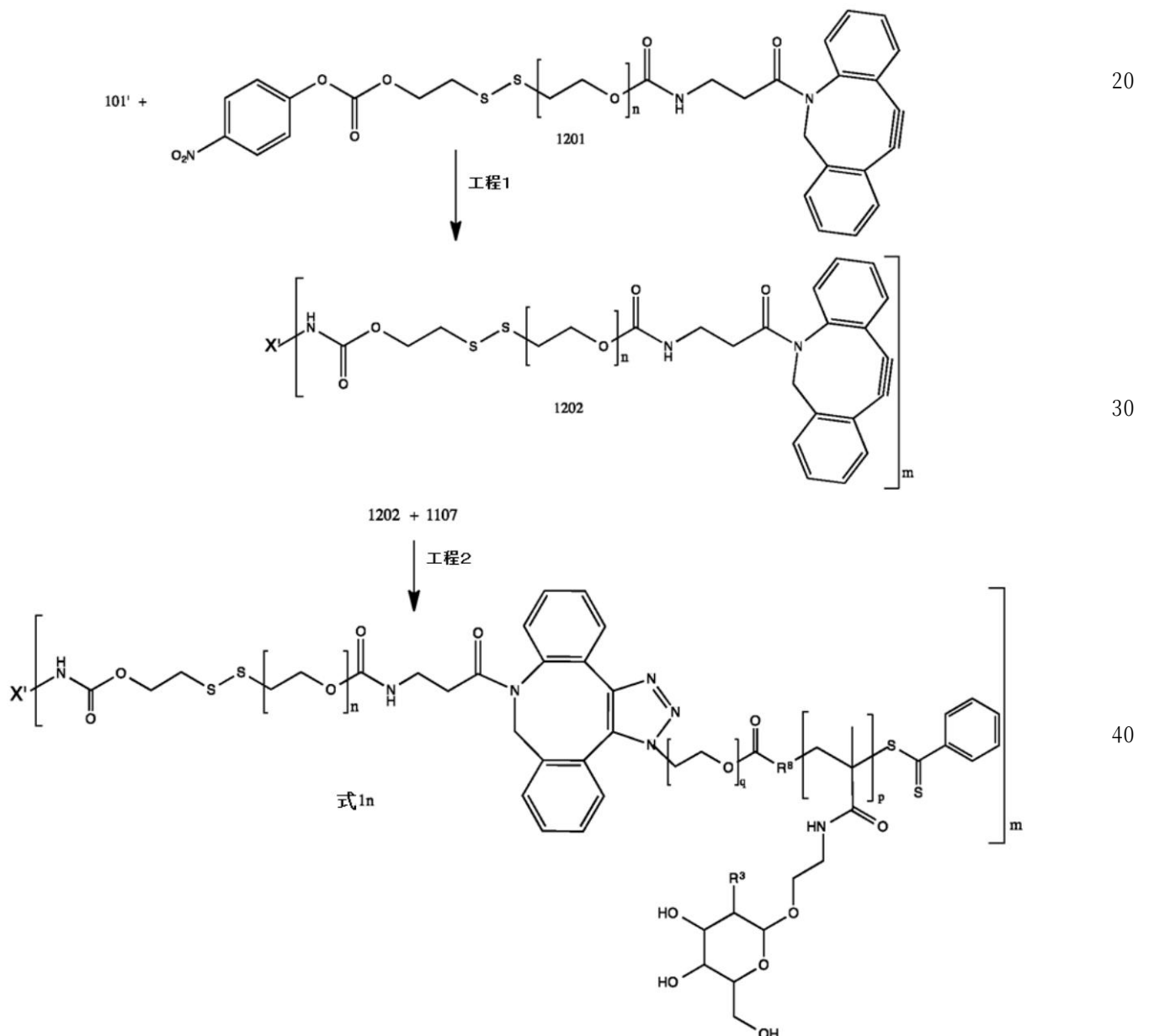
式1mに対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

“F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”、ここでZ”は1GAL、1NGALもしくは1NAGAL、または“F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAGAL”である。

【0204】

反応式12

【化67】



【0205】

反応式 1 2 の合成アプローチは、有機溶媒の使用のために疎水性の抗原、抗体、抗体フラグメントおよびリガンド（例えば、インスリン）に特に適切である。

【0206】

反応式 1 2、工程 1 において説明されるように、式 1 0 1 ' の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、トリエチルアミンを含有する有機溶媒（例えば、DMF）において溶解する。これに、式 1 2 0 1 の化合物の量（m の値に対応する）を加え、それに続いて攪拌および t-ブチルメチルエーテルを加える。式 1 2 0 2 の対応産物を沈殿物として回収する。

【0207】

式 1 2 0 2 の産物を有機溶媒において再懸濁し、かつ式 1 1 0 7（例えば、反応式 1 1 10 に関して記載されるように得られる）の量（m の値に対応する）を加え、それに続いて攪拌する。当該反応産物をジクロロメタンの添加を介して沈殿させ、それに続いて濾過および溶媒除去した。精製（例えば、PBS における再懸濁、それに続く遠心性サイズ排除クロマトグラフィー）は、式 1 n の対応する異性体産物を得る。

【0208】

式 1 n に対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

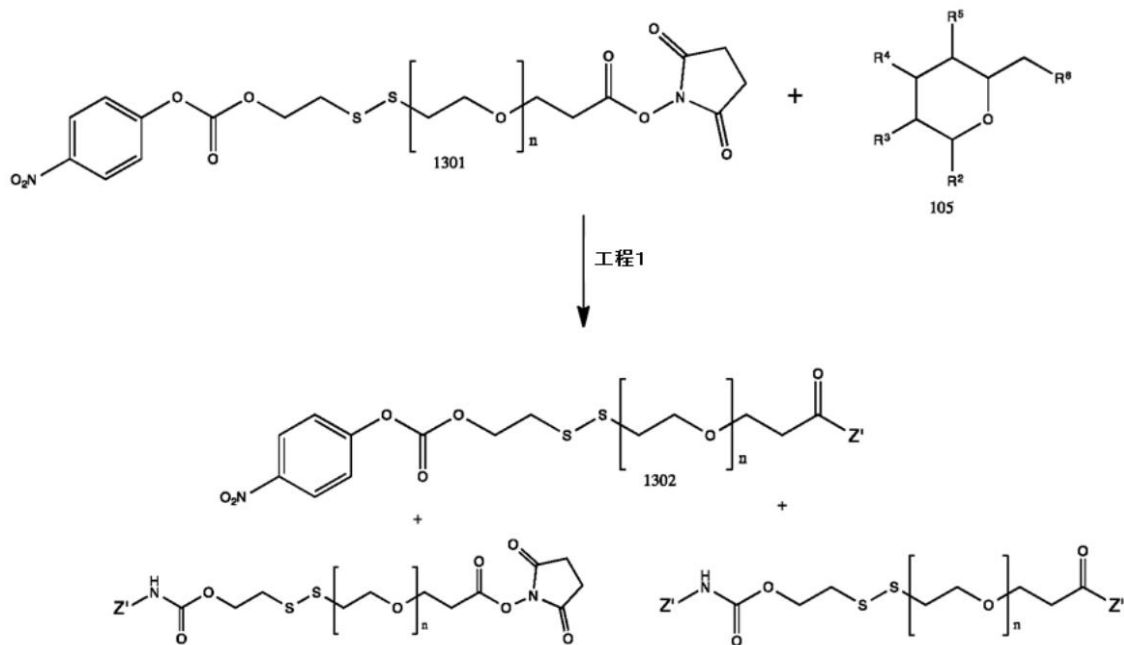
“ F 1 n - X ' - m_m - n_n - p_p - q_q - E t A c N - Z ”、ここで Z “ は 1 G A L、1 N G A L もしくは 1 N A c G A L、または ” F 1 m - X ' - n_m - n_n - p_p - q_q - 2 N A c G A L ” である。

【0209】

反応式 1 3

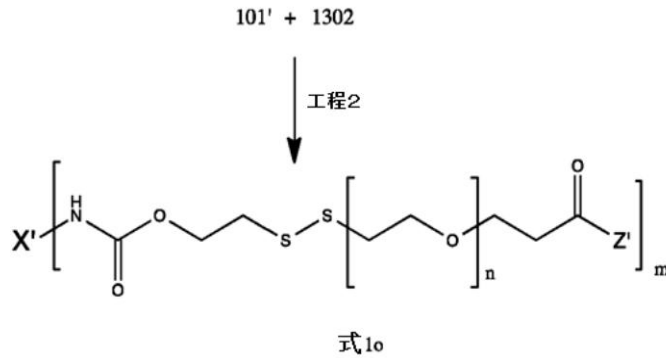
【0210】

【化 6 8】



【0211】

【化 6 9】



10

【0 2 1 2】

反応式 1 3、工程 1 において、ニトロフェノキシカルボニル－オキシアルキルジチオール－ポリ（エチレングリコール）－NH S エステル（式 1 3 0 1）を、ガラクトース、ガラクトサミンまたは N－アセチルガラクトサミン（式 1 0 5）と接触させて、他の 2 つの説明される産物と一緒に、式 1 3 0 2 の対応産物を与え、ここから式 1 3 0 2 の望ましいニトロフェノキシカルボニルジチオール－ポリ（エチレングリコール）－カルボキシエチルガラクトース、ガラクトサミンまたは N－アセチルガラクトサミンが次の工程に進む前に単離される。

【0 2 1 3】

20

反応式 1 3、工程 2 において説明されるように、式 1 0 1' の天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンドを、過剰（m の値に対応する）の式 1 3 0 2 の産物と接触させて式 1 0 による対応産物を得る。

【0 2 1 4】

式 1 0 に対応する組成物は、以下の通り式 1 0 に対応する組成物は、以下の通り命名される：

“ F 1 0 - X' - m_m - n_n - Z' ”。

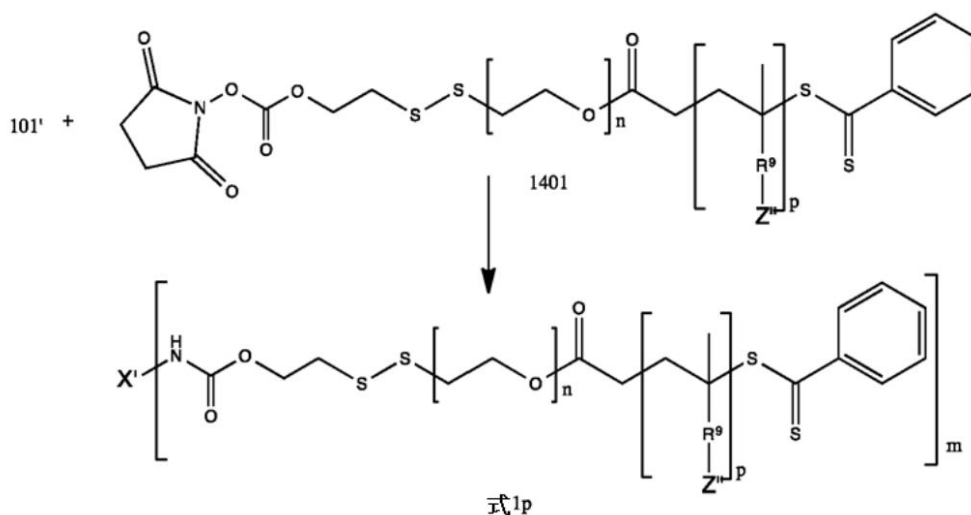
【0 2 1 5】

反応式 1 4

【0 2 1 6】

30

【化 7 0】



40

【0 2 1 7】

反応式 1 4 において説明されるように、天然型の遊離表面アミノ基を有する抗原、抗体、抗体フラグメントまたはリガンド（式 1 0 1'）を、過剰（m の値に対応する）の式 1 4 0 1 のピリジルジチオール－ポリ（エチレングリコール）－NH S エステルと接触させて式 1 p による対応産物を得る。

50

【0218】

式1pに対応する組成物は、以下の通り命名されうる：

“ F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NACGAL ” または “ F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z ”。

【0219】

融合タンパク質の調製

【0220】

商業的に入手可能な哺乳類の、細菌性の、酵母の、もしくは昆虫の細胞発現ベクター、ならびに公開されている、発見されている、もしくは設計されている遺伝子配列を使って、人工的に許容される方法論を介して、式2の融合タンパク質組成物を発現させることができる。タグ配列と共にX、YおよびZをコードする配列を、発現ベクターに、例えば、哺乳類の発現ベクターpSecTag Aにクローニングすることができ、ここで、融合タンパク質はC末端からIgκ鎖分泌リーダー配列に挿入される。部位特異的突然変異誘発法およびQuickChangeプロトコル(Geiser, et al.)のバリエーションを含む様々な他のクローニング技術は利用でき、かつ当業者によく知られている。哺乳類細胞において[例えば、ヒト胚腎臓(HEK293)細胞またはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において]、ポリエチレンジオキサンを使って上記に記載されるベクターでの一過性の遺伝子導入により融合タンパク質を一過性に発現することができる。例えば、約7日間バルプロ酸またはDMSOが補充される適切な培地(例えば、FreeStyle 293培地、ライフ・テクノロジーズ)において、遺伝子導入細胞を培養し、その後、当該細胞を遠心分離により除去し、かつ培養上清を収集し、かつ濾過により無菌化する。

【0221】

あるいは、安定に遺伝子導入された哺乳類の細胞系統を作製することにより、融合タンパク質を安定に発現することができる。加えて、適合性の培地(例えばLB、2XYT、SOB、SOC、TBおよび他の培地(broth))、補充物(例えばグリセリン、グルコース、および他の補充物)ならびに適切な増殖および発現条件を使うことによって、大腸菌、コリネバクテリウム属、またはシュドモナス・フルオレッセンスなどの細菌において融合タンパク質を産生するために発現ベクターを使用することができる。酵母における発現系は、一般にサッカロマイセス・セレビシエおよびピキア・パストリス、またはサッカロマイセス属、ピキア属、クリベロマイセス属、およびヤロウイア属の他の生物、ならびにあまり一般には使用されない、例えば糸状菌アスペルギルス、トリコデルマ、もしくはミセリオフトラサーモフィラC1などの生物を使用することができる。昆虫発現系は、バキュロウイルス感染昆虫細胞または非溶解性昆虫細胞発現を利用して、高い量でタンパク質発現レベルを達成することができ；ほとんどの一般的な昆虫細胞はSf9およびSf21(スポドプテラ・フルギペルダ由来)、Hi-5(イラクサギンウワバ由来)、ならびにシュナイダー2および3(キイロショウジョウバエ由来)を含むが、これらに限定されない。

【0222】

アフィニティークロマトグラフィーにより(例えば、HisTrap Ni²⁺セファロースカラム、GEヘルスケア、Hisタグ融合タンパク質用を使って)培養上清から、発現融合タンパク質産物を精製することができ、それに続いて、サイズ排除クロマトグラフィー(例えば、Superdex 75カラム、GEヘルスケアを使って)またはイオン交換クロマトグラフィーなどの他のクロマトグラフィーの精製工程を行う。例えば、SDS-PAGEゲルのクマシーブリリアントブルー染色およびウェスタンブロッティング(例えばHisタグ融合タンパク質用抗6xHisタグウェスタンブロッティング)により、タンパク質純度を検証することができる。タンパク質濃度をランベルト・ベールの法則を使って決定することができ、それは例えば、NanoDrop 2000(Thermo Scientific)を使って280nmでの吸光度を測定することができる。例えば、EXPASY ProtParam ツールを使ってタンパク質のアミノ酸配列が

ら、分子量および吸光係数を推定することができる。例えば、HEK-Blue TLR 4 レポーター細胞系統 (InvivoGen) を使って、製造元の指示書に従ってエンドトキシンレベルを測定することができる。

【0223】

脱シアル化抗原、抗体、抗体フラグメントおよびリガンドの調製

【0224】

商業的に入手可能なノイラミニダーゼ (アセチルノイラミニルヒドロラーゼまたはシアリダーゼとしてもよく知られている) 酵素または硫酸を使って、人工的に許容される方法論を介して脱シアル化タンパク質を産生させることができる。目的のタンパク質の酵素的脱シアル化について、当該タンパク質をノイラミニダーゼと共に 37℃ で 1 時間、または必要に応じてそれより長くインキュベートすることができる。酸加水分解による化学的脱シアル化について、目的のタンパク質を硫酸 0.025 N で、80℃ で 1 時間または必要に応じてそれより長く処理することができる。その後、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーにより (例えば、HisTrap Ni²⁺ セファロースカラム、GEヘルスケアを使って) 反応混合物から脱シアル化タンパク質を精製することができ、それに続いてサイズ排除クロマトグラフィー (例えば、Superdex 75 カラム、GEヘルスケアを使って) を行う。例えば、SDS-PAGE ゲルのクマシーブリリアントブルー染色および抗 6xHis タグウェスタンブロットティングにより、タンパク質純度を検証することができる。例えば商業的に入手可能なキット (例えばアブカム、プロザイム、またはシグマ) を使って、レクチンに基づくタンパク質の検出、ウェスタンブロットにおけるシアル酸含量またはシアル酸含量の比色定量により、脱シアル化を検証することができる。脱シアル化タンパク質濃度をランベルト・ベールの法則を使って決定することができ、それは例えば、NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) を使って 280 nm での吸光度を測定することができる。例えば、ExPASy ProtParam ツールを使ってタンパク質のアミノ酸配列から、分子量および吸光係数を推定することができる。例えば、HEK-Blue TLR 4 レポーター細胞系統 (InvivoGen) を使って、製造元の指示書に従ってエンドトキシンレベルを測定することができる。

【0225】

特定のプロセスおよび最終工程

【0226】

式 103' の化合物を、過剰 (m の値に対応する) の式 106 の化合物と接触させて式 1a の対応産物を与える。

【0227】

式 103' の化合物を、過剰 (m の値に対応する) の式 201 の化合物と接触させて式 1b の対応産物を与える。

【0228】

式 802 の化合物、902 または 1002 を、過剰 (m の値に対応する) の式 803 の化合物と接触させてそれぞれ式 1h、式 1i または式 1k の対応産物を与える。

【0229】

式 1109 の化合物を、過剰 (m の値に対応する) の式 1107 の化合物と接触させて式 1m の対応産物を与え、特には、ここで、n は約 80 であり、p は約 30 であり、q は約 4 であり、かつ抗原の機能である m は約 2 から 10 である。

【0230】

式 1202 の化合物を、過剰 (m の値に対応する) の式 1107 の化合物と接触させて式 1n の対応産物を与え、特には、ここで n は約 1 であり、p は約 30 であり、q は約 4 であり、かつ抗原の機能である m 約 2 から 10 である。

【0231】

特定の組成物

【0232】

非限定例として、当該組成物、医薬品製剤、製造方法および本開示の使用のための好ましい特定の基は、式1の置換基群の以下の組み合わせおよび並べ替えである（それぞれ、優先の増加順にサブグループ化される）：

- ・ Xは、移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原、患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性抗原、患者が望ましくない免疫応答を発症する治療用のタンパク質、患者が望ましくない免疫応答を発症する自己抗原、またはそれらの免疫寛容誘導部分である。

- ・ Xは、以下から選択される患者が望ましくない免疫応答を発症する治療用のタンパク質である：アバタセプト、アブシキシマブ、アダリムマブ、アデノシンデアミナーゼ、アドートラスツズマブエムタンシン、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスロイキン、アルグルセラゼ、アルグルコシダーゼアルファ、 α -1-プロテアーゼ阻害剤、アナキンラ、アニストレプラーゼ（アニソイル化プラスミノーゲンストレプトキナーゼ活性化複合体）、アンチトロンビン I I I、抗胸腺細胞グロブリン、アルテプラーゼ、ベバシズマブ、ビバリルジン、ボツリヌス毒素A型、ボツリヌス毒素B型、C1エステラーゼ阻害剤、カナキヌマブ、カルボキシペプチダーゼG2（グルカルピダーゼおよびVoraxaze）、セルトリズマブ ペゴル、セツキシマブ、コラゲナーゼ、マムシ類（Crotalidae）免疫Fab、ダルベポエチン- α 、デノスマブ、ジゴキシン免疫Fab、ドルナーゼアルファ、エクリズマブ、エタネルセプト、活性化第V I I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X I因子、第X I I I因子、フィブリノーゲン、フィルグラスチム、ガルスルファーゼ、ゴリムマブ、酢酸ヒストレリン、ヒアルロニダーゼ、イデュルスルファーゼ、イミグルセラゼ、インフリキシマブ、インスリン（rHu インスリンおよびウシインスリンを含む）、インターフェロン- α 2a、インターフェロン- α 2b、インターフェロン- β 1a、インターフェロン- β 1b、インターフェロン- γ 1b、イピリムマブ、L-アルギナーゼ、L-アスパラギナーゼ、L-メチオニナーゼ（methionase）、ラクターゼ、ラロニダーゼ、レピルジン／ヒルジン、メカセルミン、メカセルミンリンファバート、メトキシオファツムマブ、ナタリズマブ、オクトレオチド、オプレルベキン、膵臓アミラーゼ、膵臓リパーゼ、パパイン、Peg-アスパラギナーゼ、Peg-ドキシソルビシン H C 1、PEG-エポエチン- β 、ペグフィルグラスチム、Peg-インターフェロン- α 2a、Peg-インターフェロン- α 2b、ペグロチカーゼ、ペグビソマント、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）、プロテインC、ラスブリカーゼ（ウリカーゼ）、サクロシダーゼ、サケカルシトニン、サルグラモスチム、ストレプトキナーゼ、テネクテプラーゼ、テリパラチド、トシリズマブ（アトリズマブ）、トラスツズマブ、1型アルファ-インターフェロン、ウステキヌマブ、およびvW因子。

- ・ 特にXはアブシキシマブ、アダリムマブ、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスロイキン、アルグルコシダーゼアルファ、第V I I I因子、第I X因子、インフリキシマブ、L-アスパラギナーゼ、ラロニダーゼ、ナタリズマブ、オクトレオチド、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）、またはラスブリカーゼ（ウリカーゼ）である。

- ・ 特にXは第V I I I因子、第I X因子、ウリカーゼ、PALまたはアスパラギナーゼである。

- ・ Xは1型糖尿病、小児多発性硬化症、若年性関節リウマチ、セリアック病、または全身性脱毛症を治療するために選択される自己抗原ポリペプチドである。

- ・ 特にXは新規発症1型糖尿病、小児多発性硬化症またはセリアック病を治療するために選択される自己抗原ポリペプチドである。

- ・ Xは患者が望ましくない免疫応答を発症する以下の外来性抗原である。

- ・ ピーナッツ由来のもの、コンアラキン（Arah 1）を含む。

- ・ コムギ由来のもので、天然型アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：24）、脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）、アルファグリアジン（配列番号：26）およびオメガグリアジン（配列番号：27）を

10

20

30

40

50

含む。

- ・ ネコ由来のもの、F e l d 1 A (U N I P R O T P 3 0 4 3 8) およびネコアルブミン (U N I P R O T P 4 9 0 6 4) を含む。

- ・ イヌ由来のもの、C a n f 1 (U N I P R O T O 1 8 8 7 3) およびイヌアルブミン (U N I P R O T P 4 9 8 2 2) を含む。

- ・ Xは移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原、例えばヒト白血球抗原タンパク質である。

- ・ Xは循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドであり、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、および／またはアレルギーを生じさせる。

- ・ 特にXは内在性の循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に結合する。

- ・ Yは以下から選択されるリンカーである：式Y a、式Y b、式Y h、式Y i、式Y k、式Y m、式Y n、式Y oおよび式Y p。

- ・ 特には、ここで、nは8から90±10%であり、pは20から100±10%であり、かつqは3から20±3である。

- ・ 特には、ここで、nは40から80±10%であり、pは30から40±10%であり、かつqは4から12±3である。

- ・ 特には、ここで、Yは式Y a、式Y b、式Y mまたは式Y nである。

- ・ 特には、ここで、nは8から90±10%であり、pは20から100±10%であり、かつqは3から20±3である。

- ・ より特には、ここで、nは40から80±10%であり、pは30から40±10%であり、かつqは4から12±3である。

- ・ 特には、ここで、Zはエチルアセトアミド基を介してYにコンジュゲートされる。

- ・ より特には、ここで、ZはそのC 1でYにコンジュゲートされる。

- ・ より特には、ここで、R⁸はCMPである。

- ・ より特には、ここで、R⁸はCMPである。

- ・ 特には、ここで、R⁸はCMPである。

- ・ Zはガラクトース、ガラクトサミンまたはN-アセチルガラクトサミンである。

- ・ 特には、ここで、ZはC 1、C 2またはC 6でコンジュゲートされたガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンである。

- ・ 特には、ここで、ZはC 1またはC 2でコンジュゲートされたガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミンである。

- ・ より特には、ここで、ZはC 1でコンジュゲートされたN-アセチルガラクトサミンである。

【0233】

上記に記載される群およびサブグループのそれぞれは個々に好ましく、かつさらに好ましい本開示の態様を記載するために組み合わせることができ、例えば限定するものではないが、以下の通りである：

- ・ Xは1型糖尿病、小児多発性硬化症、若年性関節リウマチ、セリアック病、または全身性脱毛症を治療するために選択される自己抗原ポリペプチドである。

- ・ 特に、ここで、Xは新規発症1型糖尿病、小児多発性硬化症またはセリアック病を治療するために選択される自己抗原ポリペプチドである。

- ・ 特には、ここで、Yは以下から選択されるリンカーである：式Y a、式Y b、式Y h、式Y i、式Y k、式Y m、式Y n、式Y oおよび式Y p。

- ・ 特には、ここで、nは8から90±10%であり、pは20から100±10%であり、かつqは3から20±3である。

- ・ 特には、ここで、nは40から80±10%であり、pは30から40±10

10

20

30

40

50

%であり、かつ q は 4 から 12 ± 3 である。

- ・ 特には、ここで、 Y は式 Y_a 、式 Y_b 、式 Y_m または式 Y_n である。
- ・ 特には、ここで、 n は 8 から $90 \pm 10\%$ であり、 p は 20 から $100 \pm 10\%$ であり、かつ q は 3 から 20 ± 3 である。
- ・ より特には、ここで、 n は 40 から $80 \pm 10\%$ であり、 p は 30 から $40 \pm 10\%$ であり、かつ q は 4 から 12 ± 3 である。
- ・ さらにより特には、ここで、 Z はエチルアセトアミド基を介して Y にコンジュゲートされる。
- ・ より特には、ここで、 Z はエチルアセトアミド基を介して Y にコンジュゲートされる。
- ・ 特には、ここで、 Z はエチルアセトアミド基を介して Y にコンジュゲートされる。
- ・ 特には、ここで、 Z はガラクトース、ガラクトサミンまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ 特には、ここで、 Z は C_1 、 C_2 または C_6 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ より特には、ここで、 Z は C_1 または C_2 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ さらにより特には、ここで、 Z は C_1 でコンジュゲートされた N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ 特には、ここで、 Z はガラクトース、ガラクトサミンまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ 特には、ここで、 Z は C_1 、 C_2 または C_6 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ 特には、ここで、 Z は C_1 または C_2 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ より特には、ここで、 Z は C_1 でコンジュゲートされた N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ 特には、ここで、 Y は以下から選択されるリンカーである：式 Y_a 、式 Y_b 、式 Y_h 、式 Y_i 、式 Y_k 、式 Y_m 、式 Y_n 、式 Y_o および式 Y_p 。
- ・ 特には、ここで、 n は 8 から $90 \pm 10\%$ であり、 p は 20 から $100 \pm 10\%$ であり、かつ q は 3 から 20 ± 3 である。
- ・ より特には、ここで、 n は 40 から $80 \pm 10\%$ であり、 p は 30 から $40 \pm 10\%$ であり、かつ q は 4 から 12 ± 3 である。
- ・ 特には、ここで、 Y は式 Y_a 、式 Y_b 、式 Y_m または式 Y_n である。
- ・ より特には、ここで、 n は 8 から $90 \pm 10\%$ であり、 p は 20 から $100 \pm 10\%$ であり、かつ q は 3 から 20 ± 3 である。
- ・ より好ましくは、ここで、 n は 40 から $80 \pm 10\%$ であり、 p は 30 から $40 \pm 10\%$ であり、かつ q は 4 から 12 ± 3 である。
- ・ より特には、ここで、 Z はエチルアセトアミド基を介して Y にコンジュゲートされる。
- ・ 特には、ここで、 Z はガラクトース、ガラクトサミンまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ 特には、ここで、 Z は C_1 、 C_2 または C_6 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ より特には、ここで、 Z は C_1 または C_2 でコンジュゲートされたガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ より好ましくは、ここで Z は C_1 でコンジュゲートされた N -アセチルガラクトサミンである。
- ・ m は約 1 から 100 の整数である。

10

20

30

40

50

- ・ mは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または110である。
- ・ 特にmは約1から20である。
- ・ mは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22である。
- ・ より特には、mは約10である。
- ・ mは9、10または11である。
- ・ nは約1から100を含む混合物を表す整数である。
- ・ nは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または110である。 10
- ・ 特には、nは約8から90である。
- ・ 特には、nは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または99である。
- ・ より特には、nは約40から80である。
- ・ より特には、nは37、40、41、45、50、54、55、59、60、65、70、75、80、82、83または88である。 20
- ・ nは範囲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および107-113を包含する混合物を表す。
- ・ 特には、nは範囲7-13、6-14、15-25、26-30、42-50、46-57、60-82、85-90および82-99を包含する混合物を表す。
- ・ より特には、nは範囲36-44、42-50、46-57、60-82および75-85を包含する混合物を表す。
- ・ pは約2から150を含む混合物を表す整数である。
- ・ pは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または165である。 30
- ・ 特には、ここで、nは約1から100を含む混合物を表す整数である。
- ・ 特には、nは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または110である。
- ・ より特には、ここで、nは約8から90である。
- ・ より特には、nは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または99である。 40
- ・ さらにより特には、ここで、nは約40から80である。
- ・ さらにより特には、nは37、40、41、45、50、54、55、59、60、65、70、75、80、82、83または88である。
- ・ より特には、pは18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100または110である。
- ・ 特には、ここで、nは約1から100を含む混合物を表す整数である。
- ・ 特には、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 50

、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または110である。

・ より特には、ここで、nは約8から90である。

・ より特には、nは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または99である。

・ さらにより特には、ここで、nは約40から80である。

・ さらにより特には、nは37、40、41、45、50、54、55、59、60、65、70、75、80、82、83または88である。

・ より特には、pは27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、または44である。

・ 特には、ここで、nは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または110である。

・ より特には、ここで、nは約8から90である。

・ より特には、nは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または99である。

・ さらにより特には、ここで、nは約40から80である。

・ さらにより特には、nは37、40、41、45、50、54、55、59、60、65、70、75、80、82、83または88である。

・ qは約1から44を含む混合物を表す整数である。

・ qは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または48である。

。

【0234】

非限定例として、当該組成物、医薬品製剤、製造方法および本開示の使用のための好ましい特定の基は、式2の置換基群の以下の組み合わせ、および並べ替えである（それぞれ、優先の増加順にサブグループ化される）：

・ Xは、以下から選択される、患者が望ましくない免疫応答を発症する治療用のタンパク質である：アバタセプト、アブキシマブ、アダリムマブ、アデノシンデアミナーゼ、アドートラスツズマブエムタンシン、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスロイキン、アルグルセラーゼ、アルグルコシダーゼアルファ、 α -1-プロテアーゼ阻害剤、アナキンラ、アニストレプラーゼ（アニソイル化プラスミノージェンストレプトキナーゼ活性化複合体）、アンチトロニン I I I、抗胸腺細胞グロブリン、アルテプラーゼ、ベバシズマブ、ビバリルジン、ボツリヌス毒素A型、ボツリヌス毒素B型、C1エステラーゼ阻害剤、カナキマブ、カルボキシペプチダーゼG2（グルカルピダーゼおよびVoraxaze）、セルトリズマブ ペゴル、セツキシマブ、コラゲナーゼ、マムシ類（Crotalidae）免疫Fab、ダルベポエチン α 、デノスマブ、ジゴキシン免疫Fab、ドルナーゼアルファ、エクリズマブ、エタネルセプト、活性化第V I I因子、第V I I I因子、第I X因子、第X I因子、第X I I I因子、フィブリノーゲン、フィルグラスチム、ガルスルファラーゼ、ゴリムマブ、酢酸ヒストレリン、ヒアルロニダーゼ、イデュルスルファラーゼ、イミグルセラーゼ、インフリキシマブ、インスリン、インターフェロン α 2a、インターフェロン α 2b、インターフェロン β 1a、インターフェロン β 1b、インターフェロン γ 1b、イピリムマブ、L-アルギナーゼ、L-アスパラギナーゼ、L-メチオニナーゼ（methionase）、ラクターゼ、

10

20

30

40

50

ラロニダーゼ、レピルジン／ヒルジン、メカセルミン、メカセルミンリンファパート、メトキシオファツムマブ、ナタリズマブ、オクトレオチド、オブレルベキン、膵臓アミラーゼ、膵臓リパーゼ、パパイン、P e g－アスパラギナーゼ、P e g－ドキシソルビシン H C l、P E G－エポエチン－ β 、ペグフィルグラスチム、P e g－インターフェロン－ α 2 a、P e g－インターフェロン－ α 2 b、ペグロチカーゼ、ペグビソマント、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (P A L)、プロテイン C、ラスブリカーゼ (ウリカーゼ)、サクロシダーゼ、サケカルシトニン、サルグラモスチム、ストレプトキナーゼ、テネクテプラーゼ、テリパラチド、トシリズマブ (アトリズマブ)、トラスツズマブ、1 型アルファ－インターフェロン、ウステキヌマブ、および v W 因子； $m' + m''$ が 1 に等しく、かつ Z が D O M 2 6 h－1 9 6－6 1 または米国第 2 0 1 3 / 0 0 7 8 2 1 6 号に記載される別の肝臓標的化分子である場合、インターフェロン (インターフェロンアルファ 2、インターフェロンアルファ 5、インターフェロンアルファ 6、またはコンセンサスインターフェロン)、リバビリン、ネクスバール／ソラフェニブ、アービタックス／セツキシマブ、アバスタチン／ベバシズマブ、およびハーセプチン／トラスツズマブが式 2 の範囲から除外されるということを条件とする。

- ・ 特に X はアブシキシマブ、アダリムマブ、アガルシダーゼアルファ、アガルシダーゼベータ、アルデスロイキン、アルグルコシダーゼアルファ、第 V I I I 因子、第 I X 因子、インフリキシマブ、L－アスパラギナーゼ、ラロニダーゼ、ナタリズマブ、オクトレオチド、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (P A L)、またはラスブリカーゼ (ウリカーゼである)。

- ・ 特に、ここで、X は第 V I I I 因子、第 I X 因子、ウリカーゼ、P A L またはアスパラギナーゼである。

- ・ X は 1 型糖尿病、小児多発性硬化症、若年性関節リウマチ、セリアック病、または全身性脱毛症を治療するために選択される自己抗原ポリペプチドである。

- ・ 特に、ここで、X は新規発症 1 型糖尿病、小児多発性硬化症またはセリアック病を治療するために選択される自己抗原ポリペプチドである。

- ・ X は患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性抗原である

- ・ ピーナッツ由来のもの、コンアラキン (A r a h 1) を含む。

- ・ コムギ由来のもの、天然型アルファグリアジン “ 3 3－m e r ” (配列番号：2 4)、脱アミド化アルファグリアジン “ 3 3－m e r ” (配列番号：2 5)、アルファグリアジン (配列番号：2 6) およびオメガグリアジン (配列番号：2 7) を含む。

- ・ ネコ由来のもの、F e l d 1 A (U N I P R O T P 3 0 4 3 8) およびネコアルブミン (U N I P R O T P 4 9 0 6 4) を含む。

- ・ イヌ由来のもの、C a n f 1 (U N I P R O T O 1 8 8 7 3) およびイヌアルブミン (U N I P R O T P 4 9 8 2 2) を含む。

- ・ X は移植患者が望ましくない免疫応答を発症する外来性の移植抗原、例えばヒト白血球抗原タンパク質である。

- ・ X は循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に特異的に結合する、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドであり、当該循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体は、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、および／またはアレルギーを生じさせる。

- ・ 特に、ここで、X は内在性の循環タンパク質もしくはペプチドまたは抗体に結合する。

- ・ Y は G l y₃ S e r である。

- ・ Z は抗 A S G P R D o m 2 6 h－1 9 6－6 1 または保存的置換である。

- ・ $m' + m''$ は 1 または 2 に等しく、かつ X はタンパク質治療剤を含む完全長タンパク質である。

- ・ $m' + m''$ は 1 または 2 に等しく、ここで、 m' は 1 であり、かつ m'' は 0 または 1 である。

10

20

30

40

50

・ $m' + m''$ は 2 から約 10 に等しく、ここで、X は特定の自己免疫疾患に関連する、または遺伝的に様々な標的集団の治療としてよく知られている自己抗原ペプチド（エピトープ）の基である。

・ $m' + m''$ は約 4 から 7 に等しく、ここで、当該自己免疫疾患は多発性硬化症であり、かつ X は非依存的に以下から選択される：MBP 13-32（配列番号：11）、MBP 83-99（配列番号：12）、MBP 111-129（配列番号：13）、MBP 146-170（配列番号：14）、MOG 1-20（配列番号：15）、MOG 35-55（配列番号：16）および PLP 139-154（配列番号：17）。

・ $m' + m''$ は 7 に等しくかつ、X は、それぞれ、MBP 13-32（配列番号：11）、MBP 83-99（配列番号：12）、MBP 111-129（配列番号：13）、MBP 146-170（配列番号：14）、MOG 1-20（配列番号：15）、MOG 35-55（配列番号：16）および PLP 139-154（配列番号：17）である。

【0235】

式 1 に関する上記の議論と同様に、上記に記載される式 2 についての群およびサブグループのそれぞれは個々に好ましく、かつさらに好ましい本開示の態様を記載するために組み合わせることができる。

【0236】

有用性、試験および投与

【0237】

一般的有用性

【0238】

本開示の組成物は、当業者に理解されるような、移植拒絶、治療薬に対する免疫応答、自己免疫疾患、および食物アレルギーの治療を含む様々な用途での使用を見出す。

【0239】

好ましい実施形態では、本開示の組成物を調節する、特には、抗原特異的な望ましくない免疫応答をダウンレギュレートするために使用する。

【0240】

患者において内在的に生成される抗体（すなわち、患者に投与される外来性でない抗体）、ペプチド等を含む、自己免疫および関連する病変、アレルギー、炎症性免疫応答、ならびにアナフィラキシーを引き起こす、循環特異的な望ましくないタンパク質に結合し、かつクリアランスするのに、本開示の組成物は有用である。

【0241】

本開示において、免疫系を特異的にダウンレギュレートする抗原提示細胞を介する提示のため、または望ましくない循環タンパク質のクリアランスのため、肝臓へ、抗原は標的化される。以前の肝臓標的化の使用、例えば米国第 2013/0078216 号に記載されるものとは、これは別個であり、ここでは、DOM 26h-196-61 などの肝臓標的化分子の目的は、線維症、肝炎、硬変および肝臓癌などの肝疾患を治療する治療薬の送達であった。

【0242】

本開示は、限定されないが、以下を含む、自己抗原および外来性抗原への望ましくない免疫応答を治療する組成物および方法を提供する：移植患者が望ましくない免疫応答（例えば、移植拒絶）を発症する外来性の移植抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、アレルギー性または過敏症）を発症する外来性抗原、患者が望ましくない免疫応答（例えば、過敏症および／または減少治療活性）を発症する治療薬、患者が望ましくない免疫応答（例えば、自己免疫疾患）を発症する自己抗原。

【0243】

本明細書で提供される方法および組成物を使って治療することができる自己免疫疾患状態は以下を含むが、これらに限定されない：急性散在性脳脊髄炎（ADEM）；急性間質性アレルギー性腎炎（薬物アレルギー）；急性壊死性出血性白質脳炎；アジソン病；円形

10

20

30

40

50

脱毛症；全身性脱毛症；強直性脊椎炎；若年性関節炎；乾癬性関節炎；リウマチ性関節炎；アトピー性皮膚炎；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性胃炎；自己免疫性肝炎；自己免疫性下垂体炎；自己免疫性卵巣炎；自己免疫性精巣炎；多腺性自己免疫症候群1型；多腺性自己免疫症候群2型；自己免疫性甲状腺炎；ベーチェット病；閉塞性細気管支炎；水疱性類天疱瘡；セリアック病；チャグ・スト劳斯症候群；慢性炎症性脱髄性多発神経炎；癬痕性類天疱瘡；クローン病；コクサッキー心筋炎；ジューリング疱疹状皮膚炎；糖尿病（1型）；結節性紅斑；後天性表皮水疱症、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）；巨細胞性心筋炎；グッドパスチャー症候群；グレープス病；ギラン・バレー症候群；橋本脳症；橋本甲状腺炎；IgG4-関連硬化性疾患；ランバート・イートン症候群；混合性結合組織病；ムッハ・ハーベルマン病；多発性硬化症；重症筋無力症；視神経炎；視神経脊髄炎；尋常性天疱瘡およびバリアント型；悪性貧血；下垂体自己免疫疾患；多発性筋炎；心膜切開後症候群；早発卵巣不全；原発性胆汁性肝硬変；原発性硬化性胆管炎；乾癬；リウマチ性心疾患；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス；全身性硬化症；潰瘍性大腸炎；未分化型結合組織病（UCTD）；ぶどう膜炎；白斑；ならびにウェゲナー肉芽腫症。

10

【0244】

本明細書で提供される方法および組成物を使って治療することができる自己免疫疾患状態の特定の群は以下を含むが、これらに限定されない：急性壊死性出血性白質脳炎；アジソン病；乾癬性関節炎；リウマチ性関節炎；自己免疫性再生不良性貧血；自己免疫性下垂体炎；自己免疫性胃炎；多腺性自己免疫症候群1型；水疱性類天疱瘡；セリアック病；コクサッキー心筋炎；ジューリング疱疹状皮膚炎；糖尿病（1型）；後天性表皮水疱症；巨細胞性心筋炎；グッドパスチャー症候群；グレープス病；橋本甲状腺炎；混合性結合組織病；多発性硬化症；重症筋無力症；視神経脊髄炎；悪性貧血；尋常性天疱瘡およびバリアント型；下垂体自己免疫疾患；早発卵巣不全；リウマチ性心疾患；全身性硬化症；シェーグレン症候群；全身性エリテマトーデス；ならびに白斑。

20

【0245】

望ましくない免疫応答を発症する食物抗原などの抗原を利用する実施形態では、例えば：ピーナッツ、リンゴ、乳、卵白、卵黄、カラシナ、セロリ、エビ、コムギ（および他の穀類）、イチゴおよびバナナに対する反応のために治療を提供することができる。

【0246】

望ましくない免疫応答を発症したことがある外来性抗原、および抗原に基づいて開発される本開示の組成物を開示するために患者が試験されうることを、当業者は理解するだろう。

30

【0247】

試験

【0248】

本開示の組成物および方法の有用性を確立するには、肝臓における抗原提示細胞に結合における特異性（特には、肝細胞に結合すること、具体的にはASGPR）が、初期に決定されるべきである。本開示の組成物において、これは、例えば、マーカー（蛍光マーカーフィコエリトリン（“PE”）など）を利用することにより達成されうる。当該組成物を適切な実験対象に投与する。コントロール、例えば、コンジュゲートされていないPE、またはビヒクル（生理食塩水）を、対象の他の群に投与する。組成物およびコントロールを、1から5時間の間循環させ、その後対象の脾臓および肝臓を収集し、かつ蛍光について測定する。蛍光が確認される特定の細胞を引き続いて同定することができる。この様式において試験される場合、本開示の組成物は、コンジュゲートされていないPEまたは媒体と比較して、肝臓の抗原提示細胞において濃度のより高いレベルを示す。

40

【0249】

抗原単独または単なるビヒクルの投与と比較して、オボアルブミン（“OVA”）などの周知抗原を組み込む本開示の組成物の投与への応答において、OT-I CD8⁺細胞（宿主マウスへ移植される）の増殖を測定することにより、免疫調節における有効性を試

50

験することができる。この様式において試験される場合、本開示の組成物は、抗原単独またはビヒクルと比較して、増加したCD8⁺T細胞クロスプライミングを示してOT1細胞増殖の増加を示す。機能的なエフェクター表現型へと増殖されているT細胞を、増殖かつ除去されているものから区別するために、増殖性のOT-I CD8⁺T細胞を、消耗の分子サイン[programmed death-1 (PD-1)、FasL、およびその他など]、並びにアポトーシス、ひいては除去の特徴としてのアネキシンVについて、表現型的に分析することができる。OT-I CD8⁺T細胞はまた、機能的な非応答性、ひいては抗原への免疫寛容を実証するために、アジュバントを有する抗原チャレンジへのそれらの応答性について評価することができる。そうするために、本開示の組成物の宿主マウスへの投与それに続く抗原チャレンジ後に細胞を、炎症性のサインについて分析する。この様式において試験される場合、本開示の組成物は、非常に低（例えば、バックグラウンド）レベルのOVAへの炎症性のOT-I CD8⁺T細胞応答、ひいては免疫寛容を示すことを実証する。

10

【0250】

抗原単独または単なるビヒクルの投与と比較して、OVAなどの周知抗原を組み込む本開示の組成物を投与すること、および得られる抗体のレベルを測定することにより、体液性免疫応答を試験することができる。この様式において試験される場合、本開示の組成物は、それらの投与およびビヒクルの投与に応答する非常に低（例えば、バックグラウンド）レベルの抗体形成、および抗原の投与に応答する有意により高いレベルの抗体形成を示す。

20

【0251】

抗原に対する寛容化における有効性を、体液性免疫応答に関して上記のように試験することができる。ここで、本開示の組成物での治療後数週間、対象の群を抗原単独の投与によりチャレンジし、それに続いて抗原に対する抗体のレベルを測定した。この様式において試験される場合、前処理されていない群と比較して、かかる組成物で前処理されている群において、本開示の組成物は抗原のチャレンジに応答する低レベルの抗体形成を示す。

【0252】

疾病に焦点をあてる実験モデルは当業者よく知られており、かつ、自己免疫および寛容のNOD（または非肥満性糖尿病）マウスモデルならびにヒト炎症性脱髄疾患、多発性硬化症のためのEAE（実験的自己免疫性脳脊髄炎）モデルを含む。特には、NODマウスは、自発性の自己免疫性糖尿病（ヒトにおける1a型糖尿病と同様）を発症する。NODマウスの群を、試験化合物または陰性コントロールで治療し、それに続いて血糖を測定する。治療の成功は、ヒトにおいて糖尿病を治療する可能性、または他の自己免疫疾患の治療へのアプローチのための機構の証明に対応する。（例えば、Anderson and Bluestone, Annu. Rev. Immunol. 2005; 23: 447-85を参照されたい。）

30

【0253】

投与

【0254】

本開示の組成物を、治療的に有効な薬用量、例えば、以前に記載される疾病状態のための治療を提供するために十分な薬用量で投与する。本開示の化合物または薬学的に許容可能なその塩の投与は、同様の有用性果たす薬のための任意の許容される投与様式を介することができる。

40

【0255】

ヒト薬用量レベルは未だ、本開示の化合物について最適化されていないが、これらは最初、マウスについて投与された約10 μgから100 μgの用量と推定することができる。一般に、個々のヒト用量は、約0.01から2.0 mg/kg 体重、好ましくは約0.1から1.5 mg/kg 体重、およびもっとも好ましくは約0.3から1.0 mg/kg 体重である。治療を、一日または数日の期間投与することができ、かつ数日の間隔、1もしくは数週間、または1もしくは数ヶ月繰り返すことができる。投与は、単一用量として

50

(例えば、急速投与として) または初期の急速投与としてであり、それに続いて時間とともに例えば、1 から7 日、完全用量の残存部分の連続的な注入でありうる。投与される活性化合物の量はもちろん、以下の任意のまたは全てに依存するだろう: 治療される対象および疾病の状態、苦痛の重症度、投与の様式およびスケジュールならびに処方する医師の判断。それはまた、抗原、抗体、抗体フラグメントもしくはリガンドの分子量並びにリンカーのサイズに依存するであろう投与される量と認識されるだろう。

【0256】

本開示の組成物を単独または他の薬学的に許容可能な賦形剤との組み合わせのいずれかで投与することができる。全ての典型的な投与経路が想定され、それは現在注射に適切な液体薬用量形態を提供することが好ましい。製剤は、従来の医薬品の担体もしくは賦形剤ならびに本開示の組成物もしくは薬学的に許容可能なその塩を典型的に含む。さらに、これらの組成物は、本開示の組成物において利用される抗原(X)に対応する治療用のタンパク質、ペプチド、抗体もしくは抗体様分子、ならびに抗薬酸、免疫抑制剤、細胞増殖抑制剤、有糸分裂阻害剤、および抗代謝物、またはそれらの組み合わせを含む、免疫調節薬として作用することができかつ、より具体的にはB細胞に抑制性効果を有することができる他の活性の薬を含む他の薬用の薬、医薬品の薬、担体等を含むことができるが、これらに限定されない。

【0257】

一般に、意図される投与様式に依存し、薬学的に許容可能な組成物は、本開示の組成物の重量で約0.1%から95%、好ましくは約0.5%から50%を含有し、残りが適切な医薬品の賦形剤、担体等であるだろう。0.005%から95%の範囲において、無毒性担体からなるバランスのとれた活性成分を含有する薬用量形態または組成物を調製することができる。

【0258】

液体薬学的に投与可能な組成物を、例えば、溶解、分散等により調製することができる。本開示の活性の組成物(例えば、凍結乾燥した粉末)および例えば、水(注射用の水)、生理食塩水、水性ブドウ糖、グリセリン、グリコール、エタノール等(ガラクトースを除く)などの担体における任意の医薬品のアジュバントは、それによって溶液または懸濁液を形成する。所望であれば、投与される医薬組成物はまた、微量な量の湿潤剤、乳化剤、安定化剤、可溶化剤、pH緩衝作用剤等、例えば、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミン酢酸およびトリエタノールアミンオレイン酸等、浸透圧調節物質、アミノ酸、糖および炭水化物、タンパク質およびポリマー、塩、界面活性物質、キレート剤および抗酸化剤、保存料、ならびに特異的なリガンドなどの無毒性補助物質を含むことができる。かかる薬用量形態を調製する実際の方法はよく知られており、または当業者に明らかであろう; 例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, 22nd Edition, 2012を参照されたい。投与される組成物または製剤は、任意の事象において、治療される対象の症状を治療するのに有効な量の活性化合物の量を含有するだろう。

【0259】

実施例

以下の実施例は、上記に記載される開示の使用様式をより十分に記載する、並びに様々な本開示の態様を実施するために想定される最上の様式を記載するのに役立つ。決してこれらの実施例は、本開示の真の範囲を限定するものと理解されるべきではなく、むしろ例示の目的で提示される。本明細書に引用される全ての引用文献は、出典明示によりそれらの全体が組み込まれる。

【0260】

実施例1

F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (またはF1a-OVA-m₄-n₈₀-2NGAL)

【0261】

実施例 1 A. X' が OVA であり、かつ m が 4 である式 103'

【0262】

エンドトキシンプリーのチューブにおいて、OVA (5.0 mg、0.00012 mmol) を、5 mM EDTA を含有する 100 μ l の pH 8.0 PBS に加え、攪拌した。別々に、1 mg のトラウト試薬を 100 μ l の pH 7.0 PBS に溶解し、ついで、このようにして得られた 16 μ l (0.00119 mmol) のトラウト試薬溶液を、攪拌を続けて OVA の攪拌溶液に加えた。1 時間後、式 103' の対応産物を得るために遠心性サイズ排除カラムを使って過剰トラウト試薬を除去した。

