(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월15일
(11) 등록번호 10-2717969
(24) 등록일자 2024년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
A61P 37/02 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/001 (2013.01)
A61K 47/549 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2022-7042927(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년02월20일
심사청구일자 2023년01월04일
(85) 번역문제출일자 2022년12월07일
(65) 공개번호 10-2023-0003288
(43) 공개일자 2023년01월05일
(62) 원출원 특허 10-2016-7025912
원출원일자(국제) 2015년02월20일
심사청구일자 2020년02월19일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/001145
(87) 국제공개번호 WO 2015/140648
국제공개일자 2015년09월24일
(30) 우선권주장
61/942,942 2014년02월21일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2011086143 A2*
WO2013121296 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
에꼴 뽈리떼끄닉 뻬데랄 드 로잔느 (으뻬에프엘)
스위스 체하-1015 로잔느, 으베에프엘 이노베이션 파크 제이, 으베에프엘-티티오
아노키옹 에스아
스위스 에퀴블렌 쎄아쉐-1024, 쉠므 드라 다 오쉐 1아, 앙 루쇼, 으베에페엘르 이노바시옹 파흐
(72) 발명자
우벨, 제프레 아.
스위스, 체하-1015 로잔느, 으베에프엘 이노베이션 파크 제이
콘또스, 스테판느
스위스, 체하-1015 로잔느, 으베에프엘 이노베이션 파크 제이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김애라

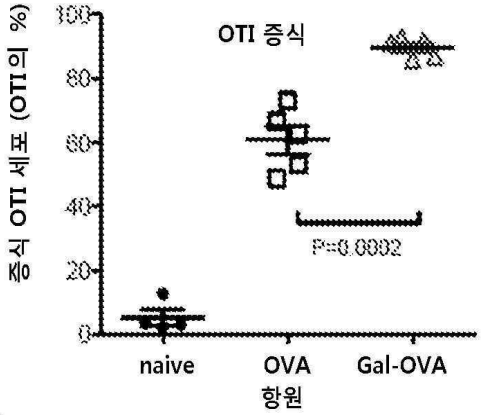
전체 청구항 수 : 총 38 항 심사관 : 곽희찬

(54) 발명의 명칭 **글리코타겟팅 치료제**

(57) 요 약

본 발명은 이식거부, 자가면역질환, 식품 알러지, 및 치료제에 대한 면역반응의 치료에 유용한 글리코타겟팅 치료제에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 47/555 (2017.08)
A61P 37/02 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
A61P 37/08 (2018.01)
A61K 2039/577 (2013.01)
A61K 2039/60 (2013.01)
A61K 2039/627 (2013.01)
(72) 발명자
로렌츠, 크리스틴 마리에
스위스, 체하-1015 로잔느, 으뻬에프엘 이노베이션 파크 제이
윌슨, 데이비드 스콧
스위스, 체하-1015 로잔느, 으뻬에프엘 이노베이션 파크 제이
가이, 슈닝
스위스, 체하-1015 로잔느, 으뻬에프엘 이노베이션 파크 제이

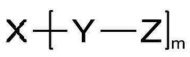
명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 1의 화합물을 포함하는, 항원 특이적 면역 내성의 유도를 위한 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에서,

M은 1 내지 100의 정수이고,

X는 원치 않는 면역 반응을 유도하는 항원 또는 이의 면역관용성 부분을 포함하고, 상기 X는 음식, 동물, 식물 또는 환경적 항원; 자가 항원; 치료제; 또는 이식 항원을 포함하고,

Y는 일단 세포의 내부로 들어가면 그 최초의 형태에서 항원 또는 이의 면역관용성 부분을 절단하여 방출하도록 하는, 다이설파닐 에틸 에스테르 또는 다이설파이드 결합의 설파이드를 포함하고,

Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸 갈락토사민을 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서, Z는 N-아세틸 갈락토사민을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, Z를 포함하되 상기 Z는 이의 C1, C2 또는 C6에서 Y에 접합되는 것인, 조성물.

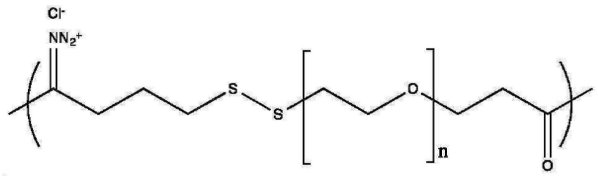
청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, Y는 N-하이드록시석신아미딜(N-hydroxysuccinamidyl) 링커, 말레이미드(malaemide) 링커, 비닐설폰(vinylsulfone) 링커, 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)(pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)) 링커, 피리딜 다이-티올(pyridyl di-thiol) 링커, n-니트로페닐 카보네이트(n-nitrophenyl carbonate) 링커, NHS-에스테르(NHS-ester) 링커, 또는 니트로페녹시 폴리(에틸렌 글리콜)에스테르(nitrophenoxy poly(ethylene glycol)ester) 링커를 사용하여 제조되는 것인, 조성물.

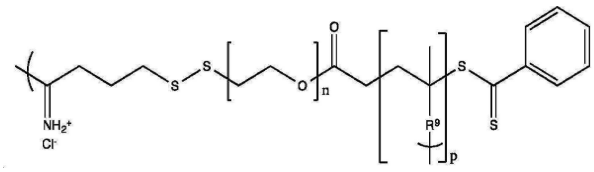
청구항 5

제1항에 있어서, Y는 화학식 Ya 내지 Yp 중 어느 하나로 표시되는 구조를 포함하거나, 또는 화학식 Y'-CMP로 표시되는 부분을 갖는 것인, 조성물:

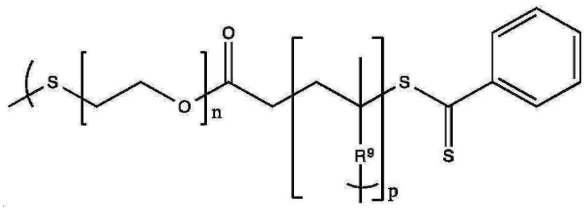
화학식 Ya



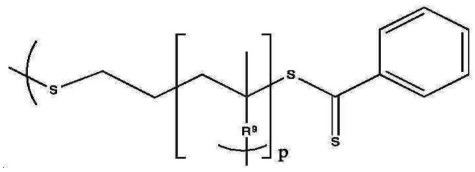
화학식 Yb



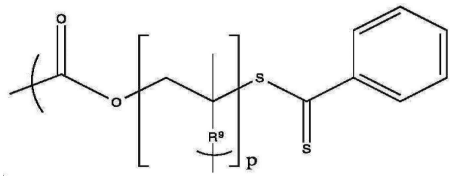
화학식 Yc



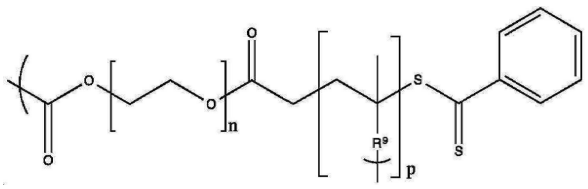
화학식 Yd



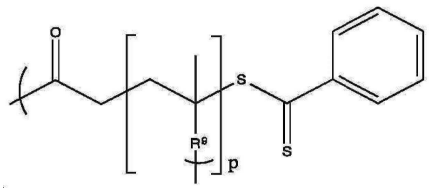
화학식 Ye



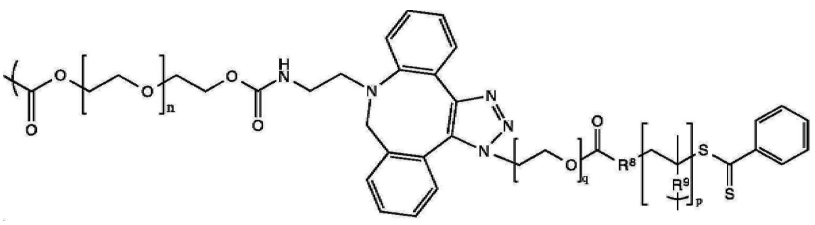
화학식 Yf



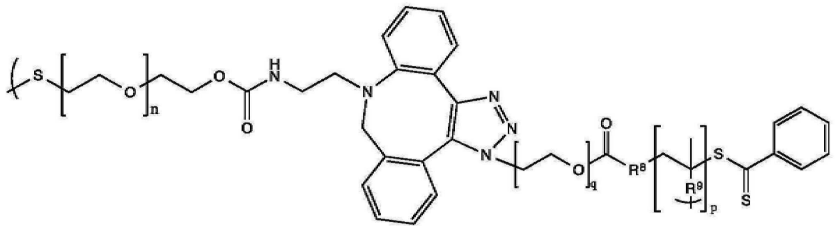
화학식 Yg



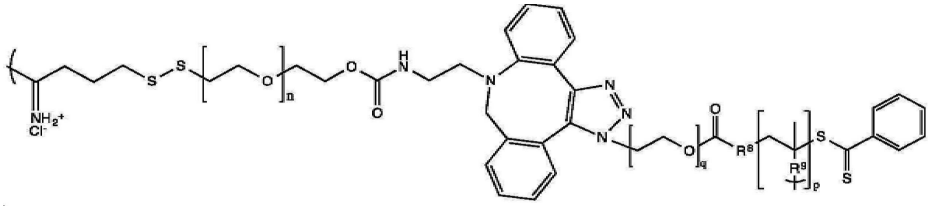
화학식 Yh



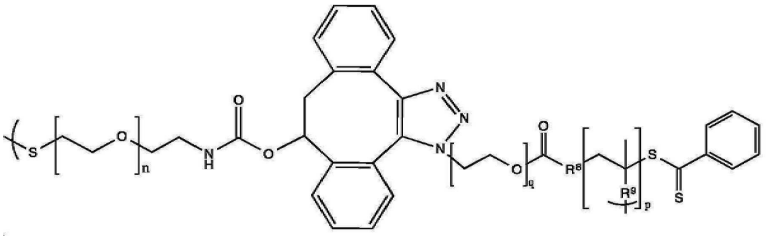
화학식 Yi



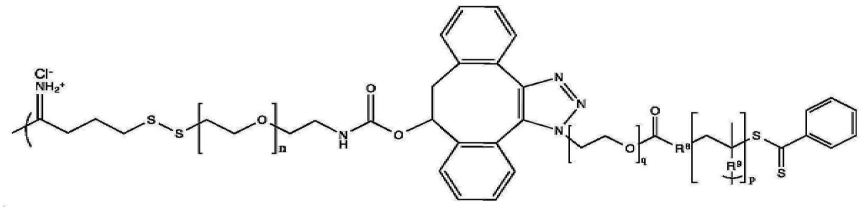
화학식 Yj



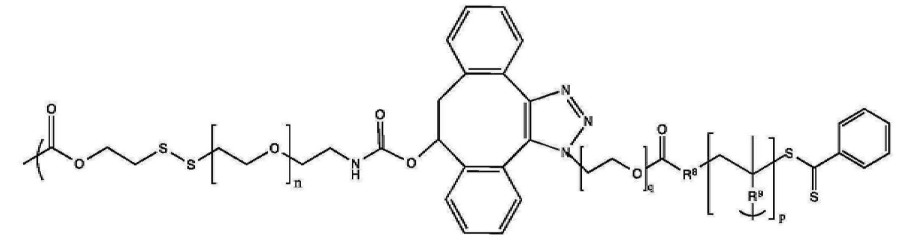
화학식 Yk



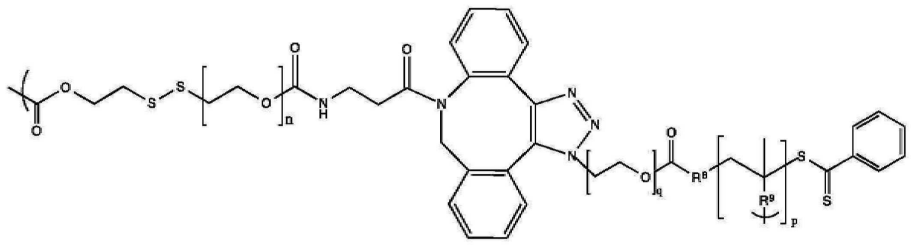
화학식 YL



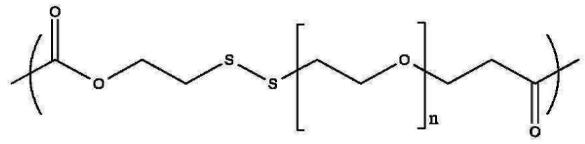
화학식 Ym



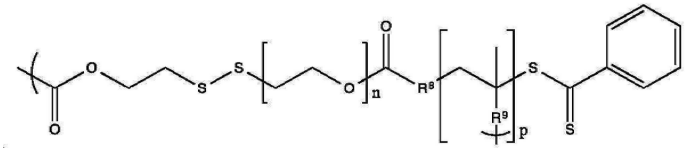
화학식 Yn



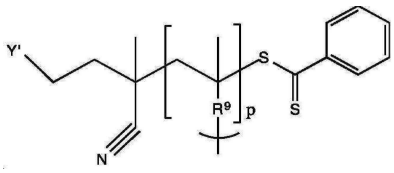
화학식 Yo



화학식 Yp



화학식 Y'-CMP



상기 화학식에서,

좌측 괄호 "("는 X와 Y 사이의 결합을 나타내고;

우측 또는 하측 괄호 ")"는 Y와 Z 사이의 결합을 나타내고;

n은 1 내지 100의 정수이고;

p는 2 내지 150의 정수이고;

q는 1 내지 44의 정수이고;

R^8은 $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고;

R^9는 직접결합 또는 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$이고;

Y'는 Y의 나머지 부분을 나타낸다.

청구항 6

제5항에 있어서,

n은 40 내지 80이고;

p는 10 내지 100이고;

q는 3 내지 20이고;

R^8은 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고;

R^9가 -C(O)-NH-CH2-CH2-인 경우, Z는 C1에서 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸 갈락토사민인 것인, 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Yc, 화학식 Yh, 화학식 Yi, 화학식 Yk, 화학식 Ym, 또는 화학식 Yn을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서,

Y는 화학식 Yc 또는 화학식 Ym을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

X는 식품 항원을 포함하고,

상기 식품 항원은 코나라킨(Ara h 1), 알레르겐 II (Ara h 2), 아라키스 아글루티닌, 콘글루틴(Ara h 6), 31 kda 주요 알레르겐/질병 저항성 단백질상 호모로그(Mal d 2), 지질 트랜스퍼 단백질 전구체(Mal d 3), 주요 알레르겐 Mal d 1.03D(Mal d 1), a-락트알부민(ALA), 락토트랜스페린, 악티니딘(Act c 1, Act d 1), 피토시스타틴, 타우마틴-유사 단백질(Act d 2), 키웰린(Act d 5), 오보뮤코이드, 오브알부민, 오보트랜스페린, 라이소자임, 리베틴, 아포비틸린, 보스베틴, 2S 알부민(Sin a 1), 11S 글로불린(Sin a 2), 지질 트랜스퍼 단백질(Sin a 3), 프로필린(Sin a 4), 프로필린(Api g 4), 고분자량 당단백질(Api g 5), 펜 a 1 알레르겐(Pen a 1), 알레르겐 펜 m 2(Pen m 2), 트로포미오신 패스트 이소폼, 고분자량 글루테닌, 저분자량 글루테닌, 알파-글리아딘, 감마-글리아딘, 오메가-글리아딘, 호르데인, 세칼린, 아베닌, 주요 딸기 알러지 Fra a 1-E(Fra a 1) 및 프로필린(Mus xp 1)으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 식품 항원은 고분자량 글루테닌, 저분자량 글루테닌, 알파-글리아딘, 감마-글리아딘, 오메가-글리아딘, 호르데인, 세칼린 및 아베닌으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

X는 자가 항원을 포함하고,

상기 자가 항원은 인슐린, 프로인슐린, 프리프로인슐린, 글루탐산 디카르복실라제-65(GAD-65), GAD-67, 인슐리노마-연관 단백질 2(IA-2), 인슐리노마-연관 단백질 2ββICA69, ICA12(SOX-13), 카르복시 펩티다제 H, 이모젠 38, GLIMA 38, 크로모그라닌-A, HSP-60, 카르복시 펩티다제 E, 페리페린, 글루코스 트랜스포터 2, 간암-장-췌장/췌장 관련 단백질, S100β아교세포섬유산성단백질, 재생유전자 II, 췌장 십이지장 호메오박스 1, 근 긴장성 이영양증 키나제, 섬-특이성 글루코스-6-포스파타제 촉매성 서브유닛-관련 단백질, 및 SST G-단백질 결합된 수용체 1-5에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

X는 자가 항원을 포함하고,

상기 자가 항원은 수초 염기성 단백질, 수초 희소돌기 아교세포 당단백질, 및 단백질지질 단백질에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서,

X는 치료제를 포함하고,

상기 치료제는 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인플리시맙(Infliximab), L-아스파라지나제(L-asparaginase), 라로니다제(Laronidase), 나탈리주맙(Natalizumab), 옥트레오타이드(Octreotide), 페닐알라닌 암모니아-리아제

(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 및 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase))에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,

X는 이식 항원을 포함하고,

상기 이식 항원은 MHC 클래스 I, MHC 클래스 II 단상형(haplotype) 단백질의 서브유닛, 및 RhCE, Kell, Kidd, Duffy 및 Ss의 마이너 블러드 그룹 항원에서 선택되는 것인, 조성물.

청구항 15

화학식 1의 화합물을 포함하는, 포유동물에서 원치 않는 면역 반응을 치료하기 위한 약제:

[화학식 1]

$$X+Y-Z]_m$$

화학식 1에서,

M은 1 내지 100의 정수이고,

X는 원치 않는 면역 반응을 유도하는 항원 또는 이의 면역관용성 부분을 포함하고,

상기 X는 환자가 원치 않는 면역 반응을 나타내는 식품, 식물 또는 환경적 항원; 환자가 그 내인성 버전(endogenous version)에 대해 원치 않는 면역 반응을 나타내는 자가 항원; 환자가 원치 않는 면역 반응을 나타내는 치료제; 또는 이식 환자가 원치 않는 면역 반응을 나타내는 이식 항원을 포함하고,

Y는 일단 세포의 내부로 들어가면 그 최초의 형태에서 항원 또는 이의 면역관용성 부분을 절단하여 방출하도록 하는, 다이설파닐 에틸 에스테르 또는 다이설파이드 결합의 설파이드를 포함하고,

Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸 갈락토사민을 포함한다.

청구항 16

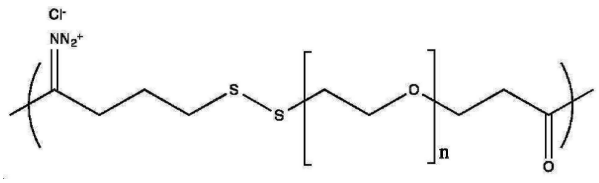
제15항에 있어서, 셀리악 병 또는 다른 식품 알러지, 제1형 당뇨병, 다발성 경화증, 혈우병, 치료제에 대한 알러지 반응, 또는 이식 조직 거부반응의 치료를 위한, 약제.

청구항 17

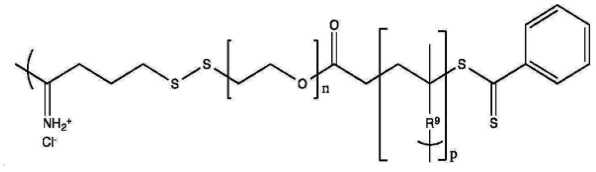
제15항 또는 제16항에 있어서,

Y는 화학식 Ya 내지 Yp 중 어느 하나로 표시되는 구조를 포함하거나, 또는 화학식 Y'-CMP로 표시되는 부분을 갖는 것인, 약제:

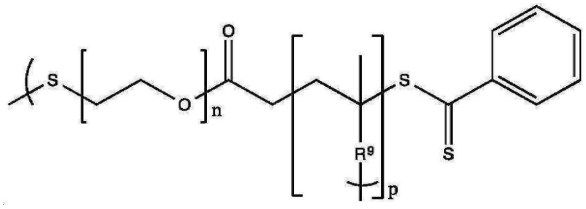
화학식 Ya



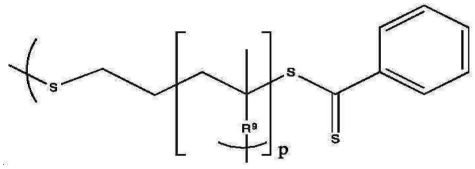
화학식 Yb



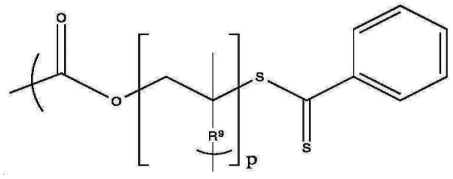
화학식 Yc



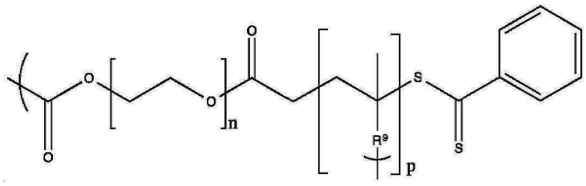
화학식 Yd



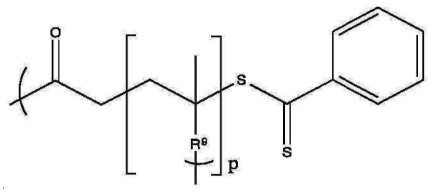
화학식 Ye



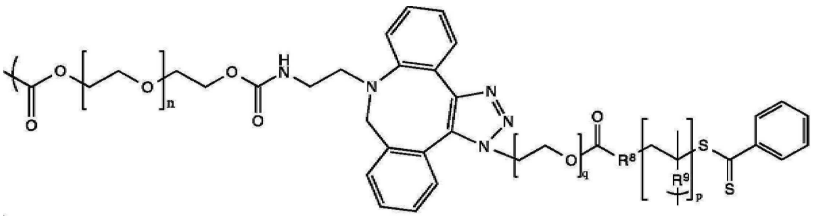
화학식 Yf



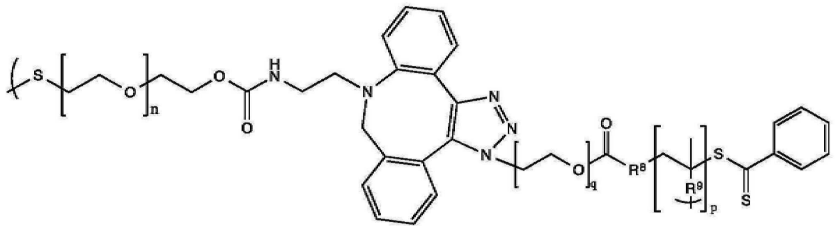
화학식 Yg



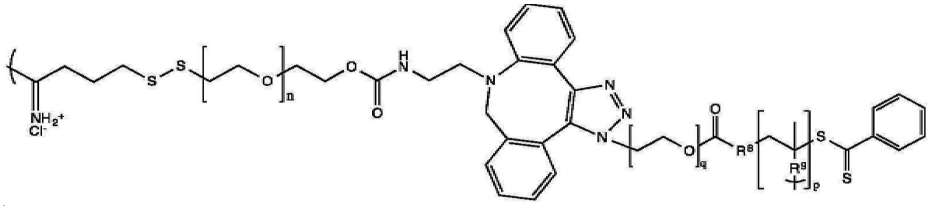
화학식 Yh



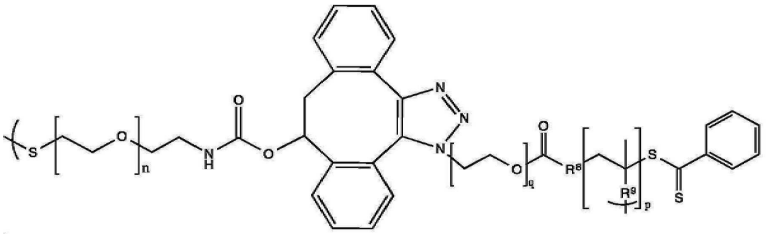
화학식 Yi



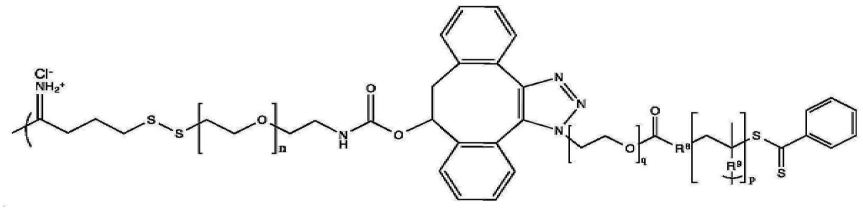
화학식 Yj



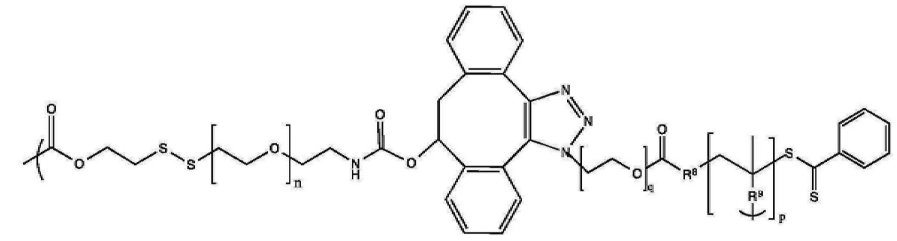
화학식 Yk



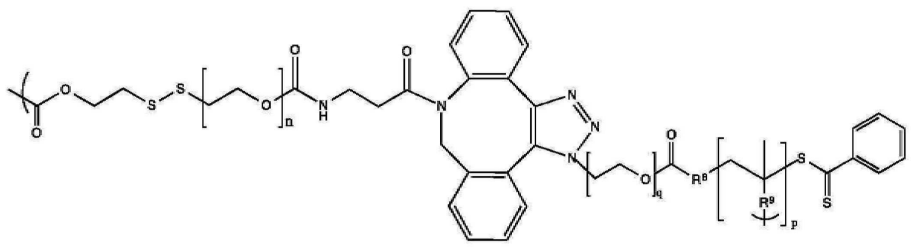
화학식 YL



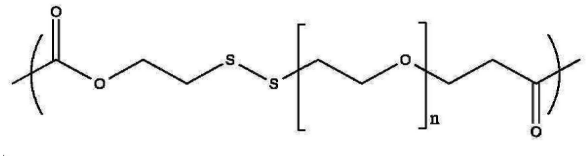
화학식 Ym



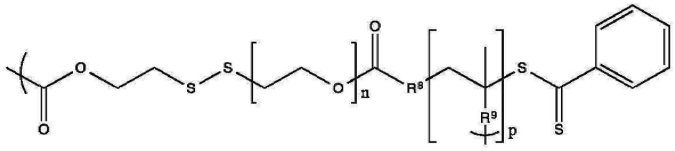
화학식 Yn



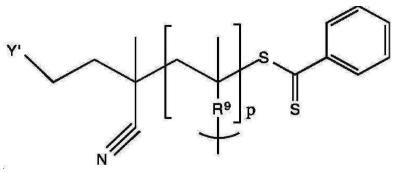
화학식 Yo



화학식 Yp



화학식 Y'-CMP



상기 화학식에서,

좌측 괄호 "("는 X와 Y 사이의 결합을 나타내고;

우측 또는 하측 괄호 ")"는 Y와 Z 사이의 결합을 나타내고;

n은 1 내지 100의 정수이고;

p는 2 내지 150의 정수이고;

q는 1 내지 44의 정수이고;

R^8은 $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고;

R^9는 직접결합 또는 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$이고;

Y'는 Y의 나머지 부분을 나타낸다.