【0263】

実施例 1 B. n が 80 である式 106 A

10

【0264】

エンドトキシンプリーのチューブにおいて、ガラクトサミン (10.0 mg、0.04638 mmol) を、5 mM EDTA を含有する 100 μ l の pH 8.0 PBS において攪拌しながら溶解させた。100 μ l の pH 7.0 PBS において溶解されるピリジルジチオールポリ (エチレングリコール) - NHS エステル (n が 80 である、式 104) (16.23 mg、0.00464 mmol) を、ガラクトサミンの攪拌溶液に加えた。1 時間後、得られるピリジルジチオールポリ (エチレングリコール) - N-アセチルガラクトサミン (式 106 A) をさらに精製せずに使用するよう準備した。

【0265】

実施例 1 C. X' が OVA であり、m が 4 であり、n が 80 であり (かつ Z' が C2 ガラクトサミンである) 式 1a A

20

【0266】

実施例 1 A において調製される式 103' の精製 OVA-トラウトコンジュゲーション体に、実施例 1 B において調製される式 106 A の攪拌産物を直接加えた。1 時間後、反応混合物を通過させることにより、遠心性サイズ排除カラムから得られる式 1a の産物を精製した。特性評価 (UHPLC SEC、ゲル電気泳動) で産物の正体を確認した。(図 5 を参照されたい。)

【0267】

実施例 1 D. 式 103' の他の化合物

【0268】

30

実施例 1 A に記載される手順に従い、かつ OVA を以下に置換することにより：

- ・ アブシキシマブ、
- ・ アダリムマブ、
- ・ アガルシダーゼアルファ、
- ・ アガルシダーゼベータ、
- ・ アルデスロイキン、
- ・ アルグルコシダーゼアルファ、
- ・ 第 V I I I 因子、
- ・ 第 I X 因子、
- ・ L-アスパラギナーゼ、
- ・ ラロニダーゼ、
- ・ オクトレオチド、
- ・ フェニルアラニンアンモニリアーゼ、
- ・ ラスブリカーゼ、
- ・ インスリン (配列番号：5)、
- ・ GAD-65 (配列番号：6)、
- ・ IGRP (配列番号：7)
- ・ MBP (配列番号：8)、
- ・ MOG (配列番号：9)、
- ・ PLP (配列番号：10)、

40

50

- ・ MBP13-32（配列番号：11）、
 - ・ MBP83-99（配列番号：12）、
 - ・ MBP111-129（配列番号：13）、
 - ・ MBP146-170（配列番号：14）、
 - ・ MOG1-20（配列番号：15）、
 - ・ MOG35-55（配列番号：16）、
 - ・ PLP139-154（配列番号：17）、
 - ・ MART1（配列番号：18）、
 - ・ チロシナーゼ（配列番号：19）、
 - ・ PMEL（配列番号：20）、 10
 - ・ アクアポリン4（配列番号：21）、
 - ・ S-アレスチン（配列番号：22）、
 - ・ IRBP（配列番号：23）、
 - ・ コンアラキン（UNIPROT Q6PSU6）、
 - ・ 天然アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：24）、
 - ・ 脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）、
 - ・ アルファグリアジン（配列番号：26）、
 - ・ オメガグリアジン（配列番号：27）、
 - ・ Feld1A（UNIPROT P30438）、
 - ・ ネコアルブミン（UNIPROT P49064）、 20
 - ・ Canf1（UNIPROT O18873）、
 - ・ イヌアルブミン（UNIPROT P49822）、および
 - ・ RhCE example（UNIPROT P18577）、
- 式103' の以下の対応する化合物が得られ、ここで：
- ・ Xはアブシキシマブであり、かつmは10である、
 - ・ Xはアダリムマブであり、かつmは11である、
 - ・ Xはアガルシダーゼアルファであり、かつmは14である、
 - ・ Xはアガルシダーゼベータであり、かつmは14である、
 - ・ Xはアルデスロイキンであり、かつmは6である、
 - ・ Xはアルグルコシダーゼアルファであり、かつmは13である、 30
 - ・ Xは第VII因子であり、かつmは100である、
 - ・ Xは第IX因子であり、かつmは18である、
 - ・ XはL-アスパラギナーゼであり、かつmは5である、
 - ・ Xはラロニダーゼであり、かつmは7である、
 - ・ Xはオクトレオチドであり、かつmは1である、
 - ・ Xはフェニルアラニンアンモニアリアーゼであり、かつmは12である、
 - ・ Xはラスブリカーゼであり、かつmは12である、
 - ・ Xはインスリン（配列番号：5）であり、かつmは2である、
 - ・ XはGAD-65（配列番号：6）であり、かつmは8である、
 - ・ XはIGRP（配列番号：7）であり、かつmは7である、 40
 - ・ XはMBP（配列番号：8）であり、かつmは6である、
 - ・ XはMOG（配列番号：9）であり、かつmは5である、
 - ・ XはPLP（配列番号：10）であり、かつmは8である、
 - ・ XはMBP13-32（配列番号：11）であり、かつmは1である、
 - ・ XはMBP83-99（配列番号：12）であり、かつmは1である、
 - ・ XはMBP111-129（配列番号：13）であり、かつmは1である、
 - ・ XはMBP146-170（配列番号：14）であり、かつmは2である、
 - ・ XはMOG1-20（配列番号：15）であり、かつmは1である、
 - ・ XはMOG35-55（配列番号：16）であり、かつmは2である、
 - ・ XはPLP139-154（配列番号：17）であり、かつmは3である、 50

- ・ XはMART1（配列番号：18）であり、かつmは4である、
- ・ Xはチロシナーゼ（配列番号：19）であり、かつmは8である、
- ・ XはPMEL（配列番号：20）であり、かつmは5である、
- ・ Xはアクアポリン4（配列番号：21）であり、かつmは4である、
- ・ XはS-アレスチン（配列番号：22）であり、かつmは12である、
- ・ XはIRBP（配列番号：23）であり、かつmは21である、
- ・ Xはコンアラキンであり、かつmは21である、
- ・ Xは天然型アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：24）であり、かつmは1である、
- ・ Xは脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）であり、かつmは1である、 10
- ・ Xはアルファグリアジン（配列番号：26）であり、かつmは1である、
- ・ Xはオメガグリアジン（配列番号：27）であり、かつmは1である、
- ・ XはFeld1であり、かつmは4である、
- ・ Xはネコアルブミンであり、かつmは16である、
- ・ XはCanf1であり、かつmは6である、
- ・ Xはイヌアルブミンであり、かつmは23である、ならびに
- ・ XはRhCE exampleであり、かつmは10である。

【0269】

実施例1E. 式1aAの他の化合物

20

【0270】

実施例1Cに記載される手順に従い、かつ式103'の化合物を置換することにより、例えば実施例1Dにおいて得られるように、式1aAの以下の対応する化合物が得られる：

- ・ F1aA-アブシキシマブ-m₁₀-n₈₀、
- ・ F1aA-アダリムマブ-m₁₁-n₈₀、
- ・ F1aA-アガルシダーゼアルファ-m₁₄-n₈₀、
- ・ F1aA-アガルシダーゼベータ-m₁₄-n₈₀、
- ・ F1aA-アルデスロイキン-m₆-n₈₀、
- ・ F1aA-アルグルコシダーゼアルファ-m₁₃-n₈₀、 30
- ・ F1aA-第VII因子-m₁₀₀-n₈₀、
- ・ F1aA-第IX因子-m₁₈-n₈₀、
- ・ F1aA-L-アスパラギナーゼ-m₅-n₈₀、
- ・ F1aA-ラロニダーゼ-m₇-n₈₀、
- ・ F1aA-オクトレオチド-m₁-n₈₀、
- ・ F1aA-フェニルアラニンアンモニリアーゼ-m₁₂-n₈₀、
- ・ F1aA-ラスブリカーゼ-m₁₂-n₈₀、
- ・ F1aA-インスリン-m₂-n₈₀、
- ・ F1aA-GAD-65-m₈-n₈₀、
- ・ F1aA-IGRP-m₇-n₈₀、 40
- ・ 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、 50

- ・ F 1 a A - M A R T 1 - m₄ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - チロシナーゼ - m₈ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - P M E L - m₅ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - アクアポリン 4 - m₄ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - S - アレスチン - m₁₂ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - I R B P - m₂₁ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - コンアラキン - m₂₁ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - 天然型アルファグリアジン “ 33 - m e r ” - m₁ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - 脱アミド化アルファグリアジン “ 33 - m e r ” - m₁ - n₈₀

10

- ・ F 1 a A - アルファグリアジン - m₁ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - オメガグリアジン - m₁ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - F e l d 1 - m₄ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - ネコアルブミン - m₁₆ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - C a n f 1 - m₆ - n₈₀、
- ・ F 1 a A - イヌアルブミン - m₂₃ - n₈₀、および
- ・ F 1 a A - R h C E - m₁₀ - n₈₀。

【 0 2 7 1 】

実施例 1 F. 式 1 0 6 A の他の化合物

20

【 0 2 7 2 】

実施例 1 B に記載される手順に従い、かつピリジルジチオールポリ（エチレングリコール）- N H S エステル（n が 8 0 である、式 1 0 4 ）を以下に置換することにより：

- ・ n が 1 2 である、式 1 0 4 、
- ・ n が 3 3 である、式 1 0 4 、
- ・ n が 4 0 である、式 1 0 4 、
- ・ n が 4 3 である、式 1 0 4 、
- ・ n が 5 0 である、式 1 0 4 、
- ・ n が 6 0 である、式 1 0 4 、
- ・ n が 7 5 である、式 1 0 4 、および
- ・ n が 8 0 である、式 1 0 4 、

30

式 1 0 6 A の以下の対応する化合物が得られ、ここで：

- ・ n は 1 2 、
- ・ n は 3 3 、
- ・ n は 4 0 、
- ・ n は 4 3 、
- ・ n は 5 0 、
- ・ n は 6 0 、
- ・ n は 7 5 、および
- ・ n は 8 4 である。

40

【 0 2 7 3 】

実施例 1 G. 式 1 a A の他の化合物

【 0 2 7 4 】

実施例 1 E に記載される手順に従い、かつ式 1 0 6 A の化合物を実施例 1 F において得られる化合物に置換することにより、式 1 a A の対応する化合物が得られる、ここで、n は 1 2 、 3 3 、 4 0 、 4 3 、 5 0 、 6 0 、 7 5 および 8 4 であり：

- ・ F 1 a A - インスリン - m₂ - n₁₂、
- ・ F 1 a A - インスリン - m₂ - n₃₃、
- ・ F 1 a A - インスリン - m₂ - n₄₀、
- ・ F 1 a A - インスリン - m₂ - n₄₃、
- ・ F 1 a A - インスリン - m₂ - n₅₀、

50

- ・ F 1 a A－インスリン－m₂－n₆₀、
- ・ F 1 a A－インスリン－m₂－n₇₅、および
- ・ F 1 a A－インスリン－m₂－n₈₄ などである。

【0275】

実施例 2

【0276】

F 1 b－O V A－m₁－n₄－p₃₄－2 N A c G A L

【0277】

実施例 2 A. X' がオボアルブミンであり、かつ m が 1 である式 103'

【0278】

10

エンドトキシンフリーのチューブにおいて、O V A (6.5 mg、0.000155 mmol) を、5 mM E D T A を含有する 200 μl の pH 8.0 P B S に加え、撹拌した。別々に、1 mg のトラウト試薬を 100 μl の pH 7.0 P B S に溶解し、かつ 43 μl (0.00310 mmol) のこのようにして得られるトラウト試薬溶液を、撹拌を続けて O V A の撹拌溶液に加えた。1 時間後、式 103' の産物を得るために遠心性サイズ排除カラムを使って未反応のトラウト試薬を除去した。

【0279】

実施例 2 B. X' がオボアルブミンであり、m が 1 であり、n が 4 であり、p が 34 であり、R⁹ が直接結合であり、かつ Z'' が 2 N A c G A L である式 1 b

【0280】

20

微小遠心チューブにおいて、ポリ (ガラクトサミンメタクリル酸)－(ピリジルジスルフィド) (式 201) (20.0 mg、0.0020 mmol) を 5 mM E D T A を含有する 50 μl の pH 8.0 P B S において可溶化した。これに、実施例 2 A 由来の精製 O V A－トラウト産物を加え、それに続いて 1 時間撹拌した。反応混合物を通過させることにより、遠心性サイズ排除カラムから得られる式 1 b の産物を精製した。特性評価 (U H P L C S E C、ゲル電気泳動) で産物の正体を確認した。(図 5 を参照されたい。)

【0281】

実施例 2 C. 式 1 b の他の化合物

【0282】

30

実施例 2 B に記載される手順に従い、かつ式 103' の化合物を置換することにより、例えば実施例 1 D において得られるように、式 1 b の以下の対応する化合物が得られる：

- ・ F 1 b－アブシキシマブ－m₁₀－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－アダリムマブ－m₁₁－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－アガルシダーゼアルファ－m₁₄－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－アガルシダーゼベータ－m₁₄－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－アルデスロイキン－m₆－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－アルグルコシダーゼアルファ－m₁₃－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－第 V I I I 因子－m₁₀₀－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－第 I X 因子－m₁₈－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－L－アスパラギナーゼ－m₅－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－ラロニダーゼ－m₇－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－オクトレオチド－m₁－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－フェニルアラニンアンモニアリアーゼ－m₁₂－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－ラスブリカーゼ－m₁₂－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－インスリン－m₂－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－G A D－65－m₈－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、
- ・ F 1 b－I G R P－m₇－n₄－p₃₄－2 N A c G A L、

50

- ・ F 1 b - M B P - m₆ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M O G - m₅ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - P L P - m₈ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M B P 1 3 - 3 2 - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M B P 8 3 - 9 9 - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M B P 1 1 1 - 1 2 9 - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M B P 1 4 6 - 1 7 0 - m₂ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M O G 1 - 2 0 - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - M O G 3 5 - 5 5 - m₂ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - P L P 1 3 9 - 1 5 4 - m₃ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、 10
- ・ F 1 b - M A R T 1 - m₄ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - チロシナーゼ - m₈ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - P M E L - m₅ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - アクアポリン 4 - m₄ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - S - アレスチン - m_{1 2} - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - I R B P - m_{2 1} - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - コンアラキン - m_{2 1} - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - 天然型アルファグリアジン “ 3 3 - m e r ” - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - 脱アミド化アルファグリアジン “ 3 3 - m e r ” - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、 20
- ・ F 1 b - アルファグリアジン - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - オメガグリアジン - m₁ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - F e l d 1 - m₄ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - ネコアルブミン - m_{1 6} - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - C a n f 1 - m₆ - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、
- ・ F 1 b - イヌアルブミン - m_{2 3} - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L、および
- ・ F 1 b - R h C E - m_{1 0} - n₄ - p_{3 4} - 2 N A c G A L。

【 0 2 8 3 】

実施例 3

30

【 0 2 8 4 】

F 1 f - O V A - m₁ - n₄ - p_{3 3} - 2 N A c G A L

【 0 2 8 5 】

実施例 3 A. X' がオボアルブミンであり、かつ m が 1 であり、n が 4 であり、p が 3 3 であり、R⁹ が直接結合であり、かつ Z' が 2 N A c G A L である式 1 f

【 0 2 8 6 】

エンドトキシフリーのチューブにおいて、O V A (4 . 0 m g 、 0 . 0 0 0 0 9 5 2 3 8 1 m m o l) を、0 . 1 m l の p H 7 . 4 P B S に加え、攪拌した。別々に、n が 4 であり、かつ p が 3 3 である式 6 0 1 のポリ- (N - アセチルガラクトサミン) - p - ニトロフェニルカーボネート (3 3 . 0 m g 、 0 . 0 0 2 3 8 0 9 5 2 m m o l) を、1 0 0 μ l の p H 7 . 5 P B S に加え、溶解されるまでボルテックスした。2 つの溶液を合わせ、当該混合物を激しく 1 時間攪拌した。式 1 f の産物を得るために混合物をその後収集し、p H 7 . 4 P B S で 3 日間透析した (3 0 k D a 分子量カットオフ) 。 40

【 0 2 8 7 】

実施例 4

【 0 2 8 8 】

F 1 g - P V A - m₁ - p_{9 0} - 2 N A c G A L

【 0 2 8 9 】

実施例 4 A. X' がオボアルブミンであり、かつ m が 1 であり、p が 9 0 であり、R⁹ が直接結合であり、かつ Z' が 2 N A c G A L である式 1 g 50

【0290】

エンドトキシンプリーのチューブにおいて、OVA (5.0 mg、0.000119048 mmol) を、0.2 ml の pH 7.4 PBS に加え、攪拌した。攪拌溶液に、0.4 ml の pH 7.4 PBS において溶解される 75 mg (0.00297619 mmol) のポリ (ガラクトサミンメタクリル酸) - NHS (式 701) を加えた。混合物を 2 時間攪拌した。式 1 g の産物を得るために混合物をその後収集し、pH 7.4 PBS で 3 日間透析した (30 kDa 分子量カットオフ)。

【0291】

実施例 5

【0292】

$F1h-OVA-m_2-n_{45}-p_{55}-q_4-2NacGAL$

【0293】

実施例 5 A. X' がオボアルブミンであり、 m が 2 であり、かつ n が 45 である式 802'

【0294】

エンドトキシンプリーのチューブにおいて、OVA (3.0 mg、0.0000714286 mmol) を、15 mM EDTA を含有する 50 μ l の pH 8.0 PBS に加え、攪拌した。DMF において溶解されるジベンゾシクロオクチン-PEG- (p-ニトロフェニルカーボネート) (式 801) (5.265 mg、0.002142857 mmol) を、OVA 溶液に加え、1 時間攪拌した。式 802' の産物を得るために遠心性サイズ排除カラムを使って過剰ジベンゾシクロオクチン-PEG- (p-ニトロフェニルカーボネート) を除去した。

【0295】

実施例 5 B. X' がオボアルブミンであり、 m が 2 であり、 n が 45 であり、 p が 55 であり、 q が 4 であり、 R^8 が、 CH_2 であり、 R^9 が直接結合であり、かつ Z'' が 2 NacGAL である式 1 h

【0296】

ポリ (ガラクトサミンメタクリル酸) - N3 (p が 55 であり、 q が 4 であり、かつ Z'' が N-アセチルガラクトサミンである式 803) (33 mg、0.002142857 mmol) を 100 μ l の pH 7.4 PBS に溶解し、攪拌しながら実施例 5 A の産物を加えた。1 時間後、遠心性サイズ排除クロマトグラフィーにより得られる式 1 h の産物を精製した。

【0297】

実施例 6

【0298】

$F1j-OVA-m_{10}-n_{45}-p_{55}-q_4-2NacGAL$

【0299】

実施例 6 A. X' がオボアルブミンであり、かつ m が 10 である式 103'

【0300】

エンドトキシンプリーのチューブにおいて、OVA (5.0 mg、0.00019 mmol) を、15 mM EDTA を含有する 50 μ l の pH 8.0 PBS に加え、攪拌した。別々に、1 mg のタウト試薬を 100 μ l の pH 7.0 PBS に溶解し、かつ 16 μ l (0.0019 mmol) のこのようにして得られるトラウト試薬溶液を、攪拌を続けて OVA の攪拌溶液に加えた。1 時間後、式 103' の産物を得るために遠心性サイズ排除カラムを使って未反応のトラウト試薬を除去した。

【0301】

実施例 6 B. X' がオボアルブミンであり、 m が 10 であり、かつ n が 45 である式 902''

【0302】

ジベンゾシクロオクチン-PEG- (ピリジルジスルフィド) (n が 45 である、式 9

10

20

30

40

50

01) (6.0 mg、0.00238 mmol) を DMF に溶解し、得られる溶液を、実施例 6A において得られる OVA 溶液に加え、1 時間攪拌した。式 902 の産物を得るために遠心性サイズ排除クロマトグラフィーを使って過剰ジベンゾシクロオクチン-PEG- (ピリジルジスルフィド) を除去した。

【0303】

実施例 6C. X' がオボアルブミンであり、m が 10 であり、n が 45 であり、p が 55 であり、q が 4 であり、R⁸ が、CH₂ であり、R⁹ が直接結合であり、かつ Z が 2 NAcGAL である式 1j

【0304】

ポリ (ガラクトサミンメタクリル酸) -N3 (p が 55 であり、q が 4 であり、かつ Z が N-アセチルガラクトサミンである式 803) (36 mg、0.00238 mmol) を 150 μl の pH 7.4 PBS に溶解し、攪拌しながら実施例 6B の産物を加えた。1 時間後、得られる式 1j の産物を遠心性サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した (過剰 p (GMA) -N3 が除去される)。特性評価 (UHPLC SEC、ゲル電気泳動) で産物の正体を確認した。

【0305】

実施例 7

【0306】

F1L-OVA-m₂-n₈₀-p₅₅-q₄-2 NAcGAL

【0307】

実施例 7A. X' がオボアルブミンであり、m が 2 であり、かつ n が 80 である式 1002

【0308】

ジベンゾシクロオクチン-PEG- (ピリジルジスルフィド) (n が 80 である、式 1001) (9.0 mg、0.00238 mmol) を DMF において溶解し、得られる溶液を、式 103' (ここで、X' はオボアルブミンであり、かつ m は 2) の精製 OVA 溶液に加え、例えば実施例 6A に記載されるように調製され、1 時間攪拌した。式 1002 の産物を得るために遠心性サイズ排除クロマトグラフィーを使って過剰ジベンゾシクロオクチン-PEG- (ピリジルジスルフィド) を除去した。

【0309】

実施例 7B. X' がオボアルブミンであり、m が 2 であり、n が 80 であり、p が 55 であり、q が 4 であり、R⁸ が、CH₂ であり、R⁹ が直接結合であり、かつ Z が 2 NAcGAL である式 1L

【0310】

ポリ (ガラクトサミンメタクリル酸) -N3 (p が 55 であり、q が 4 であり、かつ Z が N-アセチルガラクトサミンである式 803) (36 mg、0.00238 mmol) を 150 μl の pH 7.4 PBS において溶解し、攪拌しながら実施例 7A の産物を加えた。1 時間後、得られる式 1L の産物を遠心性サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した (過剰ポリ (ガラクトサミンメタクリル酸) -N3 が除去される)。特性評価 (UHPLC SEC、ゲル電気泳動) で産物の正体を確認した。

【0311】

実施例 8

【0312】

ポリ (ガラクトサミンメタクリル酸) ポリマーの調製

【0313】

実施例 8A. ガラクトサミンメタクリル酸

【0314】

攪拌されたガラクトサミン塩酸塩 (2.15 g、10.0 mmol) に、0.5 M ナトリウムメトキシド (22 ml、11.0 mmol) を加えた。30 分後、メタクリル酸無水物 (14.694 g、11.0 mmol) を加え、連続して 4 時間攪拌した。得られ

るガラクトサミンメタクリル酸を、ロータリーエバポレーターを介してシリカゲルに装填し、DCM:MeOH(85:15)を使うカラムクロマトグラフィーを介して精製した。

【0315】

実施例8B. n が4であり、かつ p が30である式201

【0316】

ガラクトースメタクリル酸(600mg、2.43mmol)、2-(2-(2-(2-(ピリジン-2-イルジスルファニル)エトキシ)エトキシ)エトキシ)エチル2-(フェニルカルボノチオイル)チオ)酢酸(44.8mg、0.081mmol)およびAIBN(3.174089069mg、0.016mmol)を、シュレンクフラスコにおいて1.5mlのDMFに加えた。反応混合物を4凍結融解サイクルに供し、その後70℃で6時間撹拌した。式201の望ましいポリマー産物を12mlのメタノール下で沈殿させ、過剰溶媒を減圧下で除去した。

【0317】

実施例9

【0318】

F1aA-PE- m_3-n_{80} の調製

【0319】

実施例9A. X' がフィコエリトリンである式103'

【0320】

エンドトキシンフリーのチューブにおいて、フィコエリトリン("PE")(ピラスから購入される)(200 μ l、0.000004mmol)を、5mM EDTAを含有する50 μ lのpH8.0 PBSに加え、撹拌した。別々に、1mgのタウト試薬を100 μ lのpH7.0 PBSに溶解し、かつ2 μ l(0.00013mmol)のこのようにして得られるトラウト試薬溶液を、撹拌を続けてPEの撹拌溶液に加えた。1時間後、式103'の産物を得るために遠心性サイズ排除カラムを使って過剰トラウト試薬を除去した。

【0321】

実施例9B. n が80である式106A

【0322】

エンドトキシンフリーのチューブにおいて、ガラクトサミン(7.0mg、0.03246mmol)を5mM EDTAを含有する100 μ lのpH8.0 PBSにおいて撹拌しながら溶解した。50 μ lのpH7.0 PBSにおいて溶解されるピリジルジチオールポリ(エチレングリコール)-NHSEステル(n が80である、式104)(16.23mg、0.00464mmol)を、ガラクトサミンの撹拌溶液に加えた。1時間後、得られる式106Aの産物をさらに精製せずに使用するよう準備した。

【0323】

実施例9C. X' がフィコエリトリンであり、 m が3であり、 n が80であり、かつ Z' がガラクトサミンである式1a

【0324】

実施例9Aにおいて調製される精製PE-トラウトコンジュゲーション体に、実施例9Bにおいて調製される式106Aの撹拌産物を直接加えた。1時間後、反応混合物を通してることにより、遠心性サイズ排除カラムから得られる式1aの産物を精製した。特性評価(UHPLC SEC、ゲル電気泳動)で産物の正体を確認した。

【0325】

実施例10

【0326】

OVA-DOM

【0327】

10A. 発現ベクターの調製

10

20

30

40

50

【0328】

哺乳類の細胞発現ベクターpSecTag Aをライフ・テクノロジーズから購入した。抗ASGPRドメイン抗体、本明細書で“DOM”と称されるDom26h-196-61をコードする遺伝子を、ヒト細胞におけるタンパク質発現のためのコドン最適化配列としてプロバイダージェンスク립トから購入した。QuickChangeプロトコール(Geiser, et al)のバリエーション後の部位特異的突然変異誘発法により哺乳類の発現ベクターpSecTag A、C末端にIgκ鎖分泌リーダー配列OVA、DOM、可動性のリンカーGly₃Ser、および6xHisタグをコードする配列をクローニングした。

【0329】

10B. m'が1であり、m"が0であり、Xがオボアルブミンであり、YがGly₃Serであり、Zが抗ASGPR Dom26h-196-61である式2の発現および精製

【0330】

HEK293細胞を、例えば実施例10Aに記載されるように調製される改変pSecTag Aベクターでポリエチレンイミンを使って一過的に遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞をバルプロ酸が補充されたFreeStyle 293培地(ライフ・テクノロジーズ)で7日間培養し、その後遠心分離により細胞を除去し、培養上清を収集し、濾過により無菌化した。HisTrap Ni²⁺セファロースカラム(GEヘルスケア)を使って、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーにより培養上清から式2のOVA/DOM融合タンパク質を精製し、それに続いてSuperdex75カラム(GEヘルスケア)を使ってサイズ排除クロマトグラフィーをし、それは以下の一般化された構造を有し：

N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C

かつ以下のアミノ酸配列を有する：

GSIGAASMEFCFDVFKE LKVHHANENIFYCPIAIMSALAM
VYLGAKDSTR TQINKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGT SVNVH
SSLRDILNQITKPN DVYSFSLASRLYAEERYPI LPEYLQC
VKELYRGGLEPIN FQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNV
LQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRV
TEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMS
MLVLLLPDEVSGLEQLES IINF EKLTEWTS SNVMEERKIKV
YLPRMKMEEEKYNLT SVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAES
LKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRA
DHPFLFCIKHIA TN AVLFFGRCVSPGGGSEVQLLESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRI
SARGVT TY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGT LVT VSSGGGSHHHHHH (配列番号：28)。

【0331】

SDS-PAGEゲルのクマシーブリリアントブルー染色および抗6xHisタグウェスタンブロッティングにより、タンパク質純度を検証した。ランベルト・ベールの法則を使ってタンパク質濃度を決定し、そのためにNanoDrop 2000 (Thermo Scientific)を使って280nmでの吸光度を測定し、分子量(57.3 kDa)および吸光係数(57,090 M⁻¹cm⁻¹)をExPASy ProtParamツールを使ってタンパク質のアミノ酸配列から推定した。製造業者の指示書に従って、HEK-BLUE TLRレポーター細胞系統(InvivoGen)を使ってエンドトキシンレベルを測定した。

【0332】

10C. 式2の他の組成物

【0333】

実施例10Aおよび10Bに記載される手順に従い、かつpSecTag Aベクターを置換することにより、それに応じて、以下の式2の融合タンパク質が得られた：

N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C

以下のアミノ酸配列を有し：

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYYAMAWVRQA
PGKGLEWVSRI SARGVTTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGT LVT VSS
GGGSGS IGAASMEFCFDVFKE LKVHHANENIFYCPIAIMS
ALAMVYLGAKDSTR TQINKVVRFDKLP GF GDS IEAQCGTS 10
VNVHSSLRDILNQITKPN DVYSFSLASRLYAEERYPI LPE
YLQCVKEL YRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGI
IRNV LQPS SVD SQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAM
PFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFAS
GTMSMLVLLPDEVSGLEQLES IINF EKLT EWTSSSNVMEER
KIKVYLPRMKMEEEKYNLT SVLMAMGITDVFSSSANLSGIS
SAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSE
EFRADHPFLFCIKH IATNAVLF FFGRCVSPGGGSHHHHHH (20
配列番号：29)；および

N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C 20

そして以下のアミノ酸配列を有する：

GSIGAASMEFCFDVFKE LKVHHANENIFYCPIAIMSALAM
VYLGAKDSTR TQINKVVRFDKLP GF GDS IEAQCGTSVNVH
SSLRDILNQITKPN DVYSFSLASRLYAEERYPI LPEYLQC
VKEL YRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNV
LQPS SVD SQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRV
TEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMS
MLVLLPDEVSGLEQLES IINF EKLT EWTSSSNVMEERKIKV
YLPRMKMEEEKYNLT SVLMAMGITDVFSSSANLSGIS 30
SAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRA
DHPFLFCIKH IATNAVLF FFGRCVSPGGGSEVQLLESGGGGL
VQPGGSLRLSCAASGFTFEKYYAMAWVRQAPGKGLEWVSRI
SARGVTTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDT
AVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGT LVT VSSGGGSGS IGAAS
MEFCFDVFKE LKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKD
STR TQINKVVRFDKLP GF GDS IEAQCGTSVNVHSSLRDIL
NQITKPN DVYSFSLASRLYAEERYPI LPEYLQCVKEL YRG
GLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNV LQPS SVD
SQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPV 40
QMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPD
EVSGLEQLES IINF EKLT EWTSSSNVMEERKIKVYLPRMKM
EEKYNLT SVLMAMGITDVFSSSANLSGIS SAESLKISQAV
HAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFC
IKH IATNAVLF FFGRCVSPGGGSHHHHHH (配列番号：30)。

【0334】

10D. 式2の他の組成物

【0335】

実施例10Aおよび10Bに記載される手順に従い、かつ免疫プロテアソーム切断部位 (“IPC”) を有するリンカーのためのGly₃Serベクター、および以下のための

OVAベクターに置換することにより：

MBP13-32（配列番号：11）、

MBP83-99（配列番号：12）、

MBP111-129（配列番号：13）、

MBP146-170（配列番号：14）、

MOG1-20（配列番号：15）、

MOG35-55（配列番号：16）、および

PLP139-154（配列番号：17）、

または以下のためのベクター：

脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）

アルファグリアジン（配列番号：26）、および

オメガグリアジン（配列番号：27）、

以下の式2の融合タンパク質が得られる：

・ MBP13-32-IPC-MBP83-99-IPC-MBP111-129-IPC-MBP146-170-IPC-MOG1-20-IPC-MOG35-55-IPC-PLP139-154-IPC-DOM、および

・ 脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”-IPC-アルファグリアジン-IPC-オメガグリアジン-IPC-DOM。

【0336】

実施例11

【0337】

脱シアル化OVA

【0338】

11A. 発現ベクターの調製

【0339】

哺乳類の細胞発現ベクターpSecTag Aをライフ・テクノロジーズから購入した。QuickChangeプロトコル（Geiser, et al）のバリエーション後の部位特異的突然変異誘発法によりpSecTag A、C末端にIgκ鎖分泌リーダー配列に、OVA、可動性のリンカーGly₃Ser、および6xHisタグをコードする配列をクローニングした。

【0340】

11B. OVAの発現および精製

【0341】

HEK293細胞を、例えば実施例10Aに記載されるように調製される改変pSecTag Aベクターでポリエチレンイミンを使って一過的に遺伝子導入した。遺伝子導入された細胞をバルプロ酸が補充されたFreeStyle 293培地（ライフ・テクノロジーズ）で7日間培養し、その後遠心分離により細胞を除去し、培養上清を収集し、濾過により無菌化した。HisTrap Ni²⁺セファロースカラム（GEヘルスケア）を使って、固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーにより培養上清からOVAタンパク質を精製し、それに続いてSuperdex 75カラム（GEヘルスケア）を使ってサイズ排除クロマトグラフィーをし、それは以下の構造を有し：

N'-OVA Gly₃Ser-6xHis-C'

かつ以下のアミノ酸配列を有する：

G S I G A A S M E F C F D V F K E L K V H H A N E N I F Y C P I A I M S A L A M
V Y L G A K D S T R T Q I N K V V R F D K L P G F G D S I E A Q C G T S V N V H
S S L R D I L N Q I T K P N D V Y S F S L A S R L Y A E E R Y P I L P E Y L Q C
V K E L Y R G G L E P I N F Q T A A D Q A R E L I N S W V E S Q T N G I I R N V
L Q P S S V D S Q T A M V L V N A I V F K G L W E K A F K D E D T Q A M P F R V
T E Q E S K P V Q M M Y Q I G L F R V A S M A S E K M K I L E L P F A S G T M S
M L V L L P D E V S G L E Q L E S I I N F E K L T E W T S S N V M E E R K I K V

Y L P R M K M E E K Y N L T S V L M A M G I T D V F S S S A N L S G I S S A E S
L K I S Q A V H A A H A E I N E A G R E V V G S A E A G V D A A S V S E E F R A
D H P F L F C I K H I A T N A V L F F G R C V S P G G G S H H H H H H (配列番号
: 31)

【0342】

S D S - P A G Eゲルのクマシーブリリアントブルー染色および抗6xHisタグウェ
スタンブロットティングにより、タンパク質純度を検証した。ランベルト・ベールの法則を
使ってタンパク質濃度を決定し、そのためにNanoDrop 2000 (Thermo
Scientific)を使って280nmでの吸光度を測定し、分子量(43.8k
Da)および吸光係数(31、525M⁻¹cm⁻¹)をExPASy ProtParam
amツールを使ってタンパク質のアミノ酸配列から推定した。

10

【0343】

11C. 脱シアル化

【0344】

O V Aを37℃で1時間ノイラミニダーゼ(New England Biolabs
)とのインキュベーションにより脱シアル化した。固定化金属イオンアフィニティークロ
マトグラフィー(例えば、HisTrap Ni²⁺セファロースカラム、GEヘルス
ケアを使って)により反応混合物から、脱シアル化O V Aを精製し、それに続いてサイズ
排除クロマトグラフィーした(例えば、Superdex 75カラム、GEヘルスケアを
使って)。

20

【0345】

S D S - P A G Eゲルのクマシーブリリアントブルー染色および抗6xHisタグウェ
スタンブロットティングにより、タンパク質純度を検証した。ウェスタンブロットにおいて
タンパク質シアル酸含量のセイヨウニワトコレクチンに基づく検出により(ベクター B
iolabs)およびシアル酸媒介蛍光アッセイ(プロザイム)により、脱シアル化を検
証した。脱シアル化前のタンパク質について上記に記載されるように、脱シアル化タンパ
ク質濃度を、ランベルト・ベールの法則を使って決定した。製造業者の指示書に従って、
HEK-Blue TLR4レポーター細胞系統(InvivoGen)を使ってエンド
トキシンレベルを測定する。

【0346】

実施例12

【0347】

肝臓の分布

【0348】

12A. 例えば、実施例9に記載されるように、F1aA-PE-m₃-n₈₀を調
製した。無菌の生理食塩水において、30μg/100μl溶液を注射のために調製した
。

【0349】

C57 black 6マウスの3つの群うちの1つ(群当たり3)に尾静脈注射を介
して、F1aA-PE-m₃-n₈₀溶液(30μg)を投与した。2つのマウスの他の
群は、100μlの生理食塩水または生理食塩水媒体において等量のフィコエリトリンを
受けた。投与後3時間、これらの動物の肝臓および脾臓を収集し、これらの臓器における
細胞蛍光のレベルを、細胞PE含量の指標として、フローサイトメトリーにより決定した
。

40

【0350】

図1に示されるように、F1aA-PE-m₃-n₈₀で治療されたマウスの肝臓由来
の類洞内皮細胞(LSEC)、肝細胞、クッパー細胞(KC)、および他の抗原提示細胞
(APC)は、PE溶液を受けた動物と比較して、蛍光において少なくとも3倍の増加を
示した。3群から収集された脾臓細胞における蛍光において、検出可能な差異は確認され
なかった。これらの結果は、F1aA-PE-m₃-n₈₀は、肝臓における抗原提示細

50

胞に結合する十分な特異性を有することを確認する。

【0351】

12B. 実施例12Aに記載される手順に従い、かつF1aA-PE-m₃-n₈₀を、例えば、実施例9に関して記載されるように、実施例2B、3、4、5B、6B、7B、19G、19L、20Bおよび20FにおけるXの置換により、調製される化合物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およびF1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OHに置換することにより、それぞれ、化合物F1aA-PE-m₃-n₈₀と化合物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およびF1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OHが、肝臓における抗原提示細胞に結合する十分な特異性を有すると確認される。

10

20

【0352】

実施例13

【0353】

抗原特異的なOT1 CD8⁺T細胞の増殖

【0354】

13A. 例えば、実施例1に記載されるような、合成F1aA-OVA-m₄-n₈₀を、注射のための10μg/100μl生理食塩水溶液として調製した。0日目、10⁶OT-1 T細胞を蛍光標識し、かつCD45. 2マウスの3群に尾静脈注射を介して養子性に移行させた（群あたり5）。翌日（すなわち1日）、それぞれ3群のマウスにそれぞれ、10μgのF1aA-OVA-m₄-n₈₀、OVAまたは生理食塩水を、尾静脈注射を介して投与した。6日目に、当該動物を屠殺し、かつ脾臓増殖性OT-1細胞の割合を、蛍光活性化細胞選別を介して決定した。

30

【0355】

当該研究の結果（図2を参照されたい）は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀（図2における“Gal-OVA”）で治療されたマウスにおける増殖性OTI T細胞の割合は、OVAまたは生理食塩水（図2における“ナীব”）で治療されたマウスの脾臓における増殖性OTI細胞の割合より有意に大きいことを示す。OTI細胞増殖における増加は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀対、他の治療法で治療される動物における増加したCD8⁺T細胞クロスプライミングを実証する。実施例12の結果に応じて、これらの結果は、F1aA-OVA-m₄-n₈₀の抗原を肝臓へ標的とする能力が、OVA-特異的なOTI T細胞への肝臓における抗原提示細胞による、OVA提示を増加させることを示す。

40

【0356】

13B. 機能的なエフェクター表現型へと増殖されているT細胞を、増殖かつ除去されているものから区別するために、増殖性OTI CD8⁺T細胞を、アポトーシス、ひいては除去の特徴としてアネキシンV、並びに消耗マーカーprogrammed death-1（PD-1）について分析した。図3に示されるように、F1aA-OVA-m₄-n₈₀（図3における“Gal-OVA”）は、可溶性のOVAよりずっと多い数のアネキシンV⁺およびPD-1⁺増殖性OTI CD8⁺T細胞を誘導した。

50

【0357】

13C. 実施例13Aおよび13Bに記載される手順に従い、かつF1aA-OVA-m₄-n₈を例えば、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19Gに記載される、得られる式1の化合物に置換することにより、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19G由来の化合物は、可溶性のOVAよりずっと多い数のアネキシンV⁺およびPD-1⁺増殖性OTI CD8⁺T細胞を誘導することが示される。

【0358】

13D. 実施例13Aおよび13Bに記載される手順に従い、かつF1aA-OVA-m₄-n₈を例えば、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20Fに記載される、得られる式1および2の化合物に置換すること、ならびにOVAをX（またはX'もしくはX''）に対応する抗原に置換することにより、それぞれに、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20F由来の化合物は、可溶性抗原Xよりずっと多い数のアネキシンV⁺およびPD-1⁺増殖性OTI CD8⁺T細胞を誘導することが示される。

【0359】

実施例14

F1aA-OVA-m₄-n₈は、OVA-特異抗体応答を誘導しない

【0360】

14A. F1aA-OVA-m₄-n₈に対する体液性免疫応答を評価するために、我々はマウスをF1aA-OVA-m₄-n₈またはOVAのいずれかの毎週静脈内注射で治療し、その後血液におけるOVA-特異的な抗体のレベルを測定した。実験の0、7、および14日目に、マウスに以下の1つを含有する100μlの生理食塩水の静脈内注射を投与した：1.) 6μgのOVA；2.) 6μgのF1aA-OVA-m₄-n₈；3.) 30μgのOVA；4.) 30μgのF1aA-OVA-m₄-n₈、または5.) 生理食塩水単独。それぞれの群は5マウスを含有した。19日目に、頬の穿刺を介してマウスから採血し、かつそれぞれのマウスの血液におけるOVA-特異的な抗体の力価を、ELISAを介して決定した。この研究の結果は、6および30μgのOVAで治療されたマウスは、OVA-特異抗体力価が増加するにも関わらず、6および30μgの両方のF1aA-OVA-m₄-n₈（図4における“Gal-OVA”）で治療されたマウスは、生理食塩水で治療されたマウス（すなわち媒体で治療される動物）と同様の血液力価を有することを示した（図4）。例えば6および30μgのOVAで治療されたマウスは、それぞれ3.5および2.5の平均抗体力価を有し；一方で、6および30μgのOVAで治療されたマウスは、それぞれ0.75および0.25の平均抗体力価を有していた。

【0361】

14B. 実施例14Aに記載される手順に従い、かつF1aA-OVA-m₄-n₈を例えば、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19Gに記載される、得られる式1の化合物に置換することにより、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19G由来の化合物で治療されたマウスは、生理食塩水で治療されたマウスと同様のOVA-特異抗体力価を有することが示される。

【0362】

14C. 実施例14Aに記載される手順に従い、かつF1aA-OVA-m₄-n₈を例えば、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20Fに記載される、得られる式1および2の化合物に置換することにより、ならびにOVAをX（またはX'もしくはX''）に対応する抗原に置換することにより、それぞれに、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20F由来の化合物で治療されたマウスは、生理食塩水で治療されたマウスと同様の抗原X-特異抗体力価を有することが示される。

【0363】

実施例15

【0364】

F1aA-OVA-m₄-n₈は、OVA-特異的な抗体を枯渇させる

【0365】

15A. 我々は異なるOVA-抗体血液力価（それぞれのマウスは0から4.5の力価を有していた）を有するマウスを100μlの生理食塩水可溶化した20μgのF1aA-OVA-m₄-n₈の静脈内注射で治療した。マウスに、0、5、7、12、および14日目にF1aA-OVA-m₄-n₈の静脈内注射を与えた（F1aA-OVA-m₄-n₈の注射を“Gal-OVA”として標識し、かつ図5のx軸上に緑色の矢印として示す）。F1aA-OVA-m₄-n₈の、血清OVA-特異的な抗体を枯渇させる能力を決定するために、-1日目にマウスから初期抗体力価を確立するために採血し、その後引き続いて、2、6、9、13、および16日目に、それぞれのF1aA-OVA-m₄-n₈の注射後に採血を実施した。それぞれのマウスの抗体力価を、ELISAを介して決定した。当該研究の結果は、F1aA-OVA-m₄-n₈は、マウスにおける血清抗体レベルを枯渇させることができることを示す。例えば、第一のF1aA-OVA-m₄-n₈注射後の1日（すなわち2日目）に、陽性OVA-抗体力価経験を有するマウスは、血清抗体レベルにおいて5から100倍減少する（図5）。我々の結果は、19日の実験の過程にわたって、ある特定のマウスについて抗体力価は増加したにもかかわらず、力価レベルは、-1日目に測定される初期の抗体力価に決して達せず、引き続くF1aA-OVA-m₄-n₈の用量は、抗体力価におけるこれらの一過性の増加を減少させる際に有効であることを示す。これらの結果は、F1aA-OVA-m₄-n₈は、血清OVA-特異的な抗体に結合する特異性を有すること、およびOVA-特異的な血清抗体を枯渇させるのに必要とされる動態（kinetics）を実証する。

【0366】

15B. 実施例15Aに記載される手順に従い、かつF1aA-OVA-m₄-n₈を例えば、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19Gに記載される、得られる式1の化合物に置換することにより、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19G由来の化合物は、血清OVA-特異的な抗体に結合する特異性を有すること、およびOVA-特異的な血清抗体を枯渇させるのに必要とされる動態が示される。

【0367】

15C. 実施例15Aに記載される手順に従い、かつF1aA-OVA-m₄-n₈を例えば、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20Fに記載される、得られる式1および2の化合物に置換することにより、ならびにOVAをX（またはX'もしくはX''）に対応する抗原に置換することにより、それぞれに、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20F由来の化合物は血清抗原X-特異的な抗体に結合する特異性を有することおよび抗原X-特異的な血清抗体を枯渇させるのに必要とされる動態が示される。

【0368】

実施例16

【0369】

寛容モデルへのOT-1チャレンジ

【0370】

16A. 確立された寛容モデルへのOTIチャレンジ（Liu, Iyoda, et al., 2002）を使って、F1aA-OVA-m₄-n₈（mGal-OVA）、F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄（pGal-OVA）、およびN-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C（Dom-OVA）の、引き続くワクチン-媒介抗原チャレンジへの免疫応答を予防する能力を、非常に強い細菌由来のアジュバント（すなわちリポ多糖）を伴うチャレンジでも実証した。寛容化するために、OTI CD8⁺（CD45.2⁺）T細胞をCD45.1⁺マウスに養子性に移行（群あたりn=5マウス）後、1および6日目に、100μlの生理食塩水中233nmolのF1aA-OVA-m₄-n₈、F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄、N-DOM-Gly

${}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ 、または可溶性のOVAのいずれかを静脈内に投与した。さらに9日後、移行T細胞の潜在的な除去を可能にするため、レシピエントマウスをその後皮内注射によりリポ多糖(LPS)(50 ng)でアジュバントされるOVA(10 μg)でチャレンジした。チャレンジ後4日の流入領域リンパ節の特徴は、除去が実際に起こったか否かの決定を可能にする。

【0371】

16B. $\text{FlaA-OVA-m}_4\text{-n}_8$ 、 $\text{Flb-OVA-m}_1\text{-n}_4\text{-p}_{34}$ 、および $\text{N-DOM-Gly}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ の静脈内投与は、LPSでの抗原チャレンジ前の未変更のOVAで治療されたマウスと比較して、流入領域リンパ節におけるOTI CD8^+ T細胞密度における多大な減少を引き起こし、これは除去寛容(deletional tolerance)を示す。例えば、図6は、 $\text{FlaA-OVA-m}_4\text{-n}_8$ (mGal-OVA)、 $\text{Flb-OVA-m}_1\text{-n}_4\text{-p}_{34}$ (pGal-OVA)、および $\text{N-DOM-Gly}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ (Dom-OVA)のいずれかで治療されたマウスからの流入領域リンパ節が、OVA-治療されるマウスと比較して9倍超少ないOTI CD8^+ T細胞、および抗原の静脈内注射を受けなかったチャレンジコントロールマウスより43倍超少ない細胞を含有したことを示し；脾臓細胞における応答は同様であった。これらの結果は、 $\text{FlaA-OVA-m}_4\text{-n}_8$ 、 $\text{Flb-OVA-m}_1\text{-n}_4\text{-p}_{34}$ 、および $\text{N-DOM-Gly}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ は、アジュバントOVAチャレンジ後のOVA-特異的な免疫応答を軽減したことを実証する。

【0372】

16C. 実施例16AおよびBに記載される手順に従い、かつ $\text{FlaA-OVA-m}_4\text{-n}_8$ 、 $\text{Flb-OVA-m}_1\text{-n}_4\text{-p}_{34}$ 、および $\text{N-DOM-Gly}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ を例えば、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19Gに記載される、得られる式1の化合物に置換することにより、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19G由来の化合物は、アジュバントされるOVAチャレンジ後のOVA-特異的な免疫応答を軽減することが示される。

【0373】

16D. 実施例16AおよびBに記載される手順に従い、かつ $\text{FlaA-OVA-m}_4\text{-n}_8$ 、 $\text{Flb-OVA-m}_1\text{-n}_4\text{-p}_{34}$ 、および $\text{N-DOM-Gly}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ を例えば、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20Fに記載される、得られる式1および2の化合物に置換することにより、ならびにOVAをX(またはX'もしくはX'')に対応する抗原に置換することにより、それぞれに、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20F由来の化合物はアジュバントされる抗原Xチャレンジ後の抗原X-特異的な免疫応答を軽減することが示される。

【0374】

実施例17

【0375】

薬物動態

【0376】

17A. 製造業者の指示書に従って、OVAならびに融合タンパク質 $\text{N-DOM-Gly}_3\text{Ser-OVA-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ および $\text{N-OVA-Gly}_3\text{Ser-DOM-Gly}_3\text{Ser-6xHis-C}$ (例えば、実施例10に記載されるように調製される)をIRDye 800CW(LI-COR バイオサイエンス)で標識した。未反応の色素は、Zeba脱塩カラム(Thermo Scientific)を使って除去した。用量あたり100 μl のPBS中50 μg の標識タンパク質をC57BL/6マウスへ静脈内または皮下に投与した(群あたり5マウス)。注射後の時点=0、0.25、0.5、1、2、4、8、24、48、および96時間で、尾の先端からヘパリン被覆キャピラリーチューブへ血液試料を収集した。当該試料を4℃で保存し、解析まで

光から保護した。

【0377】

解析の日に、血液試料を遠心し、細胞成分を除去した。血漿を新しいキャピラリーチューブへ移し、オデッセイ赤外イメージングシステム（LI-COR バイオサイエンス）を使ってスキャンした。シグナルは、800nmのチャンネルで得られる。イメージプロセッシングプログラムイメージJ（米国国立衛生研究所）を使って、それぞれの試料は幅2の線として近似され、かつ線に沿う平均強度は、その時点で循環タンパク質の量の相対測定値として決定した。

【0378】

OVAならびに融合タンパク質DOM-OVAおよびOVA-DOMについての（時点=0での蛍光に標準化される）蛍光シグナル対時間は、図8において、二重指数関数的減衰の形態に収まる曲線と一緒に、ASGPR標的化OVA融合タンパク質が未改変のOVAより急速に循環からクリアランスされることを示す。

10

【0379】

17B. 実施例17Aに記載される手順に従い、かつN-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C融合タンパク質およびOVAをアシアロ第VII因子および第VII因子に置換することにより、それぞれに、アシアロ第VII因子は未改変の第VII因子より急速に循環からクリアランスされることが示される。

【0380】

実施例18

20

【0381】

体内分布

【0382】

18A. 製造業者の指示書に従って、OVAおよびN-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C融合タンパク質（例えば、実施例10に記載されるように調製される）は、Alexa Fluor 647（ライフ・テクノロジーズ）で標識した。未反応の色素を、Zeba脱塩カラム（Thermo Scientific）を使って除去した。用量あたり100μlのPBS中50μgの標識タンパク質を、C57BL/6マウスへ静脈内または皮下に投与した（群あたり5マウス）。注射2時間後、マウスをCO₂窒息により安楽死させた。血液、心臓、腸、腎臓、肝臓、胚、胃、脾臓、および残存死体を、IVISスペクトルイメージングシステム（Caliper Life Science）を使って撮像した。データを、リヴィングイメージソフトウェア（Caliper Life Science）を使って得、かつ分析した。肝臓および脾臓の単一細胞懸濁液を調製し、0.1%（w/v）BSAのPBS中で蛍光性にコンジュゲートされたMHCクラスII、CD1d、CD3、CD4、CD8アルファ、CD11b、CD11c、CD14、CD19、CD45、CD123、および/またはLinに対する抗体で染色した。LSRIIFローサイトメトリーおよびFACS Divaソフトウェア（BD バイオサイエンス）を使って、試料を分析した。

30

【0383】

それぞれの臓器およびそれぞれのタンパク質について蛍光シグナル密度（光子/重量）を示すヒストグラムは、N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C融合タンパク質で注射される動物において、未改変のOVAで治療されるものと比較して最も高い蛍光シグナルは肝臓におけるものであることを示す。

40

【0384】

N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-CおよびOVA-陽性細胞の割合を示すヒストグラムは、N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C融合タンパク質で注射される動物は未改変のOVAで治療されるものと比較して有意に高い陽性の肝細胞の割合を有することを示す。

【0385】

18B. 実施例18Aに記載される手順に従い、かつN-DOM-Gly₃Ser-

50

OVA-Gly₃Ser-6xHis-C融合タンパク質およびOVAをアシアロ第V I I I因子および第V I I I因子に置換することにより、それぞれに、アシアロ第V I I I因子で注射される動物は、未改変の第V I I I因子で治療されるものと比較して有意に高い陽性の肝細胞の割合を有するということが示される。

【0386】

18C. 実施例18Aに記載される手順に従い、かつN-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C融合タンパク質を例えば、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19Gに記載される、得られる式1の化合物に置換することにより、実施例3A、4A、5B、6C、7Bおよび19G由来の化合物で注射される動物は、OVAで治療されるものと比較して有意に高い陽性の肝細胞の割合を有するということが示される。

10

【0387】

18D. 実施例18AおよびBに記載される手順に従い、かつFlaA-OVA-m₄-n₈、Flb-OVA-m₁-n₄-p₃₄、およびN-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-Cを例えば、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20Fに記載される、得られる式1および2の化合物に置換することにより、ならびにOVAをX（またはX'もしくはX''）に対応する抗原に置換することにより、それぞれに、実施例1E、1G、2C、10D、19I、19L、20B、20Dおよび20F由来の化合物で注射される動物は、抗原Xで治療されるものと比較して有意に高い陽性の肝細胞の割合を有するということが示されることが示される。

20

【0388】

実施例19

【0389】

Flm-OVA-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc

【0390】

19A. R³がNHAcであり、かつR⁴がOHである式1102

【0391】

N-アセチル-D-ガラクトサミン（R³がNHAcであり、かつR⁴がOHである式1101）（5g、22.6mmol）を、室温でクロロエタノール（200ml）の攪拌溶液に加えた。当該溶液を4℃まで冷却し、アセチルクロライドを、当該溶液に滴下して加えた。当該溶液を室温までにし、その後70℃に加熱した。4時間後、未反応のクロロエタノールを減圧下で除去した。100mlのエタノールを、粗産物に加え、得られる溶液を2時間炭素存在下で攪拌した。当該溶液を濾過し、溶媒を減圧下で除去した。式1102の対応産物、N-（2-（2-クロロエトキシ）-4、5-ジヒドロキシ-6-（ヒドロキシメチル）テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル）アセトアミドをさらに精製せずに使用した。

30

【0392】

19B. R³がNHAcであり、かつR⁴がOHである式1103

【0393】

実施例19Aにおいて調製されるN-（2-（2-クロロエトキシ）-4、5-ジヒドロキシ-6-（ヒドロキシメチル）テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル）アセトアミド（2g、7.4mmol）を、DMFおよびアジ化ナトリウム（4g、61.5mmol）の攪拌溶液（100ml）に加えた。当該溶液を12時間90℃で加熱し、その後、濾過した。残留している溶媒を減圧下で除去し、粗産物をフラッシュクロマトグラフィー（ジクロロメタンにおいて10%MeOH）を介して精製し、式1103の対応産物、N-（2-（2-アジドエトキシ）-4、5-ジヒドロキシ-6-（ヒドロキシメチル）テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル）アセトアミドを与えた。

40

【0394】

19C. R³がNHAcであり、かつR⁴がOHである式1104

50

【0395】

実施例19Bにおいて調製されるN-(2-(2-アジドエトキシ)-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)アセトアミド(2g、6.9mmol)を、パラジウム炭素およびエタノールの溶液(50ml)に加えた。当該溶液を水素ガス(3気圧)のもとで4時間攪拌した。得られる溶液を濾過し、残留している溶媒を減圧下で除去し、式1104の対応産物、N-(2-(2-アミノエトキシ)-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)アセトアミドを得、さらに精製せずにを使用した。

【0396】

19D. R³がNHAcであり、かつR⁴がOHである式1105

10

【0397】

実施例19Cにおいて調製されるN-(2-(2-アミノエトキシ)-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル)アセトアミド(1.0g、3.78mmol)を、DMF(50ml)におけるメタクリル酸無水物(0.583g、3.78mmol)の溶液に加えた。トリエチルアミンをその後、当該溶液に加えて反応液を2時間室温で攪拌した。2時間後、過剰溶媒を減圧下で除去し、式1105の対応産物、N-(2-(3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)エチル)メタクリルアミド、を、フラッシュクロマトグラフィーを介して単離した。

【0398】

20

19E. pが30であり、qが4であり、R³がNHAcであり、R⁴がOHであり、かつR⁸が、CMPである式1107

【0399】

qが4である式1106のアジド-改変uRAFT剤(28mg)を、DMFにおける実施例19Dにおいて調製されるN-(2-(3-アセトアミド-4,5-ジヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)テトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル)オキシ)エチル)メタクリルアミド(579mg、1.74mmol)およびアゾビスイソブチロニトリル(2.2mg、0.0116mmol)の溶液に加えた。当該反応混合物を4凍結脱気サイクルに供し、その後70℃で攪拌した。12時間後、pが30であり、かつqが4である式1107のポリマー産物を、メタノールの添加を介して反応混合物から沈殿させた。当該溶媒を、容器を傾けて固形から上清を移し、固形を収集し、残留している溶媒を、減少圧力を介して除去した。

30

【0400】

19F. X'がOVAであり、mが2であり、かつnが80である式1109

【0401】

オボアルブミン(5mg、0.00012mmol)を、100μlのリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)に加え、攪拌した。この溶液に、5mgのnが80である式1108の化合物を加えた。1時間後、未反応の式1108の化合物を遠心性サイズ排除クロマトグラフィーを介して当該溶液から除去した。式1109の対応産物を含有する、得られる緩衝溶液をさらに精製せずに次の反応において使用した。

40

【0402】

19G. X'がOVAであり、mが2であり、nが80であり、pが30であり、qが4であり、R³が、NHAcであり、かつR⁸が、CMPである式1m

【0403】

実施例19Fにおいて調製される溶液に、実施例19Eにおいて調製される式1107の10mgの産物を含有する100μlのリン酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)を加えた。反応液を2時間攪拌し、その後、過剰の式1107を、遠心性サイズ排除クロマトグラフィーを介して除去し、当該溶液において式1mの対応する異性体産物を得、それをさらに精製せずに生物学的な研究において使用した。R³置換基は、2NHAcとして標記化合物の名称において示される。

50

【0404】

19H. 式1109の他の化合物

【0405】

実施例19Fに記載される手順に従い、かつOVAを以下に置換することにより：

- ・ アブシキシマブ、
 - ・ アダリムマブ、
 - ・ アガルシダーゼアルファ、
 - ・ アガルシダーゼベータ、
 - ・ アルデスロイキン、
 - ・ アルグルコシダーゼアルファ、 10
 - ・ 第VII因子、
 - ・ 第IX因子、
 - ・ L-アスパラギナーゼ、
 - ・ ラロニダーゼ、
 - ・ オクトレオチド、
 - ・ フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、
 - ・ ラスブリカーゼ、
 - ・ インスリン（配列番号：5）、
 - ・ GAD-65（配列番号：6）、
 - ・ IGRP（配列番号：7） 20
 - ・ MBP（配列番号：8）、
 - ・ MOG（配列番号：9）、
 - ・ PLP（配列番号：10）、
 - ・ MBP13-32（配列番号：11）、
 - ・ MBP83-99（配列番号：12）、
 - ・ MBP111-129（配列番号：13）、
 - ・ MBP146-170（配列番号：14）、
 - ・ MOG1-20（配列番号：15）、
 - ・ MOG35-55（配列番号：16）、
 - ・ PLP139-154（配列番号：17）、 30
 - ・ MART1（配列番号：18）、
 - ・ チロシナーゼ（配列番号：19）、
 - ・ PMEL（配列番号：20）、
 - ・ アクアポリン4（配列番号：21）、
 - ・ S-アレスチン（配列番号：22）、
 - ・ IRBP（配列番号：23）、
 - ・ コンアラキン（UNIPROT Q6PSU6）、
 - ・ 天然型アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：24）、
 - ・ 脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）、
 - ・ アルファグリアジン（配列番号：26）、 40
 - ・ オメガグリアジン（配列番号：27）、
 - ・ Fel d 1A（UNIPROT P30438）、
 - ・ ネコアルブミン（UNIPROT P49064）、
 - ・ Can f 1（UNIPROT O18873）、
 - ・ イヌアルブミン（UNIPROT P49822）、および
 - ・ RhCE example（UNIPROT P18577）、
- 式1109の以下の対応する化合物が得られ、ここでnは80であり：
- ・ Xはアブシキシマブであり、かつmは10である、
 - ・ Xはアダリムマブであり、かつmは11である、
 - ・ Xはアガルシダーゼアルファであり、かつmは14である、 50

- ・ Xはアガルシダーゼベータであり、かつmは14である、
- ・ Xはアルデスロイキンであり、かつmは6である、
- ・ Xはアルグルコシダーゼアルファであり、かつmは13である、
- ・ Xは第V I I I因子であり、かつmは100である、
- ・ Xは第I X因子であり、かつmは18である、
- ・ XはLーアスパラギナーゼであり、かつmは5である、
- ・ Xはラロニダーゼであり、かつmは7である、
- ・ Xはオクトレオチドであり、かつmは1である、
- ・ Xはフェニルアラニンアンモニアリアーゼであり、かつmは12である、
- ・ Xはラスブリカーゼであり、かつmは12である、
- ・ Xはインスリン（配列番号：5）であり、かつmは2である、
- ・ XはG A D－65（配列番号：6）であり、かつmは8である、
- ・ XはI G R P（配列番号：7）であり、かつmは7である、
- ・ XはM B P（配列番号：8）であり、かつmは6である、
- ・ XはM O G（配列番号：9）であり、かつmは5である、
- ・ XはP L P（配列番号：10）であり、かつmは8である、
- ・ XはM B P 13－32（配列番号：11）であり、かつmは1である、
- ・ XはM B P 83－99（配列番号：12）であり、かつmは1である、
- ・ XはM B P 111－129（配列番号：13）であり、かつmは1である、
- ・ XはM B P 146－170（配列番号：14）であり、かつmは2である、
- ・ XはM O G 1－20（配列番号：15）であり、かつmは1である、
- ・ XはM O G 35－55（配列番号：16）であり、かつmは2である、
- ・ XはP L P 139－154（配列番号：17）であり、かつmは3である、
- ・ XはM A R T 1（配列番号：18）であり、かつmは4である、
- ・ Xはチロシナーゼ（配列番号：19）であり、かつmは8である、
- ・ XはP M E L（配列番号：20）であり、かつmは5である、
- ・ Xはアクアポリン4（配列番号：21）であり、かつmは4である、
- ・ XはSーアレスチン（配列番号：22）であり、かつmは12である、
- ・ XはI R B P（配列番号：23）であり、かつmは21である、
- ・ Xはコンアラキンであり、かつmは21である、
- ・ Xは天然型アルファーグリアジン“33－mer”（配列番号：24）であり、かつmは1である、
- ・ Xは脱アミド化アルファーグリアジン“33－mer”（配列番号：25）であり、かつmは1である、
- ・ Xはアルファーグリアジン（配列番号：26）であり、かつmは1である、
- ・ Xはオメガーグリアジン（配列番号：27）であり、かつmは1である、
- ・ XはF e l d 1であり、かつmは4である、
- ・ Xはネコアルブミンであり、かつmは16である、
- ・ XはC a n f 1であり、かつmは6である、
- ・ Xはイヌアルブミンであり、かつmは23である、かつ
- ・ XはR h C E e x a m p l eであり、かつmが10である。

【0406】

19I. 式1mの他の化合物

【0407】

実施例19Gに記載される手順に従い、かつ式1109の化合物を置換することにより、例えば実施例19Hにおいて得られるように、式1mの以下の対応する化合物が得られる：

- ・ F 1 m－アブシキシマブ－m₁₀－n₈₀－p₃₀－q₄－C M P－2 N H A c、
- ・ F 1 m－アダリムマブ－m₁₁－n₈₀－p₃₀－q₄－C M P－2 N H A c

- 、
- ・ F 1 m－アガルシダーゼアルファ－ $m_{14} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－アガルシダーゼベータ－ $m_{14} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－アルデスロイキン－ $m_6 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－アルグルコシダーゼアルファ－ $m_{13} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－第 V I I I 因子－ $m_{100} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、 10
- ・ F 1 m－第 I X 因子－ $m_{18} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－L－アスパラギナーゼ－ $m_5 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－ラロニダーゼ－ $m_7 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－オクトレオチド－ $m_1 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$
- 、
- ・ F 1 m－フェニルアラニンアンモニアリアーゼ－ $m_{12} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－ラスブリカーゼ－ $m_{12} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、 20
- ・ F 1 m－インスリン－ $m_2 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－GAD－65－ $m_8 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－IGRP－ $m_7 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－MBP－ $m_6 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－MOG－ $m_5 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－PLP－ $m_8 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－MBP 13－32－ $m_1 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－MBP 83－99－ $m_1 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、 30
- ・ F 1 m－MBP 111－129－ $m_1 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－MBP 146－170－ $m_2 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－MOG 1－20－ $m_1 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$
- 、
- ・ F 1 m－MOG 35－55－ $m_2 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－PLP 139－154－ $m_3 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、 40
- ・ F 1 m－MART 1－ $m_4 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－チロシナーゼ－ $m_8 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－PME L－ $m_5 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－アクアポリン 4－ $m_4 - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$
- 、
- ・ F 1 m－S－アレスチン－ $m_{12} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－IRBP－ $m_{21} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 、
- ・ F 1 m－コンアラキン－ $m_{21} - n_{80} - p_{30} - q_4 - \text{CMP} - 2 \text{NHAc}$ 50

- 、
- ・ F 1 m-天然型アルファ-グリアジン “ 3 3 - m e r ” - m ₁ - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 m-脱アミド化アルファ-グリアジン “ 3 3 - m e r ” - m ₁ - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 m-アルファ-グリアジン - m ₁ - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 m-オメガ-グリアジン - m ₁ - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 m - F e l d 1 - m ₄ - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c 10
- 、
- ・ F 1 m-ネコアルブミン - m _{1 6} - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 m - C a n f 1 - m ₆ - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c
- 、
- ・ F 1 m-イヌアルブミン - m _{2 3} - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c、および
 - ・ F 1 m - R h C E - m _{1 0} - n _{8 0} - p _{3 0} - q ₄ - C M P - 2 N H A c。
- 【 0 4 0 8 】
- 1 9 J. p が 3 0 であり、q が 8 であり、R ³ が OH であり、R ⁴ が OH であり、かつ R ⁸ が、C M P である式 1 1 0 7 20
- 【 0 4 0 9 】
- 実施例 1 9 A に記載される手順に従い、N-アセチル-D-ガラクトサミンをガラクトースに置換し、かつ q が 8 である式 1 1 0 6 のアジド-改変 u R A F T 剤を使うことを除き、実施例 1 9 E に記載される手順に従うことにより、p が 3 0 であり、q が 8 であり、R ³ が OH であり、R ⁴ が OH であり、かつ R ⁸ が C M P である式 1 1 0 7 の化合物が得られる。
- 【 0 4 1 0 】
- 1 9 K. n が 6 2 であり、かつ X ' および m が、実施例 1 9 H である式 1 1 0 9
- 【 0 4 1 1 】 30
- 実施例 1 9 F に記載される手順に従い、O V A を実施例 1 9 H に記載される化合物に置換し、かつ n が 6 2 である式 1 1 0 8 の化合物を利用することにより、n が 6 2 である式 1 1 0 9 の対応する化合物が得られる。
- 【 0 4 1 2 】
- 1 9 L. 式 1 m の他の化合物
- 【 0 4 1 3 】
- 実施例 1 9 G に記載される手順に従い、式 1 1 0 7 の化合物を実施例 1 9 J において得られる化合物に置換し、かつ式 1 1 0 9 の化合物を実施例 1 9 K において得られる化合物に置換することにより、式 1 m の以下の対応する化合物が得られる：
- ・ F 1 m-アブシキシマブ - m _{1 0} - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H、 40
 - ・ F 1 m-アダリムマブ - m _{1 1} - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 m-アガルシダーゼアルファ - m _{1 4} - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 m-アガルシダーゼベータ - m _{1 4} - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 m-アルデスロイキン - m ₆ - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 m-アルグルコシダーゼアルファ - m _{1 3} - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 m-第 V I I I 因子 - m _{1 0 0} - n _{6 2} - p _{3 0} - q ₈ - C M P - 2 O H
- 、

- ・ F 1 m-第 I X 因子-m_{1 8}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-L-アスパラギナーゼ-m₅-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-ラロニダーゼ-m₇-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-オクトレオチド-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-フェニルアラニンアンモニアリアーゼ-m_{1 2}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-ラスブリカーゼ-m_{1 2}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-インスリン-m₂-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-G A D-6 5-m₈-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-I G R P-m₇-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M B P-m₆-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M O G-m₅-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-P L P-m₈-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M B P 1 3-3 2-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M B P 8 3-9 9-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M B P 1 1 1-1 2 9-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M B P 1 4 6-1 7 0-m₂-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M O G 1-2 0-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M O G 3 5-5 5-m₂-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-P L P 1 3 9-1 5 4-m₃-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-M A R T 1-m₄-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-チロシナーゼ-m₈-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-P M E L-m₅-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-アクアポリン 4-m₄-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-S-アレスチン-m_{1 2}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-I R B P-m_{2 1}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-コンアラキン-m_{2 1}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-天然型アルファ-グリアジン “ 3 3-mer ”-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-脱アミド化アルファ-グリアジン “ 3 3-mer ”-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-アルファ-グリアジン-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-オメガ-グリアジン-m₁-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-F e l d 1-m₄-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-ネコアルブミン-m_{1 6}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-C a n f 1-m₆-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-イヌアルブミン-m_{2 3}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H、
 - ・ F 1 m-R h C E-m_{1 0}-n_{6 2}-p_{3 0}-q₈-C M P-2 O H。
- 【 0 4 1 4 】
 実施例 2 0
- 【 0 4 1 5 】
 F 1 n-インスリン-m₂-n₁-p_{3 0}-q₄-C M P-2 N H A c
- 【 0 4 1 6 】

20A. X' がインスリンであり、mが2であり、かつnが1である式1202。

【0417】

組換えヒトインスリン（5mg）を、10μlのトリエチルアミンを含有する100μlのDMFに加え、インスリンが溶けるまで攪拌した。この溶液に、nが1である式1201の前駆物質リンカーの10mg（0.0161mmol）（???から得られる）を加え、当該反応液を攪拌した。1時間後、1.3mlのtert-ブチルメチルエーテルを、式1202の対応産物を単離するために加え、それを沈殿物として回収した。残留しているDMFおよびtert-ブチルメチルエーテルを減圧下で除去した。液体クロマトグラフィー、質量分析およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を介する特性評価で産物の正体を確認した。式1202の改変インスリン産物をさらに精製せずに使用した。

10

【0418】

20B. X' がインスリンであり、mが2であり、nが1であり、pが30であり、qが4であり、かつR⁸が、CMPである式1n

【0419】

実施例20Aにおける得られる式1202の産物を100μlのDMFにおいて再懸濁した。実施例19Eにおいて得られる式1107のポリマー産物（10mg）を加え、反応液を1時間攪拌した。1時間後、反応産物をジクロロメタン（1.3ml）の添加により沈殿させた。当該産物を濾過し、残留している溶媒を減圧下で除去した。粗産物をその後500μlのPBSにおいて再懸濁し、低分子量成分を、遠心性サイズ排除クロマトグラフィーを介して除去した、式1nの対応する異性体産物を得た。液体クロマトグラフィー、質量分析およびポリアクリルアミドゲル電気泳動を介する特性評価で産物の正体を確認した。式1202の改変インスリン産物をさらに精製せずに使用した。

20

【0420】

20C. 式1202の他の化合物

【0421】

実施例19Fに記載される手順に従い、かつOVAインスリンを以下に置換することにより：

- ・ アブシキシマブ、
- ・ アダリムマブ、
- ・ アガルシダーゼアルファ、
- ・ アガルシダーゼベータ、
- ・ アルデスロイキン、
- ・ アルグルコシダーゼアルファ、
- ・ 第VII因子、
- ・ 第IX因子、
- ・ L-アスパラギナーゼ、
- ・ ラロニダーゼ、
- ・ オクトレオチド、
- ・ フェニルアラニンアンモニアリアーゼ、
- ・ ラスブリカーゼ、
- ・ GAD-65（配列番号：6）、
- ・ IGRP（配列番号：7）
- ・ MBP（配列番号：8）、
- ・ MOG（配列番号：9）、
- ・ PLP（配列番号：10）、
- ・ MBP13-32（配列番号：11）、
- ・ MBP83-99（配列番号：12）、
- ・ MBP111-129（配列番号：13）、
- ・ MBP146-170（配列番号：14）、
- ・ MOG1-20（配列番号：15）、

30

40

50

- ・ MOG 35-55 (配列番号: 16)、
 - ・ PLP 139-154 (配列番号: 17)、
 - ・ MART 1 (配列番号: 18)、
 - ・ チロシナーゼ (配列番号: 19)、
 - ・ PMEL (配列番号: 20)、
 - ・ アクアポリン4 (配列番号: 21)、
 - ・ S-アレスチン (配列番号: 22)、
 - ・ IRBP (配列番号: 23)、
 - ・ コンアラキン (UNIPROT Q6PSU6)、
 - ・ 天然型アルファグリアジン“33-mer” (配列番号: 24)、 10
 - ・ 脱アミド化アルファグリアジン“33-mer” (配列番号: 25)、
 - ・ アルファグリアジン (配列番号: 26)、
 - ・ オメガグリアジン (配列番号: 27)、
 - ・ FELD 1A (UNIPROT P30438)、
 - ・ ネコアルブミン (UNIPROT P49064)、
 - ・ Can f 1 (UNIPROT O18873)、
 - ・ イヌアルブミン (UNIPROT P49822)、および
 - ・ RhCE example (UNIPROT P18577)、
- 式 1202 の以下の対応する化合物が得られ、ここでnは1であり:
- ・ Xはアブシキシマブであり、かつmは10である、 20
 - ・ Xはアダリムマブであり、かつmは11である、
 - ・ Xはアガルシダーゼアルファであり、かつmは14である、
 - ・ Xはアガルシダーゼベータであり、かつmは14である、
 - ・ Xはアルデスロイキンであり、かつmは6である、
 - ・ Xはアルグルコシダーゼアルファであり、かつmは13である、
 - ・ Xは第VII因子であり、かつmは100である、
 - ・ Xは第IX因子であり、かつmは18である、
 - ・ XはL-アスパラギナーゼであり、かつmは5である、
 - ・ Xはラロニダーゼであり、かつmは7である、
 - ・ Xはオクトレオチドであり、かつmは1である、 30
 - ・ Xはフェニルアラニンアンモニアリアーゼであり、かつmは12である、
 - ・ Xはラスブリカーゼであり、かつmは12である、
 - ・ XはGAD-65 (配列番号: 6)であり、かつmは8である、
 - ・ XはIGRP (配列番号: 7)であり、かつmは7である、
 - ・ XはMBP (配列番号: 8)であり、かつmは6である、
 - ・ XはMOG (配列番号: 9)であり、かつmは5である、
 - ・ XはPLP (配列番号: 10)であり、かつmは8である、
 - ・ XはMBP 13-32 (配列番号: 11)であり、かつmは1である、
 - ・ XはMBP 83-99 (配列番号: 12)であり、かつmは1である、
 - ・ XはMBP 111-129 (配列番号: 13)であり、かつmは1である、 40
 - ・ XはMBP 146-170 (配列番号: 14)であり、かつmは2である、
 - ・ XはMOG 1-20 (配列番号: 15)であり、かつmは1である、
 - ・ XはMOG 35-55 (配列番号: 16)であり、かつmは2である、
 - ・ XはPLP 139-154 (配列番号: 17)であり、かつmは3である、
 - ・ XはMART 1 (配列番号: 18)であり、かつmは4である、
 - ・ Xはチロシナーゼ (配列番号: 19)であり、かつmは8である、
 - ・ XはPMEL (配列番号: 20)であり、かつmは5である、
 - ・ Xはアクアポリン4 (配列番号: 21)であり、かつmは4である、
 - ・ XはS-アレスチン (配列番号: 22)であり、かつmは12である、
 - ・ XはIRBP (配列番号: 23)であり、かつmは21である、 50

- ・ Xはコンアラキンであり、かつmは21である、
- ・ Xは天然型アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：24）であり、かつmは1である、
- ・ Xは脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”（配列番号：25）であり、かつmは1である、
- ・ Xはアルファグリアジン（配列番号：26）であり、かつmは1である、
- ・ Xはオメガグリアジン（配列番号：27）であり、かつmは1である、
- ・ XはFeld1であり、かつmは4である、
- ・ Xはネコアルブミンであり、かつmは16である、
- ・ XはCanf1であり、かつmは6である、
- ・ Xはイヌアルブミンであり、かつmは23である、かつ
- ・ XはRhCE exampleであり、かつmが10である。

10

【0422】

20D. 式1nの他の化合物

【0423】

例Bに記載される手順に従い、かつ式1202の化合物を置換することにより、例えば実施例20Cにおいて得られるように、式1mの以下の対応する化合物が得られる：

- ・ F1n-アブシキシマブ-m₁₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc
- ・ F1n-アダリムマブ-m₁₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-アガルシダーゼアルファ-m₁₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-アガルシダーゼベータ-m₁₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-アルデスロイキン-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc
- ・ F1n-アルグルコシダーゼアルファ-m₁₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-第VIII因子-m₁₀₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-第IX因子-m₁₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-L-アスパラギナーゼ-m₅-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-ラロニダーゼ-m₇-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-オクトレオチド-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-フェニアラニンアンモニアリアーゼ-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc、
- ・ F1n-ラスブリカーゼ-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、

20

30

40

50

- ・ F 1 n - M B P 1 4 6 - 1 7 0 - m₂ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - M O G 1 - 2 0 - m₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - M O G 3 5 - 5 5 - m₂ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - P L P 1 3 9 - 1 5 4 - m₃ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - M A R T 1 - m₄ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - チロシナーゼ - m₈ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - P M E L - m₅ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - アクアポリン 4 - m₄ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - S - アレスチン - m₁₂ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c
 - 、
 - ・ F 1 n - I R B P - m₂₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - コンアラキン - m₂₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - 天然型アルファグリアジン “ 3 3 - m e r ” - m₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - 脱アミド化アルファグリアジン “ 3 3 - m e r ” - m₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - アルファグリアジン - m₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - オメガグリアジン - m₁ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - F e l d 1 - m₄ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - ネコアルブミン - m₁₆ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c
 - 、
 - ・ F 1 n - C a n f 1 - m₆ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c、
 - ・ F 1 n - イヌアルブミン - m₂₃ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c
 - 、および
 - ・ F 1 n - R h C E - m₁₀ - n₁ - p₃₀ - q₄ - C M P - 2 N H A c。
- 【 0 4 2 4 】
- 2 0 E. n が 3 3 であり、かつ X' および m が実施例 2 0 C である式 1 2 0 2
- 【 0 4 2 5 】
- 実施例 1 9 F に記載される手順に従い、インスリンを実施例 2 0 C に記載される化合物に置換し、かつ n が 3 3 である式 1 2 0 1 の化合物を利用することにより、n が 3 3 である式 1 2 0 2 の対応する化合物が得られる。
- 【 0 4 2 6 】
- 2 0 F. 式 1 n の他の化合物
- 【 0 4 2 7 】
- 実施例 2 0 B に記載される手順に従い、式 1 1 0 7 の化合物を実施例 1 9 J において得られる化合物に置換し、かつ式 1 2 0 2 の化合物を実施例 2 0 E において得られる化合物に置換することにより、式 1 n の以下の対応する化合物が得られる：
- ・ F 1 n - アブシキシマブ - m₁₀ - n₃₃ - p₃₀ - q₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 n - アダリムマブ - m₁₁ - n₃₃ - p₃₀ - q₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 n - アガルシダーゼアルファ - m₁₄ - n₃₃ - p₃₀ - q₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 n - アガルシダーゼベータ - m₁₄ - n₃₃ - p₃₀ - q₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 n - アルデスロイキン - m₆ - n₃₃ - p₃₀ - q₈ - C M P - 2 O H、
 - ・ F 1 n - アルグルコシダーゼアルファ - m₁₃ - n₃₃ - p₃₀ - q₈ - C M

P-2OH、

・ F1n-第VIII因子-m₁₀₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH

、

・ F1n-第IX因子-m₁₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-L-アスパラギナーゼ-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2O

H、

・ F1n-ラロニダーゼ-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-オクトレオチド-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-フェニルアラニンアンモニリアーゼ-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-ラスブリカーゼ-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-GAD-65-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-IGRP-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-MBP-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ 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-2O

H、

・ F1n-MBP146-170-m₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2O

H、

・ 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-2O

H、

・ F1n-MART1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-チロシナーゼ-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-PMEI-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-アクアポリン4-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-S-アレスチン-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-IRBP-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-コンアラキン-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-天然型アルファグリアジン“33-mer”-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-脱アミド化アルファグリアジン“33-mer”-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-アルファグリアジン-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2O

H、

・ F1n-オメガグリアジン-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH

、

・ F1n-Feld1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-ネコアルブミン-m₁₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-Canf1-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

・ F1n-イヌアルブミン-m₂₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH、

および

・ F1n-RhCE-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH。

【0428】

実施例21

【0429】

10

20

30

40

50

循環からのO V A－特異的な抗体のクリアランス

【0430】

引き続き枯渴のためのO V A－特異的な抗体の生産を誘導するために、E L I S Aにより決定される、血漿における抗O V A I g Gの力価が3に達するまで、C 5 7 B L／6マウスに10 μ gのO V Aの5用量まで静脈内注射をした（図9 A）。室温で10分間、2000 x gでE D T A－被覆チューブに収集された血液の遠心分離により血漿試料を調製し、解析まで－20℃で保存した。力価は、検出可能な抗O V A I g Gを有する血漿の最大倍希釈のlog₁₀として規定される。ここでは、血漿試料を10－、50－、100－、500－、1、000－、5、000－、10、000－、および50、000倍希釈でアッセイし、0、1、1.7、2、2.7、3、3.7、4、および4.7の潜在的な力価測定が得られた。10 μ gのO V Aの5用量後の、3未満の力価のマウスに、10 μ gのC p G－Bでアジュバントされる10 μ gのO V Aの、さらなる2用量を与え、抗O V A I g G生産を後押しし、それ故に枯渴のために利用可能な循環抗O V A I g Gの量を得た（図9 B）。

10

【0431】

抗O V A抗体クリアランスのための、肝細胞A S G P R標的化O V Aの有効性を評価するために、循環抗O V A I g Gを有するマウスに、D O MおよびO V A、D O M－O V A、またはO V A－D O Mの同等のモル濃度を含有する生理食塩水または生理食塩水を静脈内注射した。特には、図9に示されるように、マウスを10、50、100、または200 μ gのO V Aと同等のモル濃度で治療した。時点t＝－1日、＋3時間、＋1日、および＋7日では、治療注射の比較上の時間に対して、血液試料を収集し、血漿のE L I S A解析により、循環における抗O V A I g Gの量を評価した。循環からの抗O V A I g Gのクリアランスは、血漿における抗O V A I g Gの量を減少させ、それ故にE L I S Aにより決定される血漿抗O V A I g G力価を減少させると予想される。O V A単独で免疫され、およびD O M－O V AまたはO V A－D O Mで治療されるマウスにおいて、抗O V A I g Gの力価は3または2まで減少し、それぞれ、循環抗O V A I g Gの量における1000－または100倍の減少を表し、生理食塩水またはD O MおよびO V Aを使う、コントロール治療より50倍まで有効である（図9 A）。C p G－BでアジュバントされるO V Aで免疫されたマウスにおいて、循環抗O V A I g Gのクリアランスは、観察されなかった（図9 B）。

20

30

【0432】

実施例22

【0433】

N O Dマウス

【0434】

非肥満性糖尿病（N O D）マウスは、自己免疫性糖尿病の自発性の発症に感受性で、それは様々な膵臓の自己抗原への自己免疫応答の結果である。膵島への様々な白血球の浸潤により特徴づけられる膵島炎の結果、N O Dマウスにおいて糖尿病を発症する。

【0435】

糖尿病のための治療の有効性を評価するために、6週齢で開始し、N O Dマウスをコントロールもしくは試験群へ分け、それぞれ試験組成物（10 μ g）もしくは生理食塩水などの不活性なコントロールの毎週の静脈内注射で治療する。18週間連続、注射を続ける。

40

【0436】

マウスの血糖濃度を毎週測定する。実験中300 m g／m l未満の血糖濃度を維持するマウスは非糖尿病性であると考えられる。さらに、研究の終了時にマウスの膵臓を収集し、かつ膵臓におけるT細胞浸潤を膵島炎の評価として免疫組織化学を介して決定する。生理食塩水で治療され、糖尿病を発症するマウスと比較して、寛容誘導は自己抗原特異的なC D 8 T細胞の枯渴により評価される。自己抗原特異的なC D 8 T細胞の存在は、E L I S p o tアッセイを介して決定される。

50

【0437】

上記に記載されるように試験される場合、XがF1m-インスリン-m₂-n₁-p₃₀-q₄-2NAcGALなどのインスリンである式1および2の組成物は、糖尿病を治療するための有効性を示す。

【0438】

本開示は、その特定の実施形態を参照して記載したが、当業者により開示の真の意図および範囲から逸脱せずに、様々な変形を行うことができ、等価物を置換することができる。さらに、本開示の目的、意図および範囲へ、多くの改変を特定の状況、材料、物質の組成物、プロセス、プロセス工程または工程に適応させることができる。全てのかかる改変は添付の特許請求の範囲内であることが意図される。全ての上記で引用した特許および刊行物は、本明細書に出典明示により組み込まれる。

10

【図1】

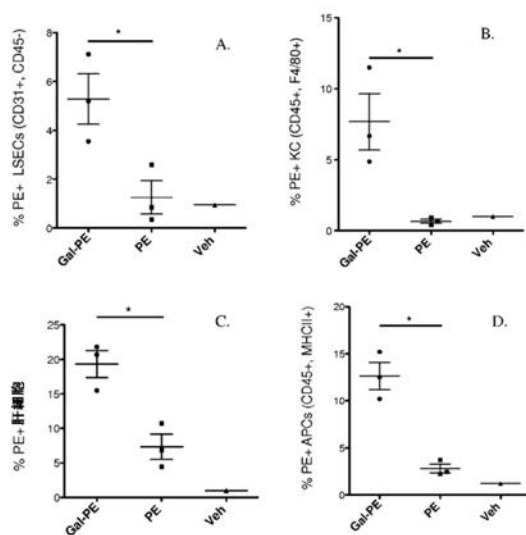


FIG. 1

【図2】

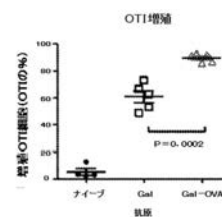


FIG. 2

【図3】

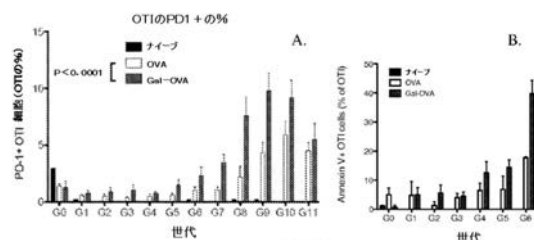


FIG. 3

【图 6】

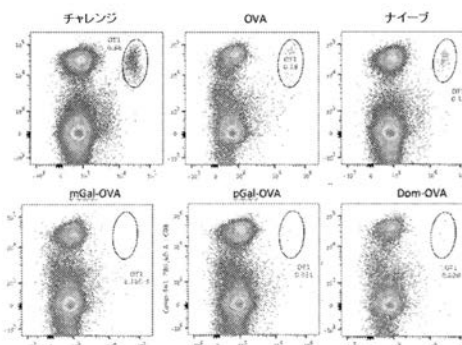


FIG. 6

【図 7 - A】

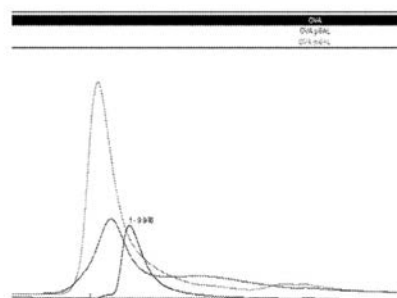
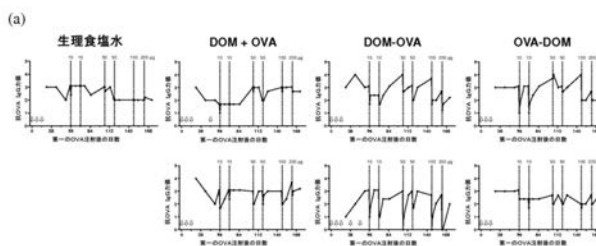


FIG. 7A

【図 9 (a)】



【図 9 (b)】

DOM + OVA

BOVA IgG titer

Day 0 36 72 108 144 180

Day 1 of OVA injection

Day 0 36 72 108 144 180

Day 1 of OVA injection

DOM-OVA

BOVA IgG titer

Day 0 36 72 108 144 180

Day 1 of OVA injection

OVA-DOM

BOVA IgG titer

Day 0 36 72 108 144 180

Day 1 of OVA injection

○ OVA
▽ OVA + CpG

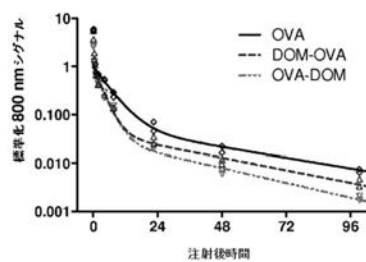


FIG. 8

【配列表】

2020121981000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和2年4月10日(2020.4.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象における抗原特異的免疫寛容の誘導のための組成物であって：

寛容が望まれる抗原；

ここで、寛容が望まれる抗原が対象における望ましくない免疫応答を誘導できる；

ポリマー化リンカー；

ここで、ポリマー化リンカーが、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルを介して寛容が望まれる抗原に結合している；

ここで、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルがそれぞれ、対象への該組成物の投与のあとに切断され、かつポリマー化リンカーから該寛容が望まれる抗原を解放するように構成されている；

ここで、ポリマー化リンカーが、1-シアノ-1-メチル-2-プロピル基およびエチルアセトアミド官能性を含むメタクリル酸単位を含む；および
肝臓標的化部分；

ここで、肝臓標的化部分が、エチルアセトアミド官能性を介してポリマー化リンカーに結合している、
を含む、組成物。

【請求項2】

対象における抗原特異的免疫寛容の誘導のための組成物であって：

寛容が望まれる抗原、

ここで、寛容が望まれる抗原が対象における望ましくない免疫応答を誘導できる；

ポリマー化リンカー；

ここで、ポリマー化リンカーが、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルを介して該抗原に結合している、

ここで、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルがそれぞれ、対象への該組成物の投与のあとに切断され、かつポリマー化リンカーから該抗原を解放するように構成されている、および

肝臓標的化部分、

を含む、組成物。

【請求項3】

対象における抗原特異的免疫寛容の誘導のための組成物であって：

寛容が望まれる1つ以上の抗原、

ここで、寛容が望まれる1つ以上の抗原が対象における望ましくない免疫応答を誘導できる；

ポリマー化リンカー；

ここで、ポリマー化リンカーが、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルを介して1つ以上の抗原に結合している、

ここで、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルがそれぞれ、該対象への該組成物の投与のあとに切断され、かつポリマー化リンカーから1つ以上の抗原を解放するように構成されている、および

肝臓標的化部分、

を含む、組成物。

【請求項 4】

肝臓標的化部分がガラクトシル化部分である、請求項 1－3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

肝臓標的化部分がベータアノマーである、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

肝臓標的化部分が、ガラクトース、ガラクトサミン、または N－アセチルガラクトサミンの 1 つ以上を含む、請求項 1－5 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

ガラクトシル化部分が、ポリマー化リンカーにその C 1、C 2 または C 6 炭素でコンジュゲートされている、請求項 4－6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

肝臓標的化部分が N－アセチルガラクトサミンである、請求項 1－7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

寛容が望まれる抗原が：
食物、動物、環境の抗原；
自己抗原；
治療薬；または
移植抗原、
を含む、請求項 1－8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

寛容が望まれる抗原が、自己免疫疾患に関連する、多発性硬化症に関連する、1 型糖尿病に関連する、セリアック病に関連する、移植抗原である、治療薬である、前述のいずれかに関連する抗原の免疫寛容誘導部分である、または前述のいずれかに関連する抗原の模倣体である、請求項 1－9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

寛容が望まれる抗原が、1 型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、白斑、ぶどう膜炎、尋常性天疱瘡および視神経脊髄炎からなる群から選択される自己免疫疾患に関連する、請求項 1－9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

寛容が望まれる抗原が、コンアラキン (Ara h 1)、アレルゲン II (Ara h 2)、ピーナッツアグルチニン、コングルチン (Ara h 6)、31 kDa の主要アレルゲン／疾病寛容タンパク質相同体 (Mal d 2)、脂質転移タンパク質前駆物質 (Mal d 3)、主要アレルゲン Mal d 1.03D (Mal d 1)、α-ラクトアルブミン (ALA)、ラクトトランスフェリン、アクチニジン (Act c 1、Act d 1)、フィトシスタチン、タウマチン様タンパク質 (Act d 2)、キウエリン (Act d 5)、オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、およびリゾチーム、リベチン、アポビチリン (apovitillin)、ボスベチン (vosvetin)、2S アルブミン (Sin a 1)、11S グロブリン (Sin a 2)、脂質転移タンパク質 (Sin a 3)、プロフィリン (Sin a 4)、プロフィリン (Api g 4)、高分子量糖タンパク質 (Api g 5)、Pen a 1 アレルゲン (Pen a 1)、アレルゲン Pen m 2 (Pen m 2)、トロポミオシン速筋型アイソフォーム、高分子量グルテニン、低分子量グルテニン、アルファー、ガンマーおよびオメガグリアジン、ホルデイン、セカリン、アベニン、主要イチゴアレルギー Fra a 1-E (Fra a 1)、プロフィリン (Mus xp 1)、前記抗原のいずれかの部分、および前記抗原のいずれかの模倣体の 1 つ以上を含む、請求項 1－9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

寛容が望まれる抗原が、高分子量グルテニン、低分子量グルテニン、アルファ、ガンマーおよびオメガグリアジン、ホルデイン、セカリン、アベニン、前記抗原のいずれかの部分、および前記抗原のいずれかの模倣体の1つ以上を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

寛容が望まれる抗原が、グリアジン、グリアジンの部分、および前記抗原のいずれかの模倣体の1つ以上を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項15】

寛容が望まれる抗原が、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、プロテオリピドタンパク質、前記抗原のいずれかの部分、および前記抗原のいずれかの模倣体の1つ以上を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

寛容が望まれる抗原が、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ-65 (GAD-65)、GAD-67、インスリノーマー関連タンパク質2 (IA-2)、およびインスリノーマー関連タンパク質2β (IA-2β)、ICA69、ICA12 (SOX-13)、カルボキシペプチダーゼH、Imogen 38、GLIMA 38、クロモグラニンA、HSP-60、カルボキシペプチダーゼE、ペリフェリン、2型グルコース輸送体、肝細胞癌-腸-膵臓/膵臓の関連タンパク質、S100β、グリア線維性酸性タンパク質、再生遺伝子II、膵臓十二指腸ホメオボックス1、筋強直性ジストロフィーキナーゼ、膵島特異的グルコース-6-ホスファターゼ触媒サブユニット-関連タンパク質、SST G-タンパク質共役型受容体1-5、および前記抗原のいずれかの部分、および前記抗原のいずれかの模倣体の1つ以上を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項17】

寛容が望まれる抗原が、インスリン、プロインスリン、プレプロインスリン、前記抗原のいずれかの免疫寛容誘導部分、または前記抗原のいずれかの模倣体の1つ以上を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項18】

寛容が望まれる抗原がセリアック病に関連する、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項19】

寛容が望まれる抗原が、配列番号25、配列番号24、配列番号26、または配列番号27の1つ以上を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

寛容が望まれる抗原が配列番号25を含む、請求項18または19に記載の組成物。

【請求項21】

配列番号24をさらに含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】

寛容が望まれる1つ以上の抗原が、配列番号24または配列番号25のアミノ酸の1つ以上を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項23】

寛容が望まれる抗原が、高分子量グルテニン、低分子量グルテニン、アルファ、ガンマーおよびオメガグリアジン、ホルデイン、セカリンおよび/またはアベニンの1つ以上の部分から選択される食物抗原である、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項24】

寛容が望まれる抗原がセリアック病に関連し、かつ少なくとも配列番号25の部分を含む、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

寛容が望まれる抗原が食物抗原である、請求項1-9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項26】

寛容が望まれる抗原が多発性硬化症に関連する、請求項 1－9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 27】

寛容が望まれる抗原が、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、ミエリン塩基性タンパク質、プロテオリピドタンパク質、および前記抗原のいずれかの免疫寛容誘導部分の 1 つ以上を含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 28】

寛容が望まれる抗原が、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 12、または配列番号 13 の 1 つ以上を含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 29】

寛容が望まれる抗原が配列番号 15 を含む、請求項 26 に記載の組成物。

【請求項 30】

寛容が望まれるさらなる抗原をさらに含み、ここで、さらなる抗原がミエリン塩基性タンパク質 (MBP) またはプロテオリピドタンパク質 (PLP) に由来し、かつ MBP の寛容誘導フラグメントおよび／または PLP の寛容誘導フラグメントを含む、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

寛容が望まれる抗原が 1 型糖尿病に関連する、請求項 1－9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 32】

寛容が望まれる抗原が配列番号 5 の部分を含む、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

1 つ以上のさらなる抗原をさらに含む、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 34】

1 つ以上のさらなる抗原がインスリノーマー関連タンパク質 2 (IA-2) に由来する、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 35】

寛容が望まれる抗原が、配列番号 5 の部分および IA-2、ならびにその寛容誘導フラグメントの 1 つ以上のアミノ酸配列を含む、請求項 34 に記載の組成物。

【請求項 36】

対象における抗原特異的免疫寛容の誘導のための化合物であって：

寛容が望まれる抗原；

ここで、寛容が望まれる抗原が対象における望ましくない免疫応答を誘導できる；
ポリマー化リンカー；

ここで、ポリマー化リンカーが、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルを介して寛容が望まれる抗原に結合している；

ここで、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルがそれぞれ、該対象への該化合物の投与のあとに切断され、かつポリマー化リンカーから寛容が望まれる該抗原を解放するように構成されている；

ここで、ポリマー化リンカーが、1-シアノー-1-メチルプロピル基およびエチルアセトアミド官能性を含むメタクリル酸単位を含む；および
肝臓標的化部分；

ここで、肝臓標的化部分が、エチルアセトアミド官能性を介してポリマー化リンカーに結合している、
を含む、化合物。

【請求項 37】

対象における抗原特異的免疫寛容の誘導のための化合物であって：

寛容が望まれる抗原、

ここで、寛容が望まれる抗原が対象における望ましくない免疫応答を誘導できる；
ポリマー化リンカー；

ここで、ポリマー化リンカーが、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルを介して該抗原に結合している、

ここで、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルがそれぞれ、該対象への該化合物の投与のあとに切断され、かつポリマー化リンカーから該抗原を解放するように構成されている、および

肝臓標的化部分、
を含む、化合物。

【請求項 38】

対象における抗原特異的免疫寛容の誘導のための化合物であって；
寛容が望まれる 1 つ以上の抗原、

ここで、寛容が望まれる 1 つ以上の抗原が対象における望ましくない免疫応答を誘導できる；

ポリマー化リンカー；

ここで、ポリマー化リンカーが、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルを介して 1 つ以上の抗原に結合している、

ここで、ジスルフィド結合またはジスルファニルエチルエステルがそれぞれ、該対象への該化合物の投与のあとに切断され、かつポリマー化リンカーから 1 つ以上の抗原を解放するように構成されている、および

肝臓標的化部分、
を含む、化合物。

【請求項 39】

肝臓標的化部分がガラクトシル化部分である、請求項 36 に記載の化合物。

【請求項 40】

肝臓標的化部分がベータアノマーである、請求項 36 または 37 に記載の化合物。

【請求項 41】

肝臓標的化部分が、ガラクトース、ガラクトサミン、または N-アセチルガラクトサミンの 1 つ以上を含む、請求項 36-40 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 42】

ガラクトシル化部分が、ポリマー化リンカーにその C1、C2 または C6 炭素でコンジュゲートされている、請求項 36-41 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 43】

肝臓標的化部分が N-アセチルガラクトサミンである、請求項 36-42 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 44】

寛容が望まれる抗原が；
食物、動物、環境の抗原；
自己抗原；
治療薬；または
移植抗原、
を含む、請求項 36-43 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 45】

それを必要とする哺乳類に抗原に対する望ましくない免疫応答を治療するための医薬の製造における、請求項 1-44 のいずれか一項に記載の組成物または化合物。

【請求項 46】

望ましくない免疫応答が、自己免疫疾患、多発性硬化症、1 型糖尿病、セリアック病に関連する、請求項 45 に記載の組成物または化合物。

【請求項 47】

寛容が望まれる抗原に対する寛容を誘導するための医薬の製造における請求項 1-46 のいずれか一項に記載の組成物または化合物の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/38	(2006.01)	A 6 1 K 38/38	
A 6 1 K 38/40	(2006.01)	A 6 1 K 38/40	
A 6 1 K 38/43	(2006.01)	A 6 1 K 38/43	
A 6 1 K 38/28	(2006.01)	A 6 1 K 38/28	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 15/12	(2006.01)	C 1 2 N 15/12	

(71)出願人 516251749

アノキオン・ソシエテ・アノニム

ANOKION SA

スイス、ツェーハー 1024 エキュブラン、シュマン・ドゥ・ラ・ダン・ドッシュ 1 ア番、ウペ
エフエル・イノヴァション・パルク、アン・ルショー

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ジェフリー・エイ・フッペル

アメリカ合衆国 60615-1915 イリノイ州シカゴ、サウス・キンバーク・アベニュー 483
7 番

(72)発明者 ステファーン・コントス

スイス、ツェーハー 1022 シャヴァンヌ・プレールナン、アヴニユ・デブネ 1 番

(72)発明者 クリステン・マリー・ロレンツ

スイス、ツェーハー 1022 シャヴァンヌ・プレールナン、アヴニユ・デブネ 1 番

(72)発明者 デイビッド・スコット・ウィルソン

スイス、ツェーハー 1007 ローザンヌ、アヴニユ・ドゥ・ティヴォリ 70 番

(72)発明者 シュニング・ガイ

スイス、ツェーハー 1196 グラン、アレー・ヴァルド 8 番

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC01 CC07 CC21 CC41 EE59 FF34

4C084 AA02 AA03 BA02 DA36 DB34 DC01 NA14 ZA01 ZB07 ZB13

ZC35

4C085 AA02 BB03 BB11 BB13 BB15 BB22 CC21 EE01

【外国語明細書】
 【0001】

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

GLYCOTARGETING THERAPEUTICS

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

[001] This application claims priority from co-pending provisional application U.S. Serial No. 61/942,942 filed February 21, 2014, entitled "GLYCOTARGETING THERAPEUTICS," which is hereby incorporated by reference herein.