청구항 18

제15항 또는 제16항에 있어서,

항원 모이어티 X에 관한 관용화를 위한 투여에 적합한 것인, 약제.

청구항 19

제15항 또는 제16항에 있어서,

X가 이식 환자가 원치 않는 면역 반응을 나타내는 이식 항원; 환자가 원치 않는 면역 반응을 나타내는 식품, 동물, 식물 또는 환경적 항원; 환자가 원치 않는 면역 반응을 나타내는 치료제; 환자가 그 내인성 버전(endogenous version)에 대해 원치 않는 면역 반응을 나타내는 합성 자가 항원; 또는 이의 면역관용성 부분을 포함하는 것인, 약제.

청구항 20

화학식 1의 화합물을 포함하는, 항원 특이적 면역 내성의 유도를 위한 조성물:

[화학식 1]

$$X+Y-Z]_m$$

화학식 1에서,

M은 1 내지 100의 정수이고,

X는 원치 않는 면역 반응을 유도하는 항원 또는 이의 면역관용성 부분을 포함하고,

Y는 일단 세포의 내부로 들어가면 그 최초의 형태에서 항원 또는 이의 면역관용성 부분을 절단하여 방출하도록 하는, 다이설파닐 에틸 에스테르 또는 다이설파이드 결합의 설파이드를 포함하고,

Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸 갈락토사민을 포함한다.

청구항 21

제20항에 있어서,

Z는 N-아세틸 갈락토사민을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서,

Z를 포함하되 상기 Z는 이의 C1, C2 또는 C6에서 Y에 접합되는 것인, 조성물.

청구항 23

제20항 또는 제21항에 있어서,

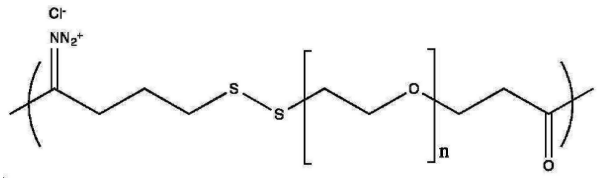
Y는 N-하이드록시석신아미딜(N-hydroxysuccinamidyl) 링커, 말레이미드(malaemide) 링커, 비닐설폰(vinylsulfone) 링커, 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)(pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)) 링커, 피리딜 다이-티올(pyridyl di-thiol) 링커, n-니트로페닐 카보네이트(n-nitrophenyl carbonate) 링커, NHS-에스테르(NHS-ester) 링커, 또는 니트로페녹시 폴리(에틸렌 글리콜)에스테르(nitrophenoxy poly(ethylene glycol)ester) 링커를 사용하여 제조되는 것인, 조성물.

청구항 24

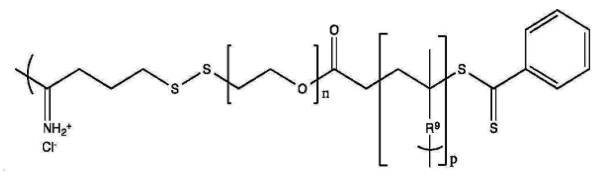
제20항 또는 제21항에 있어서,

Y는 화학식 Ya 내지 Yp 중 어느 하나로 표시되는 구조를 포함하거나, 또는 화학식 Y'-CMP로 표시되는 부분을 갖는 것인, 조성물:

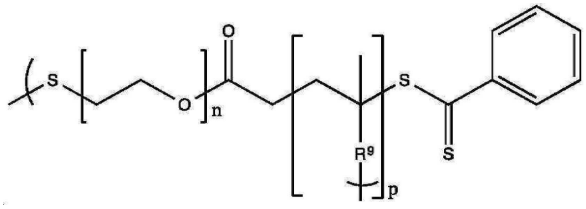
화학식 Ya



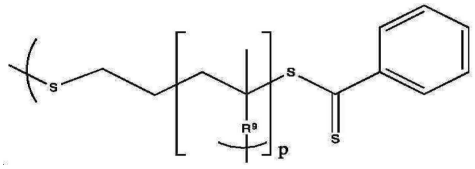
화학식 Yb



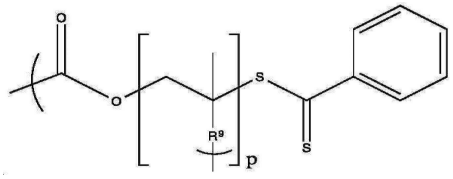
화학식 Yc



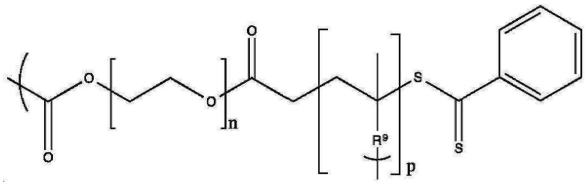
화학식 Yd



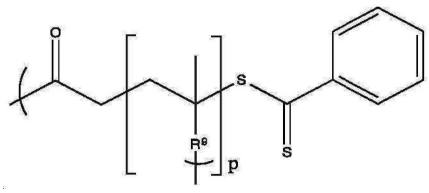
화학식 Ye



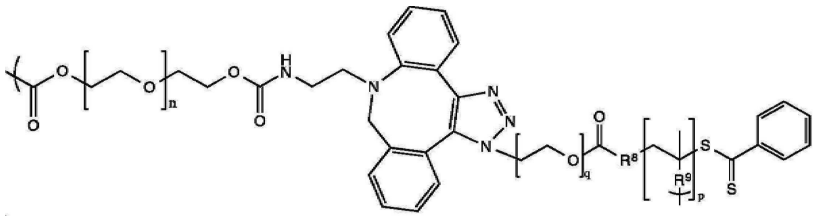
화학식 Yf



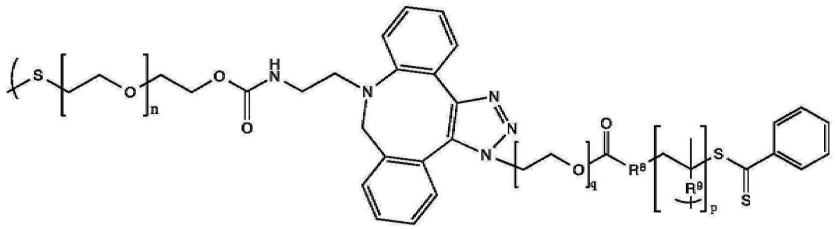
화학식 Yg



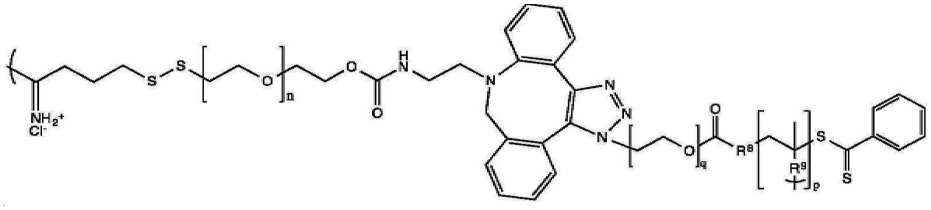
화학식 Yh



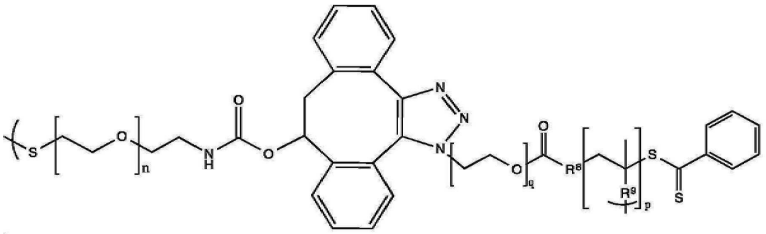
화학식 Yi



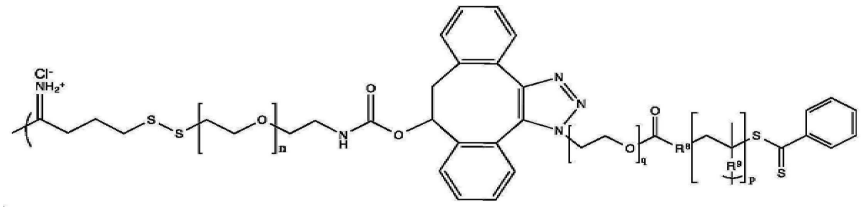
화학식 Yj



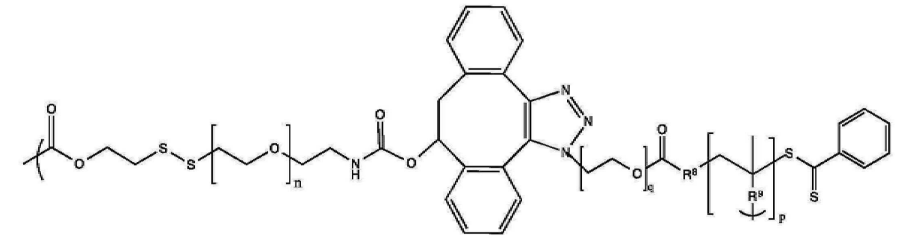
화학식 Yk



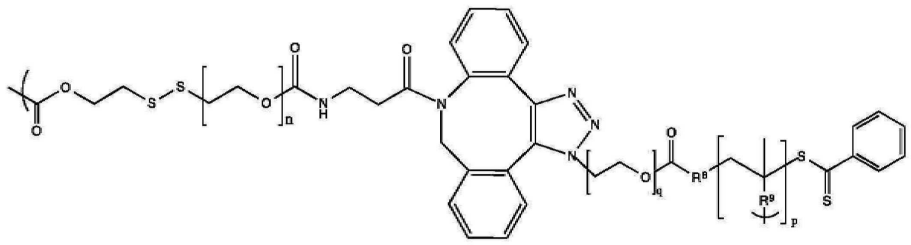
화학식 YL



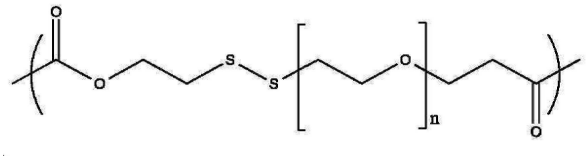
화학식 Ym



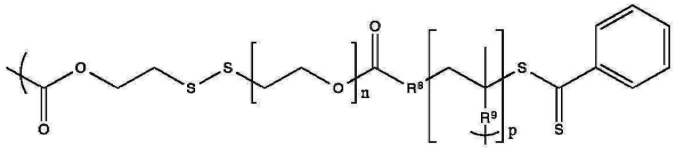
화학식 Yn



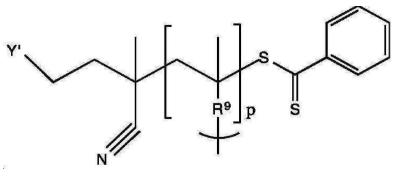
화학식 Yo



화학식 Yp



화학식 Y'-CMP



상기 화학식에서,

좌측 괄호 "("는 X와 Y 사이의 결합을 나타내고;

우측 또는 하측 괄호 ")"는 Y와 Z 사이의 결합을 나타내고;

n은 1 내지 100의 정수이고;

p는 2 내지 150의 정수이고;

q는 1 내지 44의 정수이고;

R^8은 $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고;

R^9는 직접결합 또는 $-C(O)-NH-CH_2-CH_2-$이고;

Y'는 Y의 나머지 부분을 나타낸다.

청구항 25

제24항에 있어서,

n은 40 내지 80이고;

p는 10 내지 100이고;

q는 3 내지 20이고;

R^8은 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고;

R^9가 -C(O)-NH-CH2-CH2-인 경우, Z는 C1에서 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸 갈락토사민인 것인, 조성물.

청구항 26

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 셀리악 병과 관련된 항원인 것인, 조성물.

청구항 27

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 제1형 당뇨병과 관련된 항원인 것인, 조성물.

청구항 28

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 다발성 경화증과 관련된 항원인 것인, 조성물.

청구항 29

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 치료제 부작용과 관련된 항원인 것인, 조성물.

청구항 30

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 조직 이식 부작용과 관련된 항원인 것인, 조성물.

청구항 31

제1항에 있어서,

X는 글리아딘이고,

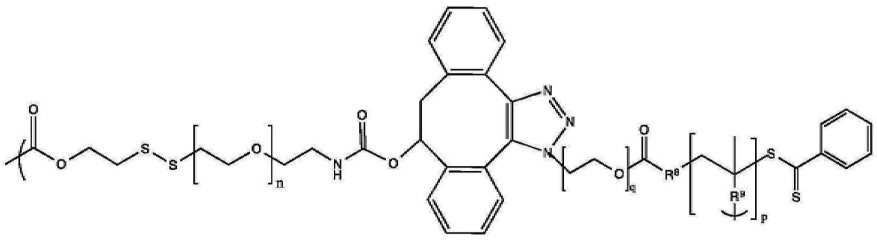
Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸 갈락토사민을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서,

Y는 화학식 Ym인 것인, 조성물:

화학식 Ym



청구항 33

제1항에 있어서,

X는 프로인슐린이고,

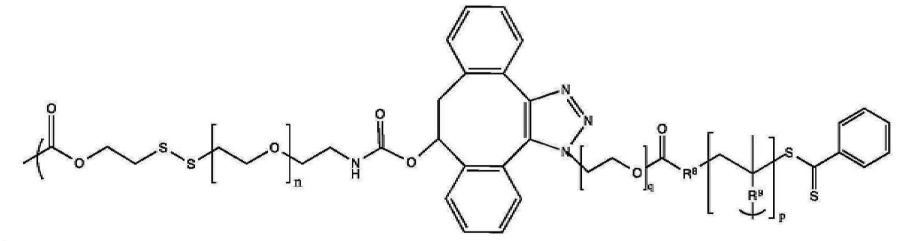
Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸 갈락토사민을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서,

Y는 화학식 Ym인 것인, 조성물:

화학식 Ym



청구항 35

제5항 또는 제6항에 있어서,

Y는 Yc를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 36

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 수초 염기성 단백질의 면역원성 부분인 것인, 조성물.

청구항 37

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 프로인슐린의 면역원성 부분인 것인, 조성물.

청구항 38

제1항, 제2항, 제20항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

X는 글리아딘의 면역원성 부분인, 조성물.

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은, 발명의 명칭을 "글리코타겟팅 치료제"로 하는 출원계속중인(co-pending) 미국가출원 제61/942,942호(2014. 2. 21.자 출원)를 기초로 우선권을 주장하며, 이는 본원에 참조로서 포함된다.

[0002] 본 발명은 이식거부, 자가면역질환, 식품 알러지, 및 치료제에 대한 면역반응의 치료에 유용한 약학적으로 허용가능한 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 미국특허출원공개 제2012/0039989호, 미국특허출원공개 제2012/0178139호 및 국제특허출원공개 제WO2013/121296호는 면역관용화(tolrerization)를 위하여 항원 제시(adntigen presentation)에서 적혈구의 역할을 이용하기 위한 적혈구로의 항원의 표적화를 기술한다. 이러한 접근으로 얻어진 긍정적인 결과에도 불구하고, 대안적 접근의 가능성이 여전히 관심사로 남아있다.

발명의 내용

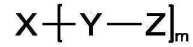
해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 이식거부, 자가면역질환, 식품 알러지, 및 치료제에 대한 면역반응의 치료에 유용한 약학적으로 허용가능한 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본원의 일 양태는 하기 화학식 1의 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0006] 화학식 1

[0007] 

[0008] 상기 식에서,

[0009] m은 약 1 내지 100의 정수이고,

[0010] X는 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 항원 또는 그의 면역관용성 부분(tolerogenic portion)을 포함하거나,

[0011] X는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트, 또는 리간드를 포함

하고, 상기 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 과민증 및/또는 알러지에 원인으로서 관여하는 것이고,

[0012] Y는 링커 모이어티(linker moiety)를 포함하고,

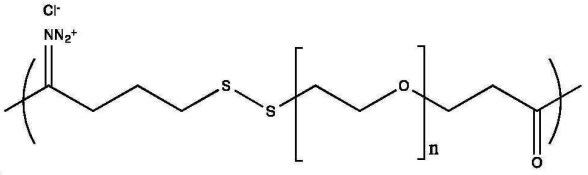
[0013] Z는 간-타겟팅 모이어티를 포함한다.

[0014] 또한, Z는, 예컨대 C1, C2 또는 C6에서 Y에 접합(conjugation)되는, 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민을 포함할 수 있다.

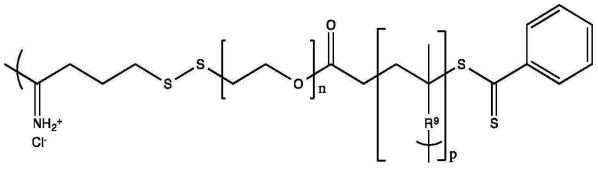
[0015] Y는 N-하이드록시석신아미딜(N-hydroxysuccinamidyl) 링커, 말레이미드(malaemide) 링커, 비닐설폰(vinylsulfone) 링커, 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)(pyridyl di-thiol-poly(ethylene glycol)) 링커, 피리딜 다이-티올(pyridyl di-thiol) 링커, n-니트로페닐 카보네이트(n-nitrophenyl carbonate) 링커, NHS-에스테르(NHS-ester) 링커, 및 니트로페녹시 폴리(에틸렌 글리콜)에스테르(nitrophenoxy poly(ethylene glycol)ester) 링커로부터 선택될 수 있다.

[0016] 또한, Y는, X에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트, 펩타이드 또는 기타 리간드; 다이설파닐 에틸 에스테르; 하기 화학식 Ya 내지 Yp 중의 어느 하나로 표시되는 구조를 포함할 수 있고, 또는 하기 화학식 Y'-CMP로 표시되는 부분을 가질 수 있다.

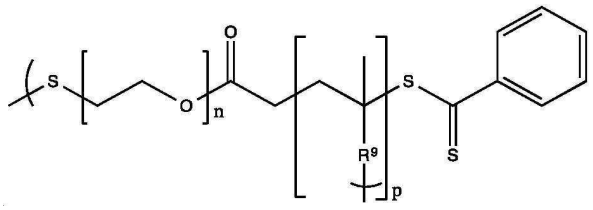
[0017] 화학식 Ya

[0018] 

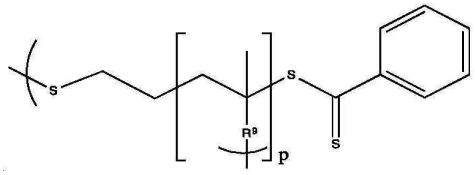
[0019] 화학식 Yb

[0020] 

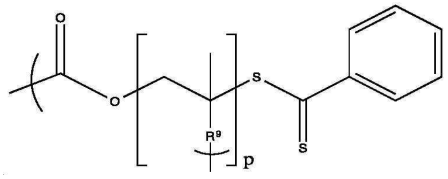
[0021] 화학식 Yc

[0022] 

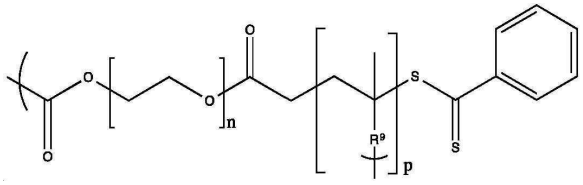
[0023] 화학식 Yd

[0024] 

[0025] 화학식 Ye

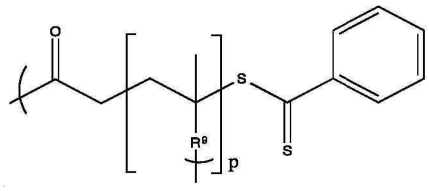
[0026] 

[0027] 화학식 Yf



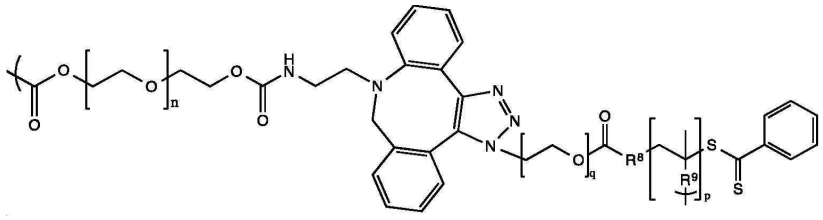
[0028]

[0029] 화학식 Yg



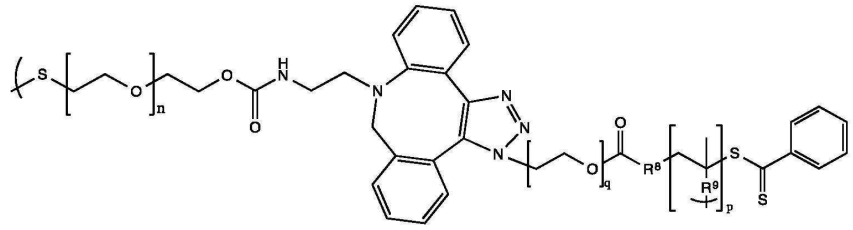
[0030]

[0031] 화학식 Yh



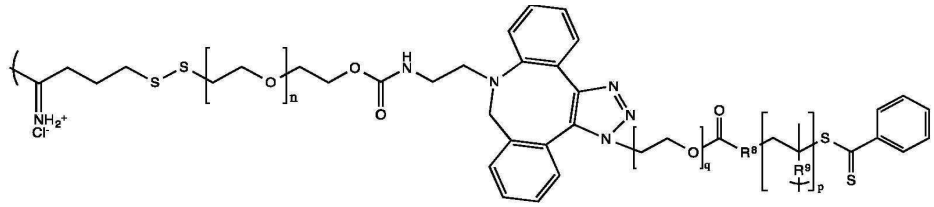
[0032]

[0033] 화학식 Yi



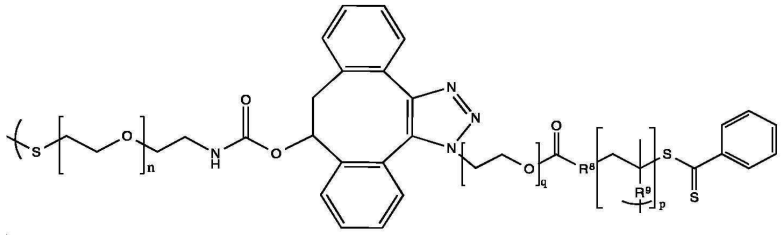
[0034]

[0035] 화학식 Yj



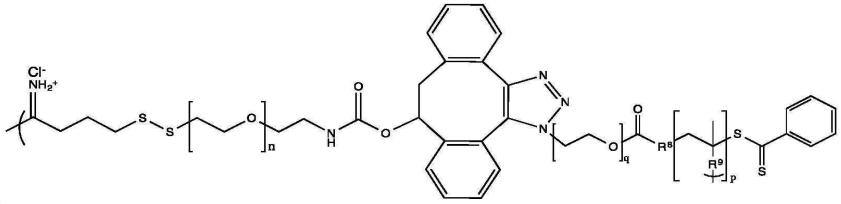
[0036]

[0037] 화학식 Yk



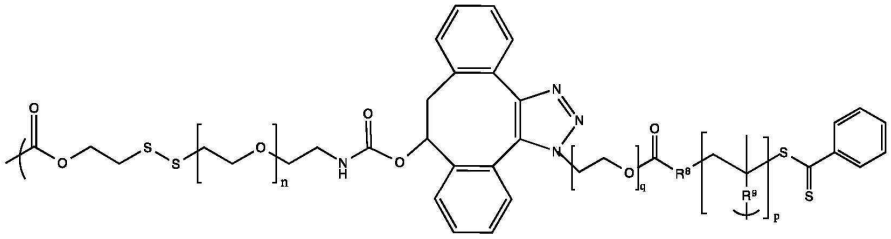
[0038]

[0039] 화학식 YL



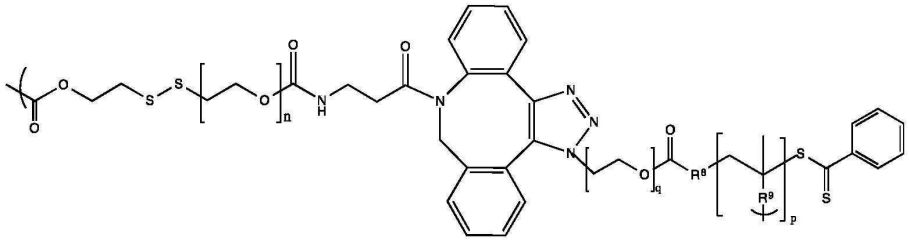
[0040]

[0041] 화학식 Ym



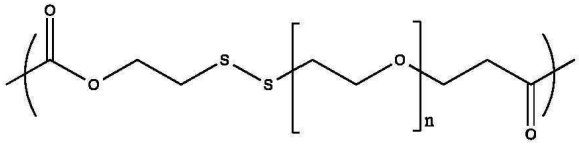
[0042]

[0043] 화학식 Yn



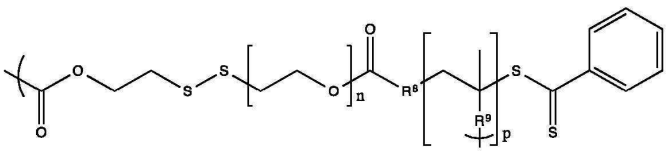
[0044]

[0045] 화학식 Yo



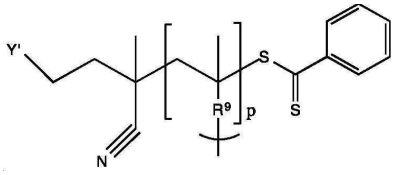
[0046]

[0047] 화학식 Yp



[0048]

[0049] 화학식 Y'-CMP



[0050]

[0051] 상기 식에서, 좌측 괄호 "("는 X와 Y 사이의 결합을 나타내고; 우측 또는 하측 괄호 ")"는 Y와 Z 사이의 결합을 나타내고; n은 약 1 내지 100의 정수이고; p는 약 2 내지 150의 정수이고; q는 약 1 내지 44의 정수이고; R^8은 $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고; R^9는 직접결합 또는 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$이고; Y'는 Y의 나머지 부분을 나타낸다.

[0052] 상기의 또 다른 양태에서, n은 약 40 내지 80이고; p는 약 10 내지 100이고; q는 약 3 내지 20이고; R^8은 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고; R^9가 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$일 때, Z는 C1에서 접합되는 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0053] 상기의 또 다른 양태에서, Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Yh, 화학식 Yi, 화학식 Yk, 화학식 Ym, 또는 화학식 Yn을 포함하고, 특히 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Ym 또는 화학식 Yn을 포함한다.