FIELD OF THE DISCLOSURE

[002] The field of the disclosure relates to pharmaceutically acceptable compositions that are useful in the treatment of transplant rejection, autoimmune disease, food allergy, and immune response against a therapeutic agent.

BACKGROUND OF THE DISCLOSURE

[003] Applications US 2012/0039989, US 2012/0178139 and WO 2013/121296 describe the targeting of antigens to erythrocytes to take advantage of the erythrocytes' role in antigen presentation for tolerization. Notwithstanding the positive results generated to date with this approach, the possibility of alternative approaches has remained of interest.

SUMMARY OF THE DISCLOSURE

[004] An aspect of the disclosure provides a composition comprising a compound of Formula 1:



Formula 1

where:

m is an integer from about 1 to 100;

X comprises an antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof; or

X comprises an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy;

Y comprises a linker moiety; and

Z comprises a liver-targeting moiety.

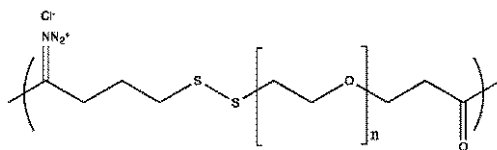
[005] Z can also comprise galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine, for example, conjugated at its C1, C2 or C6 to Y.

[006] Y can be Y is selected from N-hydroxysuccinamidyl linkers, malaeimide linkers, vinylsulfone linkers, pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol) linkers, pyridyl di-thiol linkers, n-nitrophenyl carbonate linkers, NHS-ester linkers, and nitrophenoxy poly(ethylene glycol)ester linkers.

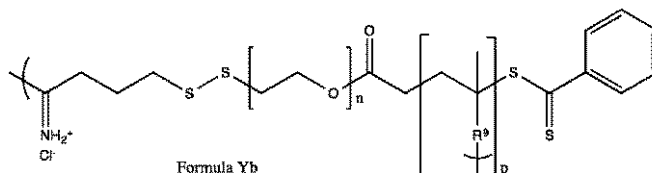
WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

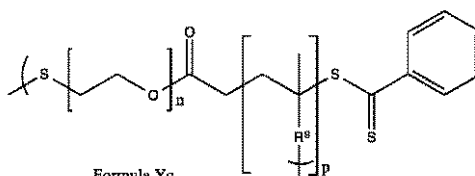
[007] Y can also comprise: an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X; a disulfanyl ethyl ester; a structure represented by one of Formulae Ya to Yp:



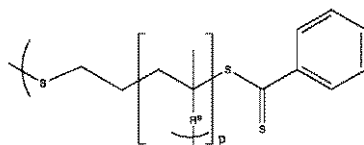
Formula Ya



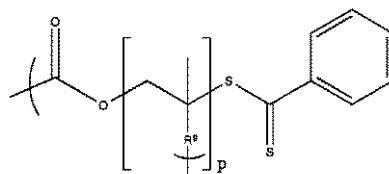
Formula Yb



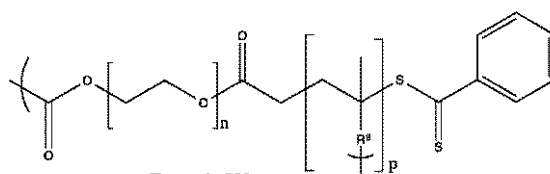
Formula Yc



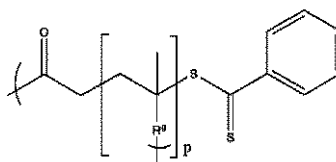
Formula Yd



Formula Ye



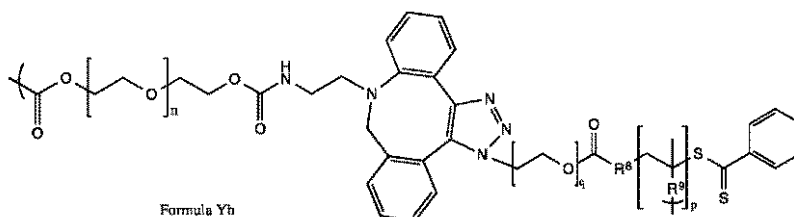
Formula Yf



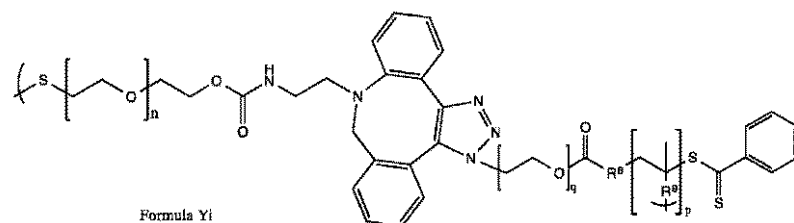
Formula Yg

WO 2015/140648

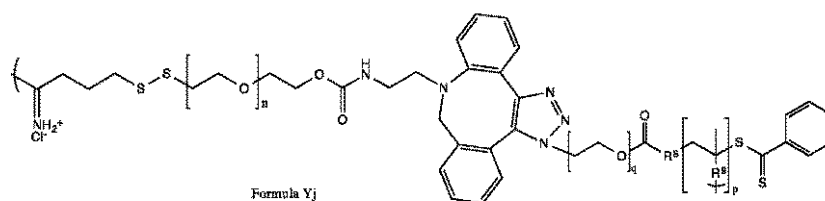
PCT/IB2015/001145



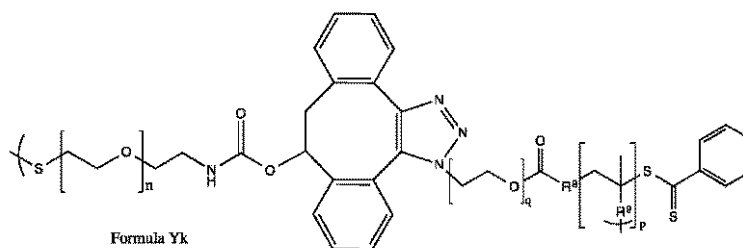
Formula Yh



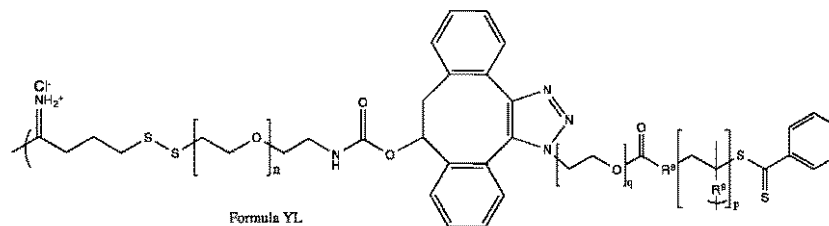
Formula Yi



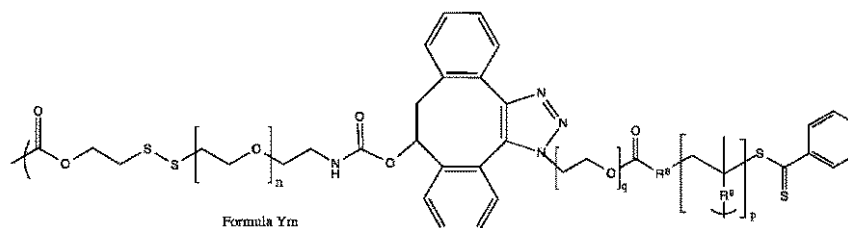
Formula Yj



Formula Yk



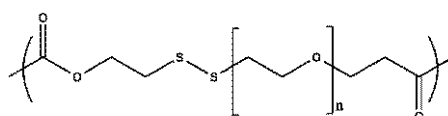
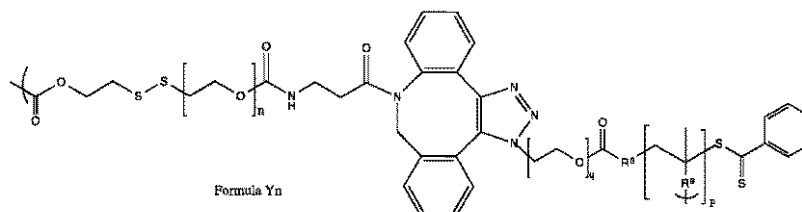
Formula YL



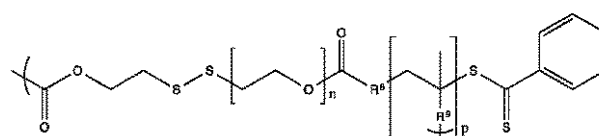
Formula Ym

WO 2015/140648

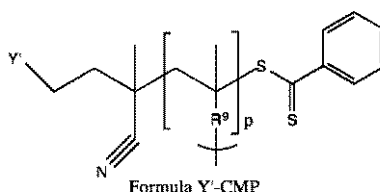
PCT/IB2015/001145



and



or has a portion represented by Formula Y'-CMP:



where: the left bracket “(” indicates the bond between X and Y; the right or bottom bracket and “)” indicates the bond between Y and Z; n is an integer from about 1 to 100; p is an integer from about 2 to 150; q is an integer from about 1 to 44; R⁸ is —CH₂— or —CH₂—CH₂—C(CH₃)(CN)—; R⁹ is a direct bond or —CH₂—CH₂—NH—C(O)—; and Y' represents the remaining portion of Y.

[008] In another aspect of the above, n is about 40 to 80, p is about 10 to 100, q is about 3 to 20, R⁸ is —CH₂—CH₂—C(CH₃)(CN)—; and when R⁹ is —CH₂—CH₂—NH—C(O)—, Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at its C1.

[009] In still another aspect of the above, Y comprises Formula Ya, Formula Yb, Formula Yh, Formula Yi, Formula Yk, Formula Ym or Formula Yn, particularly Formula Ya, Formula Yb, Formula Ym or Formula Yn.

[010] X can further comprise: a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response; a foreign food, animal, plant or environmental antigen against which patients develop an unwanted immune response; a foreign therapeutic agent against which patients develop an unwanted immune response; or a synthetic self-antigen against the endogenous version of which patients develop an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof.

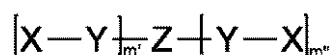
[011] The disclosure also pertains to a method of treatment for an unwanted immune response against an antigen by administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a composition comprising a compound of Formula 1 as discussed above. In such method the composition can be administered for clearance of a circulating protein or peptide or antibody that specifically binds

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

to antigen moiety X, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy. The composition can be administered in an amount effective to reduce a concentration of the antibodies that are causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy in blood of the patient by at least 50% w/w, as measured at a time between about 12 to about 48 hours after the administration. The composition can administered for tolerization of a patient with respect to antigen moiety X.

[012] Yet another aspect of the disclosure provides a composition comprising a compound of Formula 2:



Formula 2

where: m' is zero or an integer from about 1 to 10, m'' is zero or an integer from about 1 to 10, and the sum of m' + m'' is an integer from about 1 to 10 but is at least 1; each X is a foreign antigen or self-antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof; each Y is a linker moiety or a direct bond, or an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X; and Z is a liver-targeting moiety, provided that X is not interferon, Ribavirin, Nexavar/ Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab or Herceptin/trastuzumab when m'+m'' equals 1 and Z is DOM 26h-196-61

[013] In the above aspect involving Formula 2, Z can comprise an ASGPR-targeted antibody, an ASGPR-targeted antibody fragment, an ASGPR-targeted peptide, an ASGPR-targeted scFv, or another ASGPR ligand. Y can be a linker having an immunoproteosome cleavage site. X can comprise a group of related antigens against which a patient develops an unwanted immune response or a group of tolerogenic fragments thereof. For example, X can be selected from the groups comprising:

- two or more of insulin, proinsulin, preproinsulin, glutamic acid decarboxylase-65 GAD-67, glucose-6 phosphatase 2, insulinoma-associated protein 2, insulinoma-associated protein 2β, ICA69, ICA12, carboxypeptidase H, Imogen 38, GLIMA 38, chromogranin-A, HSP-60, carboxypeptidase E, peripherin, glucose transporter 2, hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein, S100β, glial fibrillary acidic protein, regenerating gene II, pancreatic duodenal homeobox 1, dystrophin myotonic kinase, islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, and SST G-protein coupled receptors 1-5;
- two or more of myelin basic protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein, myelin proteolipid protein, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, and SEQ ID NO:17; and
- two or more of SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:27.

[014] The disclosure also pertains to a method of treatment for an unwanted immune response against an antigen by administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a composition comprising a compound of Formula 2 as discussed above. In such method the composition can be administered for clearance of a circulating protein or peptide or antibody that specifically binds

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

to antigen moiety X, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy. The composition can be administered in an amount effective to reduce a concentration of the antibodies that are causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy in blood of the patient by at least 50% w/w, as measured at a time between about 12 to about 48 hours after the administration. The composition can administered for tolerization of a patient with respect to antigen moiety X.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[015] Fig. 1 is series of graphs showing galactose conjugation [F1aA-PE-m₄-n₈₀ (Gal-PE)] preferentially targets OVA to cells of the liver, including the following: (A.) sinusoidal endothelial cells (LSECs), (B.) Kupffer cells (KC), (C.) hepatocytes, and (D.) other antigen-presenting cells (APCs).

[016] Fig. 2 is a graph showing proliferation of OTI CD8⁺ T cells in mice treated with F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA), OVA or saline (i.e. naïve).

[017] Fig. 3 is a series of graphs showing the percentage of OT-I CD8⁺ T cells presenting surface markers (A.) PD-1+ and (B.) Annexin-V+ in generations of proliferating T cells treated with saline, OVA or F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (GAL-OVA).

[018] Fig. 4 is a graph showing galactose conjugation [F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA)] decreases the immunogenicity of OVA as determined by OVA-specific antibody titers (shown in Ab titers log⁻¹).

[019] Fig. 5 shows that F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA) is able to deplete OVA-specific antibodies from the serum.

[020] Fig. 6 shows that F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄ (pGal-OVA), and N'-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C' (Dom-OVA) are able to mitigate the OVA-specific immune response in draining lymphnodes after intradermal challenge with OVA and the adjuvant LPS.

[021] Fig. 7 shows the characterization of F1aA-OVA-m₄-n₈₀ and F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄. (A.) Size-exclusion HPCL traces of F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (magenta), F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄ (blue) and unconjugated OVA (black). Shift to the left represents an increase in molecular weight. (B.) Polyacrylamide gel demonstrating increased molecular weight after OVA conjugation: (1.) Unconjugated OVA, (2.) F1aA-OVA-m₄-n₈₀ and (3.) F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄.

[022] Fig. 8 is a graph showing the normalized quantity of N-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA), N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (DOM-OVA), or N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA-DOM) in the circulation of mice after injection as an *i.v.* bolus.

[023] Fig. 9 is a series of graphs showing the titer of anti-OVA IgG antibodies in the circulation of individual mice after treatment with saline, DOM and OVA, DOM-OVA, or OVA-DOM. Production of anti-OVA IgG was induced by *i.v.* injections of OVA alone (a) or OVA and CpG-B (b). Treatment times are indicated by vertical dashed lines. Titer is calculated as log₁₀ of the maximal fold dilution of plasma with detectable anti-OVA IgG.

DETAILED DESCRIPTION

[024] The two known asialoglycoprotein receptors ("ASGPRs") are expressed on hepatocytes

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

and liver sinusoidal endothelial cells (or "LSECs"). Other galactose/galactosamine/N-acetylgalactosamine receptors can be found in various forms on multiple cell types [e.g., dendritic cells, hepatocytes, LSECs, and Kupffer cells]. Dendritic cells are considered "professional antigen presenting cells," because their primary function is to present antigens to the immune system for generating immune responses. Some cells within the liver are known to be able to present antigens, but the liver is more known to be involved in tolerogenesis. The liver is understood to be a tolerogenic organ. For example, lower incidences of rejection are reported in cases of multiple organ transplants when the liver is one of the organs transplanted. LSECs are much newer to the literature; consequently their role in tolerogenesis and/or moderation of inflammatory immune responses is not yet widely acknowledged or well understood. However, it is becoming clear that they also can play a significant role in the induction of antigen-specific tolerance.

[025] One of the distinctive features of the erythrocyte surface is its glycosylation, i.e., the presence of significant numbers of glycosylated proteins. Indeed, the glycophorins (e.g., glycophorin A) have been employed as targets for erythrocyte binding. Glycophorins are proteins with many covalently attached sugar chains, the end terminus of which is sialic acid. As an erythrocyte ages and becomes ripe for clearance, the terminal sialic acid of its glycophorins tends to be lost, leaving N-acetylgalactosamine at the free end. N-acetylgalactosamine is a ligand selectively received by the ASGPR associated with hepatic cells, leading to binding of N-acetylgalactosamine-containing substances by hepatic cells and their subsequent uptake and processing in the liver.

[026] Heretofore, it has been understood by those skilled in the art that glycosylation of a therapeutic agent in a manner that results in hepatic targeting should be avoided due to first-pass clearance by the liver resulting in poor circulation half-life of the therapeutic agent. By the same token, some monoclonal antibodies need to be specifically glycosylated at ASN297 for optimal binding to their Fc receptors. It has now surprisingly been found that galactosylation can be used in a manner that induces tolerogenesis.

[027] The present disclosure provides certain therapeutic compositions that are targeted for delivery to (and for uptake by) the liver, particularly hepatocytes, LSECs, Kupffer cells and/or stellate cells, more particularly hepatocytes and/or LSECs, and even more particularly to specifically bind ASGPR. Liver-targeting facilitates two mechanisms of treatment: tolerization and clearance. Tolerization takes advantage of the liver's role in clearing apoptotic cells and processing their proteins to be recognized by the immune system as "self," as well as the liver's role in sampling peripheral proteins for immune tolerance. Clearance takes advantage of the liver's role in blood purification by rapidly removing and breaking down toxins, polypeptides and the like. Targeting of these compositions to the liver is accomplished by a galactosylating moiety (e.g., galactose, galactosamine and N-acetylgalactosamine, particularly conjugated at C1, C2 or C6), by another liver-targeting moiety (e.g., a monoclonal antibody, or a fragment or an scFv thereof), or by de-sialylating a polypeptide for which such liver-targeting is desired. The galactosylating or other liver-targeting moiety can be chemically conjugated or recombinantly fused to an antigen, whereas desialylation exposes a galactose-like moiety on an antigen polypeptide. The antigen can be endogenous (a self-antigen) or exogenous (a foreign antigen), including but not limited to: a foreign transplant antigen against which transplant recipients

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

develop an unwanted immune response (e.g., transplant rejection), a foreign food, animal, plant or environmental antigen to which patients develop an unwanted immune (e.g., allergic or hypersensitivity) response, a therapeutic agent to which patients develop an unwanted immune response (e.g., hypersensitivity and/or reduced therapeutic activity), a self-antigen to which patients develop an unwanted immune response (e.g., autoimmune disease), or a tolerogenic portion (e.g., a fragment or an epitope) thereof; these compositions are useful for inducing tolerization to the antigen. Alternatively, the galactosylating or other liver-targeting moiety can be conjugated to an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, and/or allergy (as discussed above); these compositions are useful for clearing the circulating protein, peptide or antibody. Accordingly, the compositions of the present disclosure can be used for treating an unwanted immune response, e.g., transplant rejection, an immune response against a therapeutic agent, an autoimmune disease, and/or an allergy. Also provided are pharmaceutical compositions containing a therapeutically effective amount of a composition of the disclosure admixed with at least one pharmaceutically acceptable excipient. In another aspect, the disclosure provides methods for the treatment of an unwanted immune response, such as transplant rejection, response against a therapeutic agent, autoimmune disease or allergy.

[028] Definitions

[029] As used in the present specification, the following words and phrases are generally intended to have the meanings as set forth below, except to the extent that the context in which they are used indicates otherwise.

[030] The singular forms "a," "an," and "the" include plural referents, unless the context clearly indicates otherwise.

[031] The term "about" when used in connection with a numerical value is meant to encompass numerical values within a range typically having a lower limit that is, e.g., 5-10% smaller than the indicated numerical value and having an upper limit that is, e.g., 5-10% larger than the indicated numerical value.

[032] An "antigen" is any substance that serves as a target for the receptors of an adaptive immune response, such as the T cell receptor, B cell receptor or an antibody. An antigen may originate from within the body ("self," "auto" or "endogenous"). An antigen may originate from outside the body ("non-self," "foreign" or "exogenous"), having entered, for example, by inhalation, ingestion, injection, or transplantation. Foreign antigens include, but are not limited to, food antigens, animal antigens, plant antigens, environmental antigens, therapeutic agents, as well as antigens present in an allograft transplant.

[033] An "antigen-binding molecule" as used herein relates to molecules, in particular to proteins such as immunoglobulin molecules, which contain antibody variable regions providing a specific binding to an epitope. The antibody variable region can be present in, for example, a complete antibody, an antibody fragment, and a recombinant derivative of an antibody or antibody fragment. The term "antigen-binding fragment" of an antibody (or "binding portion"), as used herein, refers to one or more

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind a target sequence. Antigen-binding fragments containing antibody variable regions include (without limitation) "Fv", "Fab", and "F(ab')₂" regions, "single domain antibodies (sdAb)", "nanobodies", "single chain Fv (scFv)" fragments, "tandem scFvs" (V_HA-V_LA-V_HB-V_LB), "diabodies", "triabodies" or "tribodies", "single-chain diabodies (scDb)", and "bi-specific T-cell engagers (BiTEs)".

[034] A "chemical modification" refers to a change in the naturally-occurring chemical structure of one or more amino acids of a polypeptide. Such modifications can be made to a side chain or a terminus, e.g., changing the amino-terminus or carboxyl terminus. In some embodiments, the modifications are useful for creating chemical groups that can conveniently be used to link the polypeptides to other materials, or to attach a therapeutic agent.

[035] The term "comprising", which is synonymous with "including," "containing," or "characterized by," is inclusive or open-ended and does not exclude additional, unrecited elements or method steps. The phrase "consisting of" excludes any element, step, or ingredient not specified. The phrase "consisting essentially of" limits the scope of described subject matter to the specified materials or steps and those that do not materially affect its basic and novel characteristics.

[036] "Conservative changes" can generally be made to an amino acid sequence without altering activity. These changes are termed "conservative substitutions" or mutations; that is, an amino acid belonging to a grouping of amino acids having a particular size or characteristic can be substituted for another amino acid. Substitutes for an amino acid sequence can be selected from other members of the class to which the amino acid belongs. For example, the nonpolar (hydrophobic) amino acids include alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, methionine, and tyrosine. The polar neutral amino acids include glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine and glutamine. The positively charged (basic) amino acids include arginine, lysine and histidine. The negatively charged (acidic) amino acids include aspartic acid and glutamic acid. Such substitutions are not expected to substantially affect apparent molecular weight as determined by polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectric point. Conservative substitutions also include substituting optical isomers of the sequences for other optical isomers, specifically D amino acids for L amino acids for one or more residues of a sequence. Moreover, all of the amino acids in a sequence can undergo a D to L isomer substitution. Exemplary conservative substitutions include, but are not limited to, Lys for Arg and vice versa to maintain a positive charge; Glu for Asp and vice versa to maintain a negative charge; Ser for Thr so that a free -OH is maintained; and Gln for Asn to maintain a free -NH₂. Yet another type of conservative substitution constitutes the case where amino acids with desired chemical reactivities are introduced to impart reactive sites for chemical conjugation reactions, if the need for chemical derivatization arises. Such amino acids include but are not limited to Cys (to insert a sulfhydryl group), Lys (to insert a primary amine), Asp and Glu (to insert a carboxylic acid group), or specialized noncanonical amino acids containing ketone, azide, alkyne, alkene, and tetrazine side-chains. Conservative substitutions or additions of free -NH₂ or -SH bearing amino acids can be particularly advantageous for chemical conjugation with the linkers and galactosylating moieties of Formula 1. Moreover, point mutations, deletions, and insertions of the polypeptide sequences or corresponding nucleic acid sequences can in some cases be made without a loss of function of the

WO 2015/140648

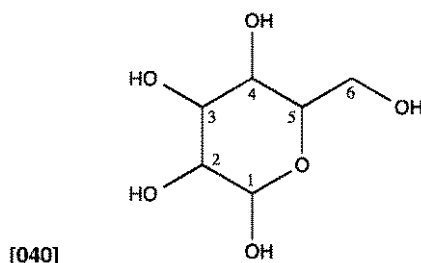
PCT/IB2015/001145

polypeptide or nucleic acid fragment. Substitutions can include, e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 or more residues. A variant usable in the present invention may exhibit a total number of up to 200 (up to 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, or 200) changes in the amino acid sequence (i.e. exchanges, insertions, deletions, N-terminal truncations, and/or C-terminal truncations). The amino acid residues described herein employ either the single letter amino acid designator or the three-letter abbreviation in keeping with the standard polypeptide nomenclature, J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559. All amino acid residue sequences are represented herein by formulae with left and right orientation in the conventional direction of amino-terminus to carboxy-terminus.

[037] The terms "effective amount" or "therapeutically effective amount" refer to that amount of a composition of the disclosure that is sufficient to effect treatment, as defined below, when administered to a mammal in need of such treatment. This amount will vary depending upon the subject and disease condition being treated, the weight and age of the subject, the severity of the disease condition, the particular composition of the disclosure chosen, the dosing regimen to be followed, timing of administration, manner of administration and the like, all of which can readily be determined by one of ordinary skill in the art.

[038] An "epitope", also known as antigenic determinant, is the segment of a macromolecule, e.g. a protein, which is recognized by the adaptive immune system, such as by antibodies, B cells, or T cells. An epitope is that part or segment of a macromolecule capable of binding to an antibody or antigen-binding fragment thereof. In this context, the term "binding" in particular relates to a specific binding. In the context of the present invention it is preferred that the term "epitope" refers to the segment of protein or polypeptide that is recognized by the immune system.

[039] The term galactose is well known in the art and refers to a monosaccharide sugar that exists both in open-chain form and in cyclic form, having D- and L- isomers. In the cyclic form there are two anomers, namely alpha and beta. In the alpha form, the C1 alcohol group is in the axial position, whereas in the beta form, the C1 alcohol group is in the equatorial position. In particular, "galactose" refers to the cyclic six-membered pyranose, more in particular the D-isomer and even more particularly the alpha-D-form (α -D-galactopyranose). The structure and numbering of galactose is illustrated below.



[041] The term "galactosylating moiety" refers to a particular type of liver-targeting moiety. Galactosylating moieties include, but are not limited to a galactose, galactosamine and/or N-acetylgalactosamine residue.

[042] The term "liver-targeting moiety", refers to moieties having the ability to direct, e.g., a

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

polypeptide, to the liver. The liver comprises different cell types, including but not limited to hepatocytes, sinusoidal epithelial cells, Kupffer cells, stellate cells, and/or dendritic cells. Typically, a liver-targeting moiety directs a polypeptide to one or more of these cells. On the surface of the respective liver cells, receptors are present which recognize and specifically bind the liver-targeting moiety. Liver-targeting can be achieved by chemical conjugation of an antigen or ligand to a galactosylating moiety, desialylation of an antigen or ligand to expose underlying galactosyl moieties, recombinant fusion or chemical conjugation of an antigen or ligand to an ASGPR-binding moiety, or specific binding of an endogenous antibody to an antigen or ligand, where the antigen or ligand is: desialylated to expose underlying galactosyl moieties, conjugated to a galactosylating moiety, or recombinantly fused or chemically conjugated to an ASGPR-binding moiety. Naturally occurring desialylated proteins are not encompassed within the scope of the present disclosure.

[043] The "numerical values" and "ranges" provided for the various substituents are intended to encompass all integers within the recited range. For example, when defining n as an integer representing a mixture including from about 1 to 100, particularly about 8 to 90 and more particularly about 40 to 80 ethylene glycol groups, where the mixture typically encompasses the integer specified as $n \pm$ about 10% (or for smaller integers from 1 to about 25, ± 3), it should be understood that n can be an integer from about 1 to 100 (e.g., 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 or 110) and that the disclosed mixture encompasses ranges such as 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 and 107-113 ethylene glycol groups. The combined terms "about" and " $\pm 10\%$ " or " ± 3 " should be understood to disclose and provide specific support for equivalent ranges wherever used.

[044] The term "optional" or "optionally" means that the subsequently described event or circumstance may or may not occur, and that the description includes instances where said event or circumstance occurs and instances in which it does not.

[045] A peptide that specifically binds a particular target is referred to as a "ligand" for that target.

[046] A "polypeptide" is a term that refers to a chain of amino acid residues, regardless of post-translational modification (e.g., phosphorylation or glycosylation) and/or complexation with additional polypeptides, and/or synthesis into multisubunit complexes with nucleic acids and/or carbohydrates, or other molecules. Proteoglycans therefore also are referred to herein as polypeptides. A long polypeptide (having over about 50 amino acids) is referred to as a "protein." A short polypeptide (having fewer than about 50 amino acids) is referred to as a "peptide." Depending upon size, amino acid composition and three dimensional structure, certain polypeptides can be referred to as an "antigen-binding molecule," "antibody," an "antibody fragment" or a "ligand." Polypeptides can be produced by a number of methods, many of which are well known in the art. For example, polypeptides can be obtained by extraction (e.g., from isolated cells), by expression of a recombinant nucleic acid encoding the polypeptide, or by chemical synthesis. Polypeptides can be produced by, for example, recombinant technology, and expression vectors encoding the polypeptide introduced into host cells (e.g., by transformation or transfection) for expression of the encoded polypeptide.

[047] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" or "pharmaceutically acceptable

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

excipient" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

[048] The term "purified" as used herein with reference to a polypeptide refers to a polypeptide that has been chemically synthesized and is thus substantially uncontaminated by other polypeptides, or has been separated or isolated from most other cellular components by which it is naturally accompanied (e.g., other cellular proteins, polynucleotides, or cellular components). An example of a purified polypeptide is one that is at least 70%, by dry weight, free from the proteins and naturally occurring organic molecules with which it naturally associates. A preparation of a purified polypeptide therefore can be, for example, at least 80%, at least 90%, or at least 99%, by dry weight, the polypeptide. Polypeptides also can be engineered to contain a tag sequence (e.g., a polyhistidine tag, a myc tag, a FLAG® tag, or other affinity tag) that facilitates purification or marking (e.g., capture onto an affinity matrix, visualization under a microscope). Thus a purified composition that comprises a polypeptide refers to a purified polypeptide unless otherwise indicated. The term "isolated" indicates that the polypeptides or nucleic acids of the disclosure are not in their natural environment. Isolated products of the disclosure can thus be contained in a culture supernatant, partially enriched, produced from heterologous sources, cloned in a vector or formulated with a vehicle, etc.

[049] The term "sequence identity" is used with regard to polypeptide sequence comparisons. This expression in particular refers to a percentage of sequence identity, for example at least 80%, at least 81%, at least 82%, at least 83%, at least 84%, at least 85%, at least 86%, at least 87%, at least 88%, at least 89%, at least 90%, at least 91%, at least 92%, at least 93%, at least 94%, at least 95%, at least 96%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% to the respective reference polypeptide or to the respective reference polynucleotide. Particularly, the polypeptide in question and the reference polypeptide exhibit the indicated sequence identity over a continuous stretch of 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 or more amino acids or over the entire length of the reference polypeptide.

[050] "Specific binding," as that term is commonly used in the biological arts, refers to a molecule that binds to a target with a relatively high affinity as compared to non-target tissues, and generally involves a plurality of non-covalent interactions, such as electrostatic interactions, van der Waals interactions, hydrogen bonding, and the like. Specific binding interactions characterize antibody-antigen binding, enzyme-substrate binding, and certain protein-receptor interactions; while such molecules might bind tissues besides their specific targets from time to time, to the extent that such non-target binding is inconsequential, the high-affinity binding pair can still fall within the definition of specific binding.

[051] The term "treatment" or "treating" means any treatment of a disease or disorder in a mammal, including:

preventing or protecting against the disease or disorder, that is, causing the clinical symptoms not to develop;

inhibiting the disease or disorder, that is, arresting or suppressing the development of

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

clinical symptoms; and/or

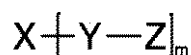
relieving the disease or disorder, that is, causing the regression of clinical symptoms.

[052] The term "unwanted immune response" refers to a reaction by the immune system of a subject, which in the given situation is not desirable. The reaction of the immune system is unwanted if such reaction does not lead to the prevention, reduction, or healing of a disease or disorder but instead causes, enhances or worsens a disorder or disease. Typically, a reaction of the immune system causes, enhances or worsens a disease if it is directed against an inappropriate target. Exemplified, an unwanted immune response includes but is not limited to transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, and allergy or hypersensitivity.

[053] The term "variant" is to be understood as a protein which differs in comparison to the protein from which it is derived by one or more changes in its length, sequence, or structure. The polypeptide from which a protein variant is derived is also known as the parent polypeptide or polynucleotide. The term "variant" comprises "fragments" or "derivatives" of the parent molecule. Typically, "fragments" are smaller in length or size than the parent molecule, whilst "derivatives" exhibit one or more differences in their sequence or structure in comparison to the parent molecule. Also encompassed modified molecules such as but not limited to post-translationally modified proteins (e.g. glycosylated, phosphorylated, ubiquitinated, palmitoylated, or proteolytically cleaved proteins) and modified nucleic acids such as methylated DNA. Also mixtures of different molecules such as but not limited to RNA-DNA hybrids, are encompassed by the term "variant". Naturally occurring and artificially constructed variants are to be understood to be encompassed by the term "variant" as used herein. Further, the variants usable in the present invention may also be derived from homologs, orthologs, or paralogs of the parent molecule or from artificially constructed variant, provided that the variant exhibits at least one biological activity of the parent molecule, i.e. is functionally active. A variant can be characterized by a certain degree of sequence identity to the parent polypeptide from which it is derived. More precisely, a protein variant in the context of the present disclosure may exhibit at least 80% sequence identity to its parent polypeptide. Preferably, the sequence identity of protein variants is over a continuous stretch of 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 or more amino acids.

[054] Compositions

[055] One aspect of the present disclosure relates to compositions, pharmaceutical formulations, and methods of treatment employing such compositions, as represented by Formula 1:



Formula 1

where:

m is an integer from about 1 to 100, particularly from about 1 to 20, and most particularly 1 to about 10;

X is an antigen moiety, particularly a foreign antigen or self-antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion (e.g., a fragment or an epitope) of such an antigen moiety;

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

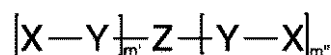
Y is a linker moiety or a direct bond, or an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X; and

Z is a liver-targeting moiety, in particular galactosylating moiety.

The value for m in Formula 1 will depend upon the nature of X, in that each antigen, antibody, antibody fragment or ligand will have an individual number and density of sites (predominantly the N-terminal amine, lysine residues and cysteine residues) to which a linker or galactosylating moiety can be bound. Antigens having a limited number of such sites can be derivatized, for example, at the N or C terminus, by adding lysine or cysteine residues (optionally via a cleavable linker, particularly a linker having an immunoproteasome cleavage site). Generally, it is preferred to provide an adequate degree of galactosylation in compositions of Formula 1 so as to facilitate uptake by liver cells. Pharmaceutical formulations and methods of the disclosure can employ a cocktail of compositions of Formula 1, respectively bearing different X moieties (e.g., several epitopes associated with a particular unwanted immune response).

[056] The compositions of Formula 1 include the sub-genuses where X is a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response (e.g., transplant rejection), a foreign food, animal, plant or environmental antigen against which patients develop an unwanted immune (e.g., allergic or hypersensitivity) response, a foreign therapeutic agent against which patients develop an unwanted immune response (e.g., hypersensitivity and/or reduced therapeutic activity), or a self-antigen against which patients develop an unwanted immune response (e.g., autoimmune disease); where Y is a linker of Formulae Ya through Yp; and/or where Z is galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine, as illustrated by Formulae 1a through 1p as described below with reference to the Reaction Schemes.

[057] The disclosure further provides a pharmaceutically acceptable composition represented by Formula 2:



Formula 2

where:

m' is zero or an integer from about 1 to 10, m'' is zero or an integer from about 1 to 10, and the sum of m' + m'' is an integer from about 1 to 10 but is at least 1;

X is an antigen moiety, particularly a foreign antigen or self-antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion (e.g., a fragment or an epitope) of such an antigen moiety;

Y is a linker moiety or a direct bond, or an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X; and

Z is a liver-targeting moiety, in particular an ASGPR-targeted antibody, an ASGPR-targeted antibody fragment, an ASGPR-targeted peptide, an ASGPR-targeted scFv, or another ASGPR ligand,

such composition optionally including amino acid sequences to facilitate isolation and purification [e.g., a "His tag" or "6xHis" having the sequence: HHHHHH (SEQ ID NO:1) and additional linkers [e.g.,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

"GlycSer" having the sequence: GGGS (SEQ ID NO:2)]. In the compositions of Formula 2 where $m' + m''$ is greater than one, the X moieties can be the same or different, and the Y moieties can be the same or different. The value for $m' + m''$ will be smaller (e.g., 3 or less) when X is a full protein, or larger (up to about 10) when X is a peptide. The linker(s) "Y" can advantageously comprise a cleavage site, particularly an immunoproteasome cleavage site.

[058] The compositions of Formula 2 include the sub-genuses where X is a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response (e.g., transplant rejection), a foreign food, animal, plant or environmental antigen against which patients develop an unwanted immune (e.g., allergic or hypersensitivity) response, a foreign therapeutic agent against which patients develop an unwanted immune response (e.g., hypersensitivity and/or reduced therapeutic activity), or a self-antigen against which patients develop an unwanted immune response (e.g., autoimmune disease).

[059] Alternatively, in the compositions of Formula 1 and/or Formula 2, X can be an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy.

[060] The compositions of Formula 2 can be prepared as fusion proteins and can include several components useful in their preparation and purification, such as a signal or leader sequence that directs the expressed polypeptide to a specific transport pathway and is subsequently cleaved from the polypeptide; therefore the signal sequence can be part of the expressed protein and DNA encoding it, but not part of the final composition. One example of a mammalian signal sequence used in expression systems is the Ig κ -chain sequence, which directs protein secretion: METDTLLWVLLWVPGSTG (SEQ ID NO:3). Similarly, one example of a common bacterial signal sequence used in expression systems is the *pelB* signal sequence, which directs expressed protein into the bacterial periplasm: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO:4).

[061] Antigens

[062] The antigen employed as X in the compositions of Formula 1 and/or Formula 2 can be a protein or a peptide, e.g. the antigen may be a complete or partial therapeutic agent, a full-length transplant protein or peptide thereof, a full-length autoantigen or peptide thereof, a full-length allergen or peptide thereof, and/or a nucleic acid, or a mimetic of an aforementioned antigen.

[063] Antigens employed in the practice of the present disclosure can be one or more of the following:

- Therapeutic agents that are proteins, peptides, antibodies and antibody-like molecules, including antibody fragments and fusion proteins with antibodies and antibody fragments. These include human, non-human (such as mouse) and non-natural (i.e., engineered) proteins, antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies, and non-antibody binding scaffolds, such as fibronectins, DARPin, knottins, and the like.
- Human allograft transplantation antigens against which transplant recipients develop an unwanted immune response.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- Self-antigens that cause an unwanted, autoimmune response. Those skilled in the art will appreciate that while self-antigens are of an endogenous origin in an autoimmune disease patient, the polypeptides employed in the disclosed compositions are typically synthesized exogenously (as opposed to being purified and concentrated from a source of origin).
- Foreign antigens, such as food, animal, plant and environmental antigens, against which a patient experiences an unwanted immune response. Those skilled in the art will appreciate that while a therapeutic protein can also be considered a foreign antigen due to its exogenous origin, for purposes of clarity in the description of the present disclosure such therapeutics are described as a separate group. Similarly, a plant or an animal antigen can be eaten and considered a food antigen, and an environmental antigen may originate from a plant. They are, however, all foreign antigens. In the interest of simplicity no attempt will be made to describe distinguish and define all of such potentially overlapping groups, as those skilled in the art can appreciate the antigens that can be employed in the compositions of the disclosure, particularly in light of the detailed description and examples.

The antigen can be a complete protein, a portion of a complete protein, a peptide, or the like, and can be derivatized (as discussed above) for attachment to a linker and/or galactosylating moiety, can be a variant and/or can contain conservative substitutions, particularly maintaining sequence identity, and/or can be desialylated.

[064] In the embodiments where the antigen is a therapeutic protein, peptide, antibody or antibody-like molecule, specific antigens can be selected from: Abatacept, Abciximab, Adalimumab, Adenosine deaminase, Ado-trastuzumab emtansine, Agalsidase alfa, Agalsidase beta, Aldeslakin, Alglucerase, Alglucosidase alfa, α -1-proteinase inhibitor, Anakinra, Anistreplase (anisooylated plasminogen streptokinase activator complex), Antithrombin III, Antithymocyte globulin, Ateplase, Bevacizumab, Bivalirudin, Botulinum toxin type A, Botulinum toxin type B, C1-esterase inhibitor, Canakinumab, Carboxypeptidase G2 (Glucarpidase and Voraxaze), Certolizumab pegol, Cetuximab, Collagenase, Crotalidae immune Fab, Darbepoetin- α , Denosumab, Digoxin immune Fab, Dornase alfa, Eculizumab, Etanercept, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XIII, Fibrinogen, Filgrastim, Galsulfase, Golimumab, Histrelin acetate, Hyaluronidase, Idursulphase, Imiglucerase, Infliximab, Insulin [including recombinant human insulin ("rHu insulin") and bovine insulin], Interferon- α 2a, Interferon- α 2b, Interferon- β 1a, Interferon- β 1b, Interferon- γ 1b, Ipilimumab, L-arginase, L-asparaginase, L-methionase, Lactase, Laronidase, Lepirudin / hirudin, Mecasermin, Mecasermin rinfabate, Methoxy Natalizumab, Octreotide, Ofatumumab, Oprelvekin, Pancreatic amylase, Pancreatic lipase, Papain, Peg-asparaginase, Peg-doxorubicin HCl, PEG-epoetin- β , Pegfilgrastim, Peg-Interferon- α 2a, Peg-Interferon- α 2b, Pegloticase, Pegvisomant, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Protein C, Rasburicase (uricase), Sacrosidase, Salmon calcitonin, Sargramostim, Streptokinase, Tenecteplase, Teriparatide, Tocilizumab (atlizumab), Trastuzumab, Type 1 alpha-interferon, Ustekinumab, vW factor. The therapeutic protein can be obtained from natural sources (e.g., concentrated and purified) or synthesized, e.g., recombinantly, and includes antibody therapeutics that are typically IgG monoclonal or fragments or fusions.

[065] Particular therapeutic protein, peptide, antibody or antibody-like molecules include

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

Abciximab, Adalimumab, Agalsidase alfa, Agalsidase beta, Aldeslakin, Alglucosidase alfa, Factor VIII, Factor IX, Infliximab, Insulin (including rHu Insulin), L-asparaginase, Laronidase, Natalizumab, Octreotide, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), or Rasburicase (uricase) and generally IgG monoclonal antibodies in their varying formats.

[066] Another particular group includes the hemostatic agents (Factor VIII and IX), insulin (including rHu Insulin), and the non-human therapeutics uricase, PAL and asparaginase.

[067] Unwanted immune response in hematology and transplant includes autoimmune aplastic anemia, transplant rejection (generally), and Graft vs. Host Disease (bone marrow transplant rejection). In the embodiments where the antigen is a human allograft transplantation antigen, specific sequences can be selected from: subunits of the various MHC class I and MHC class II haplotype proteins (for example, donor/recipient differences identified in tissue cross-matching), and single-amino-acid polymorphisms on minor blood group antigens including RhCE, Kell, Kidd, Duffy and Ss. Such compositions can be prepared individually for a given donor/recipient pair.

[068] In the embodiments where the antigen is a self-antigen, specific antigens (and the autoimmune disease with which they are associated) can be selected from:

- In type 1 diabetes mellitus, several main antigens have been identified: insulin, proinsulin, preproinsulin, glutamic acid decarboxylase-65 (GAD-65 or glutamate decarboxylase 2), GAD-67, glucose-6 phosphatase 2 (IGRP or islet-specific glucose 6 phosphatase catalytic subunit related protein), insulinoma-associated protein 2 (IA-2), and insulinoma-associated protein 2 β (IA-2 β); other antigens include ICA69, ICA12 (SOX-13), carboxypeptidase H, Imogen 38, GLIMA 38, chromogranin-A, HSP-60, carboxypeptidase E, peripherin, glucose transporter 2, hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein, S100 β , glial fibrillary acidic protein, regenerating gene II, pancreatic duodenal homeobox 1, dystrophin myotonia kinase, islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, and SST G-protein coupled receptors 1-5. It should be noted that insulin is an example of an antigen that can be characterized both as a self-antigen and a therapeutic protein antigen. For example, rHu insulin and bovine insulin are therapeutic protein antigens (that are the subject of unwanted immune attack), whereas endogenous human insulin is a self-antigen (that is the subject of an unwanted immune attack). Because endogenous human insulin is not available to be employed in a pharmaceutical composition a recombinant form is employed in the compositions of the disclosure.
 - Human insulin, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P01308):
MALWMRLRLPL LALLALWGPD PAAAFVNHQL CGSHLVEALY LVCGERGFFY
TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGLQKRG IVEQCCTSLC
SLYQLENYCN (SEQ ID NO:5).
 - GAD-65, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT Q05329):
MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGI GNKLCALLYG
DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPC SCSKVDVNYA FLHATDLLPA

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

CDGERPTLAF LQDVMNILLQ YVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA
 DQPQNLEEL MHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTA
 NTNMFTEIA PVFVLLLEYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFS PGGAISNMYA
 MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH SHFSLKKGAA ALGIGTDSVI
 LIKODERGKM IPSDLERRIL EAKQKGFVPF LVSATAGTTV YGAFDPLLAV
 ADICKKYKIW MHVDAAWGGG LLMSRKHKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV
 PLQCSALLVR EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSYDTG DKALQCGRHV
 DVFKLWLMWR AKGTTGFEAH VDKCLELAAY LYNIIKNREG YEMVFDGKPG
 HTNVCFWYIP PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA PVIKARMEY GTTMVSYOPL
 GDKVNFFRMV ISNPAATHQD IDFLIEEIER LGQDL (SEQ ID NO:6).

- IGRP, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT QN9QR9):

MDFLHRNGVLIQHLQKDYRAYYTFLNFMNSVGDPRNFIYFPLCFQFNQTVGTKMI
 WVAVIGDWLNLIFKWILFGHRPYWVQETQIYPNHSSPCLEQFPPTTCETGPGSPSG
 HAMGASCVWYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHRLTWSFLWSVFWLIQISVCISRVI
 ATHFPHQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGIQTASLGTYLKTNLFLFLFAVGFYLLRLVNI
 DLLWSVPIAKKWCANPDWIHIDTTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLSCRGGNN
 YTLFSRLLCALTSILTILQYHFLQIPTHEEHFYVLSFCKSASIPLTVAFIPYSVHMLM
 KQSGKKSQ (SEQ ID NO:7).

- In autoimmune diseases of the thyroid, including Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease, main antigens include thyroglobulin (TG), thyroid peroxidase (TPO) and thyrotropin receptor (TSHR); other antigens include sodium iodine symporter (NIS) and megalin. In thyroid-associated ophthalmopathy and dermopathy, in addition to thyroid autoantigens including TSHR, an antigen is insulin-like growth factor 1 receptor. In hypoparathyroidism, a main antigen is calcium sensitive receptor.
- In Addison's Disease, main antigens include 21-hydroxylase, 17 β -hydroxylase, and P450 side chain cleavage enzyme (P450_{scc}); other antigens include ACTH receptor, P450_{c21} and P450_{c17}.
- In premature ovarian failure, main antigens include FSH receptor and α -enolase.
- In autoimmune hypophysitis, or pituitary autoimmune disease, main antigens include pituitary gland-specific protein factor (PGSF) 1a and 2; another antigen is type 2 iodothyronine deiodinase.
- In multiple sclerosis, main antigens include myelin basic protein ("MBP"), myelin oligodendrocyte glycoprotein ("MOG") and myelin proteolipid protein ("PLP").

- MBP, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P02686):

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNN
 GTSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDR
 PSEDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRH
 RDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGLPQKSHGRTQDENPVV

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

HFFKNIVTPRTPPPSQGKGRQLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFK
GVDAQGTLSKIFKLGGDRSRSGSPMARR (SEQ ID NO:8).

- o MOG, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT Q16653):

MASLSRPSLPSCLCFLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPG
KNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTTELLKDAIGEGKVTLR
IRNVRFSDEGGFTCFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYVWSPGVLVLLAVLPVLLQIT
VGLIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCKITLFVIVPVLGPLVALIICYNW
LHRRLAGQFLEELRNPF (SEQ ID NO:9).

- o PLP, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P60201):

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQD
YEYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSAT
VTGGQKGRGSRGQHQHSLERVCHCLGKWLGHDPDKFVGITYALTVVWLLVFACSA
VPVYIYFNTWTTCCQSIAPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCGSNLLSIC
KTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTFK (SEQ ID
NO:10).

- o Peptides/epitopes useful in the compositions of the disclosure for treating multiple sclerosis include some or all of the following sequences, individually in a composition of Formula 1, together in a cocktail of compositions of Formula 1, or fused in one or more compositions of Formula 2:

- MBP13-32: KYLATASTMDHARHGFLPRH (SEQ ID NO:11);
- MBP83-99: ENPWHFFKNIVTPRTP (SEQ ID NO:12);
- MBP111-129: LSRFSWGAEGQRPFGYGG (SEQ ID NO:13);
- MBP146-170: AQGTLSKIFKLGGDRSRSGSPMARR (SEQ ID NO:14);
- MOG1-20: GQFRVIGPRHPIRALVGDEV (SEQ ID NO:15);
- MOG35-55: MEVGWYRPPFSRVHLYRNGK (SEQ ID NO:16); and
- PLP139-154: HCLGKWLGHDPDKFVGI (SEQ ID NO:17).

- In rheumatoid arthritis, main antigens include collagen II, immunoglobulin binding protein, the fragment crystallizable region of immunoglobulin G, double-stranded DNA, and the natural and cirtullinated forms of proteins implicated in rheumatoid arthritis pathology, including fibrin/fibrinogen, vimentin, collagen I and II, and alpha-enolase.
- In autoimmune gastritis, a main antigen is H⁺,K⁺-ATPase.
- In pernicious angemis, a main antigen is intrinsic factor.
- In celiac disease, main antigens are tissue transglutaminase and the natural and deamidated forms of gluten or gluten-like proteins, such as alpha-, gamma-, and omega-gliadin, glutenin, hordein, secalin, and avenin. Those skilled in the art will appreciate, for example, that while the main antigen of celiac disease is alpha gliadin, alpha gliadin turns more immunogenic in the body through deamidation by tissue glutaminase converting alpha gliadin's glutamines to glutamic acid. Thus, while alpha gliadin is originally a foreign food antigen, once it has been

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

modified in the body to become more immunogenic it can be characterized as a self-antigen.

- In vitiligo, a main antigen is tyrosinase, and tyrosinase related protein 1 and 2.
 - MART1, Melanoma antigen recognized by T cells 1, Melan-A, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT Q16655):
 MPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTVILGVLLIGCWYCRRRNGYRAL
 MDKSLHVGTCALTRRCPQEGFDHRDSKVSLQEKNCPEVVPNAPPAYEKLAEQS
 PPPYSP (SEQ ID NO:18).
 - Tyrosinase, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P14679):
 MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECPPWSGDRSPCGQLSGRGS
 CQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFW
 GPNCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTAKHTISSDYVPIGTYGQMKNGSTPM
 FNDINIIDLFVWMHYVSMALLGGSEIWRDIDFAHEAPFLPWHRFLRLRWEQEIQ
 KLTGDNFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGQHTNPNNLLSPASFFSSWQIVCSRL
 EEYNHQSCLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPLPSSADVEFCLSLTQYESGSMKD
 AANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLHHA
 FVDSIFEQWLRHRPLQEVYPEANAPIGHNRESYMPFIPLRYNGDFFISSKDLGYD
 YSYLQSDPDSPFDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRK
 QLPEEKQPLLMEKEDYHSLYQSHL (SEQ ID NO:19).
 - Melanocyte protein PMEL, gp100, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P40967):
 MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRLRTKAWNRLQYPEWTEA
 QRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSQKVLDPGQVWVNNTIING
 SQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGWSQKRSFVYVWKTWGQYVQVLGG
 PVSGLSIGTGRAMLGTHTEMTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFVSVSQ
 RALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPGSLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVT
 TYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTTDGHRTAEAPNTTAGQVPTTEVVG
 TTPGQAPTAEPSTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLA
 EMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMST
 ESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGE
 GDFAELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRQCQPVLPSPACQLVLHQILKGG
 GTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLVIGILLVMAVVLASLIYRRRL
 MKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV (SEQ ID NO:20).
- In myasthenia gravis, a main antigen is acetylcholine receptor.
- In pemphigus vulgaris and variants, main antigens are desmoglein 3, 1 and 4; other antigens include pemphaxin, desmocollins, plakoglobin, periplakin, desmoplakins, and acetylcholine receptor.
- In bullous pemphigoid, main antigens include BP180 and BP230; other antigens include plectin and laminin 5.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- In dermatitis herpetiformis Dühring, main antigens include endomysium and tissue transglutaminase.
- In epidermolysis bullosa acquisita, a main antigen is collagen VII.
- In systemic sclerosis, main antigens include matrix metalloproteinase 1 and 3, the collagen-specific molecular chaperone heat-shock protein 47, fibrillin-1, and PDGF receptor; other antigens include Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jo1, NAG-2, centromere proteins, topoisomerase I, nucleolar proteins, RNA polymerase I, II and III, PM-Slc, fibrillarin, and B23.
- In mixed connective tissue disease, a main antigen is U1snRNP.
- In Sjogren's syndrome, the main antigens are nuclear antigens SS-A and SS-B; other antigens include fodrin, poly(ADP-ribose) polymerase and topoisomerase, muscarinic receptors, and the Fc-gamma receptor IIIb.
- In systemic lupus erythematosus, main antigens include nuclear proteins including the "Smith antigen," SS-A, high mobility group box 1 (HMGB1), nucleosomes, histone proteins and double-stranded DNA (against which auto-antibodies are made in the disease process).
- In Goodpasture's syndrome, main antigens include glomerular basement membrane proteins including collagen IV.
- In rheumatic heart disease, a main antigen is cardiac myosin.
- In autoimmune polyendocrine syndrome type 1 antigens include aromatic L-amino acid decarboxylase, histidine decarboxylase, cysteine sulfinic acid decarboxylase, tryptophan hydroxylase, tyrosine hydroxylase, phenylalanine hydroxylase, hepatic P450 cytochromes P4501A2 and 2A6, SOX-9, SOX-10, calcium-sensing receptor protein, and the type 1 interferons interferon alpha, beta and omega.
- In neuromyelitis optica, a main antigen is AQP4.
 - Aquaporin-4, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P55087):
MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGST
INWGGTEKPLPVDMLISLCFGLSIATMVQCFCGHISGGHINPAVTVMVCTRKISIAKS
VFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGGLGVTMVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIF
ASCDKSRDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWI
YWVGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVE
TDDLILKPGVVHVIDVDRGEEKKGKDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:21).
- In uveitis, main antigens include Retinal S-antigen or "S-arrestin" and interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP) or retinol-binding protein 3.
 - S-arrestin, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P10523):
MAASGKTSKS EPNHVIFKKI SRDKSVTIYL GNRDYIDHVS QVQPDGVVL
VDPDLVKGKK VYVTLTCAFR YGQEDIDVIG LTFRRDLYFS RVQVYPPVGA
ASTPTKLOES LLKKLGSNTY PFLLTFPDYL PCSVMLQPAP QDSGKSCGVD
FEVKAFATDS TDAEEDKIPK KSSVRLIRK VQHAPLEMGP QPRAEAAWQF
FMSDKPLHLA VSLNKEIYFH GEPIPVTVTV TNTEKTVKK IKAFVEQVAN

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

VVLYSSDYV KPVAMEEAE KVPPNSTLTK TLTLPLLAN NRERRGIALD
 GKIKHEDTNL ASSTIIEGI DRTVLGILVS YQIKVKLTVS GFLGELTSSE
 VATEVPFRLM HPQPEDPAKE SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAEEGKRDK
 NDVDE (SEQ ID NO:22).

- IRBP, including an exogenously obtained form useful in the compositions of the disclosure, has the following sequence (UNIPROT P10745):

MMREWVLLMSVLLCGLAGPHTLFPQSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAQQAI
 KSHEILSISDPQTLASVLTAGVQSSSLNDPRLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLEEELLA
 WLQRGLRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDL
 RHCTGGQVSGIPYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDV
 VVLTSSQTRGVAEDIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLRKLIGESDFFFTVPVSRS
 LGPLGGGSQTWEGSGVLPCVGTAEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLDKDY
 TLVDRVPTLLQHLASMDFTVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSW
 PAPDAAEDSPQVAPELPEDEAIRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDSFADASVLG
 VLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRHNPGGPSSAVPLLSYFQGPEAGPVHLFTTY
 DRRTNITQEHFSHMLPGPRYSTQRGVYLLTSHRTATAAEFFAFLMQSLGWATLVG
 EITAGNLLHTRTVPLDTPGSLALTVPVLTIDNHGEAWLGGGVVPDAIVLAEALD
 KAEVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGAYRTAVDLE
 SLASQLTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEV
 LPGQLGYLRFDAMAELETVKAVGPQLVRLVWQQLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIP
 LCSYFFAEPRQHLYSVFDRTSKVTEVWTLQVAGQRYGSHKDLIYLSHTSGSA
 AEAFATMQDLQRATVIGEPTAGGALSVDGIYQVGSSPLYASMPTQMAMSATTGKA
 WDLAGVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVDADNYASAELGAKMAT
 KLSGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLSGDPHLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIPS
 PEVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMMFGDGELLTQVSRLVVEHIWKKIMHTDAMI
 MRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKK
 SMVILTSSVTAGTAEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDNTNLYTIPTA
 RSVGASDGSSWEGVGVTPHVVPAAEEALARAKEMLQHNQLRVKRSPLQDHL
 (SEQ ID NO:23).

[069] In the embodiments where the antigen is a foreign antigen against which an unwanted immune response can be developed, such as food antigens, specific antigens can be:

- from peanut: conarachin (Ara h 1), allergen II (Ara h 2), arachis agglutinin, conglutinin (Ara h 6);
 - conarachin, for example has the sequence identified as UNIPROT Q6PSU6
- from apple: 31 kDa major allergen/disease resistance protein homolog (Mal d 2), lipid transfer protein precursor (Mal d 3), major allergen Mal d 1.03D (Mal d 1);
- from milk: α -lactalbumin (ALA), lactotransferrin; from kiwi: actinidin (Act c 1, Act d 1), phytocystatin, thaumatin-like protein (Act d 2), kiwellin (Act d 5);
- from egg whites: ovomucoid, ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme;
- from egg yolks: livetin, apovitillin, and vosvetin;
- from mustard: 2S albumin (Sin a 1), 11S globulin (Sin a 2), lipid transfer protein (Sin a 3),

PCT/IB2015/001145

- from celery: profilin (Api g 4), high molecular weight glycoprotein (Api g 5);
- from shrimp: Pen a 1 allergen (Pen a 1), allergen Pen m 2 (Pen m 2), tropomyosin fast isoform;
- from wheat and/or other cereals: high molecular weight glutenin, low molecular weight glutenin, alpha-, gamma- and omega-gliadin, hordein, secalin and/or avenin;
 - peptides/epitopes useful in the compositions of the disclosure for treating Celiac Disease include some or all of the following sequences, individually in a composition of Formula 1, together in a cocktail of compositions of Formula 1, or fused in one or more compositions of Formula 2:
 - DQ-2 relevant, Alpha-gliadin "33-mer" native:
LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:24)
 - DQ-2 relevant, Alpha-gliadin "33-mer" deamidated:
LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:25)
 - DQ-8 relevant, Alpha-gliadin:
QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:26)
 - DQ-8 relevant, Omega-gliadin (wheat, U5UA46):
QPFQPEQPFQ (SEQ ID NO:27)
- from strawberry: major strawberry allergy Fra a 1-E (Fra a 1); and
- from banana: profilin (Mus xp 1).

- weeds, (including ragweed allergens amb a 1, 2, 3, 5, and 6; and Amb t 5; pigweed Che a 2 and 5; and other weed allergens Par j 1, 2, and 3, and Par o 1);
- grass (including major allergens Cyn d 1, 7, and 12; Dac g 1, 2, and 5; Hol l 1.01203; Lol p 1, 2, 3, 5, and 11; Mer a 1; Pha a 1; Poa p 1 and 5);
- pollen from ragweed and other weeds (including curly dock, lambs quarters, pigweed, plantain, sheep sorrel, and sagebrush), grass (including Bermuda, Johnson, Kentucky, Orchard, Sweet vernal, and Timothy grass), and trees (including catalpa, elm, hickory, olive, pecan, sycamore, and walnut);
- dust (including major allergens from species *Dermatophagoides pteronyssinus*, such as Der p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 20, 21, and 23; from species *Dermatophagoides farinae*, such as Der f 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 22, and 24; from species *Blomia tropicalis* such as Blo t 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19, and 21; also allergens Eur m 2 from *Euroglyphus maynei*, Tyr p 13 from *Tyrophagus putrescentiae*, and allergens Bla g 1, 2, and 4; Per a 1, 3, and 7 from cockroach);
- pets (including cats, dogs, rodents, and farm animals; major cat allergens include Fel d 1 through 8, cat IgA, BLa g 2, and cat albumin; major dog allergens include Can f 1 through 6, and dog albumin);

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- bee stings, including major allergens Api m 1 through 12; and
- fungus, including allergens derived from, species of *Aspergillus* and *Penicillium*, as well as the species *Alternaria alternata*, *Davidiella tassiana*, and *Trichophyton rubrum*.

[071] As will be appreciated by those skilled in the art, a patient can be tested to identify an antigen against which an unwanted immune response has developed, and a protein, peptide or the like can be developed based on that antigen and incorporated as X in a composition of the present disclosure.

[072] **Sialated Antigens, Antibodies, Antibody Fragments**

[073] Following are examples of antigens, antibodies, antibody fragments having sialylation that can be removed to leave glycosylation specifically targeting the ASGPR: follicle stimulating hormone (FSH), human chorionic gonadotropin (HCG), luteinizing hormone (LH), osteopontin, thyroid stimulating hormone (TSH), agalsidase alfa, agalsidase beta (FABRAZYME®; Genzyme), epoetin alfa and epoetin beta, follitropin alfa (GONAL-F®; Merck/Serono) and follitropin beta (FOLLISTIM®; Schering-Plough), insulin growth factor binding protein 6 (IGFBP-6), lutropin alfa (LUVERIS®; Merck/Serono), transforming growth factor β 1, antithrombin (ATryn®/TROMBATE-III®; Genzyme/Talecris Biotherapeutics), thyrotropin alfa (THYROGEN®; Genzyme), lenograstim, sargramostim (LEUKINE®; Genzyme), interleukin-3, prourokinase, lymphotoxin, C1-esterase inhibitor (Berinert®; CSL), IgG-like antibodies, interferon beta, coagulation factor VIIa (NOVOSEVEN®; Novo Nordisk), coagulation factor VIII (moroctocog alfa), coagulation factor IX (nonacog alfa) (BENEFIX®; Wyeth), and the p55 tumor necrosis receptor fusion protein. (See: Byrne et al., Drug Discovery Today, Vol 12, No. 7/8, pages 319-326, Apr. 2007 and Sola et al., BioDrugs. 2010; 24(1): 9-21). Pharmaceutically relevant proteins that have previously been hyperglycosylated and can be desialylated for hepatocyte-ASGPR targeting include: interferon alfa and gamma, luteinizing hormone, Fv antibody fragments, asparaginase, cholinesterase, darbepoetin alfa (AraNESP®; Amgen), trombopoietin, leptin, FSH, IFN- α 2, serum albumin, and corifollitropin alfa.

[074] Proteins with glycans that do not normally terminate in sialic acids, including proteins produced in bacteria or yeast (such as arginase, some insulins, and uricase) would not be amenable to desialylation.

[075] Those skilled in the art will appreciate that publicly available references, such as UNIPROT, disclose the presence and location of sites for desialylation on most if not all antigens, antibodies, antibody fragments and ligands of interest.

[076] **Antibodies and Peptide Ligands**

[077] In the embodiments employing an antibody, antibody fragment or ligand, such moieties are chosen to specifically bind a targeted circulating protein or peptide or antibody, and result in hepatic uptake of the circulating targeted moiety, possibly as an adduct with the targeting moiety, ultimately resulting in the clearance and inactivation of the circulating targeted moiety. For example, liver-targeted Factor VIII will bind and clear circulating Factor VIII antibodies. Procedures for the identification of such

WO 2015/140648

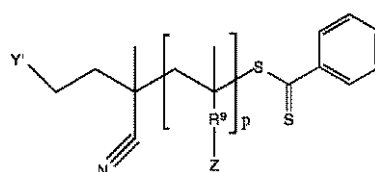
PCT/IB2015/001145

moieties will be familiar to those skilled in the art.

[078] Linkers

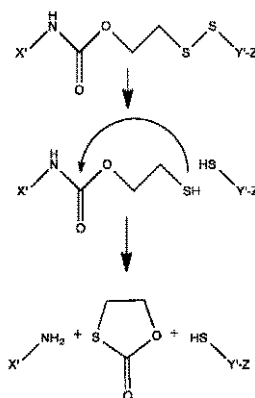
[079] The linkers employed in the compositions of the present disclosure ("Y" in Formula 1) can include N-hydroxysuccinamidyl linkers, malaemide linkers, vinylsulfone linkers, pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol) linkers, pyridyl di-thiol linkers, n-nitrophenyl carbonate linkers, NHS-ester linkers, nitrophenoxy poly(ethylene glycol)ester linkers and the like.

[080] One particular group of linkers Formula Y'-CMP below (where Y' indicates the remaining portion of the linker and R⁹ and Z are as defined). More particularly, in the group of linkers including Formula Y'-CMP, the R⁹ substituent is an ethylacetamido group, and even more particularly the ethylacetamido is conjugated with C1 of N-acetylgalactosamine.



Formula Y'-CMP

[081] Di-thiol-containing linkers, particularly particularly disulfanylethyl carbamate-containing linkers (named including a free amine of X, otherwise named a "disulfanyl ethyl ester" without including the free amine of X) are particularly advantageous in the present compositions as having the ability to cleave and release an antigen in its original form once inside a cell, for example as illustrated below (where Y' indicates the remaining portion of the linker and X' and Z are as defined).



[082]

[083] Particularly with regard to the linkers illustrated below in Formula Ya through Formula Yp: the the left bracket "(" indicates the bond between X and Y; the right or bottom bracket ")" indicates the bond between Y and Z; n is an integer representing a mixture including from about 1 to 100, particularly about 8 to 90 (e.g., 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 or 95), more particularly about 40 to 80 (e.g., 39, 40, 43, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 55, 57, 60, 62, 65, 66, 68, 70, 73, 75, 78, 80 or 81) ethylene glycol

WO 2015/140648

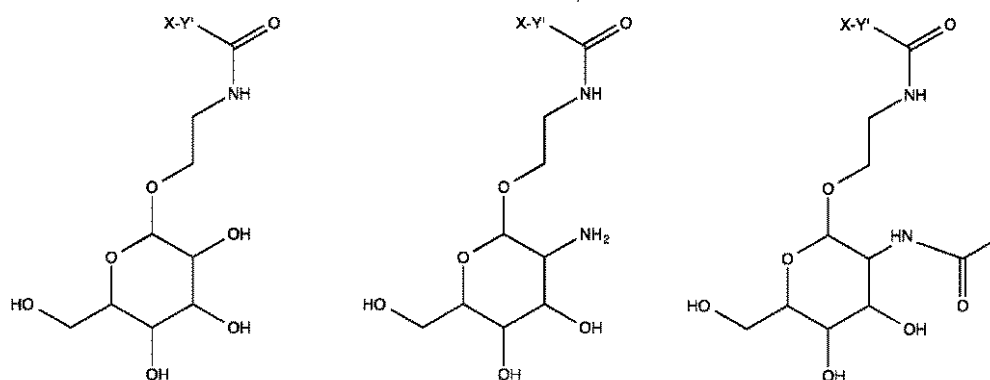
PCT/IB2015/001145

groups, where the mixture typically encompasses the integer specified as $n \pm 10\%$;
 p is an integer representing a mixture including from about 2 to 150, particularly about 20 to 100 (e.g., 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 or 105) and more particularly about 30 to 40 (e.g., 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 or 44), where the mixture typically encompasses the integer specified as $p \pm 10\%$;

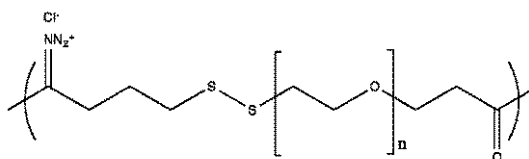
q is an integer representing a mixture including from about 1 to 44, particularly about 3 to 20 (e.g., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 or 22) and more particularly about 4 to 12 (e.g., 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 or 13), where the mixture typically encompasses the integer specified as $q \pm 10\%$; and

R^8 is $-\text{CH}_2-$ ("methyl") or $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ ("1-cyano-1-methyl-propyl" or "CMP").

R^9 is a direct bond or $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ (an ethylacetamido group or "EtAcN"), as illustrated in the following structures of Formula 1 (where the EtAcN group is shown and the rest of the linker is referred to as Y'):

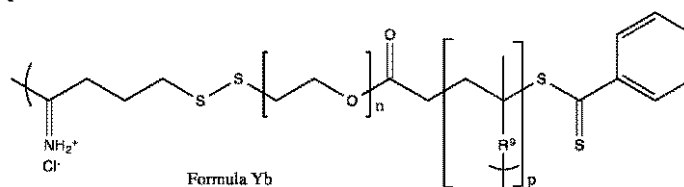


and Z is galactose, galactosamine or N -acetylgalactosamine conjugated at C1.



[084]

Formula Ya



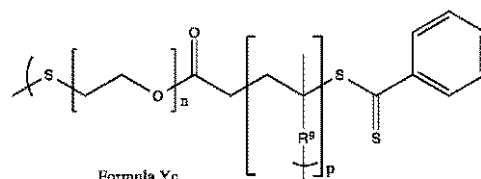
[085]

Formula Yb

WO 2015/140648

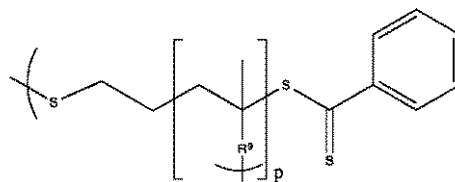
PCT/IB2015/001145

[086]



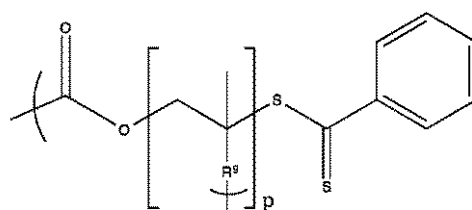
Formula Yc

[087]



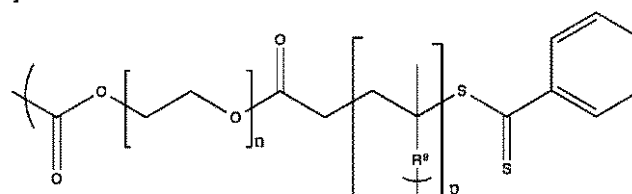
Formula Yd

[088]



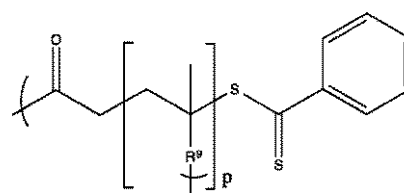
Formula Ye

[089]



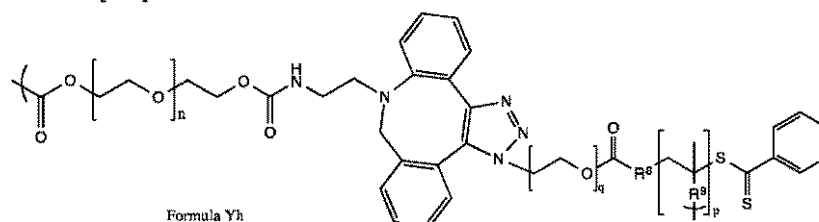
Formula Yf

[090]



Formula Yg

[091]



Formula Yh

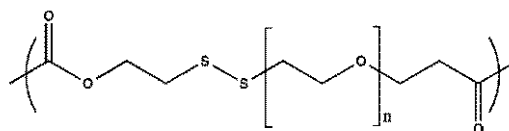
PCT/IB2015/001145



28

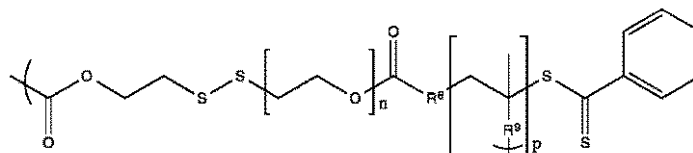
WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145



[098]

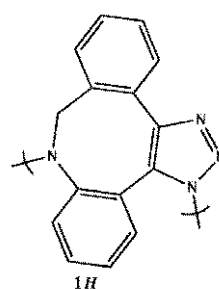
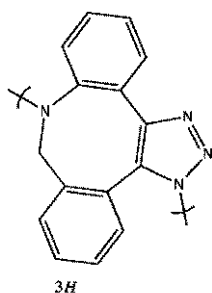
Formula Yo



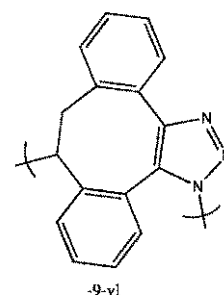
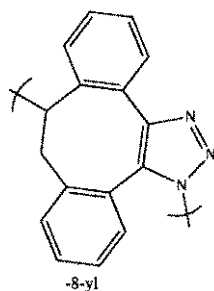
[099]

Formula Yp

[0100] The linkers shown above as Formulae Yh through Yn are synthesized as isomers that are employed without separation. For example, the linkers of Formulae Yh, Yi, Yj and Yn will be a mixture of the 8,9-dihydro-1*H*-dibenzo[*b,f*][1,2,3]triazolo[4,5-*d*]azocin-8-yl and 8,9-dihydro-3*H*-dibenzo[*b,f*][1,2,3]triazolo[4,5-*d*]azocin-8-yl structures illustrated below:



The linkers of Formulae Yk, YL and Ym will be a mixture of the 8,9-dihydro-1*H*-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-8-yl and 8,9-dihydro-1*H*-dibenzo[3,4:7,8]cycloocta[1,2-*d*][1,2,3]triazol-9-yl structures illustrated below:



The presence of such isomeric mixtures does not impair the functionality of the compositions employing such linkers.

[0101] Galactosylating Moieties

[0102] The galactosylating moieties employed in the compositions of the present disclosure serve to target the compositions to liver cells (for example, specifically binding hepatocytes) and can be selected from: galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine. It has been reported that ASGPR

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

affinity can be retained while modifying either side of galactose's C3/C4 –diol anchor (Mamidyala, Sreeman K., et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 1978-1981), therefore the points of conjugation are particularly at C1, C2 and C6.

[0103] Particular galactosylating moieties include galactose conjugated at C1 or C6, galactosamine conjugated at C2, and N-acetylgalactosamine conjugated at C6. Other particular galactosylating moieties include N-acetylgalactosamine conjugated at C2, more particularly conjugated to a linker bearing an R⁹ substituent that is CH₂. Still other particular galactosylating moieties include galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine conjugated at C1, more particularly conjugated to a linker bearing an R⁹ substituent that is an ethylacetamido group.

[0104] ASGPR Targeting Antibodies

[0105] The ASGPR-specific antibodies employed in the compositions of the present disclosure also serve to target compositions of the disclosure to liver cells and can be selected from commercially available products, such as: Anti-Asialoglycoprotein Receptor 1 antibody (ab42488) from Abcam plc, Cambridge, UK and ASGPR1/2 (FL-291) (sc28977) from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX. Alternatively, such antibodies can be expressed using any of a number of published sequences, such as the Dom26h-196-61, single-domain anti-ASGPR antibody:

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTYY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSS
(SEQ.ID.No:6)

[Coulstock E, et al., (2013) "Liver-targeting of interferon-alpha with tissue-specific domain antibodies." *PLoS One*. 8(2):e57263 and US 2013/0078216], or such a sequence having conservative substitutions. The above-referenced US patent application discloses liver-targeting molecules such as DOM26h-196-61 for delivering certain therapeutics [including interferon (interferon alpha 2, interferon alpha 5, interferon alpha 6, or consensus interferon), Ribavirin, Nexavar/Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab, and Herceptin/trastuzumab] for the treatment of liver diseases. The compositions of matter corresponding to Formula 2 employing DOM26h-196-61 or another liver-targeting molecule described in US 2013/0078216 do not include interferon (interferon alpha 2, interferon alpha 5, interferon alpha 6, or consensus interferon), Ribavirin, Nexavar/Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab, and Herceptin/trastuzumab within their scope.

[0106] New sequences for an antibody, antibody fragment, or peptide that specifically targets ASGPR can be discovered using various methods known by those skilled in the art. These methods can include, but are not limited to, vaccination technology, hybridoma technology, library display technologies (including bacterial and phage platforms), endogenous repertoire screening technologies, directed evolution and rational design.

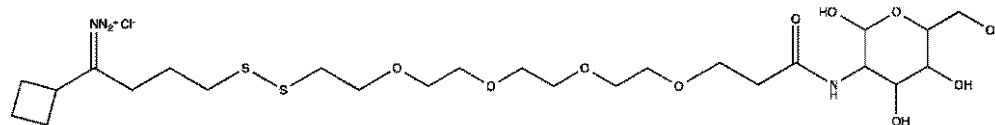
[0107] Nomenclature

[0108] The compositions of Formula 1 can be named using a combination of IUPAC and trivial names. For example, a compound corresponding to Formula 1 where X is a cyclobutyl moiety (shown instead of an antigen for illustrative purposes), Y is Formula Ya, m is 1, n is 4 and Z is N-

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

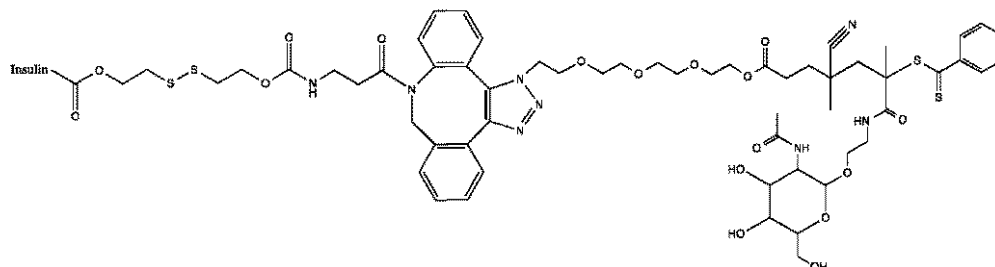
acetylgalactosamin-2-yl:



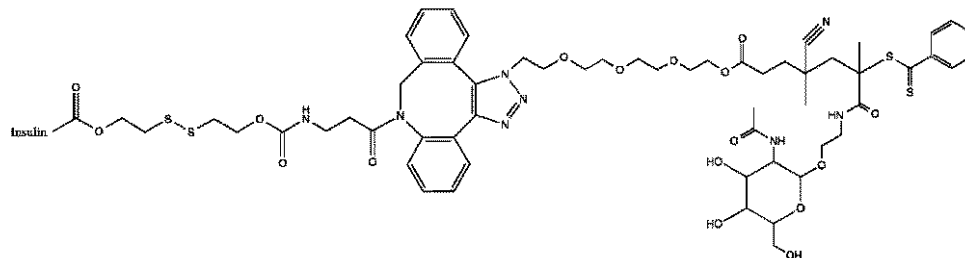
can be named (Z)-(21-cyclobutyl-1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-ylidene)triaz-1-yn-2-ium chloride, so the corresponding composition of the disclosure where X is tissue transglutaminase can be named (Z)-(21-(tissue transglutaminase)-1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-ylidene)triaz-1-yn-2-ium chloride. The corresponding composition of the disclosure where X' is tissue transglutaminase, m is 2, n is 4 and Z' is N-acetylgalactosamin-2-yl can be named (3Z)-((tissue transglutaminase)-1,3-diylbis(1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-yl-21-ylidene))bis(triaz-1-yn-2-ium) chloride.

[0109] In the interest of simplification, the compositions of Formula 1 can be named using an alternative naming system by reference to X and correspondence to one of Formulae 1a to 1p (as illustrated in the reaction schemes) followed by recitation of the integers for variables m, n, p and/or q, R⁸, R⁹ and identification of the galactosylating moiety and the position at which it is conjugated. Under this system, the composition of Formula 1a where X is ovalbumin, m is 2, n is 4 and Z is N-acetylgalactosamin-2-yl can be named "F1a-OVA-m₂-n₄-2NACGAL."

[0110] Similarly, the following composition of Formula 1



can be named "2-((2-(((3-(3-(22-((3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-16-cyano-16,18-dimethyl-13,19-dioxo-18-((phenylcarboxythio)thio)-3,6,9,12-tetraoxa-20-azadocosyl)-3,9-dihydro-8H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)carbamoyl)oxy)ethyl)disulfanyl)ethyl insulin carboxylate." The isomer:



can be named "2-((2-(((3-(1-(22-((3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

yl)oxy)-16-cyano-16,18-dimethyl-13,19-dioxo-18-((phenylcarbonothioyl)thio)-3,6,9,12-tetraoxa-20-azadocosyl)-**1,9-dihydro-8H**-dibenzo[*b,f*][1,2,3]triazolo[4,5-*d*]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)carbamoyl)-oxy)ethyl)disulfany)ethyl insulin carboxylate" (bold lettering highlights added for convenience in identifying the difference between the formal names). Employing the naming system adopted for the present disclosure, both isomers can be named "F1n-insulin-m₁-n₁-p₁-q₄-CMP-EtAcN-1NAcGAL" where CMP indicates that R⁸ is 1-cyano-1-methyl-propyl, EtAcN indicates that R⁹ is ethylacetamido and 1NAcGAL indicates Zⁿ is N-acetylgalactosamine conjugated at C1. Absence of the abbreviation EtAcN before the designation for Z would indicate that R⁹ is a direct bond.

[0111] In the compositions of Formula 2, left-to-right orientation of should not be taken as specifying N to C ordering absent specific indication to the contrary. For example, the compound of Formula 2 where m' is 1, m" is 0, X is Ovalbumin, Y is Gly₃Ser and Z is Anti-ASGPR Dom26h-196-61, can be named OVA-Gly₃Ser-DOM and read as covering both of the following:

N- OVA- Gly₃Ser- DOM-C

and

N- DOM- Gly₃Ser- OVA- C

The compositions of Formula 2, for example where m' is 1, m" is 0, X is Ovalbumin, Y is Gly₃Ser and Z is Anti-ASGPR Dom26h-196-61 (having a purification tag attached via an additional linker) can be named as follows:

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

or

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

where the C' terminal Gly₃Ser-6xHis group represents an amino acid sequence that facilitates isolation and purification.

[0112] The composition of Formula 2 where m' is 1, m" is 1, each X is Factor VIII, each Y is Gly₃Ser and Z is Anti-ASGPR Dom26h-196-61 (having a purification tag attached via an additional linker) can be named FVIII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVIII-Gly₃Ser-6xHis and covers both of the following:

N-FVIII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVIII-Gly₃Ser-6xHis-C

and

N-6xHis-Gly₃Ser-FVIII- Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser- FVIII-C.

[0113] The composition of Formula 2 where m' is 3, m" is 0, one, the three X antigens, respectively, are Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25), Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26) and Omega-gliadin (SEQ ID NO:27), each Y is a linker having an immunoproteosome cleavage site ("IPC"), and Z is Anti-ASGPR Dom26h-196-61 can be named:

Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-IPC-Alpha-gliadin-IPC-Omega-gliadin-IPC-DOM.

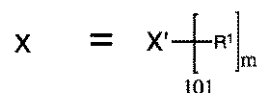
[0114] **Preparation of the Compositions of The Disclosure**

[0115] The compositions of Formula 1 can be prepared, for example, by adjusting the procedures described in Zhu, L., et al., *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 2119-2127. Syntheses of certain compositions of Formula 1 are also described below with reference to Reaction Schemes 1 to 14. Other synthetic approaches will be apparent to those skilled in the art.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0116] Formula 101 (below) is an alternative representation of X



where R¹ is a free surface amino (-NH₂) or thiol (-SH) moiety positioned on X's three-dimensional structure so as to be accessible for conjugation to a linker, and X' represents the remainder of X excluding the identified free amino group(s) [(X' is used in the reaction schemes to represent the remainder of X excluding free thiol group(s)]. Depending upon the identity of X, there will be at least one (the N-terminal amine) and can be multiple R¹ groups (predominantly from lysine residues or cysteine residues that are not involved in disulfide bonding), as represented by m, which is an integer from about 1 to 100, more typically 1 or from about 4 to 20, and most typically 1 to about 10.

[0117] Variables employed in the reaction schemes are as defined above, and additionally include the following, which should be understood to have these meanings absent any specific indication otherwise with respect to a particular reaction scheme or step.

- R² is OH or a protecting group;
- R³ is OH, NH₂, NHAc, a protecting group or NH-protecting group;
- R⁴ is OH or a protecting group;
- R⁵ is OH or a protecting group;
- R⁶ is OH or a protecting group;
- Z' is galactose conjugated at C1 or C6, galactosamine conjugated at C2, or N-acetylgalactosamine conjugated at C6;
- R⁸ is -CH₂- or -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-; and
- R⁹ is a direct bond and Z'' is N-acetylgalactosamine conjugated at C2;
- R⁹ is an ethylacetamido group and Z'' is galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine conjugated at C1.

[0118] **Synthetic Reaction Parameters**

[0119] The terms "solvent", "inert organic solvent" or "inert solvent" mean a solvent inert under the conditions of the reaction being described in conjunction therewith [including, for example, benzene, toluene, acetonitrile, tetrahydrofuran ("THF"), dimethylformamide ("DMF"), chloroform, methylene chloride (or dichloromethane), diethyl ether, methanol, pyridine and the like]. Unless specified to the contrary, the solvents used in the reactions of the present disclosure are inert organic solvents.

[0120] The term "q.s." means adding a quantity sufficient to achieve a stated function, e.g., to bring a solution to the desired volume (i.e., 100%).

[0121] Isolation and purification of the compounds and intermediates described herein can be effected, if desired, by any suitable separation or purification procedure such as, for example, filtration, extraction, crystallization, column chromatography, thin-layer chromatography or thick-layer chromatography, centrifugal size exclusion chromatography, high-performance liquid chromatography, recrystallization, sublimation, fast protein liquid chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or a combination of these procedures. Specific illustrations of suitable separation and isolation procedures

WO 2015/140648

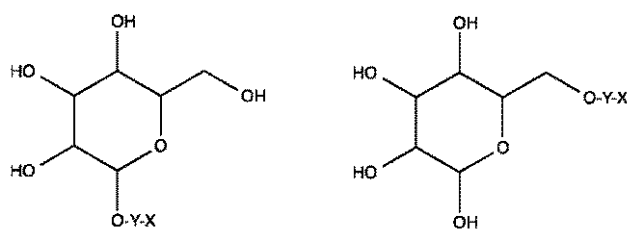
PCT/IB2015/001145

can be had by reference to the examples hereinbelow. However, other equivalent separation or isolation procedures can, of course, also be used.

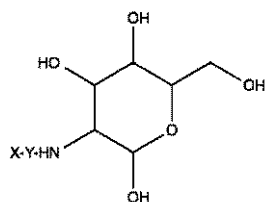
[0122] Unless otherwise specified (including in the examples), all reactions are conducted at standard atmospheric pressure (about 1 atmosphere) and ambient (or room) temperature (about 20 °C), at about pH 7.0-8.0.

[0123] Characterization of reaction products can be made by customary means, e.g., proton and carbon NMR, mass spectrometry, size exclusion chromatography, infrared spectroscopy, gel electrophoresis.

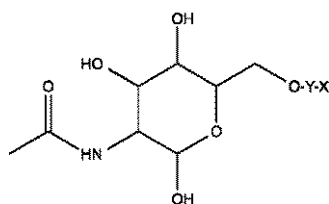
[0124] Reaction Scheme 1 illustrates the preparation of compositions of Formula 1 where Z can be galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine. In that regard and as defined above, Z' as employed in Reaction Scheme 1 encompasses galactose conjugated at C1 and C6 and corresponding to the following structures according to Formula 1:



galactosamine conjugated at C2 and corresponding to the following structure according to Formula 1:



and N-acetylgalactosamine conjugated at C6 and corresponding to the following structure according to Formula 1:

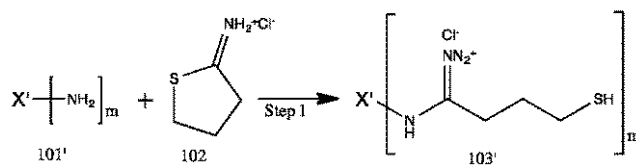


WO 2015/140648

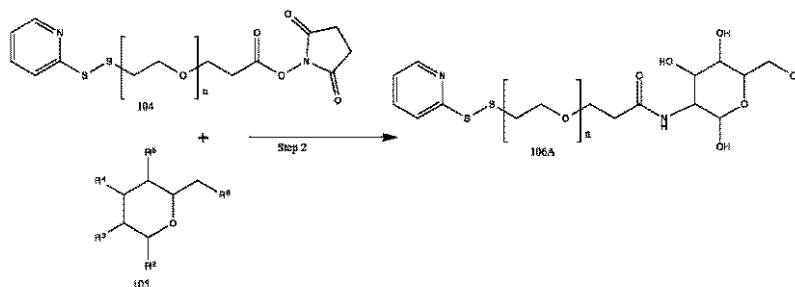
PCT/IB2015/001145

[0125]

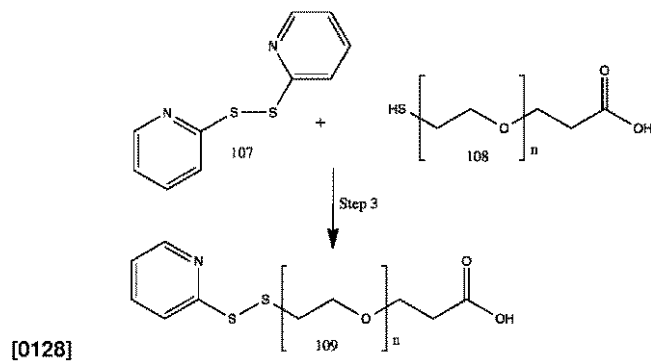
Reaction Scheme 1



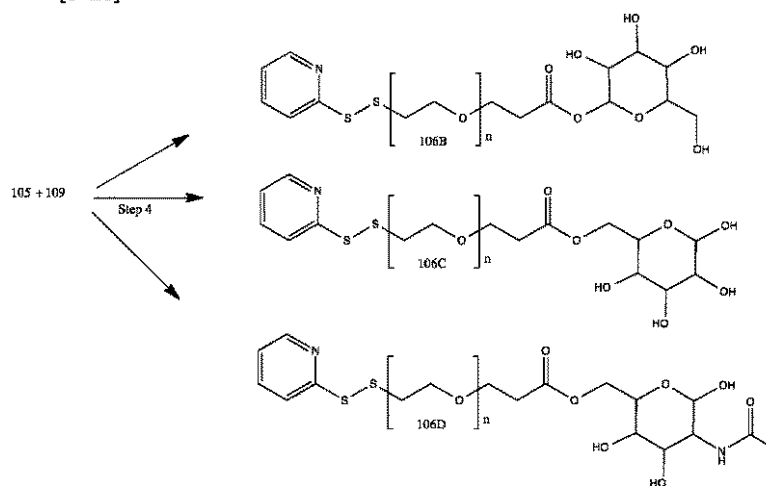
[0126]



[0127]



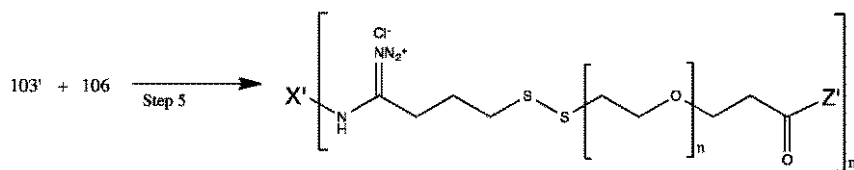
[0128]



[0129]

WO 2015/140648

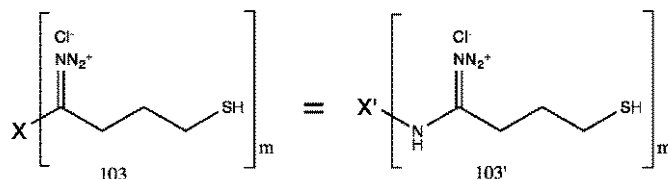
PCT/IB2015/001145



Formula 1a

[0130]

[0131] As illustrated above in Reaction Scheme 1, Step 1, surface thiol group(s) can be generated on an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having free surface amino group(s) (Formula 101') by contact with a Traut reagent (Formula 102) at a pH of about 8.0 for about 1 hour to give the Formula 103', from which unreacted Traut's reagent is removed, e.g., via centrifugal size exclusion chromatography. The two structures shown below, illustrate the product of Reaction Scheme 1, Step 1, respectively showing the free surface amino group(s) originally found on X (i.e., Formula 103' where X' represents the remainder of X excluding the identified free surface amino groups) and omitting the free surface amino group(s) (i.e., Formula 103). This parallels the distinction illustrated as between X and Formula 101. The convention has been followed in the subsequent reaction schemes.



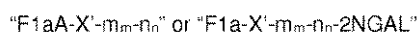
[0132] In Reaction Scheme 1, Step 2, a pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)-NHS ester (Formula 104) is contacted with galactosamine (Formula 105 where R³ is NH₂ and R², R⁴, R⁵ and R⁶ are OH) with stirring at about pH 8 for about 1 hour to give the corresponding pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)-sugar of Formula 106A, which can be used without further purification.

[0133] In Reaction Scheme 1, Step 3, 4,4'-dithiodipyridine (Formula 107) is contacted with a thiol-poly(ethylene glycol)propanoic acid (Formula 108) to give the corresponding pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)propanoic acid (Formula 109).

[0134] In Reaction Scheme 1, Step 4, the acid of Formula 109 is contacted with a protected galactose or N-acetylgalactosamine of Formula 105 where R² is OH and R³, R⁴, R⁵ and R⁶ are protecting groups ("PG"), where R⁶ is OH and R², R³, R⁴ and R⁵ are PG, or where R⁶ is N-acetyl and R², R³, R⁴ and R⁵ are PG to give the corresponding pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)-sugars of Formulae 106B, 106C and 106D, which can be used following de-protection.

[0135] In Reaction Scheme 1, Step 5, to a stirred solution of the product of Step 1 (Formula 103') is added an excess (corresponding to the value of m) of the product of Step 2 or Step 4 (Formula 106, i.e., 106A, 106B, 106C or 106D) for about 1 hour, followed by centrifugal sized exclusion chromatography to remove any free remaining reactants to yield the corresponding product according to Formula 1a, respectively, Formula 1aA, Formula 1aB, Formula 1aC and Formula 1aD.

[0136] The compositions corresponding to Formula 1a can be named, respectively, e.g., as follows:



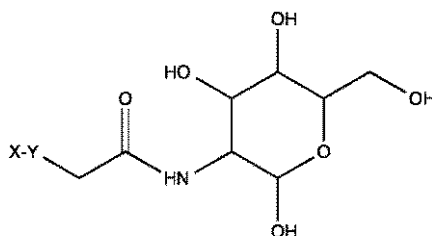
WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

"F1aB-X'-m_m-n_n" or "F1a-X'-m_m-n_n-1GAL""F1aC-X'-m_m-n_n" or "F1a-X'-m_m-n_n-6GAL""F1aD-X'-m_m-n_n" or "F1a-X'-m_m-n_n-6NAcGAL"

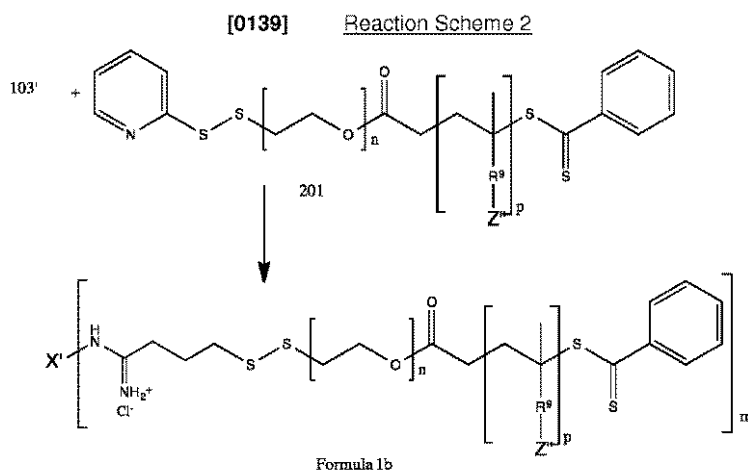
respectively, for products made employing an intermediate according to Formulae 106A-D.

[0137] Turning to Reaction Schemes 2-14 and for the purposes of the nomenclature employed therewith, except as expressly stated otherwise, "Z" refers to N-acetylgalactosamine conjugated at C2:



or to galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine conjugated at C1. It should be noted that the C1 conjugated compositions need to be protected during synthesis, for example by cyclizing the amine with the C3 hydroxyl and de-protecting following incorporation of the protected galactosamine into the adjacent portion of the linker.

[0138] The poly(galactose methacrylate) reactants of Formulae 201, 401, 501, 601, 701, 803 and 1401 can be prepared by methacrylating galactose, e.g., contacting galactosamine and methacrylate anhydride, followed by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization with a corresponding RAFT agent in the presence of azobisisobutyronitrile (AIBN) in a suitable solvent, starting with freeze-thaw cycles followed by heating at about 60-80 °C, preferably 70 °C for about 5-8, preferably about 6 hours. The polymer can be precipitated in a lower alkanol, preferably methanol.



[0140]

[0141] As illustrated in Reaction Scheme 2, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having free surface thiol group(s) prepared, e.g., as described with reference to Reaction Scheme 1, Step 1 (Formula 103') is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol) of Formula 201 for about 1 hour to yield the corresponding product according to

WO 2015/140648

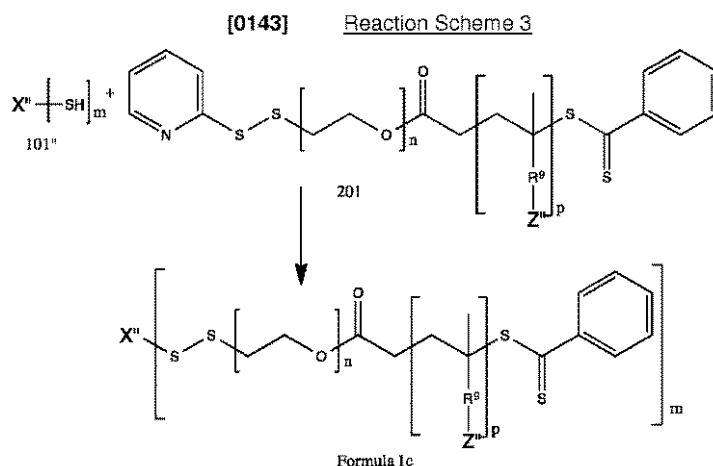
PCT/IB2015/001145

Formula 1b.

[0142] The compositions of Formula 1b can be named as follows:

"F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL" or "F1b-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

For example, the composition of Formula 1b where X' is uricase, m is 1, n is 4, p is 4 and Z' is N-acetylgalactosamine conjugated at C2 can be named "F1b-uricase-m₁-n₄-p₄-2NAcGAL" or "30-(uricase)-3,5,7,9-tetramethyl-12-oxo-1-phenyl-1-thioxo-3,5,7,9-tetrakis((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)carbamoyl)-13,16,19,22-tetraoxa-2,25,26-trithiatriacontan-30-iminium".



[0144]

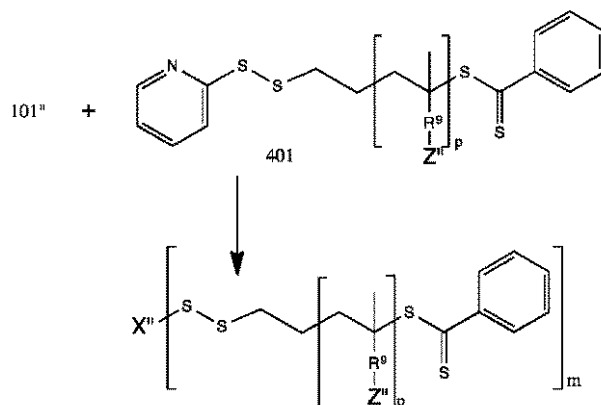
[0145] As illustrated in Reaction Scheme 3, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface thiol group(s) (cysteines) [Formula 101''] corresponding to Formula 101 and illustrating where X'', as the term will be subsequently employed, represents X excluding the identified free surface thiol group(s)] is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol) of Formula 201 to yield the corresponding product according to Formula 1c.

[0146] The compositions corresponding to Formula 1c can be named as follows:

"F1c-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL" or "F1c-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0147] Reaction Scheme 4

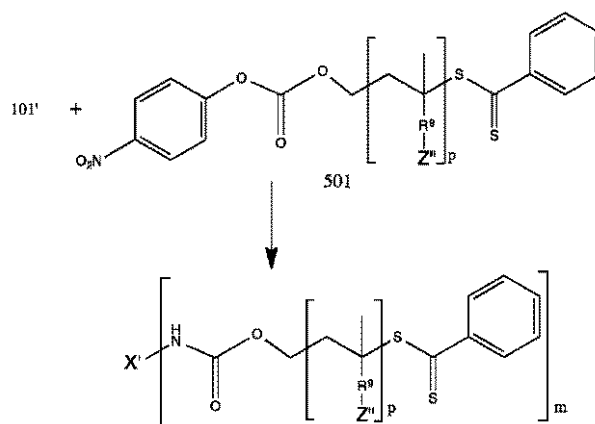
Formula 1d

[0148]

[0149] As illustrated in Reaction Scheme 4, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface thiol group(s) of Formula 101'' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a pyridyl di-thiol of Formula 401 to yield the corresponding product according to Formula 1d.

[0150] The compositions corresponding to Formula 1d can be named as follows:

"F1d-X'-m_m-p_p-2NAcGAL" or "F1d-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z".

[0151] Reaction Scheme 5

Formula 1e

[0152]

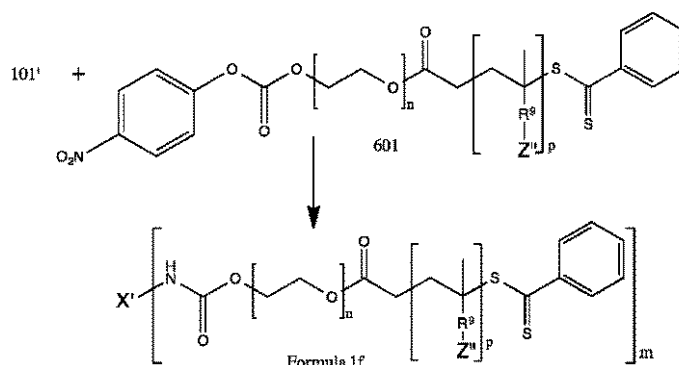
[0153] As illustrated in Reaction Scheme 5, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a n-nitrophenyl carbonate of Formula 501 to yield the corresponding product according to Formula 1e.