[0054] X는 이식수용체(transplant recipient)가 원치않는 면역반응을 나타내는 외래 이식항원; 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 외래 식품, 동물, 식물, 또는 환경항원(environmental antigen); 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 외래 치료제; 또는 환자가 그 내인성 버전(endogenous version)에 대해 원치않는 면역반응을 나타내는 합성 셀프항원(self-antigen); 또는 그의 면역관용성 부분(tolerogenic portion)을 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 또한, 본원은 상기 논의된 화학식 1의 화합물을 포함하는 조성물의 유효량을 치료가 필요한 포유동물에게 투여함으로써 항원에 대한 원치않는 면역반응을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에서, 상기 조성물은 항원 모이어티 X에 특이적으로 결합하는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체의 클리어런스(clearance)를 위해 투여될 수 있고, 상기 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 과민증 및/또는 알러지에 원인으로서 관여하는 것이다. 상기 조성물은, 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 과민증 및/또는 알러지에 원인으로서 관여하는 항체의 환자 혈중 농도를, 투여후 약 12 시간 내지 약 48 시간 사이의 시점에 측정하였을 때, 적어도 50% w/w 만큼 감소시키기 위한 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 상기 조성물은 항원 모이어티(antigen moiety) X에 관한 환자의 면역관용화(tolerization)를 위해 투여될 수 있다.

[0056] 본원의 또 다른 양태는 하기 화학식 2의 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0057] 화학식 2

[0058]

[0059] 상기 식에서, m'는 0 또는 약 1 내지 10의 정수이고, m"는 0 또는 약 1 내지 10의 정수이고, m'+m"의 합은 약 1 내지 10의 정수로서 적어도 1이고; X는 각각 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 외래 항원 또는 셀프항원, 또는 그의 면역관용성 부분을 포함하고; Y는 각각 링커부분 또는 직접결합, 또는 X에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트, 펩타이드 또는 기타 리간드를 포함하고; Z는 간-타겟팅 모이어티이고, 단 m'+m"의 합이 1이고 Z가 DOM 26h-196-61일 때, X는 인터페론(interferon), 리바비린(Ribavirin), 넥사바/소라페닙(Nexavar/Sorafenib), 에르비투스/세툭시맙(Erbitus/Cetuximab), 아바스타틴/베바시주맙(Avastatin/bevacizumab) 또는 허셉틴/트라스투주맙(Herceptin/trastuzumab)이 아니다.

[0060] 화학식 2를 포함하는 상기 양태에서, Z는 ASGPR-표적화된 항체, ASGPR-표적화된 항체 프래그먼트, ASGPR-표적화된 펩타이드, ASGPR-표적화된 scFv, 또는 기타 ASGPR 리간드를 포함할 수 있다. Y는 면역프로테오솜 절단부위(immunoproteosome cleavage site)를 갖는 링커일 수 있다. X는 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 관련 항원 그룹 또는 그의 면역관용성 프래그먼트(tolerogenic fragments) 그룹을 포함할 수 있다. 예컨대, X는 하기를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0061] ● 둘 이상의 인슐린, 프로인슐린, 프리프로인슐린(preproinsulin), 글루탐산 디카르복시라제-65 GAD-67(glutamic acid decarboxylase-65 GAD-67), 글루코스-6 포스파타제 2(glucose-6 phosphatase 2), 인슐리노마-연관 단백질 2(insulinoma-associated protein 2), 인슐리노마-연관 단백질 2β(insulinoma-associated protein 2β), ICA69, ICA12, 카르복시펩티다제 H(carboxypeptidase H), 이모젠 38(Imogen 38), GLIMA 38, 크로모그라닌-A(chromogranin-A), HSP-60, 카르복시펩티다제 E(caboxypeptidase E), 페리페린(peripherin), 글루코스 수용체 2(glucose transporter 2), 간암-장-췌장/췌장 연관 단백질(hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein), S100β, 아교세포섬유산성단백질(glial fibrillary acidic protein), 재생유전자 II(regenerating gene II), 췌장 십이지장 호메오박스 1(pancreatic duodenal homeobox 1), 근 긴장성 이영양증 키나제(dystrophia myotonica kinase), 섬-특이성 글루코스-6-포스파타제 촉매성 서브유닛-관련 단백질(islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein), 및 SST G-단백질 결합된 수용체 1-5(SST G-protein coupled receptors 1-5);

[0062] ● 둘 이상의 수초 염기성 단백질(myelin basic protein), 수초 희소돌기아교세포 당단백질(myelin oligodendrocyte glycoprotein), 수초 단백질지질 단백질(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, 및 SEQ ID NO:17; 및

[0063] ● 둘 이상의 SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, 및 SEQ ID NO:27.

[0064] 또한, 본원은 상기 논의된 화학식 2의 화합물을 포함하는 조성물의 유효량을 치료가 필요한 포유동물에게 투여함으로써 항원에 대한 원치않는 면역반응을 치료하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에서 상기 조성물은 항원 모이어티 X에 특이적으로 결합하는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체의 클리어런스(clearance)를 위해 투여될 수 있고, 상기 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 과민증 및/또는 알러지에 원인으로서 관여한다. 상기 조성물은, 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 과민증 및/또는 알러지에 원인으로서 관여하는 항체의 환자 혈중 농도를, 투여후 약 12 시간 내지 약 48 시간 사이의 시점에 측정하였을 때, 적어도 50% w/w 만큼 감소시키기 위한 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 항원 모이어티 X에 관한 환자의 면역관용화(tolerization)를 위해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0065] 본 발명은 항원에 대한 원치않는 면역반응을 치료하는 효과를 달성한다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1 은, 갈락토스 접합(conjugation) [F1aA-PE-m_4-n_{80} (Gal-PE)]이 (A) 굴내피세포(sinusoidal endothelial cells, LSECs), (B) 쿠퍼세포(KC), (C) 헤파토사이트, 및 (D) 다른 항원-제시 세포(APCs)를 포함하는 간 세포에 OVA를 우선적으로 타겟팅하는 것을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 2는 F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA), OVA 또는 식염수(즉, 나이브(naive))로 처리된 마우스에서 OTI CD8+ T 세포의 증식(proliferation)을 나타내는 그래프이다.

도 3은 식염수, OVA 또는 F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)로 처리된 증식 T 세포(proliferating T cells)의 세대(generation)에서 표면 마커 (A) PD-1+ 및 (B) 아넥신-V+를 제공하는 OTI CD8+ T 세포의 백분율을 나타내는 일련의 그래프이다.

도 4는 OVA-특이적인 항체 역가에 의해 측정된 바와 같이 갈락토스 접합 [F1aA-OVA-m_4-n_{80} (Gal-OVA)]은 OVA의 면역원성을 감소시킴을 보여주는 그래프이다(Ab 역가 $\log^{-1}$로 나타냄).

도 5는 F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)가 혈청(serum)에서 OVA-특이적인 항체를 고갈(deplete)시킬 수 있음을 나타낸다.

도 6은 F1aA-OVA-m_4-n_{80}(mGal-OVA), F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}(pGal-OVA), 및 N'-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C'(Dom-OVA)이 OVA 및 LPS 보조제로 피내 챌린지한 후 배출 림프절(draining lymphnode)에서 OVA-특이적인 면역반응을 감소시킬 수 있음을 나타낸다.

도 7은 F1aA-OVA-m_4-n_{80} 및 F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}의 캐릭터리제이션(characterization)을 나타낸다. (A) F1aA-OVA-m_4-n_{80}(적색), F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}(청색) 및 비접합 OVA(흑색)의 크기배제 HPLC 추적(traces). 왼쪽으로의 시프트는 분자량의 증가를 나타낸다. (B) OVA 접합후 분자량 증가를 보여주는 폴리아크릴아마이드겔: (1) 비접합 OVA, (2) F1aA-OVA-m_4-n_{80} 및 (3) F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}.

도 8은 i.v. 볼러스(bolus)로 주사후, 마우스의 순환에서 N-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(OVA), N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(DOM-OVA), 또는 N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C(OVA-DOM)의 정규화된 양(normalized quantity)을 나타내는 그래프이다.

도 9는 식염수, DOM 및 OVA, DOM-OVA, 또는 OVA-DOM으로 처리후, 개개 마우스의 순환에서 항-OVA IgG 항체의 역가를 보이는 일련의 그래프이다. 항-OVA IgG의 생산이 OVA 단독(a) 또는, OVA 및 CpG-B(b)의 i.v. 주사에 의해 유도되었다. 처리 회수는 수직 점선으로 나타낸다. 역가는 검출가능한 항-OVA IgG으로 혈장(plasma)의 최대

배수 희석의 $\log_{10}$으로서 계산된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 두 가지 기지의 아시알로당단백질(asialoglycoprotein) 수용체("ASGPRs")는 헤파토사이트 및 간 굴내피세포(liver sinusoidal endothelial cells) (또는 "LSECs")에서 발현된다. 다른 갈락토스/갈락토사민/N-아세틸갈락토사민 수용체는 다중 세포 형태[예컨대, 수상세포(dendritic cells), 헤파토사이트, LSECs, 및 쿠퍼셀(Kupffer cells)]에서 다양한 형태로 발견될 수 있다. 수상세포는 "전문적인 항원제시세포(professional antigen-presenting cell)"로 생각되는데, 왜냐하면 그 1차 기능이 면역반응을 생성하기 위해 면역시스템에 항원을 제공하는 것이기 때문이다. 간 내 몇몇 세포는 항원을 제시할 수 있는 것으로 알려져 있으나, 간은 면역관용도입(tolerogenesis)에 관여하는 것으로 더 많이 알려져 있다. 간은 면역관용원 장기(tolerogenic organ)로 이해된다. 예컨대, 간이 이식되는 장기들 중의 어느 하나인 다중 장기 이식의 경우에 더 낮은 거부 발생이 보고된다. LSECs는 문헌에 보다 새로이 나타난 것이어서, 결과적으로 염증 면역반응의 면역관용도입 및/또는 완화에 있어 그 역할이 아직 널리 인식되거나 잘 이해되지 않는다. 그러나, 이는 또한 항원-특이적인 면역관용의 유도에 중요한 역할을 담당할 수 있음이 분명해지고 있다.

[0068] 적혈구 표면의 차별화된 특징 중의 하나는 그 글리코실화, 즉 글리코실화된 단백질의 상당량의 존재이다. 사실 글리코포린(예컨대, 글리코포린 A)은 적혈구 결합을 위한 표적으로 사용되어 왔다. 글리코포린은 다수의 공유결합된 당 체인을 갖는 단백질이며 그 말단(end terminus)은 시알산이다. 적혈구가 노화되어 클리어런스에 이를 단계가 되면, 그 글리포포린의 말단 시알산은 소실되어 자유말단에 N-아세틸글루코사민을 남기는 경향이 있다. N-아세틸글루코사민은 헤파토사이트와 연관된 ASGPR에 의해 선택적으로 수용되는 리간드이며, 간에서 헤파토사이트에 의한 N-아세틸갈락토사민-함유 물질의 결합과 그 후속 업테이크 및 프로세스에 이른다.

[0069] 지금까지, 간 타겟팅에 이르는 치료제의 글리코실화는 간에 의한 초회통과 클리어런스에 의한 치료제의 낮은 순환반감기로 인해 기피되어야 하는 것으로 당업자에게 인식되어 왔다. 게다가, 몇몇 모노클로날 항체가 그 Fc 수용체에 최적의 결합을 위해 ASN297에서 특이적으로 글리코실화될 필요가 있다. 놀랍게도 갈락토실화가 면역관용성을 유도하는데 사용될 수 있다는 것이 현재 밝혀졌다.

[0070] 본원은 간, 특히 헤파토사이트(hepatocyte), LSECs, 쿠퍼셀 및/또는 스텔레이트 셀(stellate cells), 보다 특히 헤파토사이트 및/또는 LSECs로 송달되도록 (또한 이들에 의해 업테이크 되도록), 또 더더욱 특히 ASGPR에 특이적으로 바인딩하도록, 표적화된 특정 치료 조성물을 제공한다. 간-타겟팅은 치료의 두가지 기전을 촉진한다: 면역관용화(tolerization) 및 클리어런스(clearance). 면역관용화는 소멸세포(apoptotic cells)를 클리어런스하고 면역시스템에 의해 "자기자신(self)"으로 인식되도록 단백질을 프로세스하는데 있어서 간의 역할 및 면역관용(immune tolerance)을 위한 외재성 단백질(peripheral protein)을 샘플링하는데 있어서 간의 역할을 활용한다. 클리어런스는 독소, 폴리펩타이드 등을 분해하고 신속히 제거함에 의한 혈액 정화에 있어 간의 역할을 활용한다. 이러한 조성물의 간으로의 타겟팅은 갈락토실화 모이어티(예컨대, 특히 C1, C2 또는 C6에서 접합되는, 갈락토스, 갈락토사민 및 N-아세틸갈락토사민)에 의해, 또는 기타 간-타겟팅 잔기(예컨대, 모노클로널 항체, 또는 그 프래그먼트 또는 scFv)에 의해, 또는 그러한 간-타겟팅이 필요한 폴리펩타이드를 탈-시알릴화(de-sialylating)함에 의해 성취된다. 갈락토실화 또는 기타 간-타겟팅 잔기는 항원에 화학적으로 접합되거나 재조합적으로 융합될 수 있는 반면, 탈시알릴화는 항원 폴리펩타이드 상에 갈락토스-유사 모이어티를 노출한다. 항원은 내인성이거나(셀프항원) 외인성일(외래 항원) 수 있고, 이식 수용체(transplant recipients)가 원치않는 면역반응(예컨대, 이식거부)을 나타내는 외래 이식항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 알러지 또는 과민증)을 나타내는 외래 음식, 동물, 식물 또는 환경항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 과민증 및/또는 감소된 치료활성)을 나타내는 치료제, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 자가면역질환)을 나타내는 셀프항원, 또는 그의 면역관용성 부분(예컨대, 프래그먼트 또는 에피토프)을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 이러한 조성물은 항원에 면역관용화를 유도하는데 유용하다. 택일적으로, 갈락토실화 또는 기타 간-타겟팅 모이어티는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드에 접합될 수 있고, 상기 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 (앞서 논의된 바와 같은) 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환 및/또는 알러지에 원인적으로 관여되어 있고, 이러한 조성물은 순환 단백질, 펩타이드 또는 항체를 클리어런스하는데 유용하다. 따라서, 본원의 조성물은 원치않는 면역반응, 예컨대 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 및/또는 알러지를 치료하는데 유용할 수 있다. 또한, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 첨가제와 혼합된, 치료적 유효량의 본원 조성물을 함유하는 약학 조성물이 본원에 제공된다. 또 다른 양태에서, 이식거부, 치료제에 대한 반응, 자가면역질환 또는 알러지와 같은 원치않는 면역반응의 치료방법이 본원에

제공된다.

[0071] 정의

[0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 하기 단어와 구는, 이들이 사용되는 문맥에서 달리 지시하지 않는 한, 일반적으로 하기에 설명된 의미를 갖는 것으로 의도된다.

[0073] 단수형태인 "a", "an" 및 "the"는, 달리 지시되지 않는 한, 복수형태를 포함한다.

[0074] 숫자와 함께 사용된 용어 "약"은 지시된 숫자보다 예컨대 5 내지 10% 더 작은 하한 및 지시된 숫자보다 예컨대 5 내지 10% 더 큰 상한을 갖는 범위내의 숫자를 포괄하는 것으로 의미된다.

[0075] "항원"은 T 세포 수용체, B 세포 수용체 또는 항체와 같은 적응 면역반응의 수용체에 대한 표적으로 기능하는 임의의 물질이다. 항원은 체내로부터 유래될 수 있다("셀프", "자가(auto)" 또는 "내인성"). 항체는, 예컨대 흡입, 소화, 주사 또는 이식에 의해 도입되어, 체외로부터 유래될 수 있다("비-셀프", "외래" 또는 "외인성"). 외래 항원은 식품 항원, 동물 항원, 식물 항원, 환경항원, 치료제, 동종이식(allograft transplant)에 존재하는 항원을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 본원에서 사용되는 "항원-결합 분자"는 에피토프에 특이적인 결합을 제공하는 항체 가변영역을 포함하는 분자, 특히 면역글로불린 분자와 같은 단백질에 관한 것이다. 항체 가변구역은, 예컨대, 완전항체(complete antibody), 항체 프래그먼트 및 항체 또는 항체 프래그먼트의 재조합 유도체일 수 있다. 본원에서 사용되는 항체의 "항원-결합 프래그먼트" (또는 "결합부위")라는 용어는 표적 시퀀스에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 항체의 하나 이상의 프래그먼트를 가리킨다. 항체 가변영역을 포함하는 항원-결합 프래그먼트는 "Fv", "Fab" 및 "$F(ab')_2$" 영역, "단일 도메인 항체(single domain antibodies, sdAb)", "나노바디(nanobody)", "단일체인 Fv(scFv)" 프래그먼트, "탠덤 scFvs"(V_HA-V_LA-V_HB-V_LB), "다이아바디(diabodies)", "트리아바디(triabodies)" 또는 "트리바디(tribodies)", "단일체인 다이아바디(single-chain diabodies, scDb)" 및 "이중특이성 T 세포 관여항체(bi-specific T-cell engagers)"를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0077] "화학적 변형(chemical modification)"은 폴리펩타이드의 하나 이상의 아미노산의 자연적으로 발생하는 화학적 구조에서의 변화를 의미한다. 그러한 변형은 측쇄 또는 말단, 예컨대 아미노-말단 또는 카르복실 말단에 일어날 수 있다. 몇몇 양태에서, 변형은 다른 물질에 폴리펩타이드를 연결하기 위해 또는 치료제를 부착하기 위해 쉽게 사용될 수 있는 화학적 그룹을 생성하는데 유용하다.

[0078] 용어 "포함하는(comprising)"은 "비롯한(including)", "함유하는(containing)" 또는 "...로 특징되는(characterized by)"과 의미가 같고, 포괄적이고(inclusive) 제한이 없으며(open-ended) 언급되지 않은 구성요소나 공정 단계의 부가를 배제하지 않는다. 용어 "...로 이루어진(consisting of)"은 특정되지 않은 구성요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 용어 "...로 본질적으로 이루어진(consisting essentially of)"은 기술된 대상의 범위를, 특정지어진 대상이나 단계 및 그의 기본적이고 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들로 제한한다.

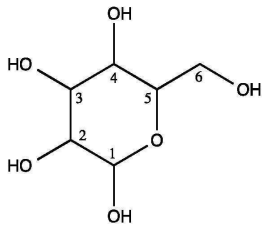
[0079] "보존적 변화(conservative changes)"는 일반적으로 활성의 변경 없이 아미노산 시퀀스에 일어날 수 있다. 이러한 변화는 "보존적 치환" 또는 돌연변이로 불리며, 즉 특정 크기와 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산이 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 아미노산 시퀀스의 치환은 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원으로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 비극성(소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판, 메티오닌 및 티로신을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성으로 하전된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음성으로 하전된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 이러한 치환은 폴리아크릴아미드겔 전기영동 또는 등전점으로 측정된 명백한 분자량에 실질적으로 영향을 미치는 것으로 기대되지 않는다. 또한, 보존적 치환은 시퀀스의 광학이성질체를 다른 광학이성질체로 치환하는 것, 구체적으로 시퀀스의 하나 이상의 잔기에 대해 L 아미노산을 D 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 더욱이, 시퀀스 중의 모든 아미노산이 D 에서 L 이성질체 치환를 거칠 수 있다. 예시적인 보존적 치환은, 양성 전하를 유지하기 위해 Arg을 Lys로 치환 및 그 반대의 경우; 음성 전하를 유지하기 위해 Asp를 Glu로 치환 및 그 반대의 경우; 유리 -OH기를 유지하기 위해 Thr를 Ser으로 치환; 및 유리 $-NH_2$기를 유지하기 위해 Asn을 Glu로 치환의 경우를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 그러나 또 다른 유형의 보존적 치환은, 화학적 유도가 필요한 경우, 바람직한 화학 반응성을 갖는 아미노산이 도입되어 화학 접합 반응을 위한 반응 부위를 제공하는 경우를 포함한다. 그러한 아미노

산은 Cys(설프히드릴기(sulfhydryl group)를 삽입하기 위해), Lys(1차아민을 삽입하기 위해), Asp 및 Glu(카르복실산기를 삽입하기 위해) 또는 케톤, 아자이드, 알카인, 알켄, 및 테트라진 측쇄를 함유하는, 고유의 범위를 벗어난(noncanonical) 특수한 아미노산을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 보존적 치환 또는 유리 $-NH_2$ 또는 -SH 함유 아미노산의 부가는 화학식 1의 링커 및 갈락토실화 모이어티를 갖는 화학적 접합에 특히 유리할 수 있다. 더욱이, 폴리펩타이드 시퀀스 또는 상응하는 핵산 시퀀스의 점 돌연변이, 결실 및 삽입은 몇몇 경우에 폴리펩타이드 또는 핵산 프래그먼트의 기능의 손실 없이 이루어질 수 있다. 치환은, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 또는 그 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 본원 발명에서 사용가능한 변이(variant)는 아미노산 시퀀스에서 총 200개까지(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, 또는 200까지)의 변화를 나타낼 수 있다(즉, 교체, 삽입, 결실, N-말단 절단, C-말단 절단). 본원에서 기술되는 아미노산 잔기는 표준 폴리펩타이드 명명법(문헌 [J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559])에 따라 단일문자 아미노산 부호 또는 3개 문자 약어를 사용한다. 모든 아미노산 잔기 시퀀스는 아미노-말단에서 카르복시-말단의 통상적인 방향으로 좌우 오리엔테이션을 갖는 화학식으로 본원에 표시된다.

[0080] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 그러한 치료가 필요한 포유동물에 투여될 때, 하기 정의된 바와 같이, 치료를 효과적이게 하는데 충분한 본원 조성물의 양을 의미한다. 이러한 양은 치료되는 개체 및 그 질환 상태, 개체의 체중 및 연령, 질환 상태의 중증도, 선택된 본원의 특정 조성물, 따르게 되는 복용 처방, 투여 타이밍, 투여 방법 등 당업자에 의해 결정될 수 있는 모든 것에 따라 달라질 수 있다.

[0081] 항원결정인자(antigenic determinant)로도 알려진, 용어 "에피토프"는 항체, B 세포 또는 T 세포와 같은 적응 면역시스템에 의해 인식되는 마크로분자(예컨대, 단백질)의 세그먼트이다. 에피토프는 항체에 결합할 수 있는 마크로분자의 부분 또는 세그먼트, 또는 그의 항원-결합 프래그먼트이다. 본원에서 용어 "결합(binding)"은 특히 특이적인 결합에 관한 것이다. 본원에서 용어 "에피토프"는 면역시스템에 의해 인식되는 단백질 또는 폴리단백질의 세그먼트를 가리킨다.

[0082] 용어 "갈락토스"는 당업계에 잘 알려져 있고 D- 및 L-이성질체를 갖는 오픈체인 형태 및 사이클릭 형태 둘다로 존재하는 모노사카라이드 당을 가리킨다. 사이클릭 형태에서, 두 개의 아노머(anomer), 즉 알파와 베타 아노머가 존재한다. 알파 형태에서 C1 알콜기는 axial 위치에 있는 반면, 베타 형태에서 C1 알콜기는 equatorial 위치에 있다. 특히 "갈락토스"는 사이클릭 6원 피라노스, 더욱 특히 D-이성질체, 더더욱 특히 알파-D-형태(α-D-갈락토피라노스)이다. 갈락토스의 구조 및 넘버링은 아래에 도시되어 있다.

[0083] 

[0084] 용어 "갈락토실화 모이어티"는 특정 유형의 간-타겟팅 모이어티를 가리킨다. 갈락토실화 모이어티는 갈락토스, 갈락토사민 및/또는 N-아세틸갈락토사민 잔기를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0085] 용어 "간-타겟팅 모이어티"는, 예컨대 폴리펩타이드를, 간으로 유도하는 능력을 가진 모이어티를 가리킨다. 간은 여러 가지의 세포 유형을 포함하며, 헤파토사이트(hepatocytes), 굴내피세포(sinusoidal endothelial cells), 쿠퍼셀, 스텔레이트 셀(stellate cells) 및/또는 수상세포(dendritic cells)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 전형적으로, 간-타겟팅 잔기는 하나 이상의 상기 세포들로 폴리펩타이드를 유도한다. 각각의 간 세포의 표면에, 간-타겟팅 모이어티를 인식하고 특이적으로 결합하는 수용체가 존재한다. 간-타겟팅은 항원 또는 리간드를 갈락토실화 모이어티에 화학적 접합시키거나, 항원 또는 리간드를 탈시알릴화시켜 내재하는 갈락토실 모이어티를 노출시키거나, 항원 또는 리간드를 ASGPR-결합 모이어티에 재조합적 융합 또는 화학적 접합시키거나, 항원 또는 리간드에 내인성 항체를 특이적으로 결합시킴으로써 성취되고, 여기서 항원 또는 리간드는 탈시알릴화되어 내재하는 갈락토실 모이어티를 노출하거나, 갈락토실화 모이어티에 접합되거나, ASGPR-결합 모이어티에 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합된다. 천연에 존재하는 탈시알릴화 단백질은 본원의 범주 내에 포함되지 않는다.

[0086] 다양한 치환체에 대해 제공되는 "수치" 및 "범위"는 언급된 범위 내의 모든 정수를 포괄하는 것으로 의도된다.

예컨대, n을 약 1 내지 100개, 특히 약 8 내지 90개, 보다 특히 약 40 내지 80개의 에틸렌글리콜기를 포함하는 혼합물을 나타내는 정수로서 정의하는 경우, 여기서 상기 혼합물은 일반적으로 n±약 10%로 특정되는 정수 (또는 1 내지 약 25의 더 작은 정수에 대해, ±3)일 수 있고, n은 약 1 내지 100의 정수(예컨대, 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 또는 110)일 수 있고, 상기 혼합물은 예컨대 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 및 107-113개의 에틸렌글리콜기의 범위를 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 조합되어 사용되는 용어 "약" 및 "±10%" 또는 "±3%"는 사용되는 모든 경우에서 균등한 범위에 대한 특정적인 뒷받침을 개시 및 제공하는 것으로 이해되어야 한다.

[0087] 용어 "임의의" 또는 "임의로"는 기술된 사건이나 경우가 일어나거나 일어나지 않는 것을 의미하며 그 기재내용은 상기 사건이나 경우가 일어나는 경우 및 일어나지 않는 경우를 포함한다.

[0088] 특정 표적에 특이적으로 결합하는 펩타이드는 그 표적에 대한 "리간드"로 언급된다.

[0089] "폴리펩타이드"는 전사후 변형(post-translational modification) (예컨대, 포스포릴화 또는 글리코실화) 및/또는 추가적인 폴리펩타이드와의 복합체 형성(complexation), 및/또는 핵산 및/또는 카보하이드레이트 또는 다른 분자와의 멀티서브유닛 컴플렉스로의 합성과 무관하게, 아미노산 잔기의 체인을 가리키는 용어이다. 따라서 프로테오글리칸 또한 본원에서 폴리펩타이드로 언급된다. (약 50개 이상의 아미노산을 갖는) 긴 폴리펩타이드는 "단백질"로 언급된다. (약 50개 이하의 아미노산을 갖는) 짧은 폴리펩타이드는 "펩타이드"로 언급된다. 사이즈, 아미노산 조성물 및 3차원 구조에 따라, 어떤 폴리펩타이드는 "항원-결합 분자", "항체", "항체 프레그먼트" 또는 "리간드"로 언급될 수 있다. 폴리펩타이드는 다수의 방법에 의해 제조될 수 있고, 이들 중 많은 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 예컨대, 폴리펩타이드는 (예컨대 단리된 세포로부터) 추출에 의해, 폴리펩타이드를 인코딩하는 재조합핵산의 발현에 의해, 또는 화학적 합성에 의해 얻어질 수 있다. 폴리펩타이드는 예컨대 인코딩된 폴리펩타이드의 발현을 위한 재조합기술 및 호스트 세포에 도입된 폴리펩타이드를 인코딩하는 발현벡터(예컨대, 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection)에 의함)에 의해 생산될 수 있다.