[0154] The compositions corresponding to Formula 1e can be named as follows:

"F1e-X'-m_m-p_p-2NAcGAL" or "F1e-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z".

WO 2015/140648

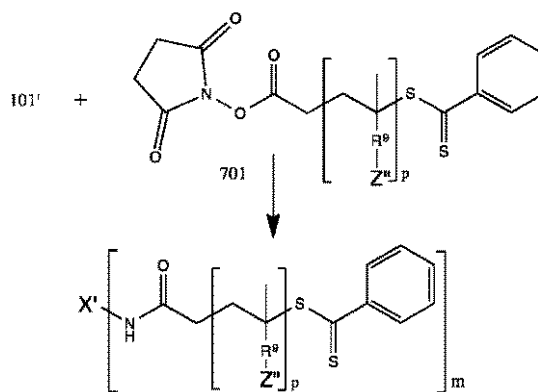
PCT/IB2015/001145

[0155] Reaction Scheme 6**[0156]**

[0157] As illustrated in Reaction Scheme 6, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a 4-nitrophenyl carbonate poly(ethylene glycol)ester of Formula 601 to yield the corresponding product according to Formula 1f.

[0158] The compositions corresponding to Formula 1f can be named as follows:

"F1f-X'-m_m-n_n-p_p-2NACGAL" or "F1f-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

[0159] Reaction Scheme 7**[0160]**

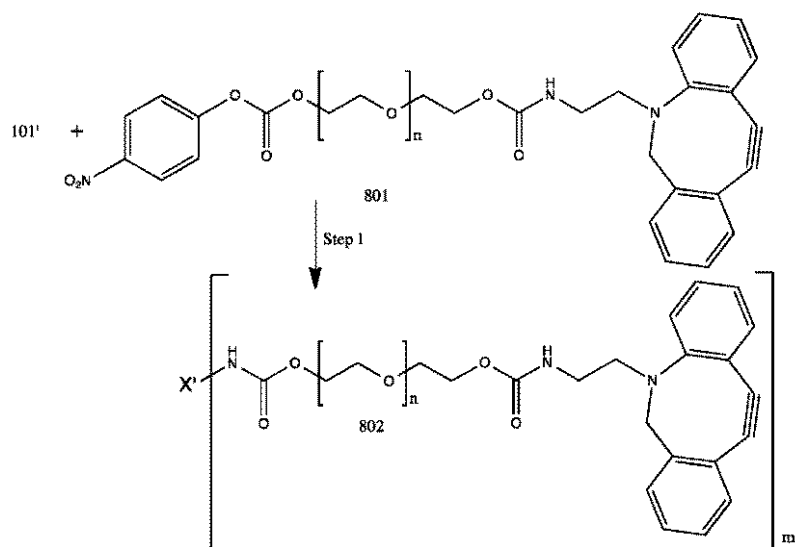
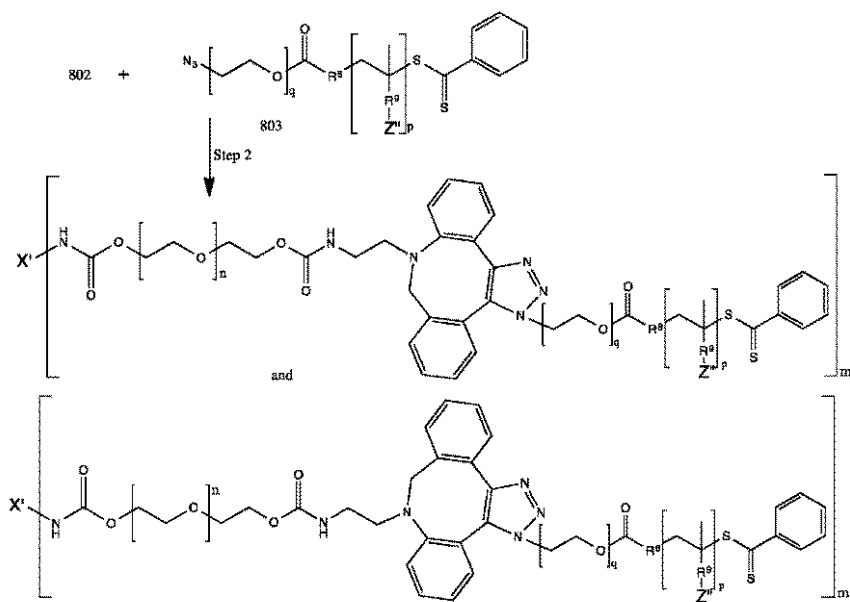
[0161] As illustrated in Reaction Scheme 7, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a NHS-ester poly(ethylene glycol)ester of Formula 701 to yield the corresponding product according to Formula 1g.

[0162] The compositions corresponding to Formula 1g can be named as follows:

"F1g-X'-m_m-p_p-2NACGAL" or "F1g-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z"

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0163] Reaction Scheme 8**[0164]****[0165]**

Both, Formula 1h

[0166] As illustrated in Reaction Scheme 8, Step 1, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of an amine-reactive linker for Click chemistry of Formula 801 to yield the corresponding product according to Formula 802.

[0167] In Reaction Scheme 8, Step 2, the product of Formula 802 is then contacted with an equivalent amount (again corresponding to the value of m) of a galactos(amine) polymer of Formula 803 to yield the corresponding isomeric product according to Formula 1h. The two isomers, illustrated

WO 2015/140648

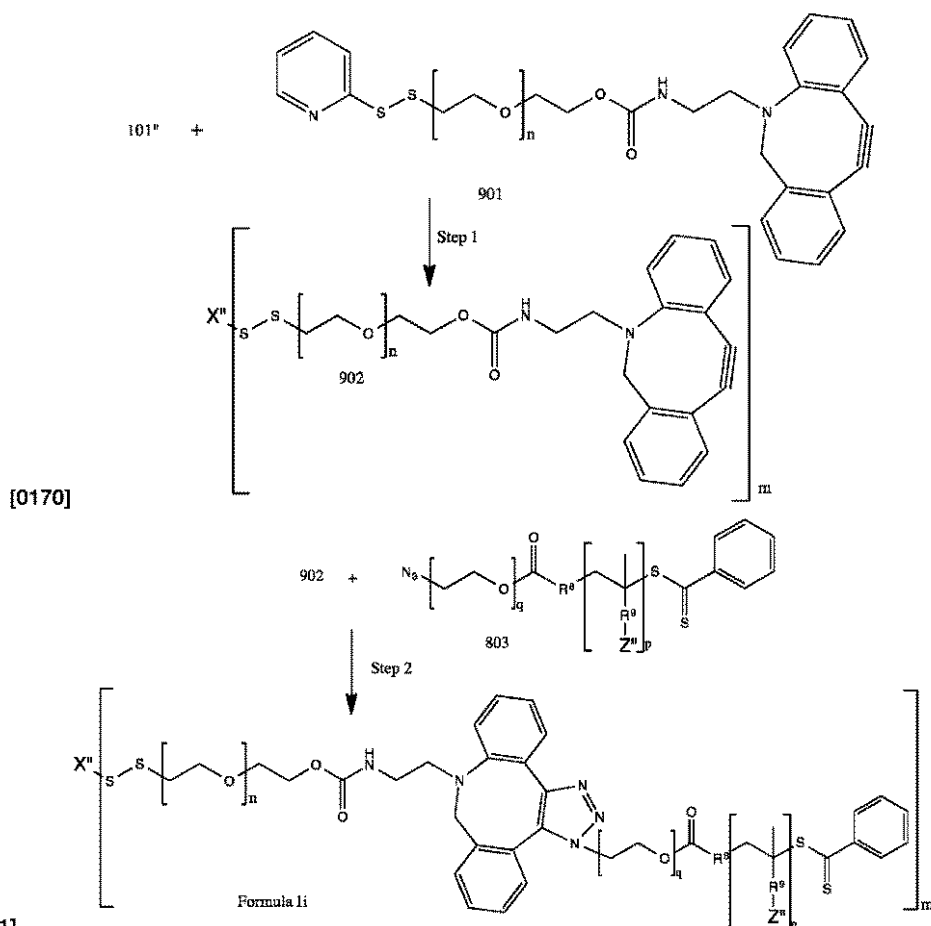
PCT/IB2015/001145

above, result from non-specific cyclization of the azide of Formula 803 with the triple bond of Formula 802. Such non-specific cyclization occurs in the synthesis of other compositions where Y is selected from Formulae Yh through Yn, but will not be illustrated in each instance.

[0168] The compositions corresponding to Formula 1h can be named as follows:

"F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" or "F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0169] Reaction Scheme 9



[0171]

[0172] As illustrated in Reaction Scheme 9, Step 1, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface thiol group(s) of Formula 101'' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a thiol-reactive linker for Click chemistry of Formula 901 to yield the corresponding product according to Formula 902''.

[0173] In Reaction Scheme 9, Step 2, the product of Formula 902'' is then contacted with an equivalent amount (again corresponding to the value of m) of a galactos(amine) polymer of Formula 803 to yield the corresponding isomeric product according to Formula 1i.

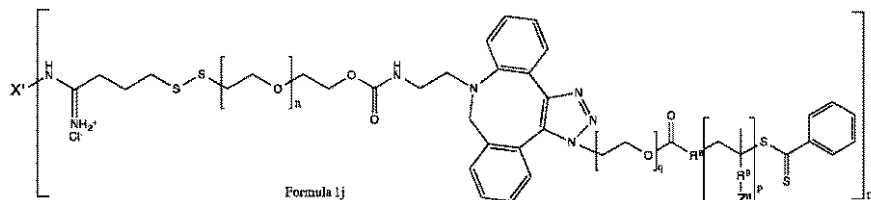
[0174] The compositions corresponding to Formula 1i can be named as follows:

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

"F1i-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" or "F1i-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0175] By following the procedures described with regard to Reaction Scheme 9, but substituting starting material 101" with a compound of Formula 103' (derivatized with the Traut reagent) there is obtained the corresponding isomeric product of Formula 1j as shown below.

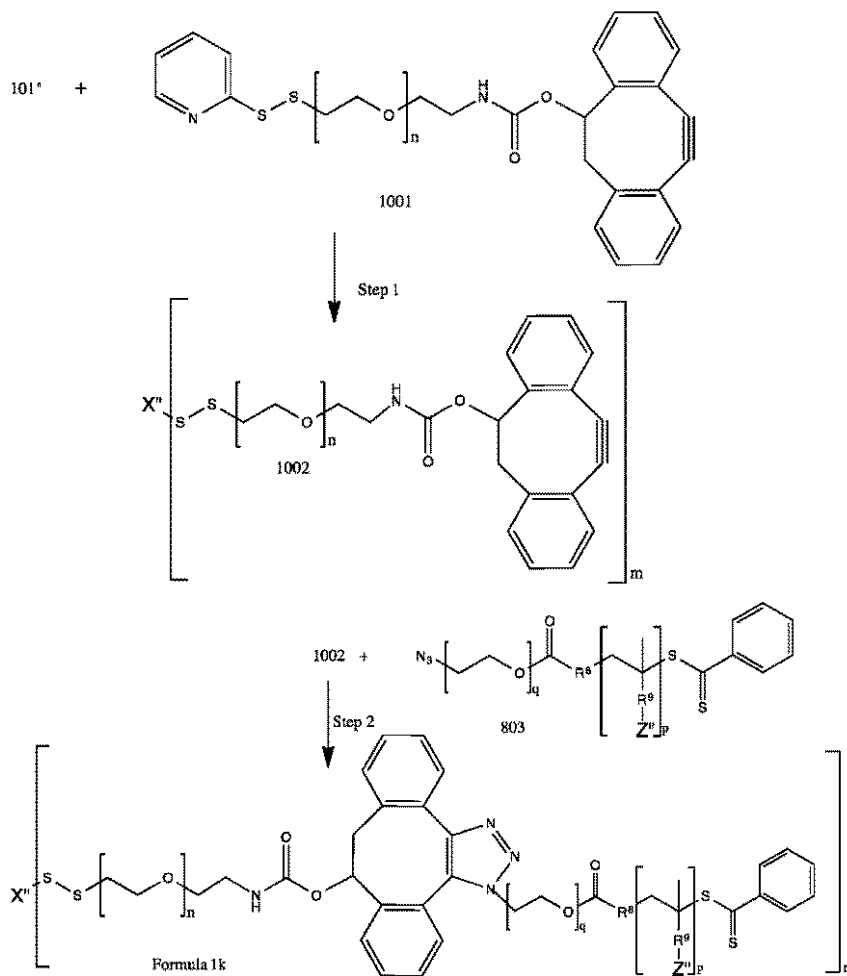


[0176]

[0177] The compositions corresponding to Formula 1j can be named as follows:

"F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" or "F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0178] Reaction Scheme 10



[0179]

[0180]

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

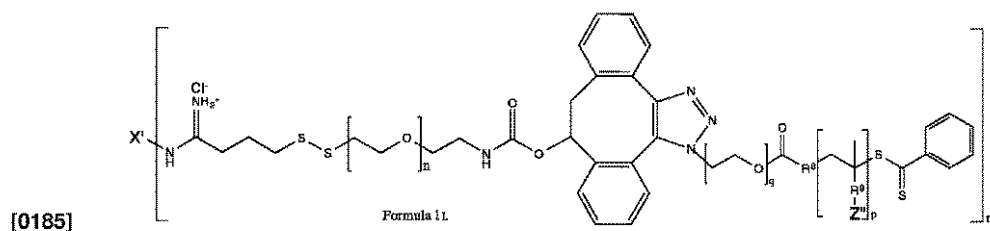
[0181] As illustrated in Reaction Scheme 10, Step 1, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface thiol group(s) of Formula 101" is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a thiol-reactive linker for Click chemistry of Formula 1001 to yield the corresponding product according to Formula 1002.

[0182] In Reaction Scheme 10, Step 2, the product of Formula 1002 is then contacted with an equivalent amount (again corresponding to the value of m) of a galactos(amine) polymer of Formula 803 to yield the corresponding isomeric product according to Formula 1k.

[0183] The compositions corresponding to Formula 1k can be named as follows:

"F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" or "F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0184] By following the procedures described with regard to Reaction Scheme 10, but substituting starting material 101" with a compound of Formula 103' (derivatized with the Traut reagent) there is obtained the corresponding isomeric product of Formula 1L as shown below.



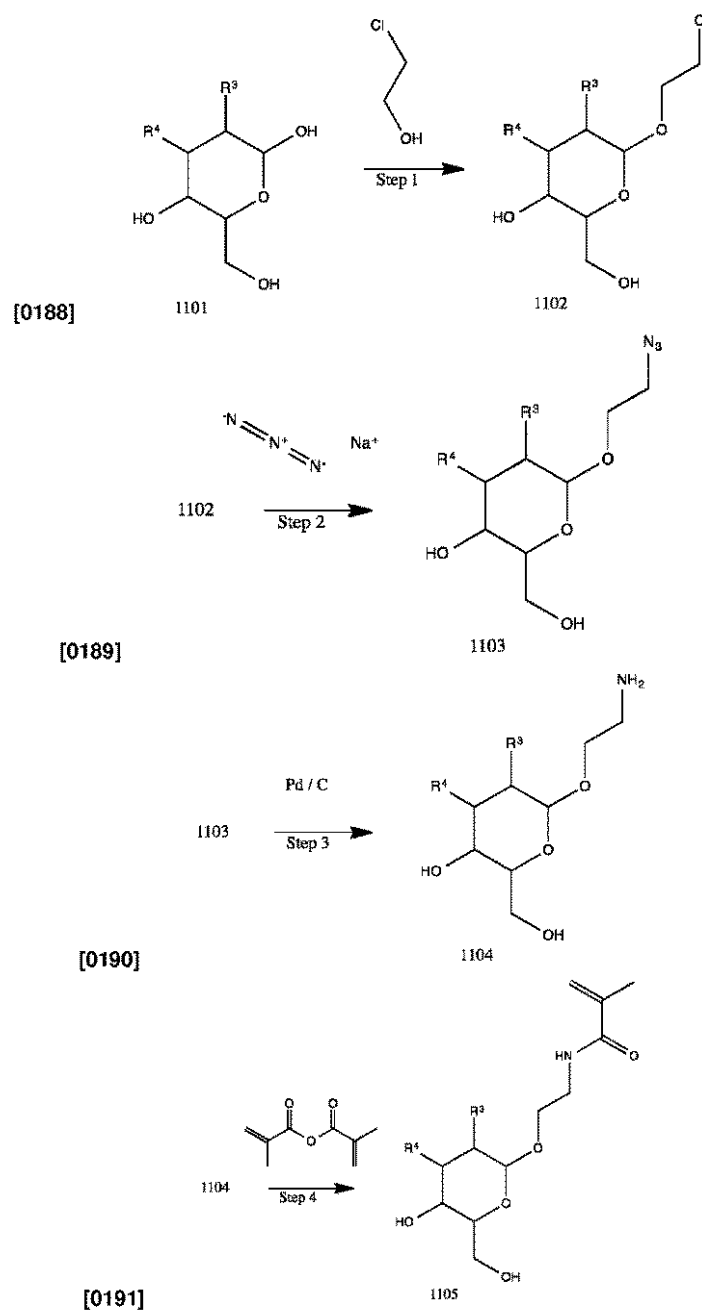
[0186] The compositions corresponding to Formula 1L can be named as follows:

"F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" or "F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

WO 2015/140648

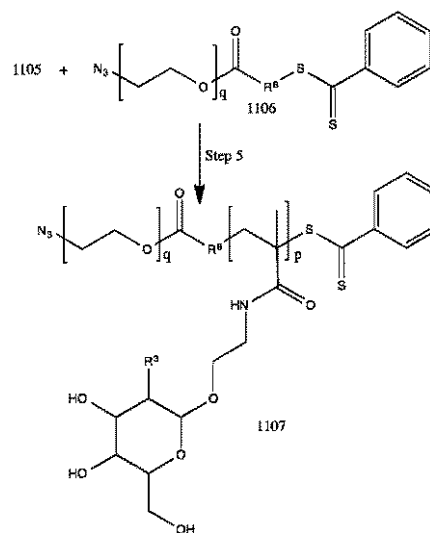
PCT/IB2015/001145

[0187] Reaction Scheme 11

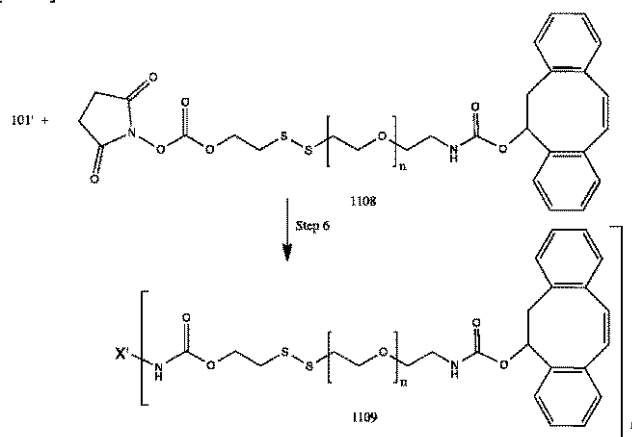


WO 2015/140648

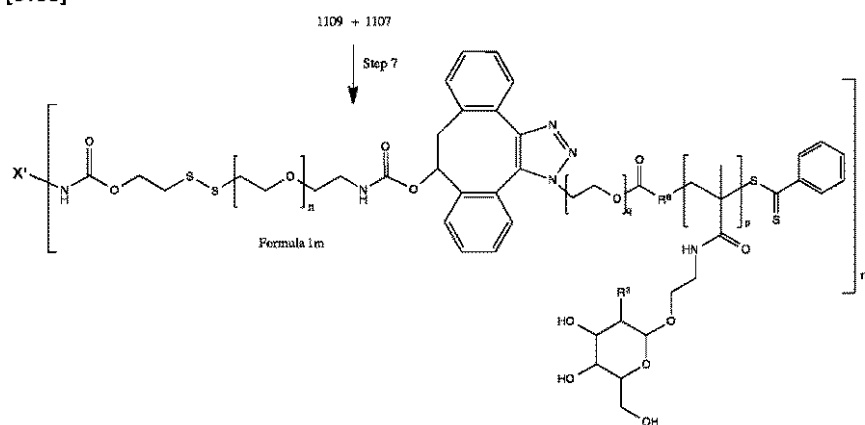
PCT/IB2015/001145



[0192]



[0193]



[0194]

[0195] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 1, galactose, protected galactosamine or N-Acetyl-D-galactosamine (Formula 1101 where R³ and R⁴ are OH, R³ is NH-protecting group (e.g.,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

cyclized with R⁴) or R³ is NHAc and R⁴ is OH, respectively) is contacted with 2-chloroethan-1-ol followed by cooling and the dropwise addition of acetylchloride. The solution is warmed to room temperature and then heated to 70°C for several hours. Ethanol is added to the crude product and the resulting solution is stirred in the presence of carbon and then filtered followed by solvent removal to yield the corresponding product of Formula 1102.

[0196] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 2, the product of Formula 1102 is added to an excess of sodium azide and heated to 90°C for several hours, then filtered followed by solvent removal to yield the corresponding product of Formula 1103.

[0197] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 3, the product of Formula 1103 is added to a solution of palladium on carbon and ethanol, and stirred under hydrogen gas (3 atm) for several hours, then filtered followed by solvent removal to yield the corresponding product of Formula 1104.

[0198] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 4, the product of Formula 1104 is added to a solution of methacrylate anhydride. Triethylamine is added and the reaction stirred for 2 hours followed by solvent removal and isolation to yield the corresponding product of Formula 1105.

[0199] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 5, an azide-modified uRAFT agent (Formula 1106) is added to a solution of the product of Formula 1105 with azobisisobutyronitrile, subjected to 4 freeze-pump-thaw cycles and then stirred at 70°C. After several hours the corresponding polymer product of Formula 1107 is precipitated by addition of a lower alkanol followed by solvent removal. Where R³ is NH-protecting group (e.g., cyclized with R⁴) the protecting group(s) is(are) removed at this point.

[0200] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 6, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is added to a pH 8.0 buffer and contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a dioxopyrrolidine of Formula 1108 with stirring. After 1 hour unreacted Formula 1108 is removed and the resulting product of Formula 1109 is used without further purification.

[0201] As illustrated in Reaction Scheme 11, Step 7, the product of Formula 1107 is added to a pH 8.0 buffer, to which is added the product of Formula 1109. After stirring for 2 hours, the excess Formula 1107 is removed to yield the corresponding isomeric product of Formula 1m.

[0202] By substituting *N*-(2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3-yl)methacrylamide for the product of Formula 1105 in Step 5 and continuing with Steps 6 and 7, the corresponding isomeric product of Formula 1m where Z" is N-acetylgalactosamine conjugated at C2 are obtained.

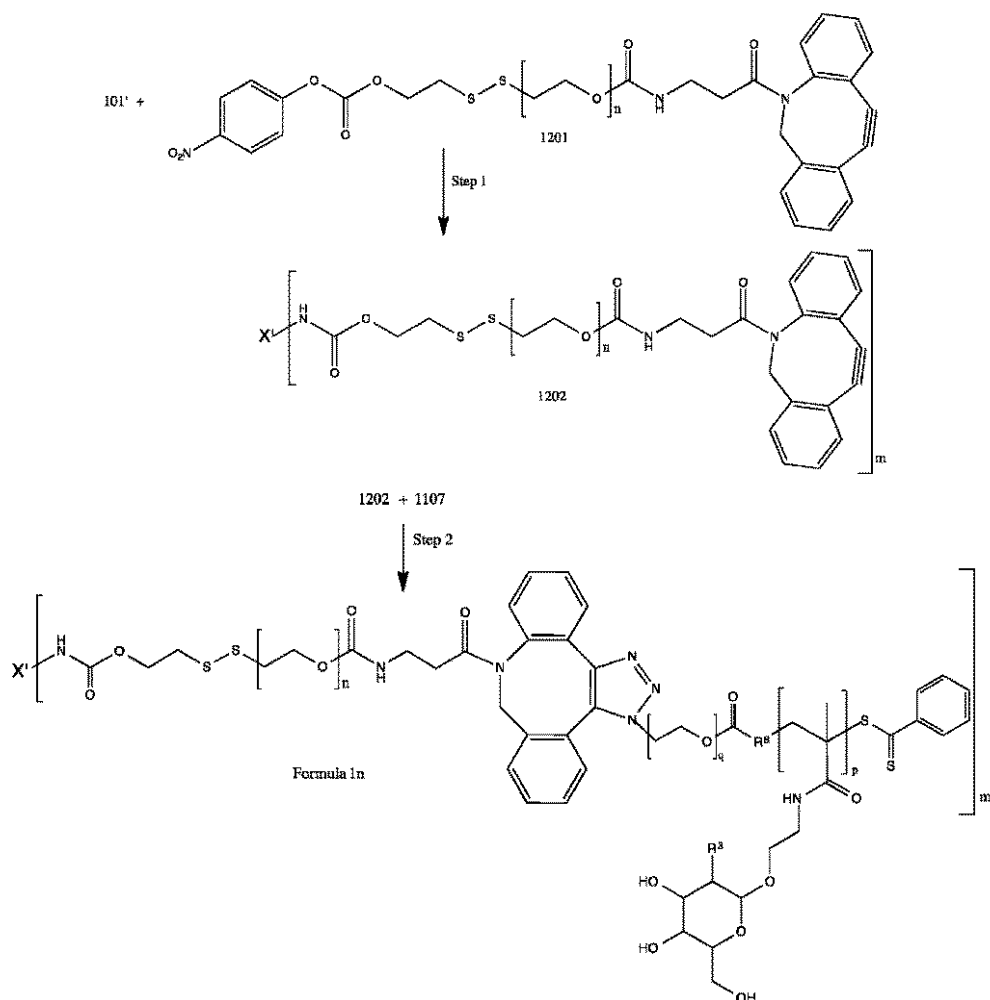
[0203] The compositions corresponding to Formula 1m can be named as follows:

"F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z" where Z" is 1GAL, 1NGAL or 1NAcGAL, or

"F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL".

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0204] Reaction Scheme 12

[0205] The synthetic approach of Reaction Scheme 12 is particularly suitable for hydrophobic antigens, antibodies, antibody fragments and ligands (e.g., Insulin) due to the use of organic solvents.

[0206] As illustrated in Reaction Scheme 12, Step 1, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is dissolved in an organic solvent (e.g., DMF) containing triethylamine. To this is added an amount (corresponding to the value of m) of a compound of Formula 1201 followed by stirring and the addition of *t*-butyl methyl ether. The corresponding product of Formula 1202 is recovered as a precipitate.

[0207] The product of Formula 1202 is resuspended in the organic solvent and an amount (corresponding to the value of m) of Formula 1107 (obtained, e.g., as described with reference to Reaction Scheme 11) is added followed by stirring. The reaction product is precipitated via the addition of dichloromethane, followed by filtration and solvent removal. Purification (e.g., resuspension in PBS followed by centrifugal size exclusion chromatography) yields the corresponding isomeric product of

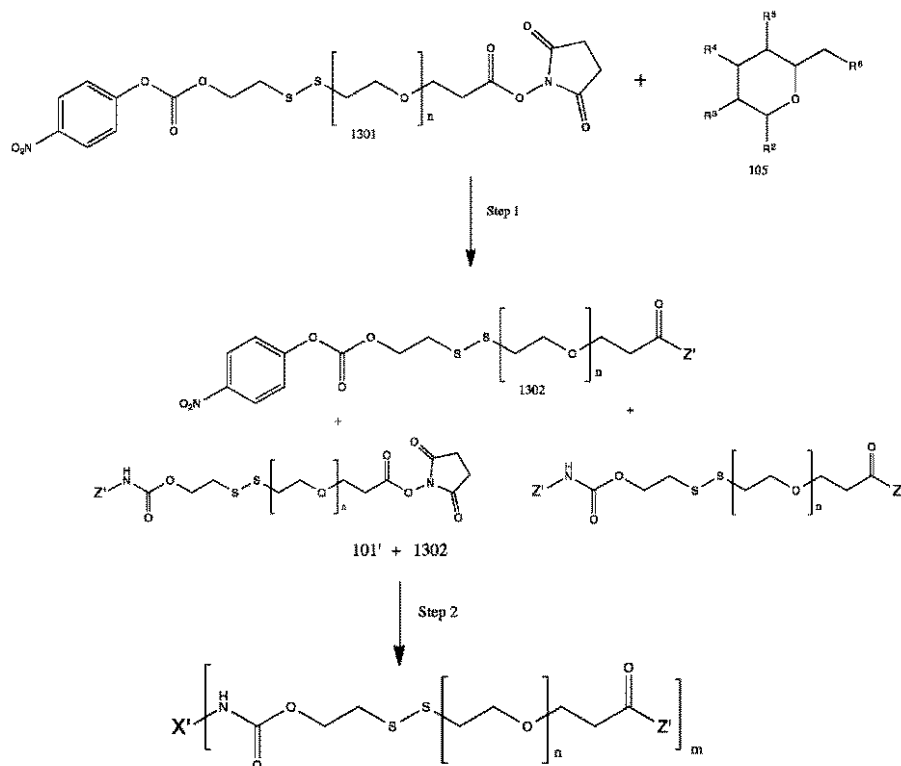
WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

Formula 1n.

[0208] The compositions corresponding to Formula 1n can be named as follows:
 "F1n-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z" where Z' is 1GAL, 1NGAL or 1NAcGAL, or
 "F1m-X'-n_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL".

[0209] Reaction Scheme 13



[0210]

[0211]

Formula 1o

[0212] In Reaction Scheme 13, Step 1, a nitrophenoxycarbonyl-oxyalkyl di-thiol-poly(ethylene glycol)-NHS ester (Formula 1301) is contacted with galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine (Formula 105) to give the corresponding product of Formula 1302, along with the other two illustrated products, from which the desired nitrophenoxycarbonyl di-thiol-poly(ethylene glycol)-carboxyethyl galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine of Formula 1302 is isolated before proceeding to the next step.

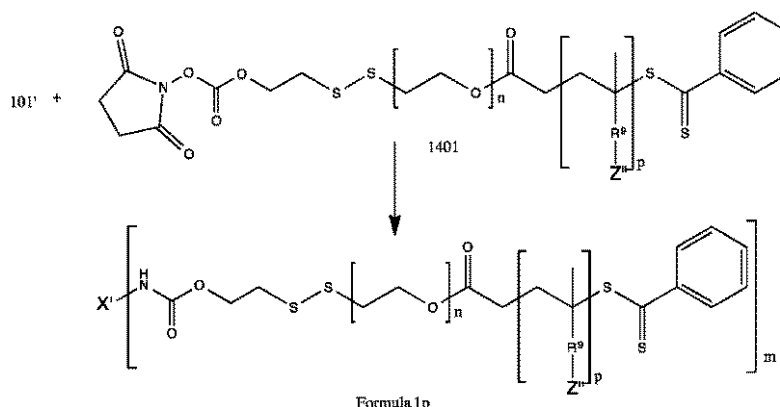
[0213] As illustrated in Reaction Scheme 13, Step 2, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) of Formula 101' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of the product of Formula 1302 to yield the corresponding product according to Formula 1o.

[0214] The compositions corresponding to Formula 1o can be named as follows:

"F1o-X'-m_m-n_n-Z'."

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0215] Reaction Scheme 14**[0216]**

[0217] As illustrated in Reaction Scheme 14, an antigen, antibody, antibody fragment or ligand having native free surface amino group(s) (Formula 101') is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)-NHS ester of Formula 1401 to yield the corresponding product according to Formula 1p.

[0218] The compositions corresponding to Formula 1p can be named as follows:

"F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NACGAL" or "F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

[0219] Preparation of Fusion Proteins

[0220] Fusion protein compositions of Formula 2 can be expressed via art-accepted methodology using commercially available mammalian, bacterial, yeast, or insect cell expression vectors, and published, discovered, or engineered gene sequences. Sequences encoding X, Y and Z together with tag sequences can be cloned into an expression vector, for example, into the mammalian expression vector pSecTag A, where the fusion protein is inserted C-terminal to the Ig κ-chain secretion leader sequence. Various other cloning techniques can be employed, including site-directed mutagenesis and variations of the QuikChange protocol (Geiser, *et al.*), and are known by those skilled in the art. Fusion proteins can be transiently expressed in mammalian cells [e.g., in human embryonic kidney (HEK293) cells or Chinese hamster ovary (CHO) cells] by transient transfection with the above-described vectors using polyethylenimine. Transfected cells are cultured in a suitable medium (e.g., FreeStyle 293 medium, Life Technologies) supplemented, for example, with valproic acid or DMSO for about 7 days, after which the cells are removed by centrifugation and the culture supernatants are collected and sterilized by filtration.

[0221] Alternatively, the fusion proteins can be stably expressed by creating stably transfected mammalian cell lines. Additionally, expression vectors can be used to produce fusion proteins in bacteria, such as *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, or *Pseudomonas fluorescens* by using compatible media (e.g. LB, 2XYT, SOB, SOC, TB and other broths), supplements (e.g. glycerol, glucose, and other supplements), and appropriate growth and expression conditions. Expression systems in yeast can commonly use *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*, or other organisms for the genera

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

Saccharomyces, *Pichia*, *Kluyveromyces*, and *Yarrowia*, and less commonly used organisms like the filamentous fungi *Aspergillus*, *Trichoderma*, or *Myceliophthora thermophila* C1. Insect expression systems can utilize baculovirus infected insect cells or non-lytic insect cell expression to achieve protein expression levels in high quantity; most common insect cells include but are not limited to Sf9 and Sf21 (from *Spodoptera frugiperda*), Hi-5 (from *Trichoplusia ni*), and Schneider 2 and 3 (from *Drosophila melanogaster*).

[0222] The expressed fusion protein products can be purified from the culture supernatants by affinity chromatography (e.g., using a HisTrap Ni²⁺ sepharose column, GE Healthcare, for a His-tagged fusion protein), followed by other chromatographic polishing steps such as size exclusion chromatography (e.g., using a Superdex 75 column, GE Healthcare) or ion exchange chromatography. Protein purity can be verified, e.g., by Coomassie Brilliant Blue staining of SDS-PAGE gels and western blotting (e.g. anti-6xHis tag western blotting for a His-tagged fusion protein). Protein concentration can be determined using the Beer-Lambert Law, for which the absorbance at 280 nm can be measured, e.g., using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). The molecular weight and extinction coefficient can be estimated from the protein's amino acid sequence, e.g., using the ExPASy ProtParam tool. Endotoxin levels can be measured, e.g., using the HEK-Blue TLR4 reporter cell line (Invivogen) according to manufacturer's instructions.

[0223] **Preparation of Desialylated Antigens, Antibodies, Antibody Fragments and Ligands**

[0224] Desialylated proteins can be produced via art-accepted methodology using commercially available neuraminidase (also known as acetyl-neuraminyl hydrolase or sialidase) enzyme or sulfuric acid. For enzymatic desialylation of a protein of interest, the protein can be incubated together with neuraminidase at 37°C for 1 hour, or longer as necessary. For chemical desialylation through acid hydrolysis, a protein of interest can be treated with 0.025 N sulfuric acid at 80°C for 1 hour, or longer as necessary. The desialylated protein can then be purified from the reaction mixture by immobilized metal ion affinity chromatography (e.g., using a HisTrap Ni²⁺ sepharose column, GE Healthcare), followed by size exclusion chromatography (e.g., using a Superdex 75 column, GE Healthcare). Protein purity can be verified, e.g., by Coomassie Brilliant Blue staining of SDS-PAGE gels and anti-6xHis tag western blotting. Desialylation can be verified, e.g. by lectin-based detection of protein sialic acid content in western blots or colorimetric quantification of sialic acid content using commercially available kits (e.g. Abcam, ProZyme, or Sigma). Desialylated protein concentration can be determined using the Beer-Lambert Law, for which the absorbance at 280 nm can be measured, e.g., using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). The molecular weight and extinction coefficient can be estimated from the protein's amino acid sequence, e.g., using the ExPASy ProtParam tool. Endotoxin levels can be measured, e.g., using the HEK-Blue TLR4 reporter cell line (Invivogen) according to manufacturer's instructions.

[0225] **Particular Processes and Last Steps**

[0226] A compound of Formula 103' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a compound of Formula 106 to give the corresponding product of Formula 1a.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0227] A compound of Formula 103' is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a compound of Formula 201 to give the corresponding product of Formula 1b.

[0228] A compound of Formula 802, 902 or 1002 is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a compound of Formula 803 to give the corresponding product of Formula 1h, Formula 1i or Formula 1k, respectively.

[0229] A compound of Formula 1109 is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a compound of Formula 1107 to give the corresponding product of Formula 1m, particularly where n is about 80, p is about 30, q is about 4, and m being a function of the antigen is about 2 to 10.

[0230] A compound of Formula 1202 is contacted with an excess (corresponding to the value of m) of a compound of Formula 1107 to give the corresponding product of Formula 1n, particularly where n is about 1, p is about 30, q is about 4, and m being a function of the antigen is about 2 to 10.

[0231] **Particular Compositions**

[0232] By way of non-limiting example, a particular group preferred for the compositions, pharmaceutical formulations, methods of manufacture and use of the present disclosure are the following combinations and permutations of substituent groups of Formula 1 (sub-grouped, respectively, in increasing order of preference):

- X is a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response, a foreign antigen to which patients develop an unwanted immune response, a therapeutic protein to which patients develop an unwanted immune response, a self-antigen to which patients develop an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof.
- X is a therapeutic protein to which patients develop an unwanted immune response selected from: Abatacept, Abciximab, Adalimumab, Adenosine deaminase, Ado-trastuzumab emtansine, Agalsidase alfa, Agalsidase beta, Aldeslakin, Alglucerase, Alglucosidase alfa, α -1-proteinase inhibitor, Anakinra, Anistreplase (anisoylated plasminogen streptokinase activator complex), Antithrombin III, Antithymocyte globulin, Ateplase, Bevacizumab, Bivalirudin, Botulinum toxin type A, Botulinum toxin type B, C1-esterase inhibitor, Canakinumab, Carboxypeptidase G2 (Glucarpidase and Voraxaze), Certolizumab pegol, Cetuximab, Collagenase, Crotalidae immune Fab, Darbepoetin- α , Denosumab, Digoxin immune Fab, Dornase alfa, Eculizumab, Etanercept, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XIII, Fibrinogen, Filgrastim, Galsulfase, Golimumab, Histrelin acetate, Hyaluronidase, Idursulphase, Imiglucerase, Infliximab, Insulin (including rHu insulin and bovine insulin), Interferon- α 2a, Interferon- α 2b, Interferon- β 1a, Interferon- β 1b, Interferon- γ 1b, Ipilimumab, L-arginase, L-asparaginase, L-methionase, Lactase, Laronidase, Lepirudin / hirudin, Mecasermin, Mecasermin rinfabate, Methoxy Ofatumumab, Natalizumab, Octreotide, Oprelvekin, Pancreatic amylase, Pancreatic lipase, Papain, Peg-asparaginase, Peg-doxorubicin HCl, PEG-epoetin- β , Pegfilgrastim, Peg-Interferon- α 2a, Peg-Interferon- α 2b, Pegloticase, Pegvisomant, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Protein C, Rasburicase (uricase), Sacrosidase, Salmon calcitonin, Sargramostim, Streptokinase, Tenecteplase, Teriparatide, Tocilizumab (atlizumab), Trastuzumab, Type 1 alpha-interferon, Ustekinumab, and vW factor.
 - Especially where X is Abciximab, Adalimumab, Agalsidase alfa, Agalsidase beta,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

Aldeslakin, Alglucosidase alfa, Factor VIII, Factor IX, Infliximab, L-asparaginase, Laronidase, Natalizumab, Octreotide, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), or Rasburicase (uricase).

- Particularly where X is Factor VIII, Factor IX, uricase, PAL or asparaginase.
- X is a self-antigen polypeptide selected for treating type 1 diabetes mellitus, pediatric multiple sclerosis, juvenile rheumatoid arthritis, celiac disease, or alopecia universalis.
 - Especially where X is a self-antigen polypeptide selected for treating new onset type 1 diabetes mellitus, pediatric multiple sclerosis or celiac disease.
- X is a foreign antigen to which patients develop an unwanted immune response
 - From peanut, including conarachin (Ara h 1)
 - From wheat, including Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24), Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25), Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26) and Omega-gliadin (SEQ ID NO:27).
 - From cat, including Fel d 1A (UNIPROT P30438) and Cat albumin (UNIPROT P49064).
 - From dog, including Can f 1 (UNIPROT O18873) and Dog albumin (UNIPROT P49822).
- X is a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response, e.g. a human leukocyte antigen protein.
- X is an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody gives rise to transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, and/or allergy.
 - Especially where X binds an endogenous circulating protein or peptide or antibody.
- Y is a linker selected from: Formula Ya, Formula Yb, Formula Yh, Formula Yi, Formula Yk, Formula Ym, Formula Yn, Formula Yo and Formula Yp.
 - Especially where n is 8 to 90 $\pm 10\%$, p is 20 to 100 $\pm 10\%$, and q is 3 to 20 ± 3 .
 - Particularly where n is 40 to 80 $\pm 10\%$, p is 30 to 40 $\pm 10\%$, and q is 4 to 12 ± 3 .
 - Especially where Y is Formula Ya, Formula Yb, Formula Ym or Formula Yn.
 - Particularly where n is 8 to 90 $\pm 10\%$, p is 20 to 100 $\pm 10\%$ and q is 3 to 20 ± 3 .
 - More particularly where n is 40 to 80 $\pm 10\%$, p is 30 to 40 $\pm 10\%$, and q is 4 to 12 ± 3 .
 - Particularly where Z is conjugated to Y via an ethylacetamido group.
 - More particularly where Z is conjugated to Y at its C1.
 - More particularly where R^a is CMP.
 - More particularly where R^a is CMP.
 - Particularly where R^a is CMP.
- Z is galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine.
 - Especially where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1, C2 or C6.
 - Particularly where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1 or C2.
 - More particularly where Z is N-acetylgalactosamine conjugated at C1.

[0233] Each of the above-described groups and sub-groups are individually preferred and can be combined to describe further preferred aspects of the disclosure, for example but not by way of

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

limitation, as follows:

- X is a self-antigen polypeptide selected for treating type 1 diabetes mellitus, pediatric multiple sclerosis, juvenile rheumatoid arthritis, celiac disease, or alopecia universalis.
 - Especially where X is a self-antigen polypeptide selected for treating new onset type 1 diabetes mellitus, pediatric multiple sclerosis or celiac disease.
 - Particularly where Y is a linker selected from: Formula Ya, Formula Yb, Formula Yh, Formula Yi, Formula Yk, Formula Ym, Formula Yn, Formula Yo and Formula Yp.
 - Especially where n is 8 to 90 $\pm 10\%$, p is 20 to 100 $\pm 10\%$, and q is 3 to 20 ± 3 .
 - Particularly where n is 40 to 80 $\pm 10\%$, p is 30 to 40 $\pm 10\%$, and q is 4 to 12 ± 3 .
 - Especially where Y is Formula Ya, Formula Yb, Formula Ym or Formula Yn.
 - Particularly where n is 8 to 90 $\pm 10\%$, p is 20 to 100 $\pm 10\%$ and q is 3 to 20 ± 3 .
 - More particularly where n is 40 to 80 $\pm 10\%$, p is 30 to 40 $\pm 10\%$, and q is 4 to 12 ± 3 .
 - Even more particularly where Z is conjugated to Y via an ethylacetamido group.
 - More particularly where Z is conjugated to Y via an ethylacetamido group.
 - Particularly where Z is conjugated to Y via an ethylacetamido group.
 - Especially where Z is galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine.
 - Particularly where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1, C2 or C6.
 - More particularly where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1 or C2.
 - Even more particularly where Z is N-acetylgalactosamine conjugated at C1.
 - Particularly where Z is galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine.
 - Especially where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1, C2 or C6.
 - Particularly where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1 or C2.
 - More particularly where Z is N-acetylgalactosamine conjugated at C1.
 - Especially where Y is a linker selected from: Formula Ya, Formula Yb, Formula Yh,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

Formula Yi, Formula Yk, Formula Ym, Formula Yn, Formula Yo and Formula Yp.

- Particularly where n is 8 to 90 $\pm 10\%$, p is 20 to 100 $\pm 10\%$, and q is 3 to 20 ± 3 .
 - More particularly where n is 40 to 80 $\pm 10\%$, p is 30 to 40 $\pm 10\%$, and q is 4 to 12 ± 3 .
- Particularly where Y is Formula Ya, Formula Yb, Formula Ym or Formula Yn.
 - More particularly where n is 8 to 90 $\pm 10\%$, p is 20 to 100 $\pm 10\%$ and q is 3 to 20 ± 3 .
 - More preferably where n is 40 to 80 $\pm 10\%$, p is 30 to 40 $\pm 10\%$, and q is 4 to 12 ± 3 .
 - More particularly where Z is conjugated to Y via an ethylacetamido group.
- Especially where Z is galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine.
 - Particularly where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1, C2 or C6.
 - More particularly where Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at C1 or C2.
 - More preferably where Z is N-acetylgalactosamine conjugated at C1.
- m is an integer from about 1 to 100.
 - m is 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 or 110.
 - Particularly m is from about 1 to 20.
 - m is 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 or 22.
 - More particularly m is about 10.
 - m is 9, 10 or 11.
- n is an integer representing a mixture including from about 1 to 100
 - n is 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 or 110.
 - Particularly n is about 8 to 90.
 - Particularly n is 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 or 99.
 - More particularly n is about 40 to 80.
 - More particularly n is 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 or 88.
 - n represents a mixture encompassing the ranges 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 and 107-113.
 - Particularly n represents a mixture encompassing the ranges 7-13, 6-14, 15-25, 26-30, 42-50, 46-57, 60-82, 85-90 and 82-99.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- More particularly n represents a mixture encompassing the ranges 36-44, 42-50, 46-57, 60-82 and 75-85.
- p is is an integer representing a mixture including from about 2 to 150.
 - p is 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 or 165.
 - Particularly where n is an integer representing a mixture including from about 1 to 100.
 - Particularly n is 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 or 110.
 - More particularly where n is about 8 to 90.
 - More particularly n is 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 or 99.
 - Even more particularly where n is about 40 to 80.
 - Even more particularly n is 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 or 88.
 - More particularly p is 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 or 110.
 - Particularly where n is an integer representing a mixture including from about 1 to 100.
 - Particularly n is 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 or 110.
 - More particularly where n is about 8 to 90.
 - More particularly n is 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 or 99.
 - Even more particularly where n is about 40 to 80.
 - Even more particularly n is 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 or 88.
 - More particularly p is 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, or 44.
 - Particularly where n is 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,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83, 85, 88, 90, 95, 99, 100, 105 or 110.

- More particularly where n is about 8 to 90.
- More particularly n is 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 or 99.
 - Even more particularly where n is about 40 to 80.
 - Even more particularly n is 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 or 88.
- q is an integer representing a mixture including from about 1 to 44.
 - q is 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 or 48.

[0234] By way of non-limiting example, a particular group preferred for the compositions, pharmaceutical formulations, methods of manufacture and use of the present disclosure are the following combinations and permutations of substituent groups of Formula 2 (sub-grouped, respectively, in increasing order of preference):

- X is a therapeutic protein to which patients develop an unwanted immune response selected from: Abatacept, Abciximab, Adalimumab, Adenosine deaminase, Ado-trastuzumab emtansine, Agalsidase alfa, Agalsidase beta, Aldeslakin, Alglucerase, Alglucosidase alfa, α -1-proteinase inhibitor, Anakinra, Anistreplase (anisoylated plasminogen streptokinase activator complex), Antithrombin III, Antithymocyte globulin, Ateplase, Bevacizumab, Bivalirudin, Botulinum toxin type A, Botulinum toxin type B, C1-esterase inhibitor, Canakinumab, Carboxypeptidase G2 (Glucarpidase and Voraxaze), Certolizumab pegol, Cetuximab, Collagenase, Crotalidae immune Fab, Darbepoetin- α , Denosumab, Digoxin Immune Fab, Dornase alfa, Eculizumab, Etanercept, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XIII, Fibrinogen, Filgrastim, Galsulfase, Golimumab, Histrelin acetate, Hyaluronidase, Idursulphase, Imiglucerase, Infliximab, Insulin, Interferon- α 2a, Interferon- α 2b, Interferon- β 1a, Interferon- β 1b, Interferon- γ 1b, Ipilimumab, L-arginase, L-asparaginase, L-methionase, Lactase, Laronidase, Lepirudin / hirudin, Mecasermin, Mecasermin rinfabate, Methoxy Ofatumumab, Natalizumab, Octreotide, Oprelvekin, Pancreatic amylase, Pancreatic lipase, Papain, Peg-asparaginase, Peg-doxorubicin HCl, PEG-epoetin- β , Pegfilgrastim, Peg-Interferon- α 2a, Peg-Interferon- α 2b, Pegloticase, Pegvisomant, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Protein C, Rasburicase (uricase), Sacrosidase, Salmon calcitonin, Sargramostim, Streptokinase, Tenecteplase, Teriparatide, Tocilizumab (atlizumab), Trastuzumab, Type 1 alpha-interferon, Ustekinumab, and vW factor; provided that interferon (interferon alpha 2, interferon alpha 5, interferon alpha 6, or consensus interferon), Ribavirin, Nexavar/ Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab, and Herceptin/trastuzumab are excluded from the scope of Formula 2 when m'+m" equals 1 and Z is DOM 26h-196-61 or another of the liver-targeting

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

molecules described in US 2013/0078216.

- Especially where X is Abciximab, Adalimumab, Agalsidase alfa, Agalsidase beta, Aldeslakin, Alglucosidase alfa, Factor VIII, Factor IX, Infliximab, L-asparaginase, Laronidase, Natalizumab, Octreotide, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), or Rasburicase (uricase).
 - Particularly where X is Factor VIII, Factor IX, uricase, PAL or asparaginase.
- X is a self-antigen polypeptide selected for treating type 1 diabetes mellitus, pediatric multiple sclerosis, juvenile rheumatoid arthritis, celiac disease, or alopecia universalis.
 - Especially where X is a self-antigen polypeptide selected for treating new onset type 1 diabetes mellitus, pediatric multiple sclerosis or celiac disease.
- X is a foreign antigen to which patients develop an unwanted immune response
 - From peanut, including conarachin (Ara h 1).
 - From wheat, including Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24), Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25), Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26) and Omega-gliadin (SEQ ID NO:27).
 - From cat, including Fel d 1A (UNIPROT P30438) and Cat albumin (UNIPROT P49064).
 - From dog, including Can f 1 (UNIPROT O18873) and Dog albumin (UNIPROT P49822).
- X is a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response, e.g. a human leukocyte antigen protein.
- X is an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody gives rise to transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, and/or allergy.
 - Especially where X binds an endogenous circulating protein or peptide or antibody.
- Y is Gly₃Ser.
- Z is Anti-ASGPR Dom26h-196-61 or a conservative substitution.
- m' + m'' equals 1 or 2 and X is a full length protein, including protein therapeutics.
- m' + m'' equals 1 or 2 where m' is 1 and m'' is 0 or 1.
- m' + m'' equals 2 to about 10 where X is a group of self-antigen peptides (epitopes) known to be associated with a particular autoimmune disease or for treatment of genetically diverse target populations.
 - m' + m'' equals about 4 to 7 where the autoimmune disease is multiple sclerosis and X is independently selected from: 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) and PLP139-154 (SEQ ID NO:17).
 - m' + m'' equals 7 and X is, respectively, 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) and PLP139-154 (SEQ ID NO:17).

[0235] As with the above discussion regarding Formula 1, each of the above-described groups and sub-groups for Formula 2 are individually preferred and can be combined to describe further

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

preferred aspects of the disclosure.

[0236] Utility, Testing and Administration

[0237] General Utility

[0238] The compositions of the disclosure find use in a variety of applications including, as will be appreciated by those in the art, treatment of transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, and food allergy.

[0239] In a preferred embodiment, the compositions of the disclosure are used to modulate, particularly down-regulate, antigen-specific undesirable immune response.

[0240] The compositions of the disclosure are useful to bind and clear from the circulation specific undesired proteins, including antibodies endogenously generated in a patient (i.e., not exogenous antibodies administered to a patient), peptides and the like, which cause autoimmunity and associated pathologies, allergy, inflammatory immune responses, and anaphylaxis.

[0241] In the present disclosure, antigens are targeted to the liver for presentation via antigen-presenting cells to specifically down-regulate the immune system or for clearance of unwanted circulating proteins. This is distinct from previous uses of liver targeting, for example as described in US 2013/0078216, where the purpose of liver-targeting molecules such as DOM26h-196-61 was the delivery of therapeutic agents to treat liver diseases such as fibrosis, hepatitis, Cirrhosis and liver cancer.

[0242] The present disclosure provides compositions and methods to treat unwanted immune response to self-antigens and foreign antigens, including but not limited to: a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response (e.g., transplant rejection), a foreign antigen to which patients develop an unwanted immune (e.g., allergic or hypersensitivity) response, a therapeutic agent to which patients develop an unwanted immune response (e.g., hypersensitivity and/or reduced therapeutic activity), a self antigen to which patients develop an unwanted immune response (e.g., autoimmune disease)

[0243] Autoimmune disease states that can be treated using the methods and compositions provided herein include, but are not limited to: Acute Disseminated Encephalomyelitis (ADEM); Acute interstitial allergic nephritis (drug allergies); Acute necrotizing hemorrhagic leukoencephalitis; Addison's Disease; Alopecia areata; Alopecia universalis; Ankylosing Spondylitis; Arthritis, juvenile; Arthritis, psoriatic; Arthritis, rheumatoid; Atopic Dermatitis; Autoimmune aplastic anemia; Autoimmune gastritis; Autoimmune hepatitis; Autoimmune hypophysitis; Autoimmune oophoritis; Autoimmune orchitis; Autoimmune polyendocrine syndrome type 1; Autoimmune polyendocrine syndrome type 2; Autoimmune thyroiditis; Behcet's disease; Bronchiolitis obliterans; Bullous pemphigoid; Celiac disease; Churg-Strauss syndrome; Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; Cicatricial pemphigoid; Crohn's disease; Coxsackie myocarditis; Dermatitis herpetiformis Dühring; Diabetes mellitus (Type 1); Erythema nodosum; Epidermolysis bullosa acquisita, Giant cell arteritis (temporal arteritis); Giant cell myocarditis; Goodpasture's syndrome; Graves' disease; Guillain-Barre syndrome; Hashimoto's encephalitis; Hashimoto's thyroiditis; IgG4-related sclerosing disease; Lambert-Eaton syndrome; Mixed

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

connective tissue disease; Mucha-Habermann disease; Multiple sclerosis; Myasthenia gravis; Optic neuritis; Neuromyelitis optica; Pemphigus vulgaris and variants; Pernicious angemias; Pituitary autoimmune disease; Polymyositis; Postpericardiectomy syndrome; Premature ovarian failure; Primary Biliary Cirrhosis; Primary sclerosing cholangitis; Psoriasis; Rheumatic heart disease; Sjogren's syndrome; Systemic lupus erythematosus; Systemic sclerosis; Ulcerative colitis; Undifferentiated connective tissue disease (UCTD); Uveitis; Vitiligo; and Wegener's granulomatosis.

[0244] A particular group of autoimmune disease states that can be treated using the methods and compositions provided herein include, but are not limited to: Acute necrotizing hemorrhagic leukoencephalitis; Addison's Disease; Arthritis, psoriatic; Arthritis, rheumatoid; Autoimmune aplastic anemia; Autoimmune hypophysitis; Autoimmune gastritis; Autoimmune polyendocrine syndrome type 1; Bullous pemphigoid; Celiac disease; Coxsackie myocarditis; Dermatitis herpetiformis Dühring; Diabetes mellitus (Type 1); Epidermolysis bullosa acquisita; Giant cell myocarditis; Goodpasture's syndrome; Graves' disease; Hashimoto's thyroiditis; Mixed connective tissue disease; Multiple sclerosis; Myasthenia gravis; Neuromyelitis optica; Pernicious angemias; Pemphigus vulgaris and variants; Pituitary autoimmune disease; Premature ovarian failure; Rheumatic heart disease; Systemic sclerosis; Sjogren's syndrome; Systemic lupus erythematosus; and Vitiligo.

[0245] In the embodiments employing an antigen against which an unwanted immune response is developed, such as food antigens, treatment can be provided for reactions against, for example: peanut, apple, milk, egg whites, egg yolks, mustard, celery, shrimp, wheat (and other cereals), strawberry and banana.

[0246] As will be appreciated by those skilled in the art, a patient can be tested to identify a foreign antigen against which an unwanted immune response has developed, and a composition of the disclosure can be developed based on that antigen.

[0247] Testing

[0248] In establishing the utility of the compositions and methods of the disclosure, specificity in binding to antigen-presenting cells in the liver (particularly binding to hepatocytes and specifically ASGPR) should initially be determined. This can be accomplished, for example, by employing a marker (such as the fluorescent marker phycoerythrin ("PE")) in a composition of the disclosure. The composition is administered to suitable experimental subjects. Controls, e.g., unconjugated PE or vehicle (saline) are administered to other group(s) of subjects. The composition and controls are allowed to circulate for a period of 1 to 5 hours, after which the spleens and livers of the subjects are harvested and measured for fluorescence. The specific cells in which fluorescence is found can be subsequently identified. Compositions of the disclosure, when tested in this manner, show higher levels of concentration in the antigen-presenting cells of the liver as compared with unconjugated PE or vehicle.

[0249] Effectiveness in immune modulation can be tested by measuring the proliferation of OT-I CD8⁺ cells (transplanted into host mice) in response to the administration of a composition of the disclosure incorporating a known antigen, such as ovalbumin ("OVA"), as compared with administration of the antigen alone or just vehicle. Compositions of the disclosure, when tested in this manner, show

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

an increase of OT1 cell proliferation as compared with antigen alone or vehicle, demonstrating increased CD8+ T-cell cross-priming. To distinguish T cells being expanded into a functional effector phenotype from those being expanded and deleted, the proliferating OT-I CD8+ T cells can be phenotypically analyzed for molecular signatures of exhaustion [such as programmed death-1 (PD-1), FasL, and others], as well as annexin-V as a hallmark of apoptosis and thus deletion. The OT-I CD8+ T cells can also be assessed for their responsiveness to an antigen challenge with adjuvant in order to demonstrate functional non-responsiveness, and thus immune tolerance, towards the antigen. To do so, the cells are analyzed for inflammatory signatures after administration of compositions of the disclosure into host mice followed by an antigen challenge. Compositions of the disclosure when tested in this manner demonstrate very low (e.g., background) levels of inflammatory OT-I CD8+ T cell responses towards OVA, thus demonstrating immune tolerance.

[0250] Humoral immune response can be tested by administering a composition of the disclosure incorporating a known antigen, such as OVA, as compared with the administration of the antigen alone or just vehicle, and measuring the levels of resulting antibodies. Compositions of the disclosure when tested in this manner show very low (e.g., background) levels of antibody formation responsive to their administration and the administration of vehicle, with significantly higher levels of antibody formation responsive to administration of the antigen.

[0251] Effectiveness in tolerization against an antigen can be tested as above with reference to humoral immune response, where several weeks following treatment(s) with a composition of the disclosure a group of subjects is challenged by administration of the antigen alone, followed by measuring the levels of antibodies to the antigen. Compositions of the disclosure when tested in this manner show low levels of antibody formation responsive to challenge with the antigen in groups pretreated with such compositions as compared to groups that are not pretreated.

[0252] Disease-focused experimental models are well known to those skilled in the art and include the NOD (or non-obese diabetic) mouse model of autoimmunity and tolerance and the EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) model for the human inflammatory demyelinating disease, multiple sclerosis. In particular, the NOD mouse develops spontaneous autoimmune diabetes (similar to type 1a diabetes in humans). Groups of NOD mice are treated with test compound or a negative control, followed by measurement of BLOOD GLUCOSE. Successful treatment corresponds to likelihood of treating diabetes in humans or proof of mechanism for approaches to the treatment of other autoimmune diseases. (See, e.g., Anderson and Bluestone, *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:447-85.)

[0253] **Administration**

[0254] The compositions of the disclosure are administered at a therapeutically effective dosage, e.g., a dosage sufficient to provide treatment for the disease states previously described. Administration of the compounds of the disclosure or the pharmaceutically acceptable salts thereof can be via any of the accepted modes of administration for agents that serve similar utilities.

[0255] While human dosage levels have yet to be optimized for the compounds of the disclosure, these can initially be extrapolated from the about 10 µg to 100 µg doses administered for mice.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

Generally, an individual human dose is from about 0.01 to 2.0 mg/kg of body weight, preferably about 0.1 to 1.5 mg/kg of body weight, and most preferably about 0.3 to 1.0 mg/kg of body weight. Treatment can be administered for a single day or a period of days, and can be repeated at intervals of several days, one or several weeks, or one or several months. Administration can be as a single dose (e.g., as a bolus) or as an initial bolus followed by continuous infusion of the remaining portion of a complete dose over time, e.g., 1 to 7 days. The amount of active compound administered will, of course, be dependent on any or all of the following: the subject and disease state being treated, the severity of the affliction, the manner and schedule of administration and the judgment of the prescribing physician. It will also be appreciated that amounts administered will depend upon the molecular weight of the antigen, antibody, antibody fragment or ligand as well as the size of the linker.

[0256] The compositions of the disclosure can be administered either alone or in combination with other pharmaceutically acceptable excipients. While all typical routes of administration are contemplated, it is presently preferred to provide liquid dosage forms suitable for injection. The formulations will typically include a conventional pharmaceutical carrier or excipient and a composition of the disclosure or a pharmaceutically acceptable salt thereof. In addition, these compositions can include other medicinal agents, pharmaceutical agents, carriers, and the like, including, but not limited to the therapeutic protein, peptide, antibody or antibody-like molecule corresponding to the antigen (X) employed in the composition of the disclosure, and other active agents that can act as immune-modulating agents and more specifically can have inhibitory effects on B-cells, including anti-folates, immune suppressants, cytostatics, mitotic inhibitors, and anti-metabolites, or combinations thereof.

[0257] Generally, depending on the intended mode of administration, the pharmaceutically acceptable composition will contain about 0.1% to 95%, preferably about 0.5% to 50%, by weight of a composition of the disclosure, the remainder being suitable pharmaceutical excipients, carriers, etc. Dosage forms or compositions containing active ingredient in the range of 0.005% to 95% with the balance made up from non-toxic carrier can be prepared.

[0258] Liquid pharmaceutically administrable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, etc. an active composition of the disclosure (e.g., a lyophilized powder) and optional pharmaceutical adjuvants in a carrier, such as, for example, water (water for injection), saline, aqueous dextrose, glycerol, glycols, ethanol or the like (excluding galactoses), to thereby form a solution or suspension. If desired, the pharmaceutical composition to be administered can also contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting agents, emulsifying agents, stabilizing agents, solubilizing agents, pH buffering agents and the like, for example, sodium acetate, sodium citrate, cyclodextrine derivatives, sorbitan monolaurate, triethanolamine acetate and triethanolamine oleate, etc., osmolytes, amino acids, sugars and carbohydrates, proteins and polymers, salts, surfactants, chelators and antioxidants, preservatives, and specific ligands. Actual methods of preparing such dosage forms are known, or will be apparent, to those skilled in this art; for example, see Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Pharmaceutical Press, 22nd Edition, 2012. The composition or formulation to be administered will, in any event, contain a quantity of the active compound in an amount effective to treat the symptoms of the subject being treated.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

EXAMPLES

[0259] The following examples serve to more fully describe the manner of using the above-described disclosure, as well as to set forth the best modes contemplated for carrying out various aspects of the disclosure. It is understood that these examples in no way serve to limit the true scope of this disclosure, but rather are presented for illustrative purposes. All references cited herein are incorporated by reference in their entirety.

[0260] Example 1

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

[0261] 1A. Formula 103' where X' is OVA and m is 4

[0262] In an endotoxin-free tube, OVA (5.0 mg, 0.00012 mmol) was added to 100 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA and stirred. Separately, 1 mg of Traut's Reagent was dissolved in 100 μ l of pH 7.0 PBS, and 16 μ l (0.00119 mmol) of the Traut's Reagent solution so obtained was added to the stirred solution of OVA with continued stirring. After 1 hour, excess Traut's Reagent was removed using a centrifugal size exclusion column to afford the corresponding product of Formula 103'.

[0263] 1B. Formula 106A where n is 80

[0264] In an endotoxin-free tube, galactosamine (10.0 mg, 0.04638 mmol) was dissolved with stirring in 100 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA. Pyridyl dithiol-poly(ethylene glycol)-NHS ester (Formula 104 where n is 80) (16.23 mg, 0.00464 mmol) dissolved in 100 μ l of pH 7.0 PBS was added to the stirring solution of galactosamine. After 1 hour, the resulting pyridyl dithiol-poly(ethylene glycol)-N-acetylgalactosamine (Formula 106A) was ready to be used without further purification.

[0265] 1C. Formula 1aA where X' is OVA, m is 4, n is 80 (and Z' is G2 galactosamine)

[0266] The purified OVA-Traut conjugate of Formula 103' prepared in Example 1A was added directly to the stirring product of Formula 106A prepared in Example 1B. After 1 hour, the resulting product of Formula 1a was purified by passing the reaction mixture through a centrifugal size exclusion column. Characterization (UHPLC SEC, gel electrophoresis) confirmed product identity. (See Fig. 5.)

[0267] 1D. Other Compounds of Formula 103'

[0268] By following the procedure described in Example 1A and substituting OVA with the following:

- Abciximab,
- Adalimumab,
- Agalsidase alfa,
- Agalsidase beta,
- Aldeslakin,
- Alglucosidase alfa,
- Factor VIII,
- Factor IX,
- L-asparaginase,
- Laronidase,
- Octreotide,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- Phenylalanine ammonia-lyase,
- Rasburicase,
- Insulin (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),
- Tyrosinase (SEQ ID NO:19),
- PMEL (SEQ ID NO:20),
- Aquaporin-4 (SEQ ID NO:21),
- S-arrestin (SEQ ID NO:22),
- IRBP (SEQ ID NO:23),
- Conarachin (UNIPROT Q6PSU6),
- Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24),
- Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25),
- Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26),
- Omega-gliadin (SEQ ID NO:27),
- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- Cat albumin (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT O18873),
- Dog albumin (UNIPROT P49822), and
- RhCE example (UNIPROT P18577),

there are obtained the following corresponding compounds of Formula 103' where:

- X is Abciximab and m is 10,
- X is Adalimumab and m is 11,
- X is Agalsidase alfa and m is 14,
- X is Agalsidase beta and m is 14,
- X is Aldeslakin and m is 6,
- X is Alglucosidase alfa and m is 13,
- X is Factor VIII and m is 100,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- X is Factor IX and m is 18,
- X is L-asparaginase and m is 5,
- X is Laronidase and m is 7,
- X is Octreotide and m is 1,
- X is Phenylalanine ammonia-lyase and m is 12,
- X is Rasburicase and m is 12,
- X is Insulin (SEQ ID NO:5) and m is 2,
- X is GAD-65 (SEQ ID NO:6) and m is 8,
- X is IGRP (SEQ ID NO:7) and m is 7,
- X is MBP (SEQ ID NO:8) and m is 6,
- X is MOG (SEQ ID NO:9) and m is 5,
- X is PLP (SEQ ID NO:10) and m is 8,
- X is MBP13-32 (SEQ ID NO:11) and m is 1,
- X is MBP83-99 (SEQ ID NO:12) and m is 1,
- X is MBP111-129 (SEQ ID NO:13) and m is 1,
- X is MBP146-170 (SEQ ID NO:14) and m is 2,
- X is MOG1-20 (SEQ ID NO:15) and m is 1,
- X is MOG35-55 (SEQ ID NO:16) and m is 2,
- X is PLP139-154 (SEQ ID NO:17) and m is 3,
- X is MART1 (SEQ ID NO:18) and m is 4,
- X is Tyrosinase (SEQ ID NO:19) and m is 8,
- X is PMEL (SEQ ID NO:20) and m is 5,
- X is Aquaporin-4 (SEQ ID NO:21) and m is 4,
- X is S-arrestin (SEQ ID NO:22) and m is 12,
- X is IRBP (SEQ ID NO:23) and m is 21,
- X is Conarachin and m is 21,
- X is Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24) and m is 1,
- X is Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25) and m is 1,
- X is Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26) and m is 1,
- X is Omega-gliadin (SEQ ID NO:27) and m is 1,
- X is Fel d 1 and m is 4,
- X is Cat albumin and m is 16,
- X is Can f 1 and m is 6,
- X is Dog albumin and m is 23, and
- X is RhCE example and m is 10.

[0269] 1E. Other Compounds of Formula 1aA

[0270] By following the procedure described in Example 1C and substituting the compounds of Formula 103', for example as obtained in Example 1D, there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1aA:

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- F1aA-Abciximab-m₁₀-n₈₀,
- F1aA-Adalimumab-m₁₁-n₈₀,
- F1aA-Agalsidase alfa-m₁₄-n₈₀,
- F1aA-Agalsidase beta-m₁₄-n₈₀,
- F1aA-Aldeslakin-m₆-n₈₀,
- F1aA-Aglucosidase alfa-m₁₃-n₈₀,
- F1aA-Factor VIII-m₁₀₀-n₈₀,
- F1aA-Factor IX-m₁₈-n₈₀,
- F1aA-L-asparaginase-m₅-n₈₀,
- F1aA-Laronidase-m₇-n₈₀,
- F1aA-Octreotide-m₁-n₈₀,
- F1aA-Phenylalanine ammonia-lyase-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-Rasburicase-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-Insulin-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-Tyrosinase-m₈-n₈₀,
- F1aA-PMEL-m₅-n₈₀,
- F1aA-Aquaporin-4-m₄-n₈₀,
- F1aA-S-arrestin-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-IRBP-m₂₁-n₈₀,
- F1aA-Conarachin-m₂₁-n₈₀,
- F1aA-Alpha-gliadin "33-mer" native-m₁-n₈₀,
- F1aA-Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-m₁-n₈₀,
- F1aA-Alpha-gliadin-m₁-n₈₀,
- F1aA-Omega-gliadin-m₁-n₈₀,
- F1aA-Fel d 1-m₄-n₈₀,
- F1aA-Cat albumin-m₁₆-n₈₀,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- F1aA-Can f 1-m₆-n₈₀,
- F1aA-Dog albumin-m₂₃-n₈₀, and
- F1aA-RhCE-m₁₀-n₈₀.

[0271] 1F. Other Compounds of Formula 106A

[0272] By following the procedure described in Example 1B and substituting the pyridyl dithiol-poly(ethylene glycol)-NHS ester (Formula 104 where n is 80) with the following:

- Formula 104 where n is 12,
- Formula 104 where n is 33,
- Formula 104 where n is 40,
- Formula 104 where n is 43,
- Formula 104 where n is 50,
- Formula 104 where n is 60,
- Formula 104 where n is 75, and
- Formula 104 where n is 80,

there are obtained the following corresponding compounds of Formula 106A where:

- n is 12,
- n is 33,
- n is 40,
- n is 43,
- n is 50,
- n is 60,
- n is 75, and
- n is 84,

[0273] 1G. Other Compounds of Formula 1aA

[0274] By following the procedure described in Example 1E and substituting the compound of Formula 106A with the compounds obtained in Example 1F, there are obtained the corresponding compounds of Formula 1aA where n is 12, 33, 40, 43, 50, 60, 75 and 84, such as:

- F1aA-Insulin-m₂-n₁₂,
- F1aA-Insulin-m₂-n₃₃,
- F1aA-Insulin-m₂-n₄₀,
- F1aA-Insulin-m₂-n₄₃,
- F1aA-Insulin-m₂-n₅₀,
- F1aA-Insulin-m₂-n₆₀,
- F1aA-Insulin-m₂-n₇₅, and
- F1aA-Insulin-m₂-n₈₄.

[0275] **Example 2**

[0276] **F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL**

[0277] 2A. Formula 103' where X' is Ovalbumin and m is 1

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0278] In an endotoxin-free tube, OVA (6.5 mg, 0.000155 mmol) was added to 200 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA and stirred. Separately, 1 mg of Taut's Reagent was dissolved in 100 μ l of pH 7.0 PBS, and 43 μ l (0.00310 mmol) of the Traut's Reagent solution so obtained was added to the stirred solution of OVA with continued stirring. After 1 hour, non-reacted Traut's Reagent was removed using a centrifugal size exclusion column to afford the product of Formula 103'.

[0279] 2B. Formula 1b where X' is Ovalbumin, m is 1, n is 4, p is 34, R⁹ is a direct bond and Z'' is 2NAcGAL

[0280] In a micro centrifuge tube, poly(Galactosamine Methacrylate)-(pyridyl disulfide) (Formula 201) (20.0 mg, 0.0020 mmol) was solubilized in 50 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA. To this was added the purified OVA-Traut product from Example 2A followed by stirring for 1 hour. The resulting product of Formula 1b was purified by passing the reaction mixture through a centrifugal size exclusion column. Characterization (UHPLC SEC, gel electrophoresis) confirmed the identity of the product. (See Fig. 5.)

[0281] 2C. Other Compounds of Formula 1b

[0282] By following the procedure described in Example 2B and substituting the compounds of Formula 103', for example as obtained in Example 1D, there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1b:

- F1b-Abciximab-m₁₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Adalimumab-m₁₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Agalsidase alfa-m₁₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Agalsidase beta-m₁₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Aldeslakin-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Alglucosidase alfa-m₁₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Factor VIII-m₁₀₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Factor IX-m₁₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-L-asparaginase-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Laronidase-m₇-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Octreotide-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Phenylalanine ammonia-lyase-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Rasburicase-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Insulin-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,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- 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-Tyrosinase-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PMEL-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Aquaporin-4-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-S-arrestin-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-IRBP-m₂₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Conarachin-m₂₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Alpha-gliadin "33-mer" native-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Alpha-gliadin-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Omega-gliadin-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Fel d 1-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Cat albumin-m₁₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Can f 1-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Dog albumin-m₂₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL, and
- F1b-RhCE-m₁₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL.

[0283] Example 3**[0284] F1f-OVA-m₁-n₄-p₃₃-2NAcGAL**

[0285] 3A. Formula 1f where X' is Ovalbumin and m is 1, n is 4, p is 33, R⁹ is a direct bond and Z' is 2NAcGAL

[0286] In an endotoxin-free tube, OVA (4.0 mg, 0.0000952381 mmol) was added to 0.1 ml of pH 7.4 PBS and stirred. Separately, poly-(n-Acetylgalactosamine)-p-nitrophenyl carbonate of Formula 601 where n is 4 and p is 33 (33.0 mg, 0.002380952 mmol) was added to 100 μ l of pH 7.5 PBS and vortexed until dissolved. The two solutions were combined and the mixture was stirred vigorously for 1 hour. The mixture was then collected and dialyzed for 3 days against pH 7.4 PBS (30 kDa molecular weight cut off) to afford the product of Formula 1f.

[0287] Example 4**[0288] F1g-PVA-m₁-p₉₀-2NAcGAL**

[0289] 4A. Formula 1g where X' is Ovalbumin and m is 1, p is 90, R⁹ is a direct bond and Z' is 2NAcGAL

[0290] In an endotoxin-free tube, OVA (5.0 mg, 0.000119048 mmol) was added to 0.2 ml of pH 7.4 PBS and stirred. To the stirring solution was added 75 mg (0.00297619 mmol) of Poly(Galactosamine Methacrylate)-NHS (Formula 701) dissolved in 0.4 ml of pH 7.4 PBS. The mixture was allowed to stir for 2 hours. The mixture was then collected and dialyzed for 3 days against pH 7.4

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

PBS (30 kDa molecular weight cut off) to afford the product of Formula 1g.

[0291] Example 5

[0292] F1h-OVA-m₂-n₄₅-p₅₅-q₄-2NACGAL

[0293] 5A. Formula 802' where X' is Ovalbumin, m is 2 and n is 45

[0294] In an endotoxin-free tube, OVA (3.0 mg, 0.0000714286 mmol) was added to 150 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA and stirred. Dibenzocyclooctyne-PEG-(p-nitrophenyl carbonate) (Formula 801) (5.265 mg, 0.002142857 mmol) dissolved in DMF was added to the OVA solution and stirred for 1 hour. The excess dibenzocyclooctyne-PEG-(p-nitrophenyl carbonate) was removed using a centrifugal size exclusion column to afford the product of Formula 802'.

[0295] 5B. Formula 1h where X' is Ovalbumin, m is 2, n is 45, p is 55, q is 4, R⁸ is CH₂, R⁹ is a direct bond and Z' is 2NACGAL

[0296] Poly(Galactosamine Methacrylate)-N3 (Formula 803 where p is 55, q is 4 and Z' is N-acetylgalactosamine) (33 mg, 0.002142857 mmol) was dissolved in 100 μ l of pH 7.4 PBS and added to the product of Example 5A with stirring. After 1 hour, the resulting product of Formula 1h was purified by centrifugal size exclusion chromatography.

[0297] Example 6

[0298] F1j-OVA-m₁₀-n₄₅-p₅₅-q₄-2NACGAL

[0299] 6A. Formula 103' where X' is Ovalbumin and m is 10

[0300] In an endotoxin-free tube, OVA (5.0 mg, 0.00019 mmol) was added to 150 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA and stirred. Separately, 1 mg of Traut's Reagent was dissolved in 100 μ l of pH 7.0 PBS, and 16 μ l (0.0019 mmol) of the Traut's Reagent solution so obtained was added to the stirred solution of OVA with continued stirring. After 1 hour, non-reacted Traut's Reagent was removed using a centrifugal size exclusion column to afford the product of Formula 103'.

[0301] 6B. Formula 902" where X' is Ovalbumin, m is 10 and n is 45

[0302] Dibenzocyclooctyne-PEG-(pyridyl disulfide) (Formula 901 where n is 45) (6.0 mg, 0.00238 mmol) was dissolved in DMF and the resulting solution was added to the OVA solution obtained in Example 6A and stirred for 1 hour. The excess dibenzocyclooctyne-PEG-(pyridyl disulfide) was removed using centrifugal size exclusion chromatography to afford the product of Formula 902".

[0303] 6C. Formula 1j where X' is Ovalbumin, m is 10, n is 45, p is 55, q is 4, R⁸ is CH₂, R⁹ is a direct bond and Z' is 2NACGAL

[0304] Poly(Galactosamine Methacrylate)-N3 (Formula 803 where p is 55, q is 4 and Z' is N-acetylgalactosamine) (36 mg, 0.00238 mmol) was dissolved in 150 μ l of pH 7.4 PBS and added to the product of Example 6B with stirring. After 1 hour, the resulting product of Formula 1j was purified (excess p(GMA)-N3 removed) by centrifugal size exclusion chromatography. Characterization (UHPLC SEC, gel electrophoresis) confirmed the identity of the product.

[0305] Example 7

[0306] F1L-OVA-m₂-n₈₀-p₅₅-q₄-2NACGAL

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0307] 7A. Formula 1002 where X' is Ovalbumin, m is 2 and n is 80

[0308] Dibenzocyclooctyne-PEG-(pyridyl disulfide) (Formula 1001 where n is 80) (9.0 mg, 0.00238 mmol) was dissolved in DMF and the resulting solution was added to a purified OVA solution of Formula 103' (where X' is Ovalbumin and m is 2), for example prepared as described in Example 6A and stirred for 1 hour. The excess dibenzocyclooctyne-PEG-(pyridyl disulfide) was removed using centrifugal size exclusion chromatography to afford the product of Formula 1002.

[0309] 7B. Formula 1L where X' is Ovalbumin, m is 2, n is 80, p is 55, q is 4, R^a is CH₂, R^b is a direct bond and Z' is 2NAcGAL

[0310] Poly(Galactosamine Methacrylate)-N3 (Formula 803 where p is 55, q is 4 and Z' is N-Acetylgalactosamine) (36 mg, 0.00238 mmol) was dissolved in 150 μ l of pH 7.4 PBS and added to the product of Example 7A with stirring. After 1 hour, the resulting product of Formula 1L was purified (excess poly(Galactosamine Methacrylate)-N3 removed) by centrifugal size exclusion chromatography. Characterization (UHPLC SEC, gel electrophoresis) confirmed the identity of the product.

[0311] Example 8

[0312] Preparation of poly(Galactosamine methacrylate) Polymers

[0313] 8A. Galactosamine Methacrylate

[0314] To stirred galactosamine hydrochloride (2.15 g, 10.0 mmol) was added 0.5 M sodium methoxide (22 ml, 11.0 mmol). After 30 minutes, methacrylate anhydride (14.694 g, 11.0 mmol) was added and stirring continued for 4 hours. The resulting galactosamine methacrylate was loaded onto silica gel via rotovap and purified via column chromatography using DCM:MeOH (85:15).

[0315] 8B. Formula 201 where n is 4 and p is 30

[0316] Galactose methacrylate (600 mg, 2.43 mmol), 2-(2-(2-(pyridin-2-ylidisulfanyl)ethoxy)ethoxy)ethyl 2-((phenylcarbonothioyl)thio)acetate (44.8 mg, 0.081 mmol) and AIBN (3.174089069 mg, 0.016 mmol) were added to 1.5 ml of DMF in a Schlenk Flask. The reaction mixture was subjected to 4 freeze-thaw cycles and then stirred at 70°C for 6 hours. The desired polymer product of Formula 201 was precipitated in 12 ml of methanol, and excess solvent was removed under reduced pressure.

[0317] Example 9

[0318] Preparation of F1aA-PE-m₂-n₈₀

[0319] 9A. Formula 103' where X' is Phycoerythrin

[0320] In an endotoxin-free tube, phycoerythrin ("PE") (purchased from Pierce) (200 μ l, 0.000004 mmol) was added to 50 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA and stirred. Separately, 1 mg of Taut's Reagent was dissolved in 100 μ l of pH 7.0 PBS, and 2 μ l (0.00013 mmol) of the Traut's Reagent solution so obtained was added to the stirred solution of PE with continued stirring. After 1 hour, excess Traut's Reagent was removed using a centrifugal size exclusion column to afford the product of Formula 103'.

[0321] 9B. Formula 106A where n is 80

[0322] In an endotoxin-free tube, galactosamine (7.0 mg, 0.03246 mmol) was dissolved with stirring in 100 μ l of pH 8.0 PBS containing 5 mM EDTA. Pyridyl dithiol-poly(ethylene glycol)-NHS ester

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

(Formula 104 where n is 80) (16.23 mg, 0.00464 mmol) dissolved in 50 μ l of pH 7.0 PBS was added to the stirring solution of galactosamine. After 1 hour, the resulting product of Formula 106A was ready to be used without further purification.

[0323] 9C. Formula 1a where X' is Phycoerythrin, m is 3, n is 80 and Z' is galactosamine

[0324] The purified PE-Traut conjugates prepared in Example 9A were added directly to the stirring product of Formula 106A prepared in Example 9B. After 1 hour, the resulting product of Formula 1a was purified by passing the reaction mixture through a centrifugal size exclusion column. Characterization (UHPLC SEC, gel electrophoresis) confirmed the identity of the product.

[0325] Example 10

[0326] OVA-DOM

[0327] 10A. Preparation of Expression Vector

[0328] The mammalian cell expression vector pSecTag A was purchased from Life Technologies. The gene encoding the anti-ASGPR domain antibody, Dom26h-196-61, herein referred to as "DOM", was purchased as a codon-optimized sequence for protein expression in human cells, from the provider Genscript. Sequences encoding OVA, DOM, the flexible linker Gly₃Ser, and the 6xHis tag were cloned into mammalian expression vector pSecTag A, C-terminal to the Ig κ -chain secretion leader sequence, by site-directed mutagenesis, following a variation of the QuikChange protocol (Geiser, *et al.*)

[0329] 10B. Expression and Purification of Formula 2 where m' is 1, m" is 0, X is Ovalbumin, Y is Gly₃Ser, Z is Anti-ASGPR Dom26h-196-61

[0330] HEK293 cells were transiently transfected with modified pSecTag A vectors, prepared for example as described in Example 10A, using polyethylenimine. Transfected cells were cultured in FreeStyle 293 medium (Life Technologies) supplemented with valproic acid for 7 days, after which the cells were removed by centrifugation and the culture supernatants were collected and sterilized by filtration. The OVA/DOM fusion proteins of Formula 2 were purified from the culture supernatants by immobilized metal ion affinity chromatography using a HisTrap Ni²⁺ sepharose column (GE Healthcare), followed by size exclusion chromatography using a Superdex 75 column (GE Healthcare), having the following generalized structure:



and the following amino acid sequence:

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRQINKVVRFDKLPFGGDSI
EAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNVVSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAA
DQARELINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQES
KPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEKLTETWTSSNVM
EERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSLVMAMGITDVFSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVV
GSAEAGVDAASVSEEFRAADHPFLFCIKHIATNAVLFGRGVSPGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTITYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGLTVTVSSGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:28)

[0331] Protein purity was verified by Coomassie Brilliant Blue staining of SDS-PAGE gels and anti-6xHis tag western blotting. Protein concentration was determined using the Beer-Lambert Law, for

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

which the absorbance at 280 nm was measured using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), and the molecular weight (57.3 kDa) and extinction coefficient ($57,090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) were estimated from the protein's amino acid sequence, using the ExPASy ProtParam tool. Endotoxin levels were measured using the HEK-BLUE TLR reporter cell line (Invivogen) according to manufacturer's instructions.

[0332] 10C. Other Compositions of Formula 2

[0333] By following the procedures described in Examples 10A and 10B and substituting the pSecTag A vectors accordingly, there were obtained the following fusion proteins of Formula 2:

N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C

having the following amino acid sequence:

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGLTVTVSSGGGSGSIGAAS
MEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAkdSTRtQINKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTS
VNVHSSLRDILNQITKPNdVVSfSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAAQARELIN
SWVESQTNgiRNVLQpSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMY
QIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIInFEKLTEWTSSNVMEERKIKVY
LPRMKMEEKYNLTsvLMAMGItDVfSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGV
DAASVSEEFRAHDPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:29); and

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

having the following amino acid sequence:

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAkdSTRtQINKVVRFDKLPFGGDSI
EAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNdVVSfSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAA
QARELINSWVESQTNgiRNVLQpSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQES
KPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIInFEKLTEWTSSNV
EERKIKVYLPRMKMEEKYNLTsvLMAMGItDVfSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREV
GSAEAGVDAASVSEEFRAHDPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRL
SCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGLTVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIF
YCPIAIMSALAMVYLGAkdSTRtQINKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNdVY
SfSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAAQARELINSWVESQTNgiRNVLQpSSV
DSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELP
FASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIInFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTsvLMAMG
ItDVfSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRAHDPFLFCIKHI
ATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:30).

[0334] 10D. Other Compositions of Formula 2

[0335] By following the procedures described in Examples 10A and 10B and substituting for Gly₃Ser the vectors for a linker having an immunoproteasome cleavage site ("IPC"), and for OVA the vectors for:

MBP13-32 (SEQ ID NO:11),

MBP83-99 (SEQ ID NO:12),

MBP111-129 (SEQ ID NO:13),

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

MBP146-170 (SEQ ID NO:14),
 MOG1-20 (SEQ ID NO:15),
 MOG35-55 (SEQ ID NO:16), and
 PLP139-154 (SEQ ID NO:17),

or the vectors for:

Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25)
 Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26), and
 Omega-gliadin (SEQ ID NO:27),

there are obtained the following fusion proteins of Formula 2:

- MBP13-32-IPC-MBP83-99-IPC-MBP111-129-IPC-MBP146-170-IPC-MOG1-20-IPC-MOG35-55-IPC-PLP139-154-IPC-DOM, and
- Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-IPC-Alpha-gliadin-IPC-Omega-gliadin-IPC-DOM.

[0336] Example 11

[0337] Desialylated OVA

[0338] 11A. Preparation of Expression Vector

[0339] The mammalian cell expression vector pSecTag A was purchased from Life Technologies. Sequences encoding OVA, the flexible linker Gly3Ser, and the 6xHis tag were cloned into pSecTag A, C-terminal to the Ig k-chain secretion leader sequence, by site-directed mutagenesis, following a variation of the QuikChange protocol (Geiser, et al.)

[0340] 11B. Expression and Purification of OVA

[0341] HEK293 cells were transiently transfected with modified pSecTag A vector, prepared for example as described in Example 10A, using polyethylenimine. Transfected cells were cultured in FreeStyle 293 medium (Life Technologies) supplemented with valproic acid for 7 days, after which the cells were removed by centrifugation and the culture supernatants are collected and sterilized by filtration. OVA protein was purified from the culture supernatant by immobilized metal ion affinity chromatography using a HisTrap Ni²⁺ sepharose column (GE Healthcare), followed by size exclusion chromatography using a Superdex 75 column (GE Healthcare), having the following structure:

N'-OVA Gly3Ser 6xHis -C'

and the following amino acid sequence:

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPFGGDSI
 EAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAA
 DQARELINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQES
 KPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIIINFEKLTWTSSNVM
 EERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSLMAMGITDVFSANLSGISSAESLKIQAQVHAHAHAINEAGREV
 GSAEAGVDAASVSEEFRAHDPFLFCIKHIATNAVLFGRGCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:31)

[0342] Protein purity was verified by Coomassie Brilliant Blue staining of SDS-PAGE gels and anti-6xHis tag western blotting. Protein concentration was determined using the Beer-Lambert Law, for which the absorbance at 280 nm was measured using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), and the molecular weight (43.8 kDa) and extinction coefficient (31,525 M⁻¹ cm⁻¹) were estimated from the

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

protein's amino acid sequence, using the ExPASy ProtParam tool.

[0343] **11C. Desialylation**

[0344] OVA is desialylated by incubation with neuraminidase for 1 hour at 37°C (New England Biolabs). Desialylated OVA is purified from the reaction mixture by immobilized metal ion affinity chromatography (e.g., using a HisTrap Ni²⁺ sepharose column, GE Healthcare), followed by size exclusion chromatography (e.g., using a Superdex 75 column, GE Healthcare).

[0345] Protein purity is verified by Coomassie Brilliant Blue staining of SDS-PAGE gels and anti-6xHis tag western blotting. Desialylation is verified by Sambucus nigra lectin-based detection of protein sialic acid content in western blots (Vector Biolabs) and by a sialic acid-mediated fluorescence assay (ProZyme). Desialylated protein concentration is determined using the Beer-Lambert Law, as described above for the protein before desialylation. Endotoxin levels are measured using the HEK-Blue TLR4 reporter cell line (Invivogen) according to manufacturer's instructions.

[0346] **Example 12**

[0347] **Hepatic Distribution**

[0348] **12A.** F1aA-PE-m₃-n₈₀ was prepared, for example, as described in Example 9. A 30µg/100µl solution in sterile saline was prepared for injection.

[0349] The F1aA-PE-m₃-n₈₀ solution (30µg) was administered to one of three groups of C57 black 6 mice (3 per group) via tail vein injection. The two other groups of mice received an equivalent volume of phycoerythrin in 100 µl of saline or saline vehicle. Three hours after administration, the livers and spleens of these animals were harvested and the level of cellular fluorescents in these organs was determined by flow cytometry as an indication of cellular PE content.

[0350] As shown in Fig. 1, sinusoidal endothelial cells (LSECs), hepatocytes, kupffer cells (KC), and other antigen-presenting cells (APCs) from the livers of mice treated with F1aA-PE-m₃-n₈₀ exhibited at least a three-fold increase in fluorescence as compared with animals that received PE solution. No detectable difference in fluorescence was found in spleen cells harvested from the three groups. These results confirm that F1aA-PE-m₃-n₈₀ has sufficient specificity for binding to antigen-presenting cells in the liver.

[0351] **12B.** By following the procedure described in Example 12A and substituting F1aA-PE-m₃-n₈₀ with the compounds 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 and F1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH, prepared, for example, as described with reference to Example 9 by substitution for X in Examples 2B, 3, 4, 5B, 6B, 7B, 19G, 19L, 20B and 20F, respectively it is confirmed that the compounds F1aA-PE-m₃-n₈₀ with the compounds 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 and F1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH have sufficient specificity for binding to antigen-presenting cells in the liver.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0352] Example 13**[0353] Proliferation of Antigen-specific OT1 CD8⁺ T cells**

[0354] 13A. F1aA-OVA-m₄-n₈₀ synthesized, for example, as described in Example 1, was prepared as a 10µg/100µl saline solution for injection. On day 0, 10⁶ OT-1 T cells were fluorescently labeled and adoptively transferred into 3 groups of CD 45.2 mice (5 per group) via tail vein injection. The next day (i.e. Day 1), to each of the 3 groups of mice were administered, respectively, 10 µg of F1aA-OVA-m₄-n₈₀, OVA or saline via tail vein injection. On day 6, the animals were sacrificed and the % of splenic proliferating OT-1 cells was determined via fluorescence activated cell sorting.

[0355] The results from this study (see Fig. 2) show that the percentage of proliferating OT1 T cells in mice treated with F1aA-OVA-m₄-n₈₀ ("Gal-OVA" in Fig. 2) was significantly greater than the percentage of proliferating OT1 cells in the spleens of mice treated with OVA or saline ("naïve" in Fig. 2). The increase in OT1 cell-proliferation demonstrates the increased CD8⁺ T-cell cross-priming in animals treated with F1aA-OVA-m₄-n₈₀ versus the other therapies. In concert with the results from Example 12, these results indicate that the ability of F1aA-OVA-m₄-n₈₀ to target antigens to the liver increases OVA presentation by antigen presenting cells in the liver to OVA-specific OT1 T cells.

[0356] 13B. To distinguish T cells being expanded into a functional effector phenotype from those being expanded and deleted, the proliferating OT1 CD8⁺ T cells were analyzed for annexin-V, as a hallmark of apoptosis and thus deletion, as well as the exhaustion marker programmed death-1 (PD-1). As shown in Fig. 3, F1aA-OVA-m₄-n₈₀ ("Gal-OVA" in Fig. 3) induced much higher numbers of annexin-V⁺ and PD-1⁺ proliferating OT1 CD8⁺ T cells than soluble OVA.

[0357] 13C. By following the procedure described in Examples 13A and 13B, and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈ with the compounds of Formula 1 obtained, for example, as described in Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G, it is shown the compounds from Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G induce much higher numbers of annexin-V⁺ and PD-1⁺ proliferating OT1 CD8⁺ T cells than soluble OVA.

[0358] 13D. By following the procedure described in Examples 13A and 13B and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈ with the compounds of Formulae 1 and 2 obtained, for example, as described in Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F, and substituting OVA with the antigens corresponding to X (or X' or X''), respectively, it is shown that the compounds from Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F induce much higher numbers of annexin-V⁺ and PD-1⁺ proliferating OT1 CD8⁺ T cells than soluble antigen X.

[0359] Example 14**F1aA-OVA-m₄-n₈ does not induce an OVA-specific antibody response**

[0360] 14A. In order to assess the humoral immune response to F1aA-OVA-m₄-n₈ we treated mice with a weekly i.v. injection of either F1aA-OVA-m₄-n₈ or OVA, then measured the levels of OVA-specific antibodies in the blood. On day 0, 7, and 14 of the experiment, mice were administered an i.v. injection of 100 µl of saline containing one of the following: 1.) 6 µg of OVA; 2.) 6 µg of F1aA-OVA-m₄-n₈; 3.) 30 µg of OVA; 4.) 30 µg of F1aA-OVA-m₄-n₈, or 5.) saline alone. Each group contained 5 mice. On day 19, the mice were bled via cheek puncture, and the titer of OVA-specific antibodies in each

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

mouse's blood was determined via ELISA. The results for this study show that although mice treated with 6 and 30 µg of OVA had increased OVA-specific antibody titers, mice treated with both 6 and 30 µg of F1aA-OVA-m₄-n₈ ("Gal-OVA" in Fig. 4) had blood titers similar to mice treated with saline (i.e. vehicle treated animals) (Fig. 4). For example mice treated with 6 and 30 µg of OVA had an average antibody titer of 3.5 and 2.5, respectively; whereas, mice treated with 6 and 30 µg of OVA had an average antibody titer of 0.75 and 0.25, respectively.

[0361] 14B. By following the procedure described in Example 14A and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈ with the compounds of Formula 1 obtained, for example, as described in Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G, it is shown that mice treated with the compounds from Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G have OVA-specific antibody titers similar to mice treated with saline.

[0362] 14C. By following the procedure described in Example 14A and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈ with the compounds of Formulae 1 and 2 obtained, for example, as described in Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F, and substituting OVA with the antigens corresponding to X (or X' or X''), respectively, it is shown that mice treated with the compounds from Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F have antigen X-specific antibody titers similar to mice treated with saline.

[0363] Example 15

[0364] F1aA-OVA-m₄-n₈ depletes OVA-specific antibodies

[0365] 15A. We treated mice that had different OVA-antibody blood titers (each mouse had a titer from 0 to 4.5) with an i.v. injection of 20 µg of F1aA-OVA-m₄-n₈ solubilized in 100 µl saline. Mice were given i.v. injections of F1aA-OVA-m₄-n₈ on days 0, 5, 7, 12, and 14 (Injections of F1aA-OVA-m₄-n₈ are labeled as "Gal-OVA" and shown as green arrows on the x-axis of Fig. 5). In order to determine the ability of F1aA-OVA-m₄-n₈ to deplete serum OVA-specific antibodies, the mice were bled on day -1 to establish an initial antibody titer and then subsequent bleeds were carried out after each injection of F1aA-OVA-m₄-n₈ on days 2, 6, 9, 13, and 16. The antibody titer for each mouse was determined via ELISA. The results from this study show that F1aA-OVA-m₄-n₈ is able to deplete serum antibody levels in mice. For example, one day after the first F1aA-OVA-m₄-n₈ injection (i.e. day 2), mice with positive OVA-antibody titers experience a 5 to 100-fold decrease in serum antibody levels (Fig. 5). Our results show that although over the course of the 19 day experiment, antibody titers did increase for certain mice, the titer levels never reached the initial antibody titer measured on Day -1 and subsequent doses of F1aA-OVA-m₄-n₈ were effective in reducing these transient increases in antibody titers. These results demonstrate that F1aA-OVA-m₄-n₈ has the specificity to bind serum OVA-specific antibodies and the kinetics required to deplete OVA-specific serum antibodies.

[0366] 15B. By following the procedure described in Example 15A and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈ with the compounds of Formula 1 obtained, for example, as described in Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G, it is shown that the compounds from Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G have the specificity to bind serum OVA-specific antibodies and the kinetics required to deplete OVA-specific serum antibodies.

[0367] 15C. By following the procedure described in Example 15A and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈ with the compounds of Formulae 1 and 2 obtained, for example, as described in Examples 1E,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F, and substituting OVA with the antigens corresponding to X (or X' or X''), respectively, it is shown that the compounds from Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F have the specificity to bind serum antigen X-specific antibodies and the kinetics required to deplete antigen X-specific serum antibodies.

[0368] Example 16

[0369] OT-1 challenge-to-tolerance model

[0370] 16A. Using an established OTI challenge-to-tolerance model (Liu, Lyoda, et al., 2002), the ability of F1aA-OVA-m₄-n₈ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ (pGal-OVA), and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (Dom-OVA) to prevent subsequent immune responses to vaccine-mediated antigen challenge were demonstrated - even with a challenge involving a very strong bacterially-derived adjuvant (i.e. lipopolysaccharide). To tolerize, 233 nmol of either F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C, or soluble OVA were intravenously administered in 100 µl saline at 1 and 6 days following adoptive transfer of OTI CD8⁺ (CD45.2⁺) T cells to CD45.1⁺ mice (n = 5 mice per group). After 9 additional days to allow potential deletion of the transferred T cells, the recipient mice were then challenged with OVA (10 µg) adjuvanted with lipopolysaccharide (LPS) (50 ng) by intradermal injection. Characterization of the draining lymph nodes 4 d after challenge allowed a determination as to whether or not deletion actually took place.

[0371] 16B. Intravenous administration of F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C resulted in profound reductions in OTI CD8⁺ T cell populations in the draining lymph nodes as compared to mice treated with unmodified OVA prior to antigen challenge with LPS, demonstrating deletional tolerance. For example, Fig. 6 shows that the draining lymph nodes from mice treated with either F1aA-OVA-m₄-n₈ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ (pGal-OVA), and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (Dom-OVA) contained over 9-fold fewer OTI CD8⁺ T cells as compared to OVA-treated mice, and more than 43-fold fewer than the challenge control mice that did not receive intravenous injections of antigen; responses in spleen cells were similar. These results demonstrate that F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C mitigated an OVA-specific immune response after adjuvanted OVA challenge.

[0372] 16C. By following the procedure described in Examples 16A and B, and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C with the compounds of Formula 1 obtained, for example, as described in Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G, it is shown that the compounds from Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G mitigate an OVA-specific immune response after adjuvanted OVA challenge.

[0373] 16D. By following the procedure described in Examples 16A and B, and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C with the compounds of Formulae 1 and 2 obtained, for example, as described in Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F, and substituting OVA with the antigens corresponding to X (or X' or X''), respectively, it is shown that the compounds from Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F mitigate an antigen X-specific immune response after adjuvanted antigen X challenge.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0374] Example 17**[0375] Pharmacokinetics**

[0376] 17A. OVA and fusion proteins N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C and N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C (prepared, e.g., as described in Example 10) are labeled with IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) according to manufacturer's instructions. Unreacted dye is removed using Zeba desalting columns (Thermo Scientific). The labeled proteins, 50 µg in 100 µl PBS per dose, are administered *i.v.* or *s.c.* into C57BL/6 mice (5 mice per group). At time = 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, and 96 hours after injection, blood samples are collected from the tip of the tail into heparin-coated capillary tubes. Samples are store at 4 °C, protected from light, until analysis.

[0377] On the day of analysis, blood samples are centrifuged to remove cellular components. Plasma is transferred to fresh capillary tubes and scanned using an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Signal is acquired in the 800 nm channel. Using the image-processing program ImageJ (US National Institutes of Health), each sample is approximated as a line of width 2 and the mean intensity along the line is determined as a relative measure of the amount of circulating protein at that time point.

[0378] Fluorescence signals (normalized to fluorescence at time = 0) vs. time for OVA and fusion proteins DOM-OVA and OVA-DOM, along with curve fits in the form of bi-exponential decays, in Figure 8, show that the ASGPR-targeted OVA fusion proteins are cleared from circulation more quickly than unmodified OVA.

[0379] 17B. By following the procedure described in Example 17A and substituting N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C fusion protein and OVA with asialo-Factor VIII and Factor VIII, respectively, it is shown that asialo-Factor VIII is cleared from circulation much more quickly than unmodified Factor VIII.

[0380] Example 18**[0381] Biodistribution**

[0382] 18A. OVA and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C fusion protein (prepared, e.g., as described in Example 10) are labeled with Alexa Fluor 647 (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Unreacted dye is removed using Zeba desalting columns (Thermo Scientific). Labeled proteins, 50 µg in 100 µl PBS per dose, are administered *i.v.* or *s.c.* into C57BL/6 mice (5 mice per group). Two hours after injection, mice are euthanized by CO₂ asphyxiation. The blood, heart, intestines, kidneys, liver, lungs, stomach, spleen, and remaining carcass are imaged using an IVIS Spectrum imaging system (Caliper Life Sciences). Data is acquired and analyzed using Living Image software (Caliper Life Sciences). Single cell suspensions of liver and spleen are prepared and stained with fluorescently conjugated antibodies against MHC class II, CD1d, CD3, CD4, CD8α, CD11b, CD11c, CD14, CD19, CD45, CD123, and/or Lin in PBS with 0.1% (w/v) BSA. Samples are analyzed using a LSR II flow cytometer and FACS Diva software (BD Biosciences).