[0090] 본원에서, "약제학적으로 허용가능한 담체" 또는 "약제학적으로 허용가능한 첨가제"는 임의의 및 모든 용매, 분산매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 약제학적 활성물질에 대한 상기 매질 및 약제(agent)는 당업계에 잘 알려져 있다. 활성성분과 배합금기인 경우를 제외하고는, 치료 조성물에 통상적인 매질이나 약제의 사용이 고려된다. 보조 활성성분 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0091] 본원에서 폴리펩타이드와 관련하여 사용되는 용어 "정제된(purified)"은 화학적으로 합성된 폴리펩타이드를 의미하고 따라서 실질적으로 다른 폴리펩타이드에 의해 오염되지 않거나, 천연적으로 동반되는 대부분의 다른 세포 성분(예컨대, 다른 세포 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 또는 세포 구성성분)으로부터 분리 또는 단리된 것이다. 정제된 폴리폽타이드의 예는 천연적으로 연관된 단백질 및 천연에 존재하는 유기 분자가 없는, 건조중량으로 70% 이상의 것이다. 따라서, 정제된 폴리펩타이드 제제는 예컨대, 건조중량으로 80% 이상, 90% 이상, 또는 99% 이상의 폴리펩타이드 일 수 있다. 또한 폴리펩타이드는 정제 또는 마킹(marking)(예컨대, 어피니티 매트릭스에 캡춰, 현미경 하에서 가시화)을 촉진하는 태그 시퀀스(tag sequence)(예컨대, 폴리히스티딘 태그, myc 태그, FLAG® 태그, 또는 기타 어피니티 태그(affinity tag))를 포함하도록 엔지니어링될 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드를 포함하는 정제된 조성물은 달리 지시되지 않으면 정제된 폴리펩타이드를 의미한다. 용어 "단리된"은 본원의 폴리펩타이드 또는 핵산이 자연적인 환경에 있는 것이 아님을 가리킨다. 따라서 본원의 단리된 생산물은 예컨대 배양 상등액에 포함되거나, 부분적으로 풍부하거나, 이종 소스(heterologous source)로부터 생산되거나, 벡터에서 클로닝되거나, 비히클과 제제화될 수 있다.

[0092] 용어 "시퀀스 동일성(sequence identity)"은 폴리펩타이드 시퀀스 비교와 관련하여 사용된다. 상기 표현은 특히 개개의 레퍼런스 폴리펩타이드에 대한 또는 개개의 레퍼런스 폴리뉴클레오타이드에 대한 시퀀스 동일성의 백분율로서, 예컨대 80% 이상, 81 % 이상, 82% 이상, 83% 이상, 84% 이상, 85% 이상, 86% 이상, 87% 이상, 88% 이상, 89% 이상, 90% 이상, 91 % 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상과 같이 언급될 수 있다. 특히, 관심 폴리펩타이드 및 레퍼런스 폴리펩타이드가 레퍼런스 폴리펩타이드의 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 이상의 아미노산의 연속적 스트레치 또는 레퍼런스 폴리펩타이드의 전체 길이에 대해 지시된 시퀀스 동일성을 나타낸다.

[0093] 생물학 분야에서 통상적으로 사용되는 용어인 "특이적인 결합"은 비-표적 조직에 비해 상대적으로 높은 친화력으로 표적에 결합하는 분자를 말하며, 일반적으로 정전기적 상호작용, 반데르발스 상호작용, 수소결합 등과 같

은 다수의 비공유 상호작용을 포함한다. 특이적인 결합 상호작용은 항체-항원 결합, 효소-기질 결합, 및 특정 단백질-수용체 상호작용을 규정하며, 한편 분자는 때때로 특정 표적 이외의 조직에도 결합할 수 있는데, 그러한 비-표적 결합은 사소한 정도에 불과하며, 이 경우 높은 친화도 결합 쌍은 특이적인 결합의 정의에 여전히 속한다.

[0094] 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 포유동물에서 질병 또는 질환의 임의의 치료를 의미하며, 다음을 포함한다:

[0095] 질병 또는 질환에 대한 예방 또는 방지, 즉 임상적 증상이 발달되지(develop) 않도록 하는 것;

[0096] 질병 또는 질환의 억제, 즉 임상적 증상의 발달을 저지 또는 억제하는 것; 및/또는

[0097] 질병 또는 질환을 완화, 즉 임상적 증상을 퇴행시키는 것.

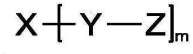
[0098] 용어 "원치않는 면역반응"은 주어진 상황에서 바람직하지 않은 개체의 면역시스템에 의한 반응을 가리킨다. 면역시스템의 반응은, 만일 그러한 반응이 질병 또는 질환의 예방, 감소, 또는 치료에 이르게 하는 것이 아니라 질병 또는 질환을 유발하거나 촉진시키거나 악화시키는 것이라면, 이는 원치않는 것이다. 일반적으로, 면역시스템의 반응은, 만일 이것이 부적절한 표적에 대해 유도된다면, 질병을 유발하거나 촉진시키거나 악화시키게 된다. 예컨대, 원치않는 면역반응은 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환 및 알러지 또는 과민성을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0099] 용어 "변종(variant)"은 단백질에 대해 길이, 시퀀스 또는 구조에 있어서 하나 이상 변화에 의해 유도되어 달라진 단백질로서 이해된다. 또한 단백질 변종이 유도된 폴리펩타이드는 페어런트 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드로서 알려져 있다. 용어 "변종"은 페어런트 분자의 "프래그먼트" 또는 "유도체"를 포함한다. 일반적으로, "프래그먼트"는 페어런트 분자보다 길이나 사이즈에 있어서 더 작고, 반면 "유도체"는 페어런트 분자에 비해 그 시퀀스 또는 구조에서 하나 이상의 차이점을 나타낸다. 또한, 전사후 변형된 단백질(예컨대, 글리코실화된 단백질, 포스포릴화된 단백질, 유비퀴틴화된(ubiquitinated) 단백질, 팔미토일화된 단밸질, 또는 단백질분해로 절단된 단백질) 및 메틸화된 DNA와 같은 변형된 핵산 등의 변형된 분자를 포괄하나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, RNA-DNA 하이브리드와 같은 상이한 분자의 혼합물은 "변종"라는 용어에 의해 포괄되나 이에 한정되는 것은 아니다. 자연 발생적인 변종 및 인위적으로 만들어진 변종은 본원에서 사용되는 "변종"이라는 용어에 의해 포괄되는 것으로 이해된다. 나아가, 본원에서 사용되는 변종은 또한 페어런트 분자의 호모로그, 오르토로그 또는 파라로그로부터 유도될 수 있거나 인위적으로 구성된 변종으로부터 유도될 수 있으며, 상기 변종은 페어런트 분자의 하나 이상의 생물학적 활성을 나타내는데, 즉 기능적으로 활성이 있다. 변종은 그것이 유도되는 페어런트 폴리펩타이드와 일정한 정도의 시퀀스 동일성에 의해 특징지어질 수 있다. 더욱 명확하게는, 본원의 단백질 변종은 그 페어런트 폴리펩타이드에 80% 이상의 시퀀스 동일성을 나타낼 수 있다. 바람직하게는, 단백질 변종의 시퀀스 동일성은 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 그 이상의 아미노산의 연속적 스트레치에 대한 것이다.

[0100] 조성물

[0101] 본원의 일 양태는 하기 화학식 1로 나타내는 화합물의 조성물, 약제학적 제제, 및 상기 조성물을 사용한 치료방법에 관한 것이다:

[0102] 화학식 1

[0103] 

[0104] 상기 식에서,

[0105] m은 약 1 내지 100, 특히 약 1 내지 20, 및 보다 특히 1 내지 약 10의 정수이고;

[0106] X는 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 항원 모이어티, 특히 외래 항원 또는 셀프항원, 또는 그러한 항원 모이어티의 면역관용성 부분(예컨대, 프래그먼트 또는 에피토프)을 포함하거나,

[0107] Y는 링커 모이어티(linker moiety) 또는 직접결합, 또는 X에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트, 펩타이드, 또는 기타 리간드를 포함하고,

[0108] Z는 간-타겟팅 모이어티, 특히 갈락토실화 모이어티를 포함한다.

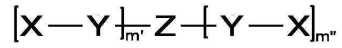
[0109] 화학식 1에서 m 값은 X의 성질에 의존하며, 이는 각 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 링커나 갈락토

실화 모이어티가 결합하는 사이트의 개개의 수와 밀도를 가지기 때문이다. 제한된 수의 상기 사이트를 갖는 항원은 예컨대 N 또는 C 말단에서 리신 또는 시스테인 잔기를 부가함으로써 (선택적으로 절단가능한 링커, 특히 면역프로테오솜 절단 부위를 갖는 링커를 경유하여) 유도체화될 수 있다. 일반적으로, 간 세포에 의한 업테이크를 촉진하기 위해 화학식 1의 조성물에서 적당한 정도의 갈락토실화를 제공하는 것이 바람직하다. 본원의 약제학적 제제 및 방법은 다른 X 모이어티들(예컨대, 특정의 원치않는 면역반응과 연관된 여러 에피토프들)을 각각 갖는 화학식 1의 조성물의 칵테일을 사용할 수 있다.

[0110] 화학식 1의 조성물은, 반응식과 관련하여 하기 기재된 화학식 1a 내지 1p로 나타낸 바와 같이, X가 이식수용체가 원치않는 면역반응(예컨대, 이식거부)을 나타내는 외래 이식항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 알러지 또는 과민성)을 나타내는 외래 식품, 동물, 식물 또는 환경항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 과민성 및/또는 감소된 치료활성)을 나타내는 외래 치료제, 또는 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 자가면역질환)을 나타내는 셀프항원이고; Y는 화학식 Ya 내지 Yp의 링커이고/이거나; Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민인 서브-제너스(sub-genuses)를 포함한다.

[0111] 본원은 하기 화학식 2로 표시되는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 추가로 제공한다:

[0112] 화학식 2

[0113] 

[0114] 상기 식에서,

[0115] m'는 0 또는 약 1 내지 10의 정수이고, m"는 0 또는 약 1 내지 10의 정수이고, m'+m"의 합은 약 1 내지 10의 정수로서 적어도 1이고;

[0116] X는 항원 모이어티, 특히 환자가 원치않는 면역반응을 나타내는 외래 항원 또는 셀프항원, 또는 그러한 항원 모이어티의 면역관용성 부분(프래그먼트 또는 에피토프)을 포함하고;

[0117] Y는 각각 링커 모이어티 또는 직접결합, 또는 X에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트, 펩타이드 또는 기타 리간드를 포함하고;

[0118] Z는 간-타겟팅 모이어티, 특히 ASGPR-표적화된 항체, ASGPR-표적화된 항체 프래그먼트, ASGPR-표적화된 펩타이드, ASGPR-표적화된 scFv, 또는 기타 ASGPR 리간드이고,

[0119] 상기 조성물은 단리 및 정제를 촉진하는 아미노산 시퀀스를 임의로 포함한다[예컨대, 서열 HHHHHH (SEQ ID NO:1)을 갖는 "His 태그" 또는 "6xHis" 및 부가적인 링커(예컨대, 서열 GGGS (SEQ ID NO:2)를 갖는 "Gly_3Ser")]. m'+m"이 1보다 큰 화학식 2의 조성물에서, X 모이어티는 동일하거나 상이할 수 있고, Y 모이어티는 동일하거나 상이할 수 있다. X가 완전한 단백질(full protein)인 경우 m'+m"의 값은 더 작고(예컨대, 3 또는 그 미만), X가 펩타이드인 경우 더 크다(약 10 이하). 링커 "Y"는 절단부위, 특히 면역프로테오솜 절단부위를 유리하게 포함할 수 있다.

[0120] 화학식 2의 조성물은 X가 이식수용체가 원치않는 면역반응(예컨대, 이식거부)을 나타내는 외래 이식항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 알러지 또는 과민성)을 나타내는 외래 식품, 동물, 식물 또는 환경항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 과민성 및/또는 감소된 치료활성)을 나타내는 외래 치료제, 또는 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 자가면역질환)을 나타내는 셀프항원인 서브-제너스(sub-genuses)를 포함한다.

[0121] 택일적으로, 화학식 1 및/또는 화학식 2의 조성물에서, X는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트, 또는 리간드일 수 있고, 여기서 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환, 과민증 및/또는 알러지에 원인으로서 관여하는 것이다.

[0122] 화학식 2의 조성물은 융합단백질로서 제조될 수 있고 그 제조와 정제에 유용한 여러 구성요소들을 포함할 수 있는데, 예컨대 발현된 폴리펩타이드를 특정 수송경로로 유도하는 시그널 또는 리더 시퀀스(signal or leader sequence)로서, 그 후 폴리펩타이트로부터 절단되므로 상기 시그널 시퀀스는 발현된 단백질 및 이를 인코딩하는 DNA의 부분일 수 있으나 최종 조성물의 부분은 아니다. 발현 시스템에 사용되는 포유동물의 시그널 시퀀스의 예는 lg κ-체인 시퀀스이고, 이는 단백질 분비를 유도한다: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO:3). 유사하게, 발현 시스템에 사용되는 통상의 박테리아 시그널 시퀀스의 예는 pelB 시그널 시퀀스이고, 이는 박테리아 원형질막 공간(periplasm)으로 발현된 단백질을 유도한다: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO:4).

[0123] 항원

[0124] 화학식 1 및/또는 화학식 2의 조성물에서 X로 표시되는 항원은 단백질 또는 펩타이드일 수 있고, 예컨대 항원은 완전한 또는 부분 치료제, 완전장(full-length) 이식 단백질 또는 그 펩타이드, 완전장 자가항원(autoantigen) 또는 그 펩타이드, 완전장 알러지항원(allergen) 또는 그 펩타이드, 및/또는 핵산, 또는 상기 언급된 항원의 유사체(mimetic)일 수 있다.

[0125] 본원에서 사용되는 항원은 하기의 하나 이상일 수 있다:

[0126] ● 항체 프래그먼트, 및 항체와 항체 프래그먼트의 융합 단백질을 포함하는, 단백질, 펩타이드, 항체 및 항체유사 분자인 치료제. 이들은 인간 단백질, 비-인간(예컨대, 마우스) 단백질 및 비-자연적인(예컨대, 제조된) 단백질, 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 비-항체 결합 스캐폴드, 예컨대 피브로넥틴, DARPins, 크노틴(knottins) 등을 포함한다.

[0127] ● 이식수용체가 원치않는 면역반응을 나타내는 인간 동종이식 항원(allograft transplantation antigen).

[0128] ● 원치않는 자가면역반응을 일으키는 셀프항원. 당업자는 셀프항원이 자가면역질환 환자에서 내인성 기원인 것에 반하여, 본원 조성물에 사용되는 폴리펩타이드는 일반적으로 외인성으로 합성된 것임을 이해할 것이다(기원으로부터 정제 및 농축된 것과 대조적으로).

[0129] ● 환자가 원치않는 면역반응을 경험하는 외래 항원(예컨대, 식품, 동물, 식물 및 환경항원). 당업자는 치료적 단백질 역시 그 외래 기원성에 기인하여 외래 항원으로 인식될 수 있는 반면, 본원에서 기재의 명확성을 위해 그러한 치료제는 별개의 그룹으로 기술된다는 것을 이해할 것이다. 유사하게, 식물 또는 동물 항원은 먹을 수 있어 식품 항원으로 간주될 수 있고, 환경항원은 식물로부터 유래될 수 있다. 그러나, 이들은 모두 외래 항원이다. 당업자는 본원의 조성물에 사용될 수 있는 항원을, 특히 상세한 설명 및 실시예에 비추어, 이해할 수 있을 것이므로, 단순화를 위해 중복되는 그룹을 별도로 구별하고 정의하지 않았다.

[0130] 항원은 완전 단백질(complete protein), 완전 단백질의 일부분, 펩타이드 등일 수 있고/있거나, 링커 및/또는 갈락토실화 모이어티에 결합(attachment)하기 위해 (상기 논의된 바와 같이) 유도체화 될 수 있고/있거나, 변종일 수 있고/있거나, 특히 시퀀스 동일성을 유지하면서 보존적 치환을 포함할 수 있고/있거나, 탈시알릴화될 수 있다.

[0131] 항원이 치료 단백질, 펩타이드, 항체 또는 항체-유사 분자인 양태에서, 특정 항원은 하기로부터 선택될 수 있다: 아바타셉트(Abatacept), 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아데노신 디아미나제(Adenosine deaminase), 아도-트라스투주맙 엠탄신((Ado-trastuzumab emtansine), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루세라제(Alglucerase), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), α-1-프로테이나제 억제제(α-1-proteinase inhibitor), 아나킨라(Anakinra), 아니스트렙라제(Anistreplase, 아니소일레이티드 플라스미노겐 스트렙토키나제 액티베이터 컴플렉스(anisoylated plasminogen streptokinase activator complex)), 안티트롬빈 III(Antithrombin III), 안티티모사이트 글로불린(Antithymocyte globulin), 아텝라제(Ateplase), 베바시주맙(Bevacizumab), 비발리루딘(Bivalirudin), 보툴리눔 톡신 타입 A(Botulinum toxin type A), 보툴리눔 톡신 타입 B(Botulinum toxin type B), C1-에스테라제 억제제(C1-esterase inhibitor), 카나키누맙(Canakinumab), 카르복시펩티다제 G2(Carboxypeptidase G2, 글루카르피다제(Glucarpidase) 및 보락사제(Voraxaze), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol), 세툭시맙(Cetuximab), 콜라게나제(Collagenase), 크로탈리다에 이뮨 팹(Crotalidae immune Fab), 다르베포에틴-α(Darbepoetin-α), 데노수맙(Denosumab), 디곡신 이뮨 팹(Digoxin immune Fab), 도르나제 알파(Dornase alfa), 에쿨리주맙(Eculizumab), 에타너셉트(Etanercept), 인자 VIIa(Factor VIIa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인자 XI(Factor XI), 인자 XIII(Factor XIII), 피브리노겐(Fibrinogen), 필그라스팀(Filgrastim), 갈설파제(Galsulfase), 골리무맙(Golimumab), 히스테린 아세테이트(Histrelin acetate), 히알루로니다제(Hyaluronidase), 이두르설파제(Idursulphase), 이미글루세라제(Imiglucerase), 인플릭시맙(Infliximab), 인슐린(Insulin) [재조합 인간 인슐린(recombinant human insulin, "rHu 인슐린") 및 소 인슐린(bovine insulin)을 포함함], 인터페론-α2a(Interferon-α2a), 인터페론-α2b(Interferon-α2b), 인터페론-β1a(Interferon-β1a), 인터페론-β1b(Interferon-β1b), 인터페론-γ1b(Interferon-γ1b), 이필리무맙(Ipilimumab), L-아르기나제(L-arginase), L-아스파라지나제(L-asparaginase), L-메티오나제(L-methionase), 락타제(Lactase), 라로니다제(Laronidase), 레피루딘/히루딘(Lepirudin/hirudin), 메카세르민(Mecasermin), 메카세르민 린파베이트(Mecasermin rinfabate), 메톡시 나탈리주맙(Methoxy Natalizumab), 옥트레오타이드

(Octreotide), 오파투무맙(Ofatumumab), 오프렐베킨(Oprelvekin), 판크레아틱 아밀라제(Pancreatic amylase), 판크레아틱 리파제(Pancreatic lipase), 파파인(Papain), 페그-아스파라지나제(Peg-asparaginase), 페그-독소루비신 HCl(Peg-doxorubicin HCl), PEG-에포에틴-β(PEG-epoetin-β), 페그필그라스팀(Pegfilgrastim), 페그-인터페론-α2a(Peg-Interferon-α2a), 페그-인터페론-α2b(Peg-Interferon-α2b), 페글로티카제(Pegloticase), 페그비소만트(Pegvisomant), 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 프로테인 C(Protein C), 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase)), 사크로시다제(Sacrosidase), 연어 칼시토닌(Salmon calcitonin), 사르그라모스팀(Sargramostim), 스트렙토키나제(Streptokinase), 테넥텝라제(Tenecteplase), 테리파라타이드(Teriparatide), 토실리주맙(Tocilizumab)(아트리주맙(atlizumab)), 트라스투주맙, 타입 1 알파-인터페론(Trastuzumab, Type 1 alpha-interferon), 우스테키누맙(Ustekinumab), vW 인자(vW factor). 치료 단백질은 천연에서 (예컨대, 농축 및 정제되어) 얻어지거나, 예컨대 재조합적으로, 합성되고, 일반적으로 IgG 모노클로널 또는 프래그먼트 또는 융합인 항체 치료제를 포함한다.

[0132] 특정 치료 단백질, 펩타이드, 항체 또는 항체-유사 분자는 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인플릭시맙(Infliximab), 인슐린(rHu 인슐린을 포함함), L-아스파라지나제(L-asparaginase), 라로니다제(Laronidase), 나탈리주맙(Natalizumab), 옥트레오타이드(Octreotide), 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 또는 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase)), 및 일반적으로 IgG 모노클로널 항체를 다양한 형태로 포함한다.

[0133] 또 다른 특정 그룹은 지혈제(인자 VIII 및 IX), 인슐린 (rHu 인슐린을 포함함), 및 비-인간 치료제 우리카아제, PAL 및 아스파라지나제(asparaginase)를 포함한다.

[0134] 혈액학 및 이식에서 원치않는 면역반응은 자가면역 재생불량성 빈혈, 이식거부(일반적으로) 및 이식편 대 숙주질병(Graft vs. Host Disease)(골수이식거부)를 포함한다. 항원이 인간 동종이식 항원인 양태에서, 특정 시퀀스는 하기로부터 선택될 수 있다: 다양한 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 단상형(haplotype) 단백질의 서브유닛(예컨대, 조직 크로스-매칭으로 확인된 공여체/수용체 차이), 및 RhCE, Kell, Kidd, Duffy 및 Ss를 포함한 마이너 블러드 그룹 항원에서 단일-아미노산 다형체. 이러한 조성물은 주어진 공여체/수용체 짝에 대해 개별적으로 제조될 수 있다.

[0135] 항원이 셀프항원인 양태에서, 특정 항원 (및 이들이 연관된 자가면역질환)은 하기로부터 선택될 수 있다:

[0136] ● 유형 1 당뇨병에서, 여러 주요 항원은 확인되었다: 인슐린, 프로인슐린(proinsulin), 프리프로인슐린(preproinsulin), 글루탐산 디카복시라제-65(glutamic acid decarboxylase-65) (GAD-65 또는 글루타메이트 디카복시라제 2), GAD-67, 글루코스-6 포스파타제 2(glucose-6 phosphatase 2)(IGRP 또는 섬(islet)-특이성 글루코스 6 포스파타제 촉매 서브유닛 관련 단백질), 인슐리노마(insulinoma)-연관된 프로테인 2(protein 2) (IA-2), 및 인슐리노마-연관된 프로테인 2β(protein 2β)(ＩA-2β); 기타 항원은 ICA69, ICA12 (SOX-13), 카르복시펩티다제 H(carboxypeptidase H), 이모젠 38(Imogen 38), GLIMA 38, 크로모그라닌-A(chromogranin-A), HSP-60, 카르복시펩티다제 E(caboxypeptidase E), 페리페린(peripherin), 글루코스 트랜스포터 2(glucose transporter 2), 간압-장-췌장/췌장 관련 단백질(hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein), S100β, 아교세포섬유산성단백질(glial fibrillary acidic protein), 재생유전자 II(regenerating gene II), 췌장 십이지장 호메오박스 1(pancreatic duodenal homeobox 1), 근 긴장성 이영양증 키나제(dystrophia myotonica kinase), islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein, 및 SST G-protein coupled receptors 1-5를 포함한다. 인슐린은 셀프항원 및 치료 단백질 항원 모두로서 규정될 수 있다는 점을 주목해야 한다. 예컨대, rHu 인슐린 및 소 인슐린(bovine insulin)은 (원치않는 면역공격의 대상인) 치료 단백질 항원인데 반하여, 내인성 인간 인슐린은 (원치않는 면역공격의 대상인) 셀프항원이다. 내인성 인간 인슐린은 약제학적 조성물에 사용되지 않으므로, 재조합 형태가 본원의 조성물에 사용된다.

[0137] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인적으로 얻어지는 형태를 포함하는 인간 인슐린은 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT P01308):

[0138] MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN (SEQ ID NO:5).

[0139] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인적으로 얻어지는 형태를 포함하는 GAD-65는 하기 시퀀스를 갖는다

(UNIPROT Q05329):

[0140] MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGI GNKLCALLYG DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPC SCSKVDVNYA FLHATDLLPA CDGERPTLAF LQDVMNILLQ YVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA DQPQNLEEIL MHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTA NTNMFTYEIA PVFVLLEYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFS PGGAISNMYA MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH SHFSLKKGAA ALGIGTDSVI LIKCDERGKM IPSDLERRIL EAKQKGFVPF LVSATAGTTV YGAFDPLLAV ADICKKYKIW MHVDAAWGGG LLMSRKHKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV PLQCSALLVR EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSYDTG DKALQCGRHV DVFKLWLMWR AKGTTGFEAH VDKCLELAEY LYNIIKNREG YEMVFDGKPQ HTNVCFWYIP PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA PVIKARMMEY GTTMVSYQPL GDKVNFFRMV ISNPAATHQD IDFLIEEIER LGQDL (SEQ ID NO:6).

[0141] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인적으로 얻어지는 형태를 포함하는 IGRP는 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT QN9QR9):

[0142] MDFLHRNGVLIIQHLQKDYRAYYTFLNFMSNVGDPRNIFFIYFPLCFQFNQTVGTKMIWVAVIGDWLNLIFKWILFGHRPYWWVQETQIYPNHSSPCLEQFP TTCETGPGSPSGHAMGASCVWYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHRLTWSFLWSVFWLIQISVCISRVFIATHFPHQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGIQTASL GTYLKTNLFLFLFAVGFYLLLRVLNIDLLWSVPIAKKWCANPDWIHIDTTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLLSCRGGNNYTLSFRLLCALTSLTILQL YHFLQIPTHEEHLFYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLMKQSGKKSQ (SEQ ID NO:7).

[0143] ● 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis) 및 그레이브 질병(Graves' disease)을 포함한 갑상선 자가면역질환에서, 주요 항원은 티로글로불린(thyroglobuline, TG), 티로이드 퍼옥시다제(TPO) 및 티로트로핀 수용체(TSHR)를 포함하고; 기타 항원은 소듐 요오드 동반수송체(sodium iodide symporter, NIS) 및 메갈린(megalin)을 포함한다. 갑상선-연관 눈병증 및 피부병증에서, TSHR을 포함한 갑상선 자가항원에 추가하여, 항원은 인슐린-유사 성장인자 1 수용체이다. 부갑상선기능저하증(hypoparathyroidism)에서, 주요 항원은 칼슘 민감성 수용체이다.

[0144] ● 애디슨 질병(Addison's Disease)에서, 주요 항원은 21-히드록시라제, 17-히드록시라제 및 P450 측쇄 절단 효소(P450scc)를 포함하고; 기타 항원은 ACTH 수용체, P450c21 및 P450c17을 포함한다.

[0145] ● 조기 난소부전에서, 주요 항원은 FSH 수용체 및 -에놀라제(-enolase)를 포함한다.

[0146] ● 자가면역 뇌하수체염 또는 뇌하수체 자가면역질환에서, 주요 항원은 뇌하수체-특이적인 단백질 인자(pituitary gland-speicific protein factor, PGSF) 1a 및 2이고; 또 다른 항원은 유형 2 요오도티로닌 디요오디나제(type 2 iodothyronine deiodinase)이다.

[0147] ● 다발경화증에서, 주요 항원은 수초 염기성 단백질(myelin basic protein, "MBP"), 수초 올리고덴드로사이트 당단백질(myelin oligodendrocyte glycoprotein, "MOG") 및 수초 프로테오리피드 단백질(myelin proteolipid protein, "PLP")을 포함한다.

[0148] ○ 본원 조성물에서 유용한 외인적으로 얻어지는 형태를 포함하는, MBP는 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT P02686)):

[0149] MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNNGTSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGR EDNTFKDRPSESDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYG SLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPGFGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:8).

[0150] ○ 본원 조성물에서 유용한 외인적으로 얻어지는 형태를 포함하는, MOG는 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT Q16653):

[0151] MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLK DAIGEGKVTLRIRNVRFSDEGGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRV PCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF (SEQ ID NO:9).

[0152] ○ 본원 조성물에서 유용한 외인적으로 얻어지는 형태를 포함하는, PLP는 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT P60201):

[0153] MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFG DYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLERVCHCLGKWLGHPDKFVGITYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTCQSIAFPSKTSASIGSLCADA RMYGVLPWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF (SEQ ID NO:10).

[0154] ○ 다발경화증의 치료를 위한 본원 조성물에 유용한 펩타이드/에피토프는, 화학식 1의 조성물에 개별적으로, 화학식 1의 조성물들의 칵테일에 함께, 또는 화학식 2의 하나 이상의 조성물(들)에 융합되어, 하기 시퀀스의 일부 또는 전부를 포함한다.

[0155] ■ MBP13-32: KYLATASTMDHARHGFLPRH (SEQ ID NO:11);

[0156] ■ MBP83-99: ENPWHFFKNIVTPRTP (SEQ ID NO:12);

[0157] ■ MBP111-129: LSRFSWGAEGQRPGFGYGG (SEQ ID NO:13);

[0158] ■ MBP146-170: AQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:14);

[0159] ■ MOG1-20: GQFRVIGPRHPIRALVGDEV (SEQ ID NO:15);

[0160] ■ MOG35-55: MEVGWYRPPFSRWHLYRNGK (SEQ ID NO:16); 및

[0161] ■ PLP139-154: HCLGKWLGHPDKFVGI (SEQ ID NO:17).

[0162] ● 류마티스 관절염에서, 주요 항원은 피브린/피브리노겐, 비멘틴(vimentin), 콜라겐 I 및 II 및 알파-에놀라제를 포함한, 콜라겐 II, 면역글로불린 결합 단백질, 면역글로불린 G의 프래그먼트 결정화가능 영역(fragment crystallizable region), 2중가닥 DNA, 및 류마티스 관절염 병리학에 관련된 단백질의 천연 및 시트룰린화(cirtullinated) 형태를 포함한다.

[0163] ● 자가면역 위염에서, 주요 항원은 H+, K+-ATPase이다.

[0164] ● 악성 빈혈(pernicious angemis)에서, 주요 항원은 내인성 인자이다.

[0165] ● 셀리악병(celiac disease)에서, 주요 항원은 조직 트랜스글루타미나제(tissue transglutaminase) 및 글루텐 또는 글루텐-유사 단백질(예컨대 알파-, 감마- 및 오메가-글리아딘(gliadin), 글루테닌(glutenin), 호르데인(hordein), 세칼린(secalin), 및 아베닌(avenin))의 천연 또는 탈아미드화된(deamidated) 형태이다. 당업자는, 예컨대 셀리악병의 주요 항원이 알파 글리아딘인 경우, 알파 글리아딘은 알파 글리아딘의 글루타민을 글루탐산으로 전환시키는 조직 글루타미나제에 의해 탈아미드화(deamidation)를 거쳐 체내에서 더 면역원성으로(immunogenic) 된다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 알파 글리아딘이 원래 외래 식품 항원인 경우, 이는 체내에서 보다 면역원성이 되도록 변형되어 셀프항원으로 규정될 수 있다.

[0166] ● 백반증(vitiligo)에서, 주요 항원은 티로시나제 및 티로시나제 관련 단백질 1 및 2이다.

[0167] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인성으로 얻어지는 형태를 포함한, MART1, T 세포 1에 의해 인식되는 멜라노마 항원, 멜란-A(Melan-A)는 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT Q16655):

[0168] MPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEEAAGIGILTVILGVLLLIGCWYCRRRNGYRALMDKSLHVGTQCALTRRCPQEGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPP AYEKLSAEQSPPPYSP (SEQ ID NO:18)

[0169] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인성으로 얻어지는 형태를 포함한, 티로시나제는 하기 시퀀스를 갖는다 (UNIPROT P14679):

[0170] MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGN CKFGFWGPNCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFVWMHYYVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEA PAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDK SRTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFVDSIFEQWLRRHRPLQ EVYPEANAPIGHNRESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSDPDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEE KQPLLMEKEDYHSLYQSHL (SEQ ID NO:19).

[0171] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인성으로 얻어지는 형태를 포함한, 멜라노사이트 단백질 PMEL, gp100은 하기 시퀀스를 갖는다(UNIPROT P40967):

[0172] MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVLPDGQV IWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSS SAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPV PGTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIV VLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAF

ELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVLMAVVLA
SLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV (SEQ ID NO:20).

[0173] ● 중증근육무력증(myasthenia gravis)에서, 주요 항원은 아세틸콜린 수용체이다.

[0174] ● 심상성천포창(pemphigus vulgaris) 및 그 변종에서, 주요 항원은 데스모글레인(desmoglein) 3, 1 및 4이고; 다른 항원은 펨팍신(pemphaxin), 데스모콜린스(desmocollins), 플락코글로빈(plakoglobin), 퍼플락킨(perplakin), 데스모플라킨스(desmoplakins), 및 아세틸콜린 수용체이다.

[0175] ● 수포성유사천포창(bullous pemphigoid)에서, 주요 항원은 BP180 및 BP230이고; 다른 항원은 플렉틴(plectin) 및 라미닌(laminin) 5를 포함한다.

[0176] ● 듀링포진상피부염(dermatitis herpetiformis Duhring)에서, 주요 항원은 엔도미시움(endomysium) 및 조직 트랜스글루타미나제(tissue transglutaminase)를 포함한다.

[0177] ● 후천성표피수포증(epidermolysis bullosa acquisita)에서 주요 항원은 콜라겐 VII이다.

[0178] ● 경피증(systemic sclerosis)에서, 주요 항원은 매트릭스 메탈로프로테이나제(matrix metalloproteinase) 1 및 3, 콜라겐-특이적인 분자 차페론 열-쇼크 단백질 47(collagen-specific molecular chaperone heat-shock protein 47), 피브릴린(fibrillin)-1, 및 PDGF 수용체를 포함하고; 다른 항원은 Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jo1, NAG-2, 센트로미어 단백질(centromere proteins), 토포아이소머라제(topoisomerase) I, 핵소체 단백질(nucleolar proteins), RNA 폴리머라제(polymerase) I, II 및 III, PM-SIc, 피브릴라린(fibrillarin), 및 B23을 포함한다.

[0179] ● 혼합 결합조직병(mixed connective tissue disease)에서, 주요 항원은 UlsnRNP이다.

[0180] ● 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)에서, 주요 항원은 핵항원(nuclear antigen) SS-A 및 SS-B이고; 다른 항원은 포드린(fodrin), 폴리(ADP-리보오스) 폴리머라제 (poly(ADP-ribose) polymerase) 및 토포아이소머라제(topoisomerase), 무스카린 수용체(muscarinic receptors), 및 Fc-감마 수용체 IIIb를 포함한다.

[0181] ● 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus)에서, 주요 항원은 (자가항체(auto-antibodies)가 질병 과정에서 만들어지는) "스미스 항원"(Smith antigen) SS-A를 포함하는 핵단백질(nuclear protein), HMGB1(high mobility group box 1), 뉴클레오솜(nucleosomes), 히스톤 단백질(histone proteins) 및 이중가닥 DNA를 포함한다.

[0182] ● 구드패스츄어 증후군(Goodpasture's syndrome)에서, 주요 항원은 콜라겐 IV를 포함한 사구체기저막 단백질(glomerular basement membrane proteins)을 포함한다.

[0183] ● 류마티스성 심질환(rheumatic heart disease)에서, 주요 항원은 심장 미오신(cardiac myosin)이다.

[0184] ● 자가면역 다내분비성 증후군(autoimmune polyendocrine syndrome) 유형 1에서, 항원은 방향족 L-아미노산 디카복시라제(aromatic L-amino acid decarboxylase), 히스티딘 디카복시라제(histidine decarboxylase), 시스테인 설핀산 디카복시라제(cysteine sulfinic acid decarboxylase), 트립토판 하이드록시라제(tryptophan hydroxylase), 티로신 하이드록시라제(tyrosine hydroxylase), 프페닐알라닌 하이드록시라제(enylalanine hydroxylase), 헤파틱(hepatic) P450 시토크롬(tochromes) P4501A2 및 2A6, SOX-9, SOX-10, 칼슘-센싱 수용체 단백질(calcium-sensing receptor protein), 및 유형 1 인터페론들(interferons)인 인터페론 알파, 베타 및 오메가를 포함한다.

[0185] ● 시속척수염(neuromyelitis optica)에서, 주요 항원은 AQP4이다.

[0186] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인성으로 얻어지는 형태를 포함한, 아쿠아포린-4(aquaporin-4)는 하기 시퀀스를 갖는다(UNIPROT P55087):

[0187] MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMVLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTV
AMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFA
INYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDR
GEEKKGKDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:21).

[0188] ● 포도막염(uveitis)에서, 주요 항원은 레티날 S-항원(Retinal S-antigen) 또는 "S-아레스틴(S-arrestin)" 및 인터포토리셉터 레티노이드 결합 단백질(interphotooreceptor retinoid binding protein, IRBP) 또는 레티놀-

결합 단백질 3(Retinol-binding protein 3)을 포함한다.

[0189] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인성으로 얻어지는 형태를 포함한, S-아레스틴은 하기 시퀀스를 갖는다(UNIPROT P10523):

[0190] MAASGKTSKS EPNHVIFKKI SRDKSVTIYL GNRDYIDHVS QVQPVDGVVL VDPDLVKGKK VYVTLTCAFR YGQEDIDVIG LTFRRDLYFS RVQVYPPVGA ASTPTKLQES LLKKLGSNTY PFLLTFPDYL PCSVMLQPAP QDSGKSCGVD FEVKAFATDS TDAEEDKIPK KSSVRLLIRK VQHAPLEMGP QPRAEAAWQF FMSDKPLHLA VSLNKEIYFH GEPIPVTVTV TNNTEKTVKK IKAFVEQVAN VVLYSSDYYV KPVAMEEAQE KVPPNSTLTK TLTLLPLLAN NRERRGIALD GKIKHEDTNL ASSTIIKEGI DRTVLGILVS YQIKVKLTVS GFLGELTSSE VATEVPFRLM HPQPEDPAKE SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAEEGKRDK NDVDE (SEQ ID NO:22).

[0191] ○ 본원의 조성물에 유용한 외인성으로 얻어지는 형태를 포함한, IRBP는 하기 시퀀스를 갖는다(UNIPROT P10745):

[0192] EELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMFGDGELLTQVSRLLVEHIWKKIMHTDAMIIDMRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQ VVGERYGSKKSMVILTSSVTAGTAEEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTARSVGASDGSSWEGVGVTPHVVVPAEEALARAKEM LQHNQLRVKRSPGLQDHL (SEQ ID NO:23).

[0193] 항원이, 원치않는 면역반응이 나타날 수 있는 외래 항원(예컨대 식품 항원)인 양태에서, 특정 항원은 하기의 것일 수 있다:

[0194] ● 땅콩으로부터: 코나라킨(conarachin) (Ara h 1), 알레르겐(allergen) II (Ara h 2), 아라키스 아글루티닌(arachis agglutinin), 콘글루틴(conglutin) (Ara h 6);

[0195] ○ 코나라킨(conarachin)은, 예컨대 UNIPROT Q6PSU6로 특정되는 시퀀스를 갖는다.

[0196] ● 사과로부터: 31 kda 주요 알레르겐/질병 저항성 단백질 호모로그(31 kda major allergen/disease resistance protein homolog)(Mal d 2), 지질 트랜스퍼 단백질 전구체(lipid transfer protein precursor) (Mal d 3), 주요 알레르겐 Mal d 1.03D(major allergen Mal d 1 .03D) (Mal d 1);

[0197] ● 우유로부터: α-락트알부민(ALA), 락토트랜스페린(lactotransferrin);

[0198] ● 키위로부터: 악티니딘(actinidin (Act c 1, Act d 1), 피토시스타틴(phytocystatin), 타우마틴-유사 단백질(thaumatin-like protein)(Act d 2), 키웰린(Act d 5);

[0199] ● 난백(egg whites)으로부터: 오보뮤코이드(ovomucoid), 오브알부민(ovalbumin), 오보트랜스페린(ovotransferrin), 및 라이소자임(lysozyme);

[0200] ● 난황(egg yolks)으로부터: 리베틴(livetin), 아포비틸린(apovitillin), 및 보스베틴(vosvetin);

[0201] ● 겨자(mustard)로부터: 2S 알부민(Sin a 1), 11S 글로불린 (Sin a 2), 지질 트랜스퍼 단백질(lipid transfer protein) (Sin a 3), 프로필린(profilin)(Sin a 4);

[0202] ● 셀러리로부터: 프로필린(profilin)(Api g 4), 고분자량 당단백질(Api g 5);

[0203] ● 새우로부터: 펜 a 1 알레르겐 (Pen a 1), 알레르겐 펜 m 2(Pen m 2), 트로포미오신 패스트 이소폼(tropomyosin fast isoform);

[0204] ● 밀 및/또는 기타 곡물로부터: 고분자량 글루테닌(glutenin), 저분자량 글루테닌, 알파-, 감마- 및 오메가-글리아딘(gliadin), 호르데인(hordein), 세칼린(secalin) 및/또는 아베닌(avenin);

[0205] ○ 셀리악병(Celiac Disease)을 치료하기 위한 본원의 조성물에 유용한 펩타이드/에피토프는, 화학식 1의 조성물에 개별적으로, 화학식 1의 조성물들의 칵테일에서 함께, 또는 화학식 2의 하나 이상의 조성물(들)에 융합되어, 하기 시퀀스의 몇몇 또는 전부를 포함한다:

[0206] ■ DQ-2 관련, 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) "33-mer" 네이티브(native):

[0207] LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:24)

[0208] ■ DQ-2 관련, 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) "33-mer" 디아미데이티드(deamidated):

[0209] LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF (SEQ ID NO:25)

[0210] ■ DQ-8 관련, 알파-글리아딘(Alpha-gliadin):

[0211] QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:26)

[0212] ■ DQ-8 관련, 오메가-글리아딘(Omega-gliadin)(밀, U5UA46):

[0213] QPFPQPEQPFPW (SEQ ID NO:27)

[0214] ● 딸기로부터: 주요 딸기 알러지 Fra a 1-E(major strawberry allergy Fra a 1 -E)(Fra a 1); 및

[0215] ● 바나나로부터: 프로필린(profilin)(Mus xp 1).

[0216] 항원이 원치않는 면역반응이 나타나는 외래 항원, 예컨대 동물, 식물 및 환경항원인 양태에서, 특정 항원은 예컨대 마우스, 개, 말, 벌, 먼지, 나무 및 미역취(goldenrod)일 수 있고 하기로부터 유도되는 하기 단백질 또는 펩타이드일 수 있다:

[0217] ● 잡초(돼지풀 알레르겐 amb a 1, 2, 3, 5, 및 6 및 Amb t 5; 명아주 Che a 2 및 5; 및 기타 잡초 알레르겐 Par j 1, 2, 및 3, 및 Par o 1을 포함함);

[0218] ● 잔디(주요 알레르겐 Cyn d 1, 7 및 12; Dac g 1, 2 및 5; Hol I 1.01203; Lol p 1, 2, 3, 5 및 11; Mer a 1; Pha a 1; Poa p 1 및 5를 포함함);

[0219] ● 돼지풀 및 기타 잡초로부터의 꽃가루(소리쟁이(curly dock), 명아주(lambs quarters), 명아주(pigweed), 플랜틴(plantain), 애기수영(sheep sorrel) 및 산쑥(sagebrush)을 포함함), 잔디(버뮤다, 존슨, 켄터키, 오차드, 향기풀(Sweet vernal) 및 티모시 잔디를 포함함), 및 나무(개오동나무, 느릅나무, 히커리, 올리브, 피칸, 플라타너스(sycamore) 및 월넛을 포함함);

[0220] ● 먼지(하기의 주요 알레르겐을 포함함: 집먼지진드기 종(Dermatophagoides pteronyssinus)으로부터, 예컨대 Der p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 20, 21 및 23; 집먼지진드기 종(Dermatophagoides pteronyssinus)으로부터, 예컨대 Der f 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 22 및 24; 열대진드기 종(Blomia tropicalis)으로부터, 예컨대 Blo t 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19 및 21; 주름먼지진드기(Euroglyphus maynei)로부터 알레르겐 Eur m 2; 긴털가루진드기(Tyrophagus putrescentiae)로부터의 알레르겐 Tyr p 13; 및 바퀴벌레로부터의 알레르겐 Bla g 1, 2, 및 4; Per a 1, 3, 및 7);

[0221] ● 애완동물(고양이, 개, 쥐 및 농장동물을 포함함; 주요 고양이 알레르겐은 Fel d 1 내지 8, cat IgA, BLa g 2, 및 고양이 알부민을 포함함; 주요 개 알레르겐은 Can f 1 내지 6, 및 개 알부민을 포함함);

[0222] ● 벌침(bee stings): 주요 알레르겐 Api m 1 내지 12를 포함함; 및

[0223] ● 곰팡이: 아스페르길루스(*Aspergillus*) 및 페니실리움(*Penicillium*) 종, 알타나리아 알타나타(*Alternaria alternata*), 다비디엘라 타시아나(*Davidiella tassiana*) 및 트리코피톤 로브룸(*Trichophyton rubrum*) 종으로부터 유도되는 알레르겐을 포함함.

[0224] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 환자는 원치않는 면역반응을 나타내는 항원을 규명하기 위해 테스트될 수 있고, 단백질, 펩타이드 등은 그 항원에 기초하여 나타날 수 있고 본원의 조성물에서 X로서 포함된다.

[0225] 시알화된(sialated) 항원, 항체, 항체 프래그먼트

[0226] 하기 예들은, 시알릴화(sialylation)가 제거되어 글리코실화(glycosylation)를 남김으로써 ASGPR을 특이적으로 타겟팅하는, 시알릴화(silalylation)를 갖는 항원, 항체 및 항체 프래그먼트들이다: 여포자극 호르몬(follicle stimulating hormone, FSH), 인간 융모성 고나도트로핀(human chorionic gonadotropin, HCG), 황체형성 호르몬(luteinizing hormone, LH), 오스테오폰틴(osteopontin), 갑상선자극 호르몬(thyroid stimulating hormone, TSH), 아갈시다제 알파(agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(agalsidase beta)(FABRAZYME®; Genzyme), 에포에틴 알파(epoetin alfa) 및 에포에틴 베타(epoetin beta), 폴리트로핀 알파(follitropin alfa)(GONAL-F®; Merck/Serono) 및 폴리트로핀 베타(follitropin beta)(FOLLISTIM®; Schering-Plough), 인슐린성장인자결합단백질 6(insulin growth factor binding protein 6, IGFBP-6), 루트로핀 알파(lutropin alfa)(LUVERIS®; Merck/Serono), 형질전환성장인자 β1(transforming growth factor β1), 안티트롬빈(ATryn®/TROMBATE-III®; Genzyme/Talecris Biotherapeutics), 티오트로핀 알파(thyrotropin alfa)(THYROGEN®; Genzyme), 레노그라스팀(lenograstim), 사르그라모스팀(sargramostim)(LEUKINE®; Genzyme), 인터루킨-3(interleukin-3), 프로우로키나제(prourokinase), 림포톡신(lymphotoxin), C1-에스테라제 억제제(C1-esterase inhibitor)(Berinert®;

CSL), IgG-유사 항체, 인터페론 베타, 응집인자 VIIa(coagulation factor VIIa)(NOVOSEVEN®; Novo Nordisk), 응집인자 VIII(coagulation factor VIII)(모록토코그 알파(moroctocog alfa)), 응집인자 IX(coagulation factor IX)(노나코그 알파(nonacog alfa))(BENEFIX®; Wyeth), 및 p55 종양괴사수용체 융합단백질(p55 tumor necrosis receptor fusion protein). (문헌 [Byrne et al., Drug Discovery Today, Vol 12, No. 7/8, pages 319-326, Apr. 2007] 및 [Sola et al., BioDrugs. 2010; 24(1): 9-21] 참조). 과당화(hyperglycosylation)되어 헤파토사이트-ASGPR 타겟팅을 위해 탈시알릴화될 수 있는 약제학적 관련 단백질은 하기를 포함한다: 인터페론 알파(interferon alfa) 및 감마(interferon gamma), 황체형성호르몬(luteinizing hormone), Fv 항체 프래그먼트, 아스파라지나제(asparaginase), 콜리네스테라제(cholinesterase), 다르베포에틴 알파(darbepoetin alfa)(AraNESP®; Amgen), 트롬보포이에틴(trombopoietin), 렙틴(leptin), FSH, IFN-α2, 혈청 알부민(serum albumin), 및 코리폴리트로핀 알파(corifollitropin alfa).

[0227] 박테리아 또는 효모에서 생산되는 단백질(예컨대, 아르기나제, 몇몇 인슐린 및 우리카아제)을 포함한, 말단이 통상적으로 시알산이 아닌 글리칸을 갖는 단백질은 탈시알릴화되지 않을 것이다.

[0228] 당업자는 UNIPROT와 같은 공지공용의 참조문헌이, 모두는 아닐지라도 대부분의 관심 항원, 항체, 항체 프래그먼트, 및 리간드에서 탈시알릴화를 위한 위치의 존재 및 그 위치를 개시한다는 것을 이해할 것이다.

[0229] 항체 및 펩타이드 리간드

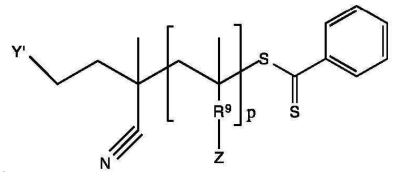
[0230] 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드를 사용하는 양태에서, 그러한 모이어티는 표적화된 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 특이적으로 결합하도록 선택되고, 타겟팅 모이어티와의 부가물일 수 있는 순환하는 표적화된 모이어티는 간 업테이크(hepatic uptake)에 이르고, 궁극적으로 순환하는 표적화된 모이어티는 클리어런스 및 불활성화에 이르게 된다. 예컨대, 간-표적화된 인자 VIII(Factor VIII)은 순환하는 인자 VIII(Factor VIII) 항체에 결합하고 이를 제거할 것이다. 그러한 모이어티의 규명(identification) 절차는 당업자에게 익숙할 것이다.

[0231] 링커

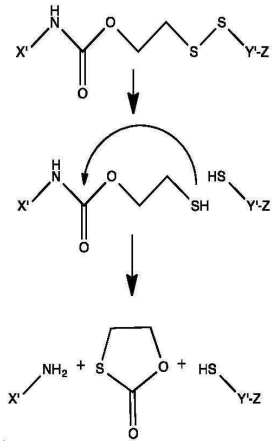
[0232] 본원 조성물에 사용되는 링커(화학식 1에서 "Y")는 N-하이드록시숙신아미딜 링커, 말레이미드(malaemide) 링커, 비닐설폰 링커, 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜) 링커, 피리딜 다이-티올 링커, n-니트로페닐 카보네이트 링커, NHS-에스테르 링커, 니트로페녹시 폴리(에틸렌 글리콜)에스테르 링커 등을 포함할 수 있다.

[0233] 링커인 화학식 Y'-CMP의 특정 기의 한 양태는 하기와 같고, 여기서 Y'는 링커의 잔여부분을 의미하고 R^9 및 Z는 정의된 바와 같다. 보다 특히, 화학식 Y'-CMP를 포함하는 링커의 그룹에서, 치환체 R^9는 에틸아세트아미도기이고, 보다 더 특히 에틸아세트아미도는 N-아세틸갈락토사민의 C1과 접합된다.

[0234] 화학식 Y'-CMP

[0235] 

[0236] 다이-티올-함유 링커, 특히 다이설파닐에틸 카바메이트-함유 링커(X를 자유아민(free amine)으로 포함하는 경우 상기로 명명되고, 반면 자유아민을 포함하지 않는 경우 "다이설파닐 에틸 에스터"로 명명됨)는 특히 본원 조성물에서 유용한데, 이는, 예컨대 아래 도시된 바와 같이, 일단 세포 내에서는 절단되어 원래 형태(original form)의 항원을 유리할 수 있기 때문이다(하기에서, Y'는 링커의 잔여부분을 의미하고 X' 및 Z는 정의된 바와 같다.



[0237]

[0238] 특히, 화학식 Ya 내지 Yp에서 하기 도시된 링커와 관련하여:

[0239] 좌측 괄호 "("는 X와 Y 사이의 결합을 나타내고;

[0240] 우측 또는 하측 괄호 ")"는 Y와 Z 사이의 결합을 나타내고;

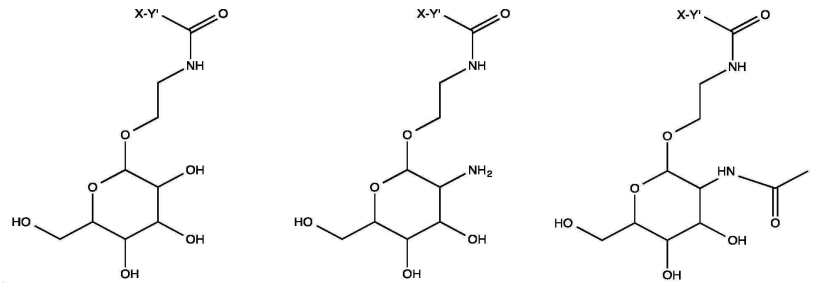
[0241] n은 약 1 내지 100, 특히 약 8 내지 90(예컨대, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 또는 95), 보다 특히 약 40 내지 80(예컨대, 39, 40, 43, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 55, 57, 60, 62, 65, 66, 68, 70, 73, 75, 78, 80 또는 81)개의 에틸렌 글리콜기를 포함하는 혼합물을 나타내는 정수이고, 여기서 상기 혼합물은 일반적으로 n±10%로 특정되는 정수를 포괄한다.

[0242] p는 약 2 내지 150, 특히 약 20 내지 100(예컨대, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 105) 및 더욱 특히 약 30 내지 40(예컨대, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 또는 44)이고, 여기서 상기 혼합물은 일반적으로 p±10%로 특정되는 정수를 포괄한다.

[0243] q는 약 1 내지 44, 특히 약 3 내지 20(예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22), 및 더 특히 약 4 내지 12(예컨대, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13)를 포함하는 혼합물을 나타내는 정수이고, 여기서 상기 혼합물은 일반적으로 q±10%로 특정되는 정수를 포괄한다.

[0244] R^8은 $-CH_2-$("메틸") 또는 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$ ("1 -시아노-1-메틸-프로필" 또는 "CMP")이다.

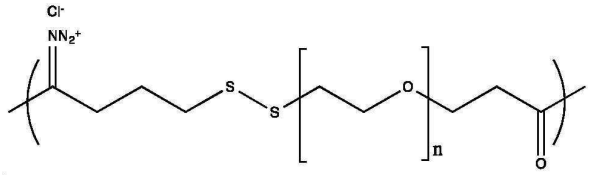
[0245] R^9는, 하기 화학식 1의 구조에 도시된 바와 같이, 직접결합 또는 $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$(에틸아세트아미도기 또는 "EtAcN")(상기 EtAcN 기는 하기 표시된 바와 같고 링커의 나머지는 Y'로서 언급됨)이고:



[0246]

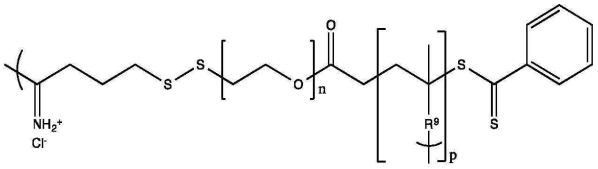
[0247] Z는 C1에서 접합되는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0248] 화학식 Ya



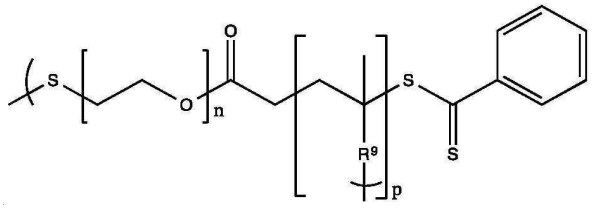
[0249]

[0250] 화학식 Yb



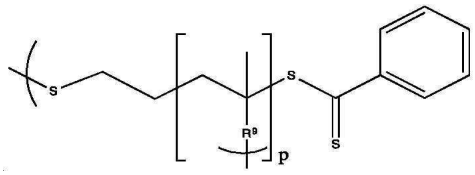
[0251]

[0252] 화학식 Yc



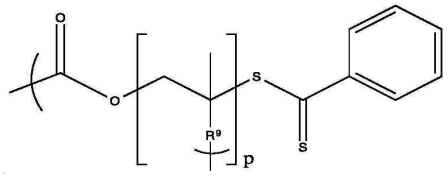
[0253]

[0254] 화학식 Yd



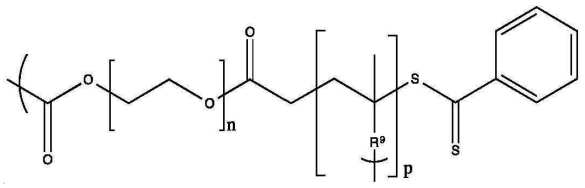
[0255]

[0256] 화학식 Ye



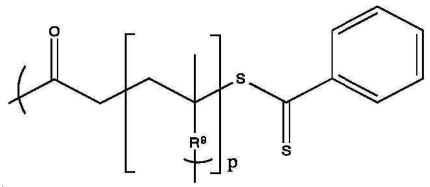
[0257]

[0258] 화학식 Yf



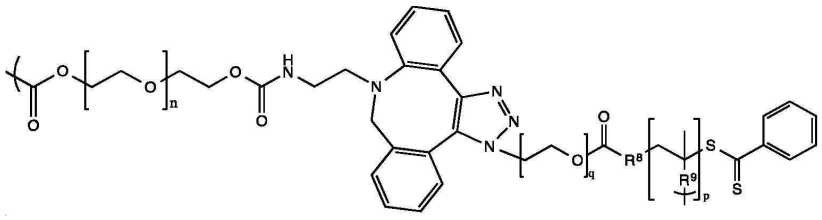
[0259]

[0260] 화학식 Yg



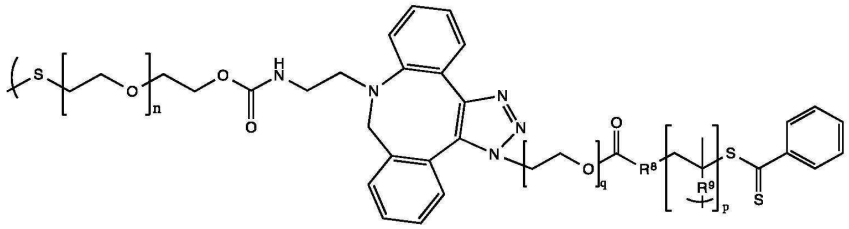
[0261]

[0262] 화학식 Yh



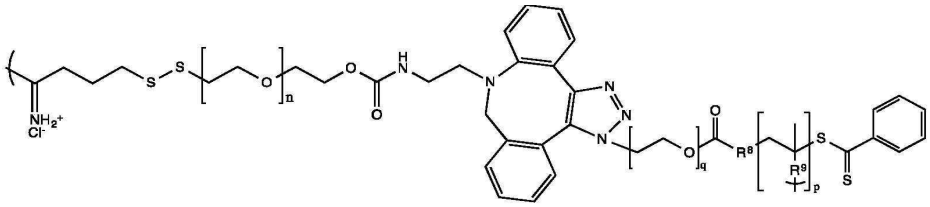
[0263]

[0264] 화학식 Yi



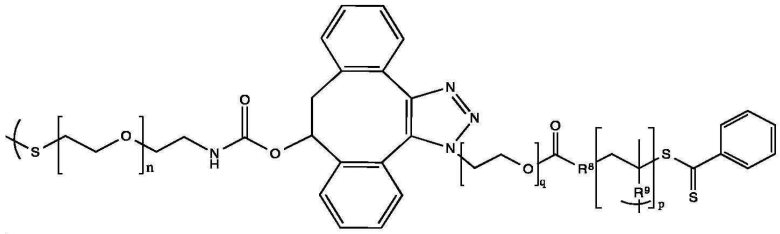
[0265]

[0266] 화학식 Yj



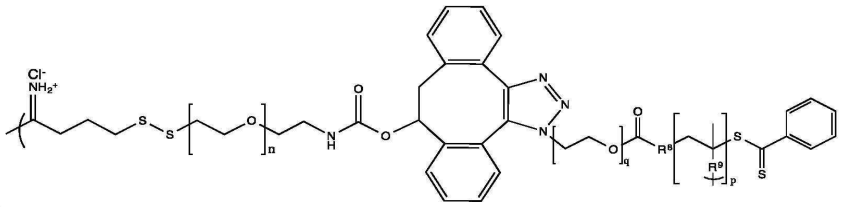
[0267]

[0268] 화학식 Yk



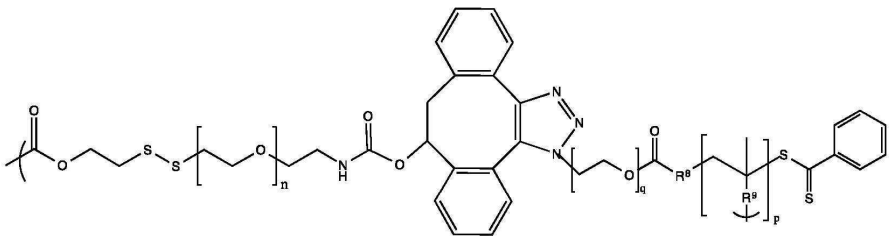
[0269]

[0270] 화학식 YL



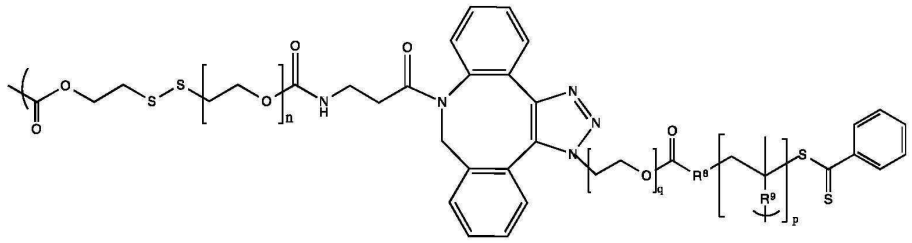
[0271]

[0272] 화학식 Ym



[0273]

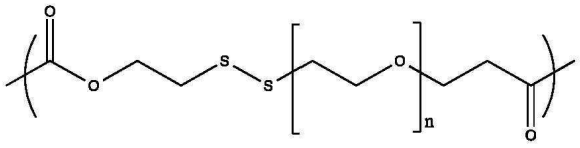
[0274] 화학식 Yn



[0275]

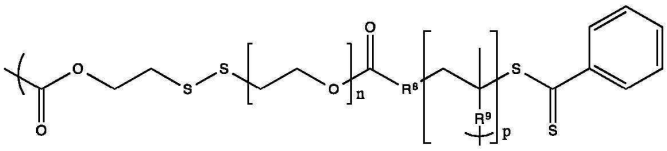
[0276] (화학식 Yn의 링커는, Yn을 소수성 항원에 접합하기에 특히 적합하게 하는 특정 전구체를 경유하여 합성될 수 있다.)

[0277] 화학식 Yo



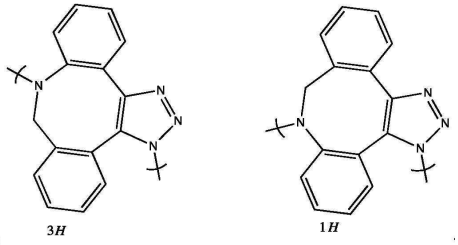
[0278]

[0279] 화학식 Yp



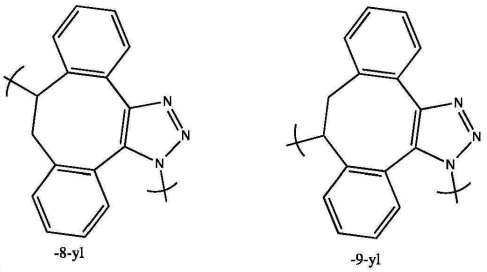
[0280]

[0281] 화학식 Yh 내지 Yn으로 상기 나타낸 링커는 분리없이 사용되는 이성질체로서 합성된다. 예컨대, 화학식 Yh, Yi, Yj 및 Yn의 링커는 하기 도시된 8,9-다이하이드로-1H-다이벤조[b,f][1,2,3]트리아졸로[4,5-d]아조신-8일 및 8,9-다이하이드로-3H-다이벤조[b,f][1,2,3]트리아졸로[4,5-d]아조신-8-일 구조의 혼합물일 것이다.



[0282]

[0283] 화학식 Yk, YL 및 Ym의 링커는 하기 도시된 8,9-다이하이드로-1H-다이벤조[3,4:7,8]사이클로옥타[1,2-d][1,2,3]트리아졸-8-일 및 8,9-다이하이드로-1H-다이벤조[3,4:7,8]사이클로옥타[1,2-d][1,2,3]트리아졸-9-일 구조의 혼합물일 것이다.



[0284]

[0285] 이러한 이성질체 혼합물의 존재는 그러한 링커를 사용하는 조성물의 기능을 손상시키지 않는다.

[0286] 갈락토실화 모이어티

[0287] 본원의 조성물에 사용되는 갈락토실화 모이어티는 조성물을 간 세포에 타겟팅하는데 사용되며(예컨대, 헤파토사

이트에 특이적으로 결합함) 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민으로부터 선택될 수 있다. 갈락토스의 C3/C4-다이올 앵커의 어느 한 쪽을 변형하는 동안 ASGPR 친화력은 유지될 수 있다고 된 바 있고(문헌 [Mamidyala, Sreeman K., et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1978-1981 참조), 따라서 접합 포인트는 특히 C1, C2 및 C6이다.

[0288] 특정 갈락토실화 모이어티는 C1 또는 C6에서 접합되는 갈락토스, C2에서 접합되는 갈락토사민, 및 C6에서 접합되는 N-아세틸갈락토사민을 포함한다. 기타의 특정 갈락토실화 모이어티는 C2에서 접합되는 N-아세틸갈락토사민, 보다 특히 CH_2인 R^9 치환체를 포함하는 링커에 접합된 것이다. 또, 특히 기타 갈락토실화 모이어티는 C1에 접합되는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민을 포함하고, 보다 특히 에틸아세트아미도기인 R^9 치환체를 포함하는 링커에 접합된 것이다.

[0289] ASGPR 타겟팅 항체

[0290] 본원 조성물에 사용되는 ASGPR-특이적 항체는 본원 조성물을 간 세포로 타겟팅하는데 사용되고 상업적으로 입수 가능한 제품, 예컨대 아브캄 피엘씨 사(Abcam plc, 영국 캠브리지 소재)의 안티-아시알로당단백질 수용체 1 항체(Anti-Asialoglycoprotein Receptor 1 antibody) (ab42488) 및 산타크루즈 바이오테크놀로지 인크 사(Santa Cruz Biotechnology, Inc., 텍사스 달라스 소재)의 ASGPR1 /2 (FL-291) (sc28977)로부터 선택될 수 있다. 택일적으로, 이러한 항체는 다양한 공지의 시퀀스, 예컨대 하기 싱글-도메인 안티-ASGPR 항체인 Dom26h-196-61, 또는 보존적 치환을 갖는 시퀀스를 사용하여 발현될 수 있다:

[0291] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRH EHTRFDSWGQGTLVTVSS (SEQ.ID.No:6)

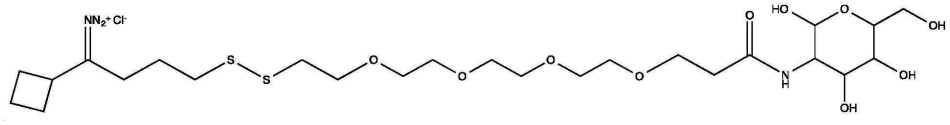
[0292] (문헌 [Coulstock E, et al., (2013) "Liver-targeting of interferon-alpha with tissue-specific domain antibodies." PLoS One. 8(2):e57263] 및 미국특허출원공개 제2013/0078216호 참조).

[0293] 상기 언급된 미국특허출원은 간 질환의 치료를 위해 특정 치료제 [인터페론(인터페론 알파 2, 인터페론 알파 5, 인터페론 알파 6 또는 컨센서스 인터페론(consensus interferon), 리바비린(Ribavirin), 넥사바/소라페닙(Nexavar/Sorafenib), 에르비투스/세툭시맙(Erbitus/Cetuximab), 아바스타틴/베바시주맙(Avastatin/bevacizumab), 및 허셉틴/트라스투주맙(Herceptin/trastuzumab)을 포함함]를 송달하기 위한 Dom26h-196-61과 같은 간-타겟팅 분자를 개시한다. 미국특허출원공개 제2013/0078216호에 기술된 Dom26h-196-61 또는 다른 간-타겟팅 분자를 사용한 화학식 2에 대응하는 물질의 조성물은 그 범위에 인터페론(인터페론 알파 2, 인터페론 알파 5, 인터페론 알파 6 또는 컨센서스 인터페론(consensus interferon), 리바비린(Ribavirin), 넥사바/소라페닙(Nexavar/Sorafenib), 에르비투스/세툭시맙(Erbitus/Cetuximab), 아바스타틴/베바시주맙(Avastatin/bevacizumab), 및 허셉틴/트라스투주맙(Herceptin/trastuzumab)을 포함하지 않는다.

[0294] ASGPR를 특이적으로 표적하는 항체, 항체 프래그먼트, 또는 펩타이드의 신규한 시퀀스가 당업자에 의해 공지된 다양한 방법을 사용하여 발견될 수 있다. 이러한 방법은 백신화 기술, 하이브리도마 기술, 라이브러리 디스플레이 기술(박테리아 및 파지 플랫폼을 포함함), 내인성 레퍼토리 스크리닝 기술, 유도 진화(directed evolution) 및 합리적인 디자인을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0295] 명명법

[0296] 화학식 1의 조성물은 IUPAC 및 관용명칭의 조합을 사용하여 명명될 수 있다. 예컨대, X가 사이클로부틸 모이어티(예시를 위해 항원을 대신하여 나타냄)이고, Y가 화학식 Ya이고, m이 1이고, n이 4이고 Z가 N-아세틸갈락토사민-2-일인 화학식 1에 해당하는 화합물:

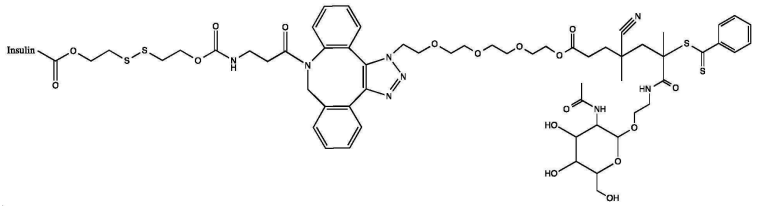
[0297] 

[0298] 은 (Z)-(21-사이클로부틸-1-oxo-1-((2,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아미노)-4,7,10,13-테트라옥사-16,17-다이티아헤니코산-21-일리덴)트리아즈-1-인-2-이움 클로라이드로 명명될 수 있고, 따라서 X가 조직 트랜스글루타미나제(tissue transglutaminase)인 본원에 해당하는 조성물은 (2)-(21-(조직 트랜스글루타미나제)-1-oxo-1-((2,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아미노)-4,7,10,13-테트라옥사-16,17-다이티아헤니코산-21-일리덴)트리아즈-1-인-2-이움 클로라이드로 명명될 수 있

다. X'가 조직 트랜스글루타미나제이고, m이 2이고, n이 4이고 Z'가 N-아세틸갈락토사민-2-일인 본원에 해당하는 조성물은 (3Z)-((조직 트랜스글루타미나제)-1,3-다이일비스(1-옥소-1-((2,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아미노)-4,7,10,13-테트라옥사-16,17-다이티아헤니코산-21-일-21-일리덴))비스(트리아즈-1-인-2-이움) 클로라이드로 명명될 수 있다.

[0299] 단순화를 위해, 화학식 1의 조성물은 X를 참조하고 (반응식에서 도시된 바와 같은) 화학식 1a 내지 1p 중 하나를 참조하되 변수 m, n, p 및/또는 q에 대한 정수와 R^8 및 R^9를 언급하고, 갈락토실화 모이어티 및 이의 접합 위치를 특정함으로써 대체적인 명명 시스템을 사용하여 명명될 수 있다. 이러한 시스템에서, X가 오브알부민이고, m이 2이고, n이 4이고, Z가 N-아세틸갈락토사민-2-일인 화학식 1a의 조성물은 "F1a-OVA-m_2-n_4-2NAcGAL"로 명명될 수 있다.

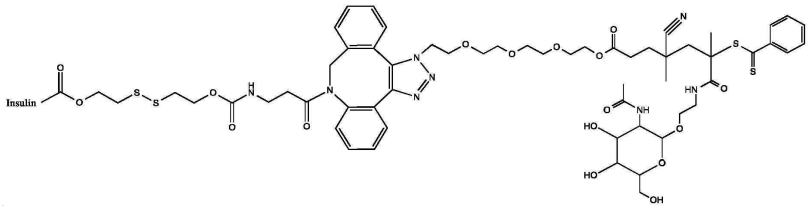
[0300] 유사하게, 하기 화학식 1의 조성물



[0301]

[0302] 은 "2-((2-(((3-(**3-**(22-((3-아세트아미도-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-16-시아노-16,18-다이메틸-13,19-다이옥소-18-((페닐카보노티오일)티오)-3,6,9,12-테트라옥사-20-아자도코실)-**3,9-다이하이드로**-8H-다이벤조[b,f][1,2,3]트리아졸로[4,5-d]아조신-8-일)-3-옥소프로필)카바모일)옥시)에틸)다이설파닐)에틸 인슐린 카르복실레이트"로 명명될 수 있다.

[0303] 이성질체:



[0304]

[0305] 는 "2-((2-(((3-(**1-**(22-((3-아세트아미도-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)-16-시아노-16,18-다이메틸-13,19-다이옥소-18-((페닐카르보노티오일)티오)-3,6,9,12-테트라옥사-20-아자도코실)-**1,9-다이하이드로**-8H-다이벤조[b,f][1,2,3]트리아졸로[4,5-d]아조신-8-일)-3-옥소프로필)카바모일)-옥시)에틸)다이설파닐)에틸 인슐린 카르복실레이트"로 명명될 수 있다(볼드체 하이라이트는 화합물 명칭들 간의 차이점을 보이도록 편의상 추가된 것임). 본원에서 채택된 명명 시스템을 적용하면, 두 이성질체는 "F1n-인슐린-m_1-n_1-p_1-q_4-CMP-EtAcN-1 NAcGAL"으로 명명될 수 있고, 여기서 CMP는 R^8이 1-시아노-1-메틸-프로필임을 가리키고, EtAcN은 R^9가 에틸아세트아미도임을 가리키고, 1NAcGAL는 Z가 C1에서 접합된 N-아세틸갈락토사민임을 가리킨다. Z에 대한 지시기호 앞의 약어 EtAcN의 부재는 R^9가 직접결합임을 가리킨다.

[0306] 화학식 2의 조성물에서, 좌에서 우로의 오리엔테이션이 달리 특정 지시가 없으면 N에서 C로의 방향을 특정하는 것으로 받아들여져서는 안된다. 예컨대, m'이 1이고, m"이 0이고, X가 오브알부민이고, Y가 Gly_3Ser이고 Z가 안티-ASGPR Dom26h-196-61인 화학식 2의 화합물은 OVA-Gly_3Ser-DOM으로 명명될 수 있고, 하기 두 가지 모두를 포함하는 것으로 해석된다:

[0307] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-C

[0308] 및

[0309] N- DOM- Gly_3Ser- OVA- C.

[0310] 예컨대, m'이 1이고, m"이 0이고, X가 오브알부민이고, Y가 Gly_3Ser이고 Z가 안티-ASGPR Dom26h-196-61인(부가

적인 링커를 경유하여 부착된 정제 태그를 가짐) 화학식 2의 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0311] N- OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis -C

[0312] 또는

[0313] N- DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis -C

[0314] 여기서 C' 말단의 Gly_3Ser-6xHis 기는 단리 및 정제를 용이하게 하는 아미노산 시퀀스를 나타낸다.

[0315] m'이 1이고, m"이 1이고, 각각의 X가 인자 VIII이고, 각각의 Y가 Gly_3Ser이고, Z가 안티-ASGPR Dom26h-196-61인 (부가적인 링커를 경유하여 부착된 정제 태그를 가짐) 화학식 2의 조성물은 FVIII-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-FVIII-Gly_3Ser-6xHis로 명명될 수 있고 하기 두 가지를 포함한다:

[0316] N-FVIII-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-FVIII-Gly_3Ser-6xHis-C

[0317] 및

[0318] N-6xHis-Gly_3Ser-FVIII-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-FVIII-C.

[0319] m'이 3이고, m"이 0이고, 3개의 X 항원이 각각 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드(Alpha-gliadin "33-mer" deamidated)(SEQ ID NO:25), 알파-글리아딘(SEQ ID NO:26) 및 오메가-글리아딘(SEQ ID NO:27)이고, 각각의 Y가 면역프로테오솜 절단 부분("IPC")을 갖는 링커이고 Z가 안티-ASGPR Dom26h-196-61인 화학식 2의 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

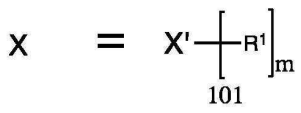
[0320] 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-IPC-알파-글리아딘-IPC-오메가-글리아딘-IPC-DOM.

[0321] 본원의 조성물의 제조

[0322] 화학식 1의 조성물은 예컨대 문헌 [Zhu, L, et al., Bioconjugate Chem. 2010, 21, 2119-2127]에 기술된 방법을 조정하여 제조될 수 있다. 또한, 화학식 1의 특정 조성물의 합성은 반응식 1 내지 14에 관하여 하기에 기술된다. 다른 합성 방법들은 당업자에게 자명할 것이다.

[0323] 하기 화학식 101은 X의 대체적 표현이다:

[0324] 화학식 101

[0325] 

[0326] 상기 식에서, R^1은 링커에 접합이 가능하도록 X의 3차원 구조에 위치한 유리 표면 아미노(-NH_2) 또는 티올(-SH) 모이어티이고, X'는 상기 확인된 유리 아미노기(들)을 제외한 X의 나머지를 나타낸다 [(X"는 유리 티올기(들)을 제외한 X의 나머지를 나타내기 위해 반응식에 사용됨]. X가 무엇인지에 따라, 하나 이상일 것이며(N-말단 아민), m으로 나타난 바와 같이 다중의 R^1 기(주로 리신 잔기 또는 다이설파이드 결합에 관여하지 않는 시스테인 잔기로부터)일 수 있고, m은 약 1 내지 100, 보다 일반적으로 1 또는 약 4 내지 20, 보다 일반적으로 1 내지 약 10이다.

[0327] 반응식에 사용된 변수는 상기 정의된 바와 같고, 부가적으로 하기를 포함하며, 특정 반응식 또는 단계에 관해 달리 특별히 지시가 없는 경우 이러한 의미를 가지는 것으로 이해되어야 한다.

[0328] ● R^2는 OH 또는 보호기이고;

[0329] ● R^3는 OH, NH_2, NHAc, 보호기 또는 NH-보호기이고;

[0330] ● R^4는 OH 또는 보호기이고;

[0331] ● R^5는 OH 또는 보호기이고;

[0332] ● R^6은 OH 또는 보호기이고;

[0333] ● Z'는 C1 또는 C6에 접합된 갈락토스, C2에 접합된 갈락토사민, 또는 C6에 접합된 N-아세틸갈락토사민이고;

[0334] ● R^8은 $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$이고;

[0335] ● R^9는 직접결합이고 Z"는 C2에서 접합된 N-아세틸갈락토사민이고;

[0336] ● R^9는 에틸아세트아미도기이고 Z"는 C1에서 접합된 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0337] 합성반응 파라미터

[0338] 용어 "용매", "비활성 유기용매" 또는 "비활성 용매"는 함께 기술된 반응조건 하에서 비활성인 용매를 의미한다[예컨대, 벤젠, 톨루엔, 아세토니트릴, 테트라하이드로퓨란("THF"), 다이메틸포름아마이드("DMF"), 클로로포름, 메틸렌 클로라이드 (또는 다이클로로메탄), 다이에틸 에테르, 메탄올, 피리딘 등을 포함함]. 달리 특정되지 않는 한, 본원의 반응에서 사용되는 용매는 비활성 유기용매이다.

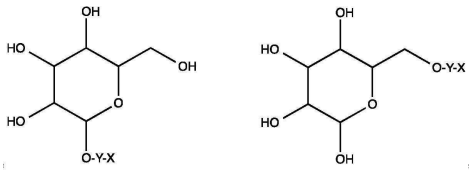
[0339] 용어 "q.s."는 언급된 기능을 달성하기에, 예컨대 용액을 원하는 부피(즉, 100%)로 만들기에, 충분한 양(quantity sufficient)을 더하는 것을 의미한다.

[0340] 본원에 기술된 화합물 및 중간체의 단리 및 정제는, 바람직하게는, 임의의 적절한 분리 또는 정제공정, 예컨대 여과, 추출, 결정화, 컬럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피, 또는 두꺼운 층 크로마토그래피(thick-layer chromatography), 원심크기배제 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피, 재결정화, 승화, 고속단백질 액체 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 이들 공정의 조합에 의해 이루어질 수 있다. 적절한 분리 및 단리 공정은 하기 실시예로서 특정적으로 예시될 수 있다. 그러나, 다른 균등한 분리 또는 단리공정이 또한 당연히 사용될 수 있다.

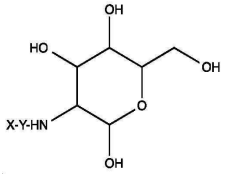
[0341] (실시예를 포함하여 본원에서) 달리 특정되지 않는 한, 모든 반응은 표준 대기압(약 1기압) 및 주위(또는 실내) 온도(약 20℃), 약 pH 7.0-8.0에서 실시된다.

[0342] 반응 생성물의 동정(characterization)은 통상적인 방법, 예컨대 수소 및 탄소 NMR, 질량분석, 크기배제 크로마토그래피, 적외선분광, 겔 전기영동에 의해 이루어질 수 있다.

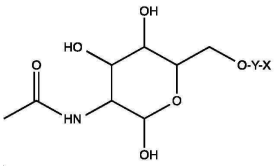
[0343] 반응식 1은 Z가 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민일 수 있는 화학식 1의 조성물의 제조를 예시한다. 이와 관련하여 또 상기 정의된 바와 같이, 반응식 1에서 사용된 Z'는, C1 및 C6에서 접합되고 화학식 1에 따른 하기 구조에 대응하는 갈락토스:

[0344] 

[0345] C2에 접합되고 화학식 1에 따른 하기 구조에 대응하는 갈락토사민: 및

[0346] 

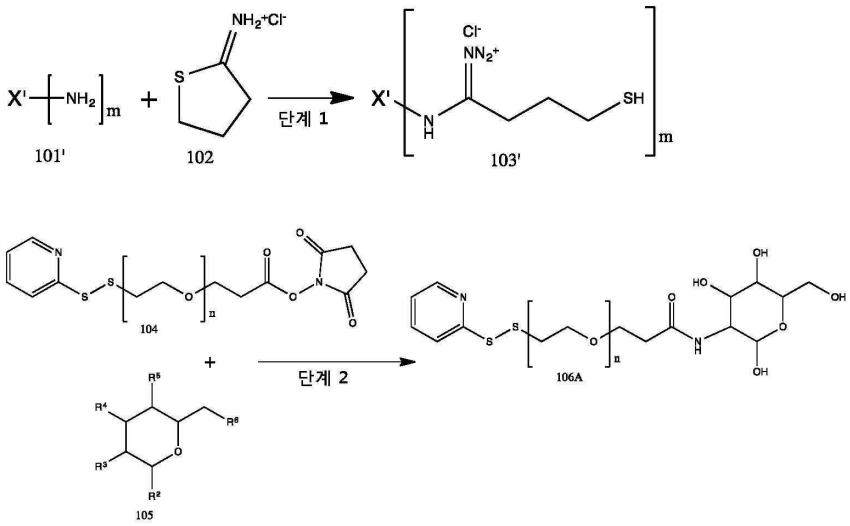
[0347] C6에 접합되고 화학식 1에 따른 하기 구조에 대응하는 N-아세틸갈락토사민:



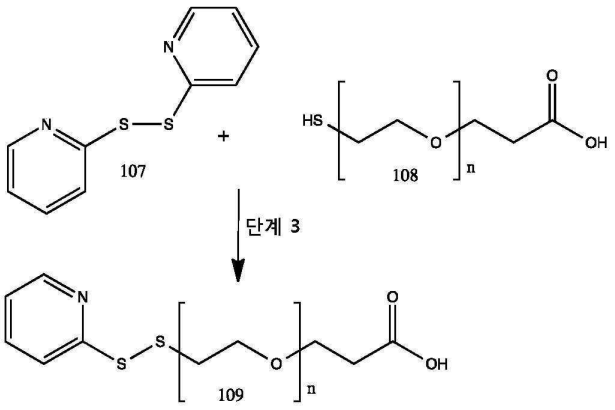
[0348]

[0349] 을 포함한다.

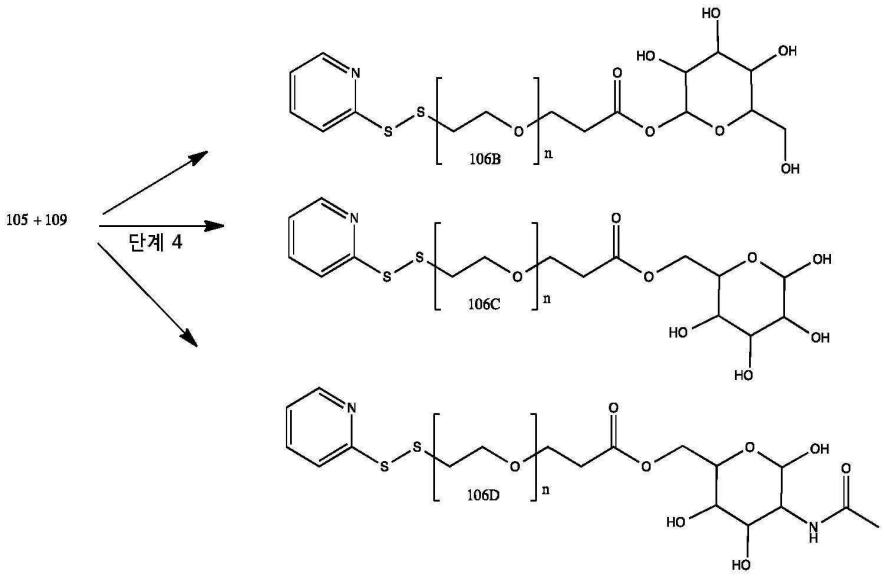
[0350] 반응식 1



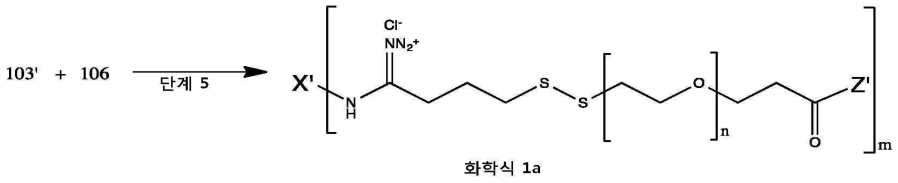
[0351]



[0352]



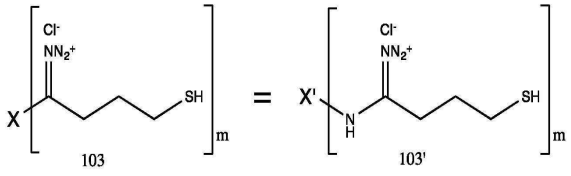
[0353]



화학식 1a

[0354]

[0355] 반응식 1의 단계 1에 상기 도시된 바와 같이, 표면 티올기(들)이 pH 약 8에서 약 1시간동안 트라우트 시약(화학식 102)와 접촉함으로써 유리 표면 아민기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드(화학식 101')에 생성되어 화학식 103'을 수득하고, 이로부터, 예컨대 원심크기배제 크로마토그래피 등을 거쳐 미반응 트라우트 시약을 제거한다. 하기 두 구조는 반응식 1의 단계 1의 생성물을 도시하며, 각각 X에서 원래 발견되는 유리 표면 아미노기(들)(즉, 화학식 103'에서 X'는 확인된 유리 표면 아미노기를 제외한 X의 나머지를 나타냄)을 보이며 유리 표면 아미노기(들)을 생략하고 있다(즉, 화학식 103). 이는 X와 화학식 101 사이에서와 같이 도시된 차이에 부합한다.



[0356]

[0357] 반응식 1, 단계 2에서, 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)-NHS 에스테르(화학식 104)는 갈락토사민(R^3이 NH_2이고 R^2, R^4, R^5, 및 R^6이 OH인 화학식 105)과 접촉하면서 1시간동안 약 pH 8에서 교반하면 화학식 106A의 대응하는 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)-당을 수득하며, 이는 추가 정제 없이 사용가능하다.

[0358] 반응식 1, 단계 3에서, 4,4'-다이티오다이피리딘(화학식 107)은 티올-폴리(에틸렌 글리콜)피로피온산(화학식 108)과 접촉하여 대응하는 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)프로피온산(화학식 109)을 수득한다.

[0359] 반응식 1, 단계 4에서, 화학식 109의 산은 R^2가 OH이고 R^3, R^4, R^5 및 R^6이 보호기("PG")이거나 R^6이 OH이고 R^2, R^3, R^4 및 R^5가 PG이거나, 또는 R^6이 N-아세틸이고 R^2, R^3, R^4 및 R^5가 PG인 화학식 105의 보호된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민과 접촉하여 화학식 106B, 106C 및 106D의 대응하는 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)-당을 수득하고, 이는 탈보호후 사용가능하다.

[0360] 반응식 1, 단계 5에서, 단계 1의 생성물(화학식 103')의 교반 용액에 과량의(m 값에 상응함) 단계 2 또는 단계 4의 생성물(화학식 106, 즉 106A, 106B, 106C 또는 106D)을 약 1시간동안 가한 다음, 원심크기배제 크로마토그래피를 거쳐 임의의 유리 잔여 반응물을 제거하고 화학식 1a에 따른 대응하는 생성물로서 각각 화학식 1aA, 화학식 1aB, 화학식 1aC 및 화학식 1aD를 수득한다.

[0361] 화학식 1a에 대응하는 조성물은, 각각 화학식 106A 내지 106D에 따른 중간체를 사용하여 만들어진 생성물에 대해, 예컨대 다음과 같이 각각 명명될 수 있다:

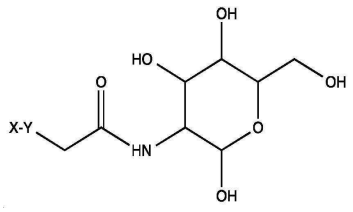
[0362] "F1aA-X'-m_m-n_n" 또는 "F1a-X'-m_m-n_n-2NGAL"

[0363] "F1aB-X'-m_m-n_n" 또는 "F1a-X'-m_m-n_n-1GAL"

[0364] "F1aC-X'-m_m-n_n" 또는 "F1a-X'-m_m-n_n-6GAL"

[0365] "F1aD-X'-m_m-n_n" 또는 "F1a-X'-m_m-n_n-6NAcGAL"

[0366] 반응식 2 내지 14로 돌아가서 여기서 사용된 명명법을 위해, 달리 명시적으로 언급된 경우를 제외하고는, Z"는 C2에서 접합된 N-아세틸갈락토사민:

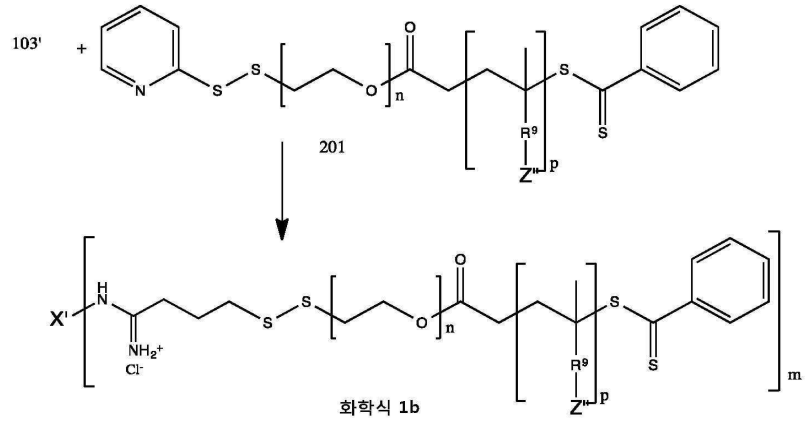


[0367]

[0368] 또는 C1에서 접합된 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민을 가리킨다. C1 접합된 조성물은 합성중에, 예컨대 C3 하이드록실로 아민을 환형화함으로써, 보호될 필요가 있고 보호된 갈락토사민을 링커의 인접부에 삽입한 다음 탈보호된다.

[0369] 화학식 201, 401, 501, 601, 701, 803 및 1401의 폴리(갈락토스 메트아크릴레이트) 반응물은, 예컨대 갈락토사민 및 메트아크릴레이트 무수물을 접촉하는 등, 갈락토스를 메트아크릴레이트화한 다음, 적절한 용매 중에서 아조비스이소부티로니트릴(AIBN)의 존재하에 대응하는 RAFT 시약으로 가역적인 부가-프래그먼트화 체인 트랜스퍼(RAFT) 중합화하고, 동결-해동 사이클로 시작하여, 약 5-8시간동안, 바람직하게는 약 6시간동안, 약 60-80℃로, 바람직하게는 70℃로 가열함으로써 제조될 수 있다. 중합체는 저급알칸올, 바람직하게는 메탄올에서 침전될 수 있다.

[0370] 반응식 2



[0371]

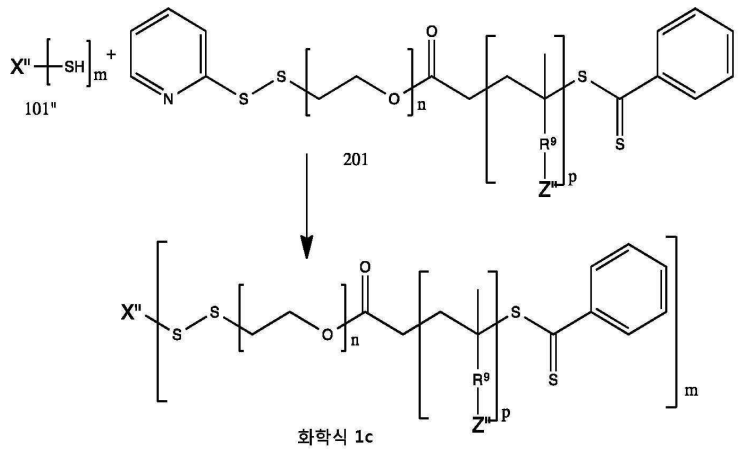
[0372] 반응식 2에 도시된 바와 같이, 예컨대 반응식 1, 단계 1에서 기술된 바와 같이 제조된 유리 표면 티올기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드(화학식 103')는 과량의(m 값에 상응함) 화학식 201의 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)과 약 1시간동안 접촉하여 화학식 1b에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

[0373] 화학식 1b의 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0374] "F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL" 또는 "F1b-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

[0375] 예컨대, X'가 우리카아제이고, m이 1이고, n이 4이고, p가 4이고, Z"가 C2에서 접합된 N-아세틸갈락토사민인 화학식 1b의 조성물은 "F1b-우리카아제-m_1-n_4-p_4-2NAcGAL" 또는 "30-(우리카아제)-3,5,7,9-테트라메틸-12-옥소-1-페닐-1-티옥소-3,5,7,9-테트라키스((2,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)카바모일)-13,16,19,22-테트라옥사-2,25,26-트리티아트리아콘탄-30-이미늄"으로 명명될 수 있다.

[0376] 반응식 3



화학식 1c

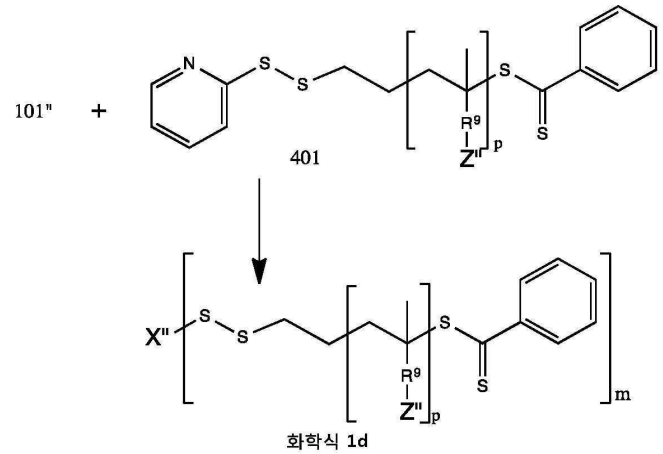
[0377]

[0378] 반응식 3에 도시된 바와 같이, 네이티브 유리 표면 티올기(들)(시스테인)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드 [화학식 101에 대응하고, X"(상기 용어는 하기에 사용될 것임)는 규정된 유리 표면 티올기(들)을 제외한 X를 나타내는 것을 도시하는, 화학식 101"]는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 201의 피리딜-다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)과 접촉하여 화학식 1c에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

[0379] 화학식 1c에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0380] "F1c-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL" 또는 "F1c-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

[0381] 반응식 4



화학식 1d

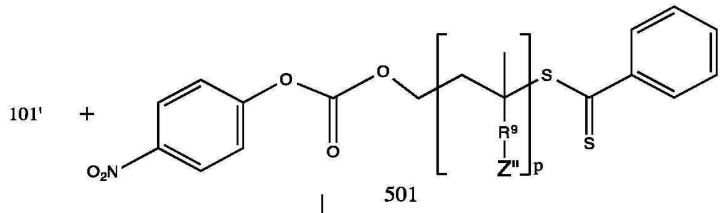
[0382]

[0383] 반응식 4에 도시된 바와 같이, 화학식 101"의 네이티브 유리 표면 티올기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 401의 피리딜-다이티올과 접촉하여 화학식 1d 에 따른 상응하는 생성물을 수득한다.

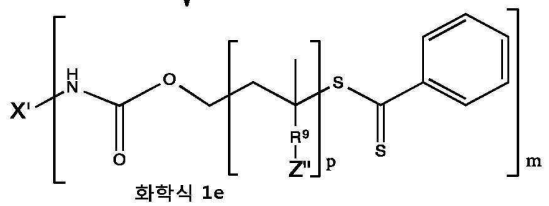
[0384] 화학식 1d에 상응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0385] "F1d-X'-m_m-p_p-2NAcGAL" 또는 "F1d-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z".

[0386] 반응식 5



501



화학식 1e

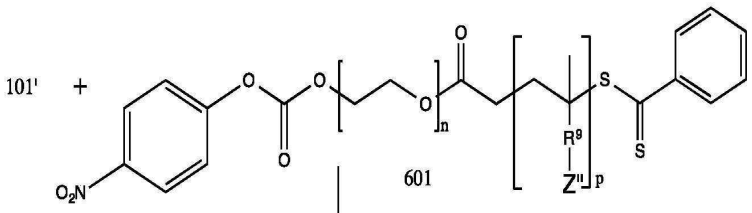
[0387]

[0388] 반응식 5에 도시된 바와 같이, 화학식 101'의 네이티브 유리 표면 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 501의 n-니트로페닐 카보네이트와 접촉하여 화학식 1e에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

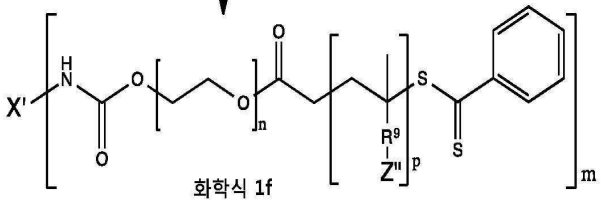
[0389] 화학식 1e에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0390] "F1e-X'-m_m-p_P-2NAcGAL" 또는 "F1e-X'-m_m-p_P-EtAcN-Z".

[0391] 반응식 6



601



화학식 1f

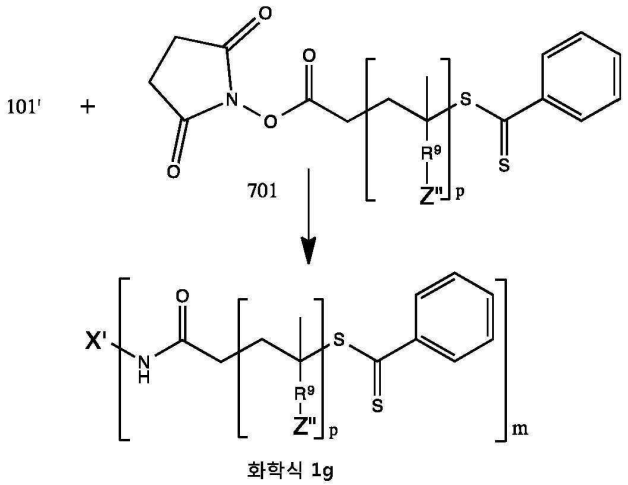
[0392]

[0393] 반응식 6에 도시된 바와 같이, 화학식 101'의 네이티브 유리 표면 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 601의 n-니트로페닐 카보네이트 폴리(에틸렌 글리콜)에스테르와 접촉하여 화학식 1f에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

[0394] 화학식 1f에 대응하는 조성물은 다음과 같이 명명될 수 있다:

[0395] "F1f-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL" 또는 "F1f-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

[0396] 반응식 7



화학식 1g

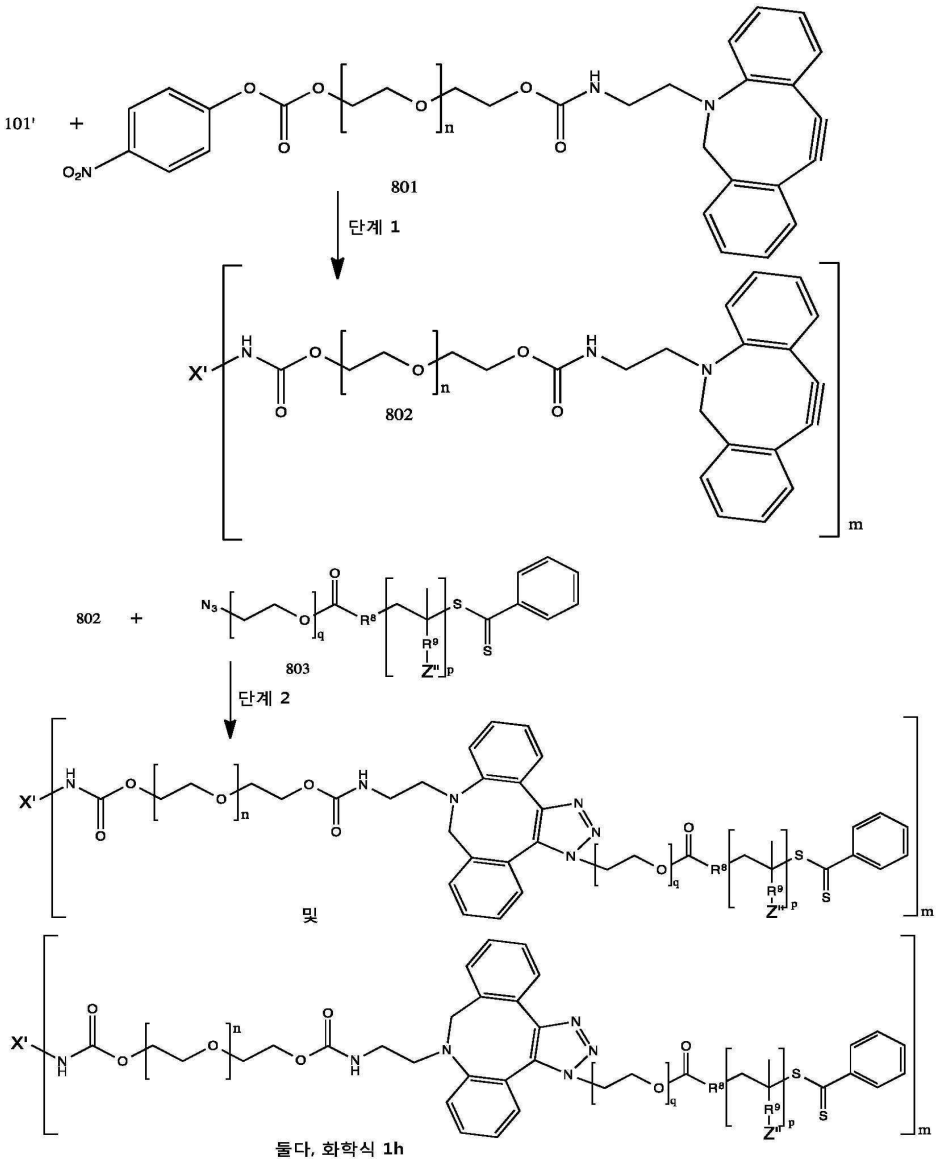
[0397]

[0398] 반응식 7에 도시된 바와 같이, 화학식 101'의 네이티브 유리 표면 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 701의 NHS-에스테르 폴리(에틸렌 글리콜)에스테르와 접촉하여 화학식 1g에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

[0399] 화학식 1g에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0400] "F1g-X'-m_m-p_P-2NAcGAL" 또는 "F1g-X'-m_m-p_P-EtAcN-Z".

[0401] 반응식 8



[0402]

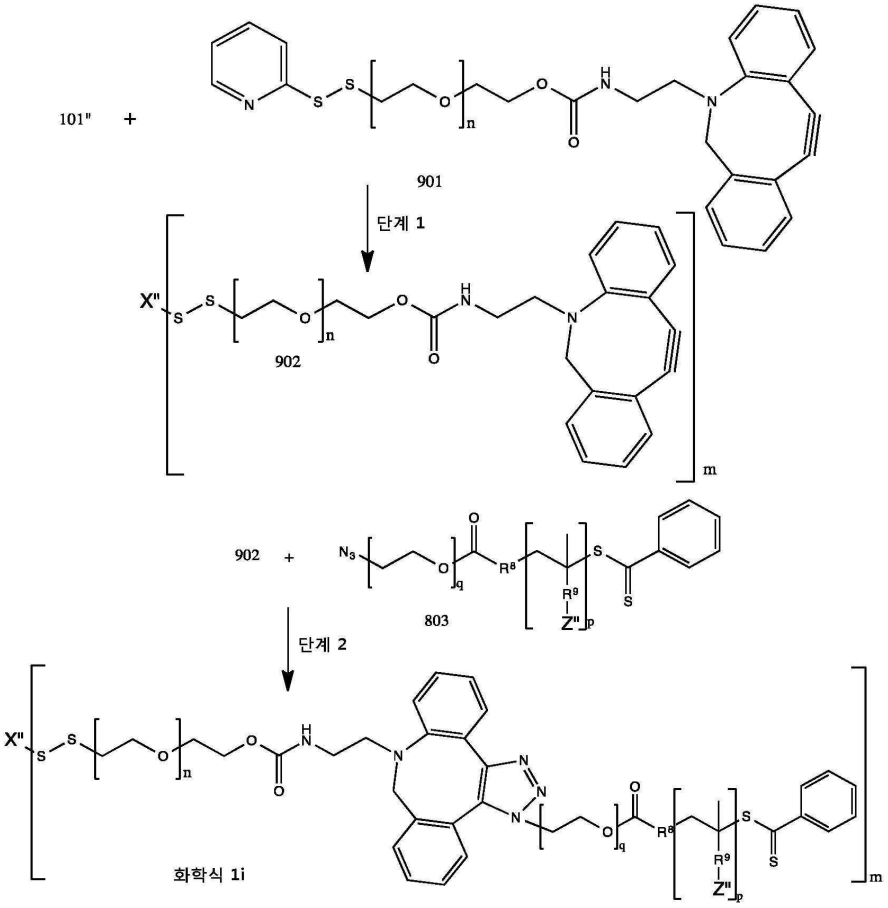
[0403] 반응식 8, 단계 1에 도시된 바와 같이, 화학식 101'의 네이티브 유리 표면 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 801의 클릭 케미스트리(Click chemistry)를 위한 아민-반응성 링커와 접촉하여 화학식 802에 따른 상응하는 생성물을 수득한다.

[0404] 반응식 8, 단계 2에서, 화학식 802의 생성물은 그 후 균등량의(m 값에 역시 상응함) 화학식 803의 갈락토스(아민) 중합체와 접촉하여 화학식 1h에 따른 대응하는 이성질체 생성물을 수득한다. 상기 도시된 두 이성질체는 화학식 802의 삼중결합과 함께 화학식 803의 아자이드의 비특이적인 고리화(cyclization)로부터 얻어진다. 이러한 비특이적인 고리화는 Y가 화학식 Yh 내지 Yn으로부터 선택되는 기타 조성물의 합성에서 일어나지만, 각 경우에서 도시되지는 않을 것이다.

[0405] 화학식 1h에 상응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0406] "F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL" 또는 "F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0407] 반응식 9



[0408]

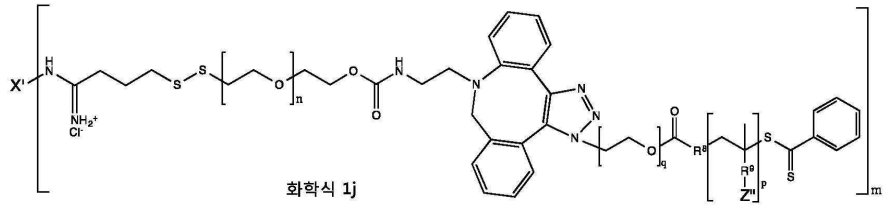
[0409] 반응식 9, 단계 1에 도시된 바와 같이, 화학식 101"의 네이티브 유리 표면 티올기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 901의 클릭 케미스트리를 위한 티올-반응성 링커와 접촉하여 화학식 902"에 따른 상응하는 생성물을 수득한다.

[0410] 반응식 9, 단계 2에서, 화학식 902"의 생성물은 그 후 균등량(m 값에 역시 상응함)의 화학식 803의 갈락토스(아민) 중합체와 접촉하여 화학식 1i에 따른 상응하는 이성질체 생성물을 수득한다.

[0411] 화학식 1i에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0412] "F1i-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL" 또는 "F1i-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0413] 반응식 9에 관하여 기술된 공정을 따르되, 다만 출발물질 101"를 화학식 103'의 화합물(트라우트 시약으로 유도체화됨)로 치환한 경우, 하기 나타낸 바와 같은 화학식 1j의 대응하는 이성질체 생성물을 수득한다.

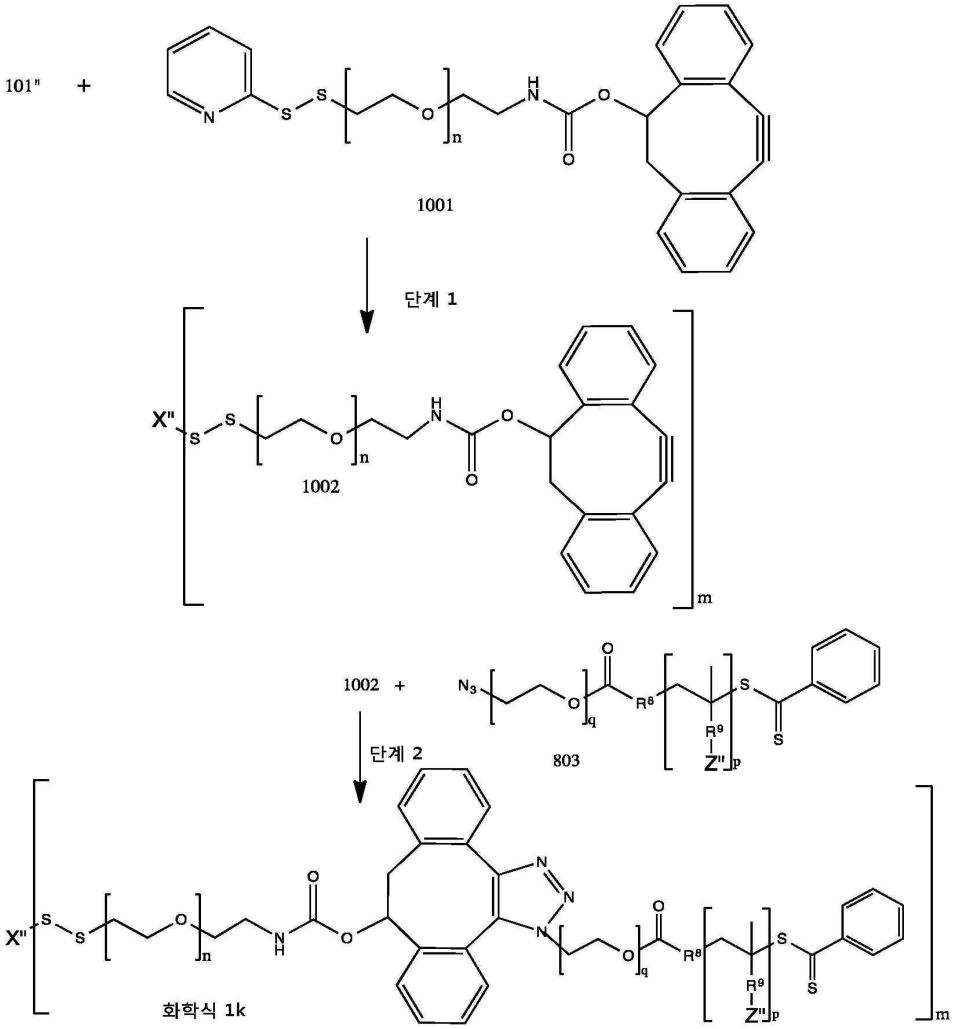


[0414]

[0415] 화학식 1j에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0416] "F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL" 또는 "F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0417] 반응식 10



[0418]

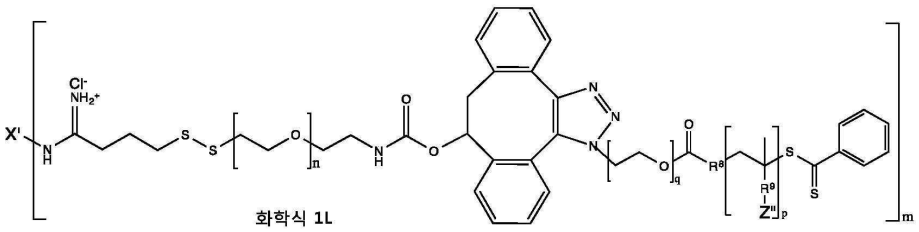
[0419] 반응식 10, 단계 1에 도시된 바와 같이, 화학식 101"의 네이티브 유리 표면 티올기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드는 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 1001의 클릭 케미스트리를 위한 티올-반응성 링커와 접촉하여 화학식 1002에 따른 상응하는 생성물을 수득한다.

[0420] 반응식 10, 단계 2에서, 화학식 1002의 생성물은 그 후 균등량(m 값에 역시 상응함) 화학식 803의 갈락토스(아민) 중합체와 접촉하여 화학식 1k에 따른 대응하는 이성질체 생성물을 수득한다.

[0421] 화학식 1k에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0422] "F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL" 또는 "F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

[0423] 반응식 10에 관하여 기술된 공정에 따르되, 출발물질 101"를 화학식 103'의 화합물(트라우트 시약으로 유도체화됨)로 치환한 경우, 하기 나타낸 바와 같이 화학식 1L의 대응하는 이성질체 생성물을 얻는다.

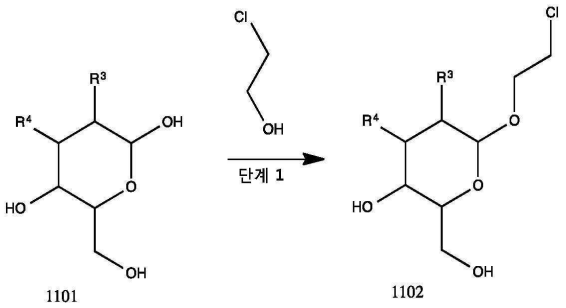


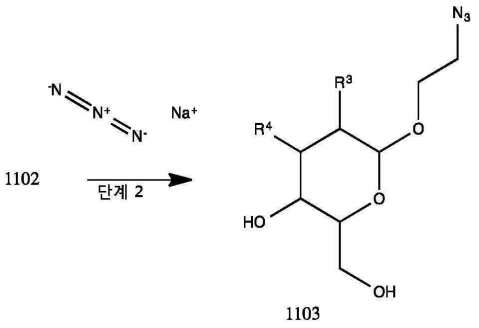
[0424]

[0425] 화학식 1L에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

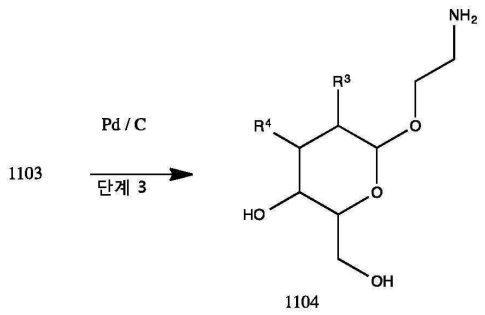
[0426] "F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL" 또는 "F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

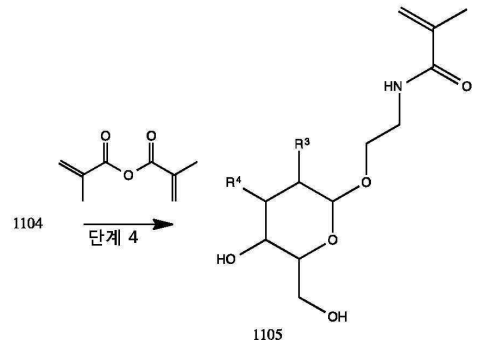
[0427] 반응식 11





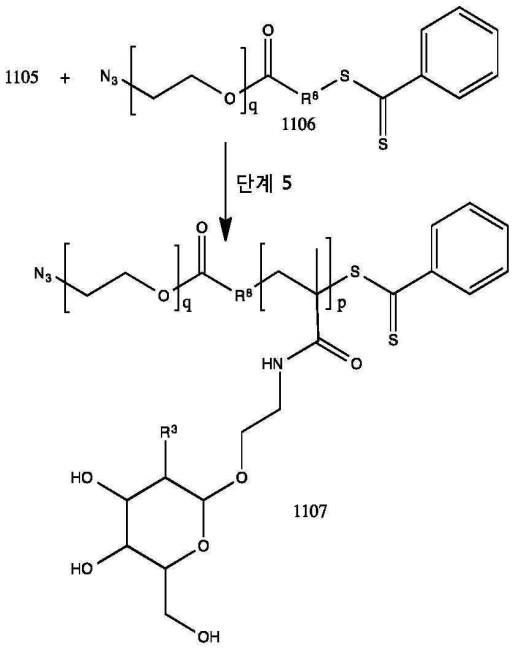
[0428]

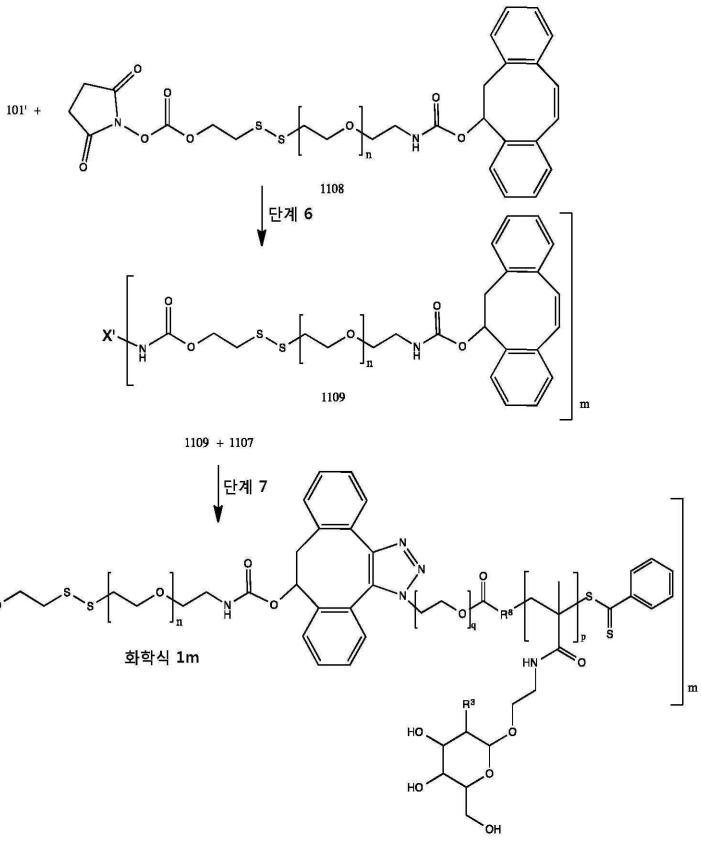




[0429]

[0430]





[0431]

[0432] 반응식 11, 단계 1에 도시된 바와 같이, 갈락토스, 보호된 갈락토사민 또는 N-아세틸-D-갈락토사민(각각의 경우에, R^3 및 R^4가 OH이거나, R^3이 NH-보호기(예컨대, R^4와 고리화됨)이거나, 또는 R^3이 NHAc이고 R^4가 OH인, 화학식 1101)은 2-클로로에탄-1-올과 접촉한 다음, 냉각 및 아세틸클로라이드를 적가한다. 용액을 실온으로 가온한 다음 수 시간동안 70℃로 가온한다. 에탄올을 조 생성물에 가하고 얻어지는 용액을 탄소의 존재하에 교반한 다음 여과후 용매를 제거하여 화학식 1102의 대응하는 생성물을 수득한다.

[0433] 반응식 11, 단계 2에 도시된 바와 같이, 화학식 1103의 생성물을 과잉의 소듐 아자이드에 가하고 수 시간동안 90℃로 가온한 다음, 여과후 용매를 제거하여 화학식 1103의 대응하는 생성물을 수득한다.

[0434] 반응식 11, 단계 3에 도시된 바와 같이, 화학식 1102의 생성물을 탄소상 팔라듐 및 에탄올의 용액에 가하고 수

소기체(3기압) 하에 수 시간 교반한 다음, 여과후 용매를 제거하여 화학식 1104의 대응하는 생성물을 수득한다.

[0435] 반응식 11, 단계 4에 도시된 바와 같이, 화학식 1104의 생성물을 메트아크릴레이트 무수물의 용액에 가한다. 트리에틸아민을 가하고 반응물을 2시간동안 교반한 다음 용매 제거 및 단리하여 화학식 1105의 대응하는 생성물을 수득한다.

[0436] 반응식 11, 단계 5에 도시된 바와 같이, 아자이드-변형된(modified) uRAFT 시약 (화학식 1106)을 아조비스이소부티로니트릴과 함께 화학식 1105의 생성물의 용액에 가하고, 4회의 동결-펌프-해동 사이클(freeze-pump-thaw cycles)을 거친 후 70℃에서 교반한다. 수 시간후 화학식 1107의 대응하는 중합체 생성물을 저급 알칸올의 첨가로 침전시킨 다음 용매를 제거한다. R^3이 NH-보호기(예컨대, R^4와 고리화됨)인 경우, 보호기(들)은 이 시점에서 제거된다.

[0437] 반응식 11, 단계 6에 도시된 바와 같이, 화학식 101'의 네이티브 유리 표면 아민기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드를 pH 8.0 완충액에 가하고 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 1108의 다이옥소피롤리딘과 교반하면서 접촉시킨다. 1시간 후 미반응 화학식 1108을 제거하고 화학식 1109의 얻어지는 생성물을 추가 정제 없이 사용한다.

[0438] 반응식 11, 단계 7에 도시된 바와 같이, 화학식 1107의 생성물을 pH 8.0 완충액에 가하고, 여기에 화학식 1109의 생성물을 부가한다. 2시간동안 교반 후, 과잉의 화학식 1107을 제거하여 화학식 1m의 대응하는 이성질체 생성물을 수득한다.

[0439] 단계 5에서 화학식 1105의 생성물을 N-(2,4,5-트리하이드록시-6-(하이드록메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)메트아크릴아미드로 치환하고 단계 6 및 7을 진행하여, Z"가 C2에서 접합된 N-아세틸갈락토사민인 화학식 1m의 대응하는 이성질체 생성물을 수득한다.

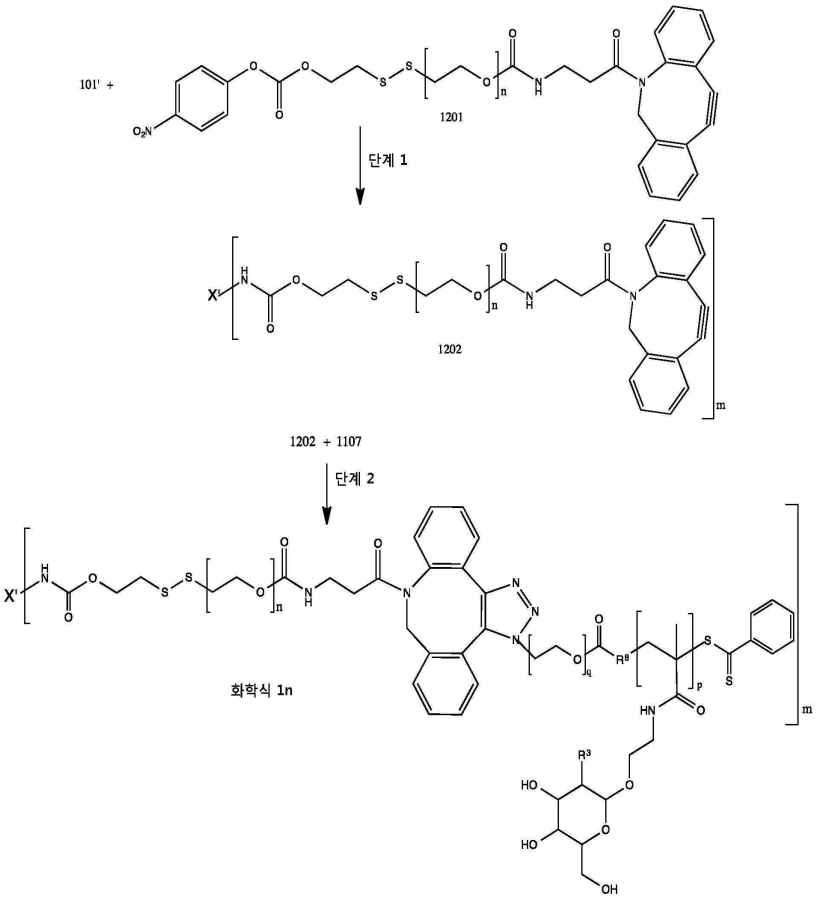
[0440] 화학식 1m에 대응하는 조성물은 다음과 같이 명명될 수 있다:

[0441] "F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z" 또는

[0442] (상기 식에서, Z"는 1GAL, 1NGAL 또는 1NAcGAL임)

[0443] "F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL".

[0444] 반응식 12



[0445]

[0446] 반응식 12의 합성법은 유기용매의 사용으로 인해 소수성 항원, 항체, 항체 프래그먼트 및 리간드(예컨대, 인슐린)에 특히 적합하다.

[0447] 반응식 12, 단계 1에 도시된 바와 같이, 화학식 101'의 네이티브 유리 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 및 리간드를 트리에틸아민을 함유하는 유기용매(예컨대, DMF)에 용해한다. 여기에, 일정량의(m 값에 상응함) 화학식 1201의 화합물을 가한 다음 교반하고 t-부틸 메틸 에테르를 부가한다. 화학식 1202의 대응하는 생성물을 침전물로 회수한다.

[0448] 화학식 1202의 생성물을 유기용매에 재분산시키고 일정량의(m 값에 상응함) 화학식 1107(예컨대, 반응식 11에서 기술된 바와 같이 얻어짐)을 가한 후 교반한다. 반응 생성물은 디클로로메탄의 첨가로 침전하며 이후 여과하고 및 용매를 제거한다. 정제(예컨대, PBS 중에서 재분산한 후 원심크기배제 크로마토그래피)하여 화학식 1n의 대응하는 이성질체 생성물을 수득한다.

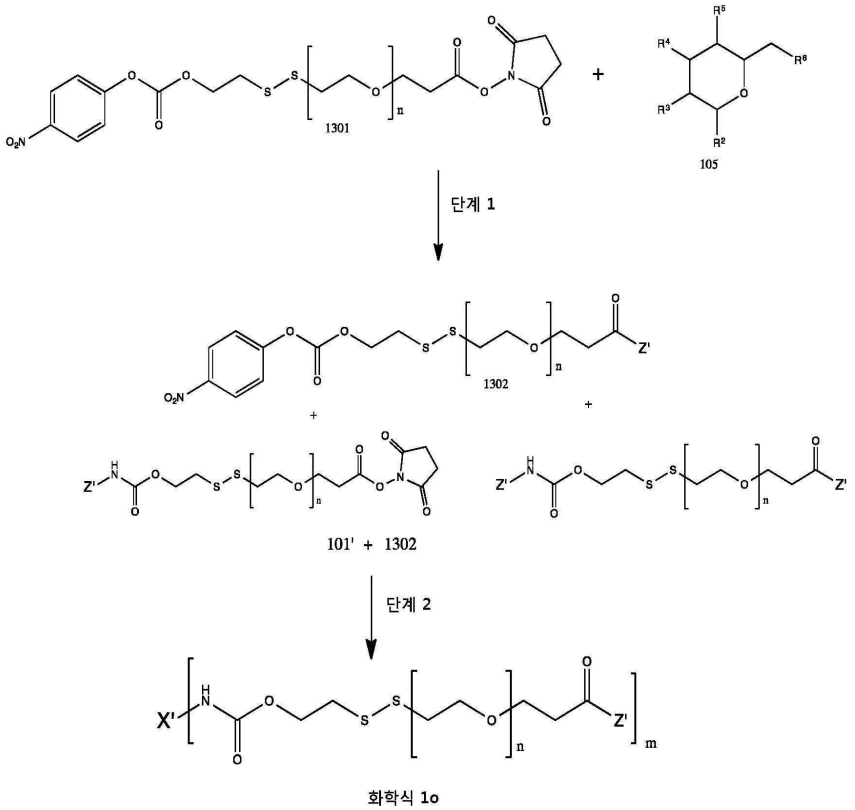
[0449] 화학식 1n에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0450] "F1n-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z" 또는

[0451] (상기 식에서, Z"는 1GAL, 1NGAL 또는 1NAcGAL임)

[0452] "F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL".

[0453] 반응식 13



[0454] 화학식 1o

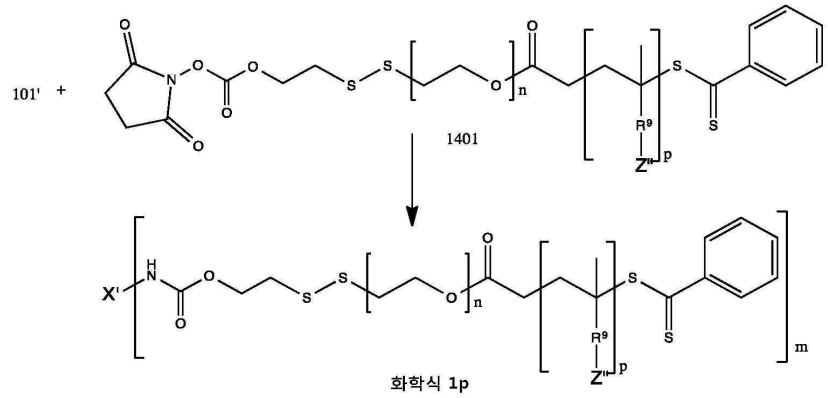
[0455] 반응식 13, 단계 1에서, 니트로페녹시카르보닐-옥시알킬 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)-NHS 에스테르(화학식 1301)를 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민(화학식 105)과 접촉하여 화학식 1302의 대응하는 생성물을 다른 두 가지의 도시된 생성물과 함께 얻고, 다음 단계로 넘어가기 전에, 이로부터 목적하는 화학식 1302의 니트로페녹시카르보닐 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)-카르복시에틸 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민을 단리한다.

[0456] 반응식 13, 단계 2에 도시된 바와 같이, 반응식 101'의 네이티브 자유 표면 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드를 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 1302의 생성물과 접촉하여 화학식 1o에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

[0457] 화학식 1o에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0458] "F1o-X'-m_m-n_n-Z'."

[0459] 반응식 14



[0460] 화학식 1p

[0461] 반응식 14에 도시된 바와 같이, 네이티브 유리 아미노기(들)을 갖는 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드(화학식 101')를 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 1401의 피리딜 다이-티올-폴리(에틸렌 글리콜)-NHS 에스테르와

접촉하여 화학식 1p에 따른 대응하는 생성물을 수득한다.

[0462] 화학식 1p에 대응하는 조성물은 하기와 같이 명명될 수 있다:

[0463] "F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL" 또는 "F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

[0464] 융합단백질의 제조

[0465] 화학식 2의 융합단백질 조성물은 상업적으로 입수가능한 포유류, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 발현 벡터, 및 공지되거나 발견되거나 조작된(engineered) 유전자 시퀀스를 사용하여 당업계에서 인정하는 방법에 의해 발현될 수 있다. 태그 시퀀스와 함께 X, Y 및 Z를 인코딩하는 시퀀스는 발현 벡터, 예컨대 포유류 발현 벡터 pSecTag A로 클로닝될 수 있는데, 여기서 융합단백질은 Ig κ-체인 분비 리더 시퀀스(Ig κ-chain secretion leader sequence)의 C-말단에 삽입된다(the fusion protein is inserted C-terminal to the Ig -chain secretion leader sequence). 사이트-유도된 돌연변이 및 퀵체인지 프로토콜(QuikChange protocol)(가이저(Geiser) 등)의 변형을 포함한 다양한 기타의 클로닝 기술이 사용될 수 있고, 이들은 당업자들에게 공지되어 있다. 융합단백질은 폴리에틸렌이민을 사용한 상기 기재된 벡터로 트랜지언트 트랜스펙션(transisent transfection)에 의해 포유류 세포 [예컨대, 인간 태아 신장(HEK293) 세포 또는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포]에서 일시적으로 발현될 수 있다. 트랜스펙션된 세포는, 예컨대 발프로산 또는 DMSO로 보충된, 적절한 배지(예컨대, 라이프 테크놀로지스 사의 FreeStyle 293 배지)에서 약 7일간 배양한 후, 세포는 원심분리로 제거되고 배양 상등액을 수집하여 여과 살균한다.

[0466] 택일적으로, 융합단백질은 안정하게 트랜스펙션된 포유류 세포주를 제조함으로써 안정하게 발현될 수 있다. 또한, 발현 벡터는 적절한 배지(예컨대, LB, 2XYT, SOB, SOC, TB 및 기타 브로쓰(broth)), 보조제(예컨대, 글리세롤, 글루코스, 및 기타 보조제) 및 적절한 성장 및 발현 조건을 사용하여 Escherichia coli, Corynebacterium, 또는 Pseudomonas fluorescens와 같은 박테리아 중에서 융합단백질을 생산하는데 사용될 수 있다. 효모에서 발현 시스템은 Saccharomyces cerevisiae 및 Pichia pastoris, 또는 Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, 