[0383] A histogram showing fluorescence signal densities (photons/weight) for each organ and each protein shows that in animals injected with N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C fusion protein the highest fluorescence signal is in the liver as compared to those treated with unmodified OVA.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0384] A histogram showing percentages of N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C and OVA-positive cells shows that animals injected with N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C fusion proteins have a significantly higher percentage of positive hepatocytes as compared to those treated with unmodified OVA.

[0385] 18B. By following the procedure described in Example 18A and substituting N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C fusion protein and OVA with asialo-Factor VIII and Factor VIII, respectively, it is shown that animals injected with asialo-Factor VIII have a significantly higher percentage of positive hepatocytes as compared to those treated with unmodified Factor VIII.

[0386] 18C. By following the procedure described in Example 18A and substituting N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C fusion protein with the compounds of Formula 1 obtained, for example, as described in Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G, it is shown that animals injected with the compounds from Examples 3A, 4A, 5B, 6C, 7B and 19G have a significantly higher percentage of positive hepatocytes as compared to those treated with OVA.

[0387] 18D. By following the procedure described in Examples 18A and B, and substituting F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, and N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C with the compounds of Formulae 1 and 2 obtained, for example, as described in Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F, and substituting OVA with the antigens corresponding to X (or X' or X''), respectively, it is shown that animals injected with the compounds from Examples 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D and 20F have a significantly higher percentage of positive hepatocytes as compared to those treated with antigen X.

[0388] Example 19

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

[0390] 19A. Formula 1102 where R³ is NHAc and R⁴ is OH

[0391] N-Acetyl-D-galactosamine (Formula 1101 where R³ is NHAc and R⁴ is OH) (5g, 22.6 mmol) was added to a stirred solution of chloroethanol (200 ml) at room temperature. The solution was cooled to 4°C and acetylchloride was added drop-wise to the solution. The solution was brought to room temperature and then heated to 70°C. After 4 hours, the unreacted chloroethanol was removed under reduced pressure. 100 ml of ethanol was added to the crude product and the resulting solution was stirred in the presence of carbon for 2 hours. The solution was filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The corresponding product of Formula 1102, N-(2-(2-chloroethoxy)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide, was used without further purification.

[0392] 19B. Formula 1103 where R³ is NHAc and R⁴ is OH

[0393] The N-(2-(2-chloroethoxy)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide prepared in Example 19A (2g, 7.4 mmol) was added to a stirred solution of DMF (100 ml) and sodium azide (4g, 61.5 mmol). The solution was heated at 90°C for 12 hours and then filtered. The residual solvent was removed under reduced pressure and the crude product was purified via flash chromatography (10% MeOH in dichloromethane) to give the corresponding product of Formula 1103, N-(2-(2-azidoethoxy)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)acetamide.

[0394] 19C. Formula 1104 where R³ is NHAc and R⁴ is OH

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0395] The *N*-(2-(2-azidoethoxy)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3-yl)acetamide prepared in Example 19B (2 g, 6.9 mmol) was added to a solution of palladium on carbon and ethanol (50 ml). The solution was stirred under hydrogen gas (3 atm) for 4 hours. The resulting solution was filtered and the residual solvent was removed under reduced pressure to afford the corresponding product of Formula 1104, *N*-(2-(2-aminoethoxy)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3-yl)acetamide, which was used without further purification.

[0396] 19D. Formula 1105 where R³ is NHAc and R⁴ is OH

[0397] The *N*-(2-(2-aminoethoxy)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3-yl)acetamide prepared in Example 19C (1.0 g, 3.78 mmol) was added to a solution of methacrylate anhydride (0.583 g, 3.78 mmol) in DMF (50 ml). Triethylamine was then added to the solution and the reaction was stirred for 2 hours at room temperature. After 2 hours, the excess solvent was removed under reduced pressure, and the corresponding product of Formula 1105, *N*-(2-((3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethyl)methacrylamide, was isolated via flash chromatography.

[0398] 19E. Formula 1107 where p is 30, q is 4, R³ is NHAc, R⁴ is OH and R⁸ is CMP

[0399] An azide-modified uRAFT agent of Formula 1106 where q is 4 (28 mg) was added to a solution of *N*-(2-((3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethyl)methacrylamide prepared in Example 19D (579 mg, 1.74 mmol) and azobisisobutyronitrile (2.2 mg, 0.0116 mmol) in DMF. The reaction mixture was subjected to 4 freeze-pump-thaw cycles, and then stirred at 70°C. After 12 hours, the polymer product of Formula 1107, where p is 30 and q is 4 was precipitated from the reaction mixture via the addition of methanol. The solvent was decanted from the solid and the solid was collected and residual solvent was removed via reduced pressure.

[0400] 19F. Formula 1109 where X' is OVA, m is 2 and n is 80

[0401] Ovalbumin (5 mg, 0.00012 mmol) was added to 100 µl of sodium phosphate buffer (pH 8.0) and stirred. To this solution was added 5 mg of the compound of Formula 1108 where n is 80. After 1 hour, the unreacted compound of Formula 1108 was removed from the solution via centrifugal size-exclusion chromatography. The resulting buffered solution containing the corresponding product of Formula 1109 was used in the next reaction without further purification.

[0402] 19G. Formula 1m where X' is OVA, m is 2, n is 80, p is 30, q is 4, R³ is NHAc and R⁸ is CMP

[0403] The solution prepared in Example 19F was added to 100 µl of sodium phosphate buffer (pH 8.0) which contained 10 mg of the product of Formula 1107 prepared in Example 19E. The reaction was allowed to stir for 2 hours and then the excess Formula 1107 was removed via centrifugal size exclusion chromatography to afford the corresponding isomeric product of Formula 1m in solution, which was used in biological studies without further purification. The R³ substituent is shown in the name of the title compound as 2NHAc.

[0404] 19H. Other Compounds of Formula 1109

[0405] By following the procedure described in Example 19F and substituting OVA with the following:

- Abciximab,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- Adalimumab,
- Agalsidase alfa,
- Agalsidase beta,
- Aldeslakin,
- Alglucosidase alfa,
- Factor VIII,
- Factor IX,
- L-asparaginase,
- Laronidase,
- Octreotide,
- Phenylalanine ammonia-lyase,
- Rasburicase,
- Insulin (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),
- Tyrosinase (SEQ ID NO:19),
- PMEL (SEQ ID NO:20),
- Aquaporin-4 (SEQ ID NO:21),
- S-arrestin (SEQ ID NO:22),
- IRBP (SEQ ID NO:23),
- Conarachin (UNIPROT Q6PSU6),
- Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24),
- Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25),
- Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26),
- Omega-gliadin (SEQ ID NO:27),
- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- Cat albumin (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT O18873),

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- Dog albumin (UNIPROT P49822), and
- RhCE example (UNIPROT P18577),

there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1109 where n is 80:

- X is Abciximab and m is 10,
- X is Adalimumab and m is 11,
- X is Agalsidase alfa and m is 14,
- X is Agalsidase beta and m is 14,
- X is Aldeslakin and m is 6,
- X is Alglucosidase alfa and m is 13,
- X is Factor VIII and m is 100,
- X is Factor IX and m is 18,
- X is L-asparaginase and m is 5,
- X is Laronidase and m is 7,
- X is Octreotide and m is 1,
- X is Phenylalanine ammonia-lyase and m is 12,
- X is Rasburicase and m is 12,
- X is Insulin (SEQ ID NO:5) and m is 2,
- X is GAD-65 (SEQ ID NO:6) and m is 8,
- X is IGRP (SEQ ID NO:7) and m is 7,
- X is MBP (SEQ ID NO:8) and m is 6,
- X is MOG (SEQ ID NO:9) and m is 5,
- X is PLP (SEQ ID NO:10) and m is 8,
- X is MBP13-32 (SEQ ID NO:11) and m is 1,
- X is MBP83-99 (SEQ ID NO:12) and m is 1,
- X is MBP111-129 (SEQ ID NO:13) and m is 1,
- X is MBP146-170 (SEQ ID NO:14) and m is 2,
- X is MOG1-20 (SEQ ID NO:15) and m is 1,
- X is MOG35-55 (SEQ ID NO:16) and m is 2,
- X is PLP139-154 (SEQ ID NO:17) and m is 3,
- X is MART1 (SEQ ID NO:18) and m is 4,
- X is Tyrosinase (SEQ ID NO:19) and m is 8,
- X is PMEL (SEQ ID NO:20) and m is 5,
- X is Aquaporin-4 (SEQ ID NO:21) and m is 4,
- X is S-arrestin (SEQ ID NO:22) and m is 12,
- X is IRBP (SEQ ID NO:23) and m is 21,
- X is Conarachin and m is 21,
- X is Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24) and m is 1,
- X is Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25) and m is 1,
- X is Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26) and m is 1,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- X is Omega-gliadin (SEQ ID NO:27) and m is 1,
- X is Fel d 1 and m is 4,
- X is Cat albumin and m is 16,
- X is Can f 1 and m is 6,
- X is Dog albumin and m is 23, and
- X is RhCE example and m is 10.

[0406] 19I. Other Compounds of Formula 1m

[0407] By following the procedure described in Example 19G and substituting the compounds of Formula 1109, for example as obtained in Example 19H, there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1m:

- F1m-Abciximab-m₁₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Adalimumab-m₁₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Agalsidase alfa-m₁₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Agalsidase beta-m₁₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Aldeslakin-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Alglucosidase alfa-m₁₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Factor VIII-m₁₀₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Factor IX-m₁₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-L-asparaginase-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Laronidase-m₇-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Octreotide-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Phenylalanine ammonia-lyase-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Rasburicase-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Insulin-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-Tyrosinase-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-PMEL-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- F1m-Aquaporin-4-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-S-arrestin-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-IRBP-m₂₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Conarachin-m₂₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Alpha-gliadin "33-mer" native-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Alpha-gliadin-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Omega-gliadin-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Feld 1-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Cat albumin-m₁₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Can f 1-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Dog albumin-m₂₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, and
- F1m-RhCE-m₁₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc.

[0408] 19J. Formula 1107 where where p is 30, q is 8, R³ is OH, R⁴ is OH and R⁸ is CMP

[0409] By following the procedure described in Example 19A and substituting the N-acetyl-D-galactosamine with galactose, and following through to the procedure described in Example 19E except using an azide-modified uRAFT agent of Formula 1106 where q is 8, there is obtained the compound of Formula 1107 where where p is 30, q is 8, R³ is OH, R⁴ is OH and R⁸ is CMP.

[0410] 19K. Formula 1109 where n is 62 and where X' and m are as in Example 19H

[0411] By following the procedure described in Example 19F, substituting the OVA with the compounds as described in Example 19H and employing the compound of Formula 1108 where n is 62, there are obtained the corresponding compounds of Formula 1109 where n is 62.

[0412] 19L. Other Compounds of Formula 1m

[0413] By following the procedure described in Example 19G and substituting the compound of Formula 1107 with the compounds obtained in Example 19J, and substituting the compound of Formula 1109 with the compounds obtained in Example 19K, there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1m:

- F1m-Abciximab-m₁₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Adalimumab-m₁₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Agalsidase alfa-m₁₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Agalsidase beta-m₁₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Aldeslukin-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Aglucosidase alfa-m₁₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Factor VIII-m₁₀₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Factor IX-m₁₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-L-asparaginase-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Laronidase-m₇-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Octreotide-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Phenylalanine ammonia-lyase-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- F1m-Rasburicase-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Insulin-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-Tyrosinase-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-PMEL-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Aquaporin-4-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-S-arrestin-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-IRBP-m₂₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Conarachin-m₂₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Alpha-gliadin "33-mer" native-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Alpha-gliadin-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Omega-gliadin-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Feld 1-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Cat albumin-m₁₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Can f 1-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1m-Dog albumin-m₂₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, and
- F1m-RhCE-m₁₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH.

[0414] Example 20**[0415] F1n-insulin-m₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc****[0416]** 20A. Formula 1202 where X' is Insulin, m is 2 and n is 1

[0417] Recombinant human insulin (5 mg) was added to 100 μ l of DMF containing 10 μ l of triethylamine and stirred until the insulin became soluble. To this solution was added 10 mg (0.0161 mmol) of a linker precursor of Formula 1201 where n is 1 (obtained from???) and the reaction was allowed to stir. After 1 hour, 1.3 ml of tert-butyl methyl ether was added to isolate the corresponding product of Formula 1202, which was recovered as the precipitate. Residual DMF and tert-butyl methyl

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

ether were removed under reduced pressure. Characterization via liquid chromatography, mass spectroscopy and polyacrylamide gel electrophoresis confirmed the identity of the product. The modified insulin product of Formula 1202 was used without further purification.

[0418] 20B. Formula 1n where X' is Insulin, m is 2, n is 1, p is 30, q is 4 and R⁸ is CMP

[0419] The product of Formula 1202 obtained in Example 20A was resuspended in 100 μ l of DMF. The polymer product of Formula 1107 obtained in Example 19E (10 mg) was added and the reaction was allowed to stir for 1 hour. After 1 hour, the reaction products were precipitated via the addition of dichloromethane (1.3 ml). The product was filtered and the residual solvent was removed under reduced pressure. The crude product was then resuspended in 500 μ l of PBS, and the low molecular weight components were removed via centrifugal size exclusion chromatography to afford the corresponding isomeric product of Formula 1n. Characterization via liquid chromatography, mass spectroscopy and polyacrylamide gel electrophoresis confirmed the identity of the product. The modified insulin product of Formula 1202 was used without further purification.

[0420] 20C. Other Compounds of Formula 1202

[0421] By following the procedure described in Example 19F and substituting OVA insulin the following:

- Abciximab,
- Adalimumab,
- Agalsidase alfa,
- Agalsidase beta,
- Aldeslakin,
- Alglucosidase alfa,
- Factor VIII,
- Factor IX,
- L-asparaginase,
- Laronidase,
- Octreotide,
- Phenylalanine ammonia-lyase,
- Rasburicase,
- 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),

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- MOG35-55 (SEQ ID NO:16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO:17),
- MART1 (SEQ ID NO:18),
- Tyrosinase (SEQ ID NO:19),
- PMEL (SEQ ID NO:20),
- Aquaporin-4 (SEQ ID NO:21),
- S-arrestin (SEQ ID NO:22),
- IRBP (SEQ ID NO:23),
- Conarachin (UNIPROT Q6PSU6),
- Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24),
- Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25),
- Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26),
- Omega-gliadin (SEQ ID NO:27),
- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- Cat albumin (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT O18873),
- Dog albumin (UNIPROT P49822), and
- RhCE example (UNIPROT P18577),

there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1202 where n is 1:

- X is Abciximab and m is 10,
- X is Adalimumab and m is 11,
- X is Agalsidase alfa and m is 14,
- X is Agalsidase beta and m is 14,
- X is Aldeslukin and m is 6,
- X is Alglucosidase alfa and m is 13,
- X is Factor VIII and m is 100,
- X is Factor IX and m is 18,
- X is L-asparaginase and m is 5,
- X is Laronidase and m is 7,
- X is Octreotide and m is 1,
- X is Phenylalanine ammonia-lyase and m is 12,
- X is Rasburicase and m is 12,
- X is GAD-65 (SEQ ID NO:6) and m is 8,
- X is IGRP (SEQ ID NO:7) and m is 7,
- X is MBP (SEQ ID NO:8) and m is 6,
- X is MOG (SEQ ID NO:9) and m is 5,
- X is PLP (SEQ ID NO:10) and m is 8,
- X is MBP13-32 (SEQ ID NO:11) and m is 1,
- X is MBP83-99 (SEQ ID NO:12) and m is 1,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- X is MBP111-129 (SEQ ID NO:13) and m is 1,
- X is MBP146-170 (SEQ ID NO:14) and m is 2,
- X is MOG1-20 (SEQ ID NO:15) and m is 1,
- X is MOG35-55 (SEQ ID NO:16) and m is 2,
- X is PLP139-154 (SEQ ID NO:17) and m is 3,
- X is MART1 (SEQ ID NO:18) and m is 4,
- X is Tyrosinase (SEQ ID NO:19) and m is 8,
- X is PMEL (SEQ ID NO:20) and m is 5,
- X is Aquaporin-4 (SEQ ID NO:21) and m is 4,
- X is S-arrestin (SEQ ID NO:22) and m is 12,
- X is IRBP (SEQ ID NO:23) and m is 21,
- X is Conarachin and m is 21,
- X is Alpha-gliadin "33-mer" native (SEQ ID NO:24) and m is 1,
- X is Alpha-gliadin "33-mer" deamidated (SEQ ID NO:25) and m is 1,
- X is Alpha-gliadin (SEQ ID NO:26) and m is 1,
- X is Omega-gliadin (SEQ ID NO:27) and m is 1,
- X is Fei d 1 and m is 4,
- X is Cat albumin and m is 16,
- X is Can f 1 and m is 6,
- X is Dog albumin and m is 23, and
- X is RhCE example and m is 10.

[0422] 20D. Other Compounds of Formula 1n

[0423] By following the procedure described in Example B and substituting the compounds of Formula 1202, for example as obtained in Example 20C, there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1m:

- F1n-Abciximab-m₁₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Adalimumab-m₁₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Agalsidase alfa-m₁₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Agalsidase beta-m₁₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Aldeslakin-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alglucosidase alfa-m₁₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Factor VIII-m₁₀₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Factor IX-m₁₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-L-asparaginase-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Laronidase-m₇-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Octreotide-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Phenylalanine ammonia-lyase-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Rasburicase-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-GAD-65-m₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- 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-Tyrosinase-m₈-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PMEL-m₅-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Aquaporin-4-m₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-S-arrestin-m₁₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-IRBP-m₂₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Conarachin-m₂₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alpha-gliadin "33-mer" native-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alpha-gliadin-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Omega-gliadin-m₁-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Fel d 1-m₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Cat albumin-m₁₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Can f 1-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Dog albumin-m₂₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, and
- F1n-RhCE-m₁₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc.

[0424] 20E. Formula 1202 where n is 33 and where X' and m are as in Example 20C

[0425] By following the procedure described in Example 19F, substituting the insulin with the compounds as described in Example 20C and employing the compound of Formula 1201 where n is 33, there are obtained the corresponding compounds of Formula 1202 where n is 33.

[0426] 20F. Other Compounds of Formula 1n

[0427] By following the procedure described in Example 20B and substituting the compound of Formula 1107 with the compounds obtained in Example 19J, and substituting the compound of Formula 1202 with the compounds obtained in Example 20E, there are obtained the following corresponding compounds of Formula 1n:

- F1n-Abciximab-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Adalimumab-m₁₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Agalsidase alfa-m₁₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

- F1n-Agalsidase beta-m₁₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Aldeslakin-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alglucosidase alfa-m₁₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Factor VIII-m₁₀₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Factor IX-m₁₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-L-asparaginase-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Laronidase-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Octreotide-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Phenylalanine ammonia-lyase-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Rasburicase-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-GAD-65-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-IGRP-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MOG-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PLP-m₆-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-Tyrosinase-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PMEL-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Aquaporin-4-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-S-arrestin-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-IRBP-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Conarachin-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alpha-gliadin "33-mer" native-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alpha-gliadin "33-mer" deamidated-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alpha-gliadin-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Omega-gliadin-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Fel d 1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Cat albumin-m₁₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Can f 1-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Dog albumin-m₂₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH, and
- F1n-RhCE-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

[0428] Example 21**[0429] Clearance of OVA-specific antibodies from circulation**

[0430] To induce production of OVA-specific antibodies for subsequent depletion, C57BL/6 mice were injected *i.v.* with up to five doses of 10 µg OVA until a titer of anti-OVA IgG in plasma, as determined by ELISA, reached 3 (Figure 9A). Plasma samples were prepared by centrifugation of blood collected into EDTA-coated tubes at 2000 x *g* for 10 minutes at room temperature and stored at -20°C until analysis. Titer is defined as the log₁₀ of the maximal fold dilution of plasma with detectable anti-OVA IgG. Here, plasma samples were assayed at dilutions of 10-, 50-, 100-, 500-, 1,000-, 5,000-, 10,000-, and 50,000-fold, yielding potential titer measurements of 0, 1, 1.7, 2, 2.7, 3, 3.7, 4, and 4.7. Mice with titers below 3 after five doses of 10 µg OVA were given two additional doses of 10 µg OVA adjuvanted with 10 µg CpG-B to boost anti-OVA IgG production and hence the amount of circulating anti-OVA IgG available for depletion (Figure 9B).

[0431] To evaluate the efficacy of hepatocyte ASGPR-targeted OVA for anti-OVA antibody clearance, mice with circulating anti-OVA IgG were injected *i.v.* with saline or saline containing molar equivalents of DOM and OVA, DOM-OVA, or OVA-DOM. In particular, mice were treated with molar equivalents of 10, 50, 100, or 200 µg OVA, as indicated in Figure 9. At times *t* = -1 day, +3 hours, +1 day, and +7 days, relative to the time of treatment injection, blood samples were collected to assess, by ELISA analysis of plasma, the amount of anti-OVA IgG in circulation. Clearance of anti-OVA IgG from circulation is expected to decrease the amount of anti-OVA IgG in plasma and hence decrease plasma anti-OVA IgG titer as determined by ELISA. In mice immunized with OVA alone and treated with DOM-OVA or OVA-DOM, titers of anti-OVA IgG decreased by up to 3 or 2, respectively, representing decreases in the amount of circulating anti-OVA IgG by 1000- or 100-fold, which is up to 50-fold more effective than control treatment using saline or DOM and OVA (Figure 9A). In mice immunized with OVA adjuvanted with CpG-B, clearance of circulating anti-OVA IgG was not observed (Figure 9B).

[0432] Example 22**[0433] NOD Mouse**

[0434] Non-obese diabetic (NOD) mice are susceptible to the spontaneous onset of autoimmune diabetes mellitus, which is the result of an autoimmune response to various pancreatic auto-antigens. Diabetes develops in NOD mice as a result of insulinitis, characterized by the infiltration of various leukocytes into the pancreatic islets.

[0435] In order to evaluate the efficacy of a treatment for diabetes mellitus, starting at 6-weeks of age, NOD mice are divided into control or test groups and treated, respectively, with weekly intravenous injections of a test composition (10 µg) or an inactive control such as saline. The injections continue for 18 consecutive weeks.

[0436] The blood glucose concentration of the mice is measured weekly. Mice that maintain a blood glucose concentration of less than 300 mg/ml during the experiment are considered non-diabetic. In addition, at the end of the study the pancreases of the mice are harvested and T cell infiltration in the pancreas is determined via immunohistochemistry as an assessment of insulinitis. Tolerance induction

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

is assessed by the depletion of auto-antigen specific CD8 T cells as compared to mice that are treated with saline and develop diabetes. The existence of auto-antigen specific CD8 T cells is determined via ELISpot assay.

[0437] When tested as described above, compositions of Formulae 1 and 2 where X is insulin, such as F1m-insulin-m2-n1-p30-q4-2NAcGAL, show efficacy for treating diabetes mellitus.

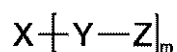
[0438] While the present disclosure has been described with reference to the specific embodiments thereof, it should be understood by those skilled in the art that various changes can be made and equivalents can be substituted without departing from the true spirit and scope of the disclosure. In addition, many modifications can be made to adapt a particular situation, material, composition of matter, process, process step or steps, to the objective, spirit and scope of the present disclosure. All such modifications are intended to be within the scope of the claims appended hereto. All patents and publications cited above are hereby incorporated by reference.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

We claim:

1. A composition comprising a compound of Formula 1:



Formula 1

where:

m is an integer from about 1 to 100;

X comprises an antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof; or

X comprises an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy;

Y comprises a linker moiety; and

Z comprises a liver-targeting moiety.

2. The composition of claim 1 where Z comprises galactose, galactosamine or N-acetylgalactosamine.

3. The composition of claim 2 comprising Z conjugated at its C1, C2 or C6 to Y.

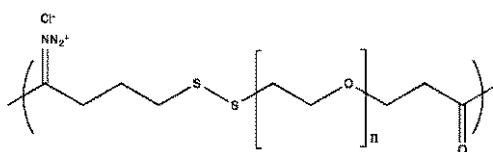
4. The composition of claim 1 where Y is selected from N-hydroxysuccinamidyl linkers, malaemide linkers, vinylsulfone linkers, pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol) linkers, pyridyl di-thiol linkers, n-nitrophenyl carbonate linkers, NHS-ester linkers, and nitrophenoxy poly(ethylene glycol)ester linkers.

5. The composition of claim 1 where Y comprises:

an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X;

a disulfanyl ethyl ester;

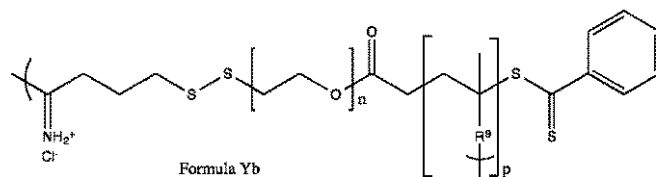
a structure represented by one of Formulae Ya to Yp:



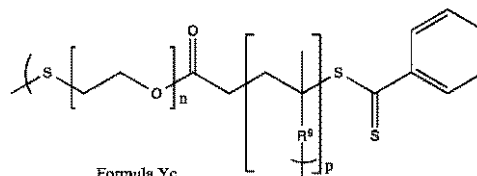
Formula Ya

WO 2015/140648

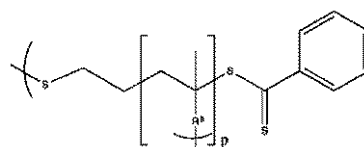
PCT/IB2015/001145



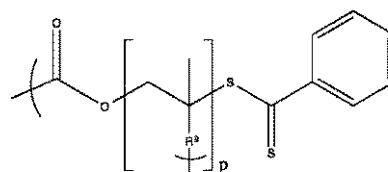
Formula Yb



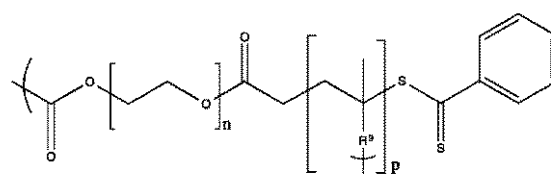
Formula Yc



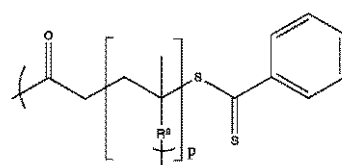
Formula Yd



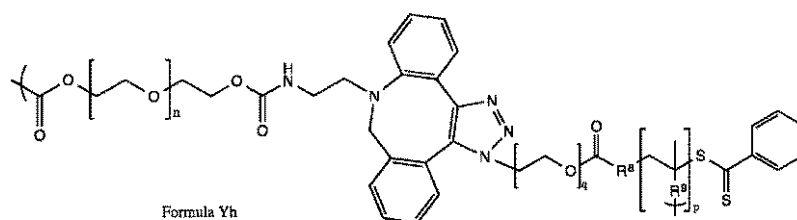
Formula Ye



Formula Yf



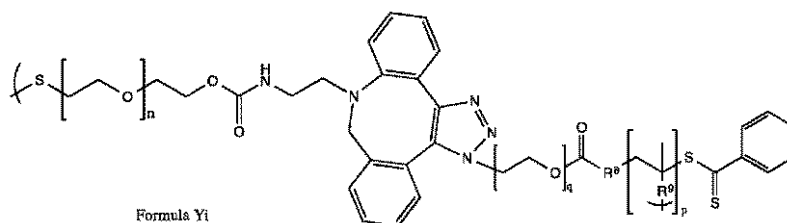
Formula Yg



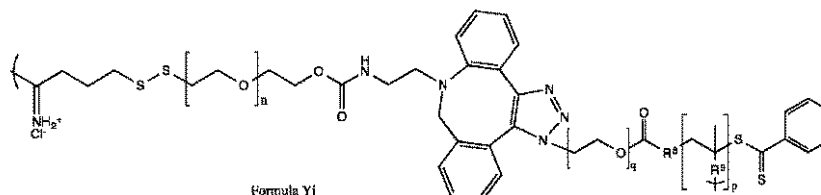
Formula Yh

WO 2015/140648

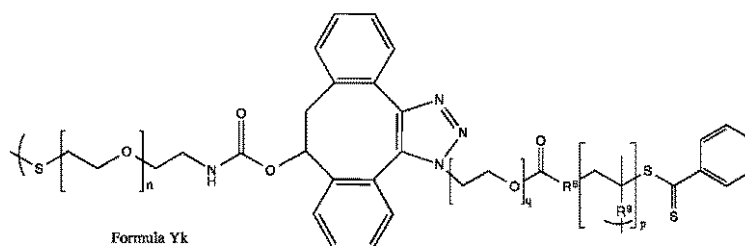
PCT/IB2015/001145



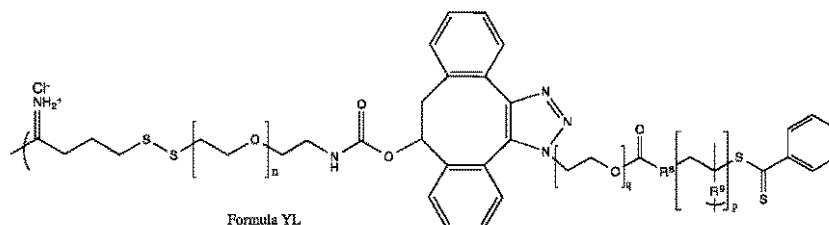
Formula Yi



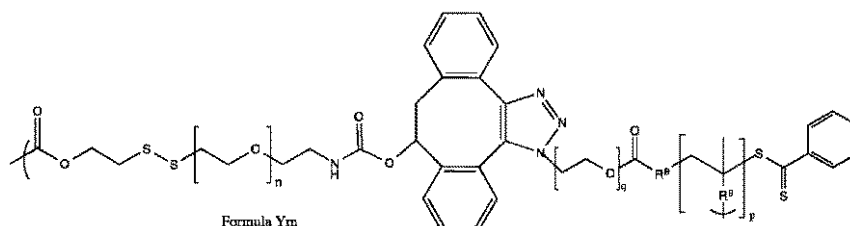
Formula Yj



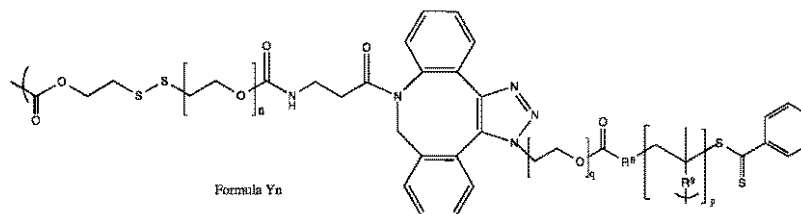
Formula Yk



Formula YL



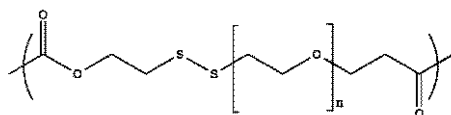
Formula Ym



Formula Yn

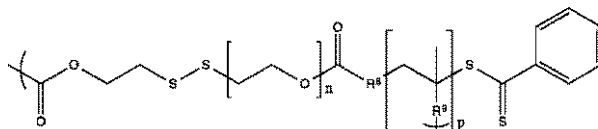
WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145



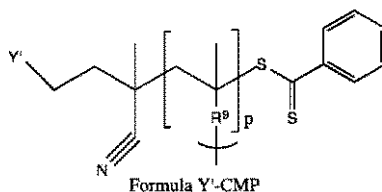
Formula Yo

and



Formula Yp

or has a portion represented by Formula Y'-CMP:



Formula Y'-CMP

where:

- the left bracket "(" indicates the bond between X and Y;
- the right or bottom bracket and ")" indicates the bond between Y and Z;
- n is an integer from about 1 to 100;
- p is an integer from about 2 to 150;
- q is an integer from about 1 to 44;
- R⁸ is -CH₂- or -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-;
- R⁹ is a direct bond or -CH₂-CH₂-NH-C(O)-; and
- Y' represents the remaining portion of Y.

6. The composition of claim 5 where:
 - n is about 40 to 80;
 - p is about 10 to 100;
 - q is about 3 to 20;
 - R⁸ is -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-; and
 - when R⁹ is -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, Z is galactose or N-acetylgalactosamine conjugated at its C1.
7. The composition of claim 5 where Y comprises Formula Ya, Formula Yb, Formula Yh, Formula Yi, Formula Yk, Formula Ym or Formula Yn.
8. The composition of claim 5 where Y comprises Formula Ya, Formula Yb, Formula Ym or Formula Yn.

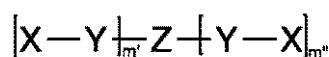
WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

9. The composition of claim 6 where Y comprises Formula Ya, Formula Yb, Formula Ym or Formula Yn.

10. The composition of claim 1 wherein X comprises:
 a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response;
 a foreign food, animal, plant or environmental antigen against which patients develop an unwanted immune response;
 a foreign therapeutic agent against which patients develop an unwanted immune response; or
 a synthetic self-antigen against the endogenous version of which patients develop an unwanted immune response,
 or a tolerogenic portion thereof.

11. A composition comprising a compound of Formula 2:



Formula 2

where:

m' is zero or an integer from about 1 to 10, m'' is zero or an integer from about 1 to 10, and the sum of m' + m'' is an integer from about 1 to 10 but is at least 1;

each X comprises a foreign antigen or self-antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof;

each Y comprises a linker moiety or a direct bond, or an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X; and

Z comprises a liver-targeting moiety,

provided that X is not interferon, Ribavirin, Nexavar/ Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab or Herceptin/trastuzumab when m'+m'' equals 1 and Z is DOM 26h-196-61.

12. The composition of claim 11 where Z comprises an ASGPR-targeted antibody, an ASGPR-targeted antibody fragment, an ASGPR-targeted peptide, an ASGPR-targeted scFv, or another ASGPR ligand.

13. The composition of claim 11 where X comprises a group of related antigens against which a patient develops an unwanted immune response or a group of tolerogenic fragments thereof.

14. The composition of claim 13 where X is selected from the groups comprising:
 two or more of insulin, proinsulin, preproinsulin, glutamic acid decarboxylase-65 GAD-67, glucose-6 phosphatase 2, insulinoma-associated protein 2, insulinoma-associated protein 2β, ICA69, ICA12, carboxypeptidase H, Imogen 38, GLIMA 38, chromogranin-A, HSP-60, caboxypeptidase E, peripherin, glucose transporter 2, hepatocarcinoma-

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

intestine-pancreas/pancreatic associated protein, S100 β , glial fibrillary acidic protein, regenerating gene II, pancreatic duodenal homeobox 1, dystrophin myotonic kinase, islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, and SST G-protein coupled receptors 1-5;

two or more of myelin basic protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein, myelin proteolipid protein, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, and SEQ ID NO:17; and

two or more of SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:27.

15. The composition of claim 11 where Y is a linker having an immunoproteasome cleavage site.
16. The compositions of claim 11 where X comprises:
 - a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response;
 - a foreign food, animal, plant or environmental antigen against which patients develop an unwanted immune response;
 - a foreign therapeutic agent against which patients develop an unwanted immune response; or
 - a synthetic self-antigen against the endogenous version of which patients develop an unwanted immune response,
 or a tolerogenic portion thereof.
17. A method of treatment for an unwanted immune response against an antigen by administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a composition comprising a compound of Formula 1:



Formula 1

where:

- m is an integer from about 1 to 100;
- X comprises an antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof; or
- X comprises an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds a circulating protein or peptide or antibody, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy;
- Y comprises a linker moiety; and
- Z comprises a liver-targeting moiety.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

18. The method of claim 17 where:

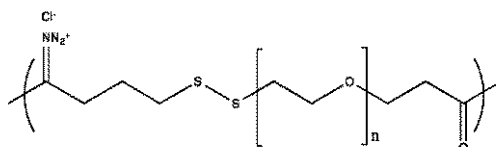
X comprises an antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof; and

Y comprises:

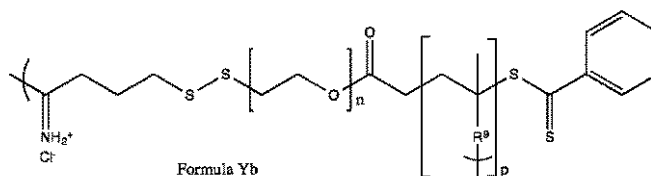
an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X;

a disulfanyl ethyl ester;

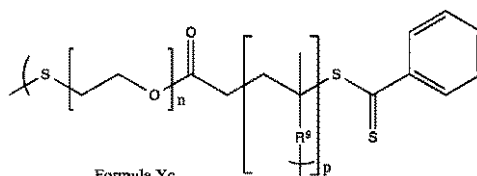
a structure represented by one of Formulae Ya to Yp:



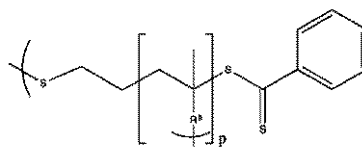
Formula Ya



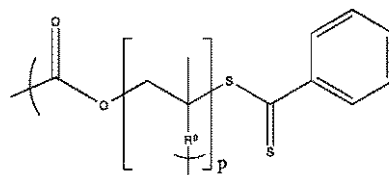
Formula Yb



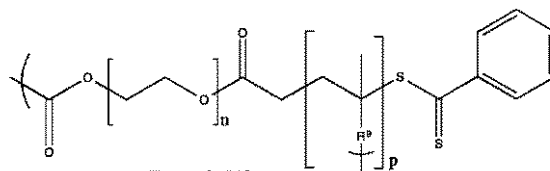
Formula Yc



Formula Yd



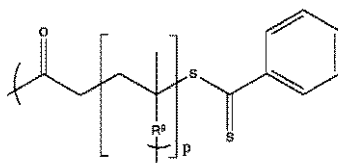
Formula Ye



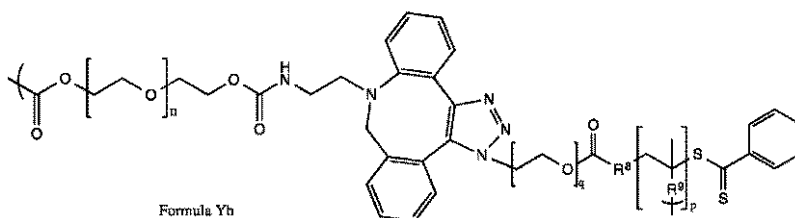
Formula Yf

WO 2015/140648

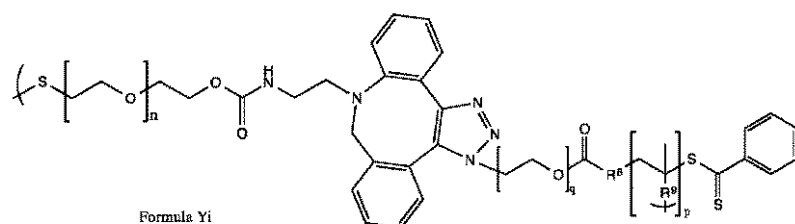
PCT/IB2015/001145



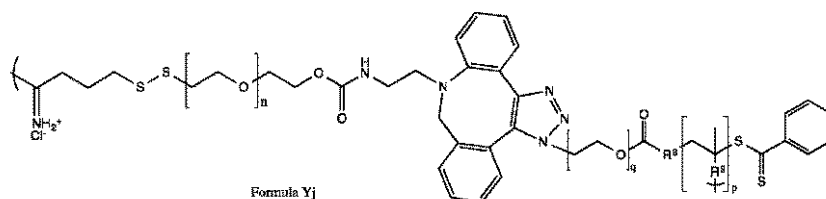
Formula Yg



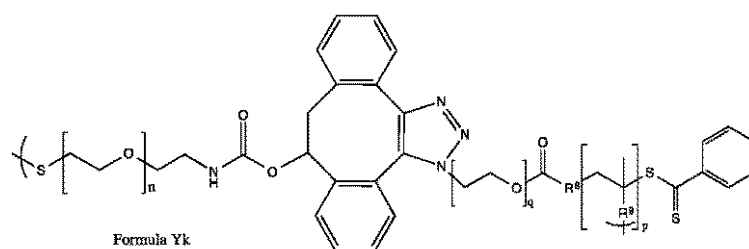
Formula Yh



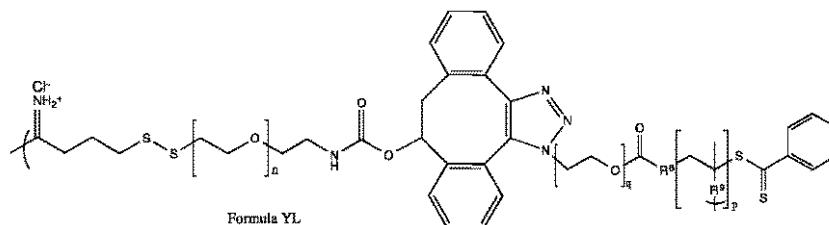
Formula Yi



Formula Yj



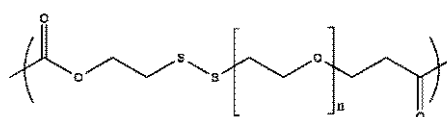
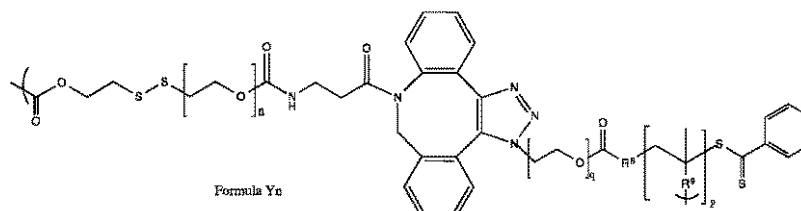
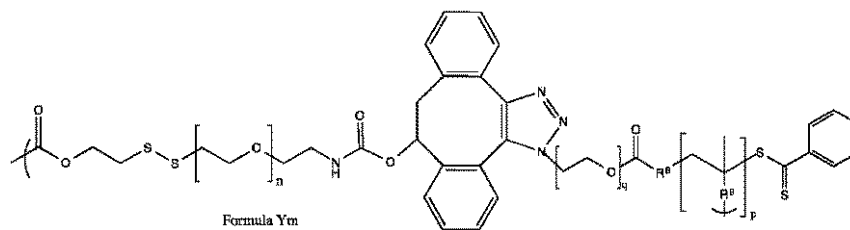
Formula Yk



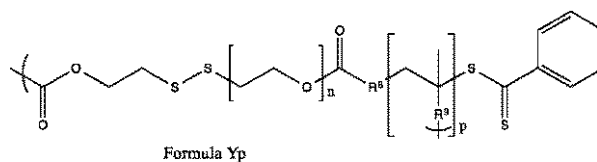
Formula YL

WO 2015/140648

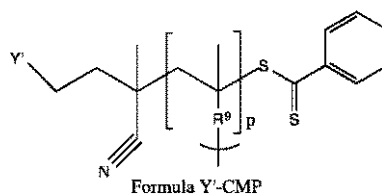
PCT/IB2015/001145



and



or has a portion represented by Formula Y'-CMP:



where:

the left bracket "(" indicates the bond between X and Y;

the right or bottom bracket and ")" indicates the bond between Y and Z;

n is an integer from about 1 to 100;

p is an integer from about 2 to 150;

q is an integer from about 1 to 44;

R⁶ is -CH₂- or -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-;R⁹ is a direct bond or -CH₂-CH₂-NH-C(O)-; and

Y' represents the remaining portion of Y.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

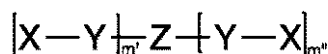
19. The method of claim 17 wherein X comprises the antibody, antibody fragment or ligand, and the composition is administered for clearance of a circulating protein or peptide or antibody that specifically binds to X, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy.

20. The method of claim 17 wherein X comprises the antibody, antibody fragment or ligand, and the composition is administered in an amount effective to reduce a concentration of the antibodies that are causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy in blood of the patient by at least 50% w/w, as measured at a time between about 12 to about 48 hours after the administration.

21. The method of claim 17 wherein the composition is administered for tolerization of the patient with respect to antigen moiety X.

22. The method of claim 17 where X comprises:
 a foreign transplant antigen against which transplant recipients develop an unwanted immune response;
 a foreign food, animal, plant or environmental antigen against which patients develop an unwanted immune response;
 a foreign therapeutic agent against which patients develop an unwanted immune response; or
 a synthetic self-antigen against the endogenous version of which patients develop an unwanted immune response,
 or a tolerogenic portion thereof.

23. A method of treatment for an unwanted immune response against an antigen by administering to a mammal in need of such treatment an effective amount of a composition comprising Formula 2:



Formula 2

where:

m' is zero or an integer from about 1 to 10, m'' is zero or an integer from about 1 to 10, and the sum of $m' + m''$ is an integer from about 1 to 10 but is at least 1;

each X is an antigen moiety;

each Y is a linker moiety or a direct bond, or an antibody, antibody fragment, peptide or other ligand that specifically binds X; and

Z is a liver-targeting moiety,

provided that X is not interferon, Ribavirin, Nexavar/ Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab or Herceptin/trastuzumab when $m'+m''$ equals 1 and Z is DOM 26h-196-61.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

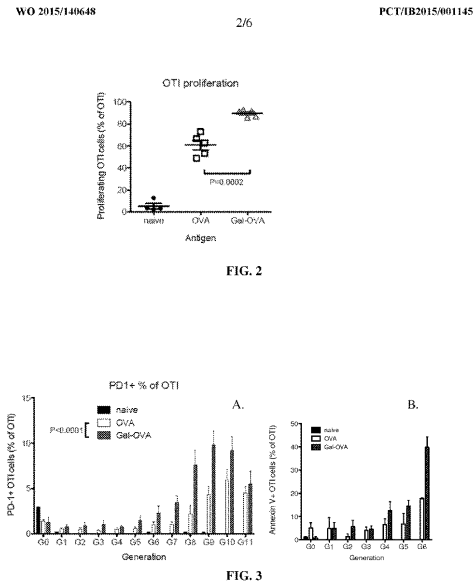
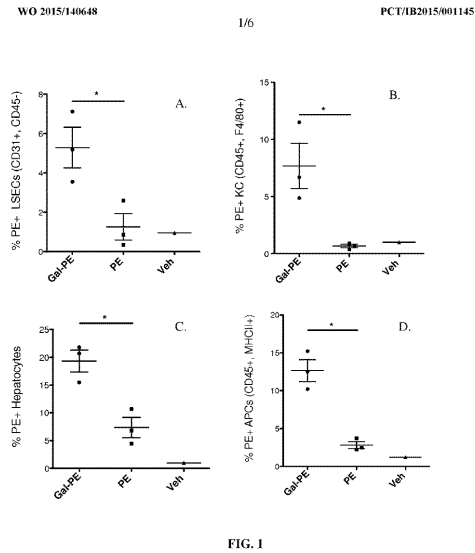
24. The method of claim 23 wherein the composition is administered for clearance of a circulating protein or peptide or antibody that specifically binds to antigen moiety X, which circulating protein or peptide or antibody is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy.
25. The method of claim 23 wherein the composition is administered in an amount effective to reduce a concentration of the antibodies that are causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy in blood of the patient by at least 50% w/w, as measured at a time between about 12 to about 48 hours after the administration.
26. The method of claim 23 wherein the composition is administered for tolerization of the patient with respect to antigen moiety X.
27. The method of claim 23 where Z comprises an ASGPR-targeted antibody, an ASGPR-targeted antibody fragment, an ASGPR-targeted peptide, an ASGPR-targeted scFv, or another ASGPR ligand.
28. The method of claim 23 where X comprises a group of related antigens against which a patient develops an unwanted immune response or a group of tolerogenic fragments thereof.
29. The method of claim 23 where X is selected from the groups comprising:
two or more of insulin, proinsulin, preproinsulin, glutamic acid decarboxylase-65 GAD-67, glucose-6 phosphatase 2, insulinoma-associated protein 2, insulinoma-associated protein 2 β , ICA69, ICA12, carboxypeptidase H, Imogen 38, GLIMA 38, chromogranin-A, HSP-60, caboxypeptidase E, peripherin, glucose transporter 2, hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein, S100 β , glial fibrillary acidic protein, regenerating gene II, pancreatic duodenal homeobox 1, dystrophin myotonia kinase, islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, and SST G-protein coupled receptors 1-5;
two or more of myelin basic protein, myelin oligodendrocyte glycoprotein, myelin proteolipid protein, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, and SEQ ID NO:17; and
two or more of SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:27.
30. A use of the composition of any of claims 1-10 or 11-16 to treat an unwanted immune response.

WO 2015/140648

PCT/IB2015/001145

31. A use of the composition of any of claims 1-10:
for tolerization of a patient with respect to X, wherein X comprises an antigen against which a patient develops an unwanted immune response, or a tolerogenic portion thereof, or
for clearance of a circulating protein or peptide or antibody that is causatively involved in transplant rejection, immune response against a therapeutic agent, autoimmune disease, hypersensitivity and/or allergy, wherein X comprises an antibody, antibody fragment or ligand that specifically binds the circulating protein or peptide or antibody.
32. A use of the composition of any of claims 11-16 wherein the composition is administered for tolerization of a patient with respect to antigen moiety X.

(57) **Abstract:** Glycotargeting therapeutics are useful in the treatment of transplant rejection, autoimmune disease, food allergy, and immune response against a therapeutic agent.



WO 2015/140648 3/6 PCT/IB2015/001145

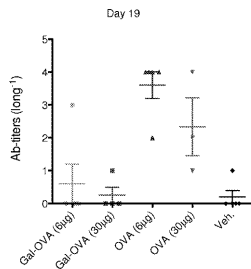


FIG. 4

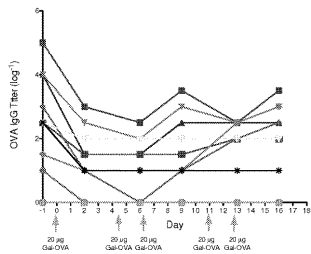


FIG. 5

WO 2015/140648 4/6 PCT/IB2015/001145

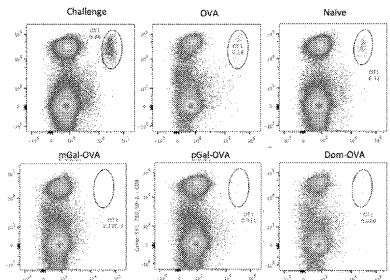


FIG. 6

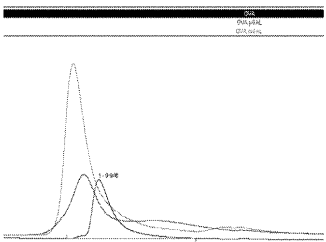


FIG. 7A

WO 2015/140648 5/6 PCT/IB2015/001145

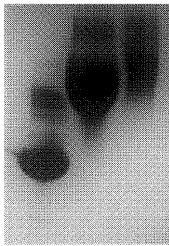


FIG. 7B

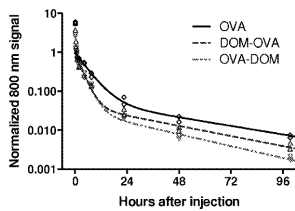


FIG. 8

WO 2015/140648 6/6 PCT/IB2015/001145

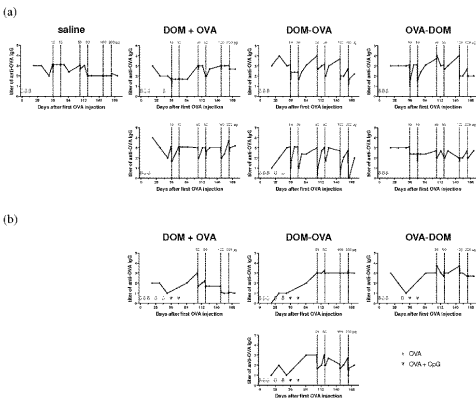


FIG. 9

【配列表】
2020121981000002.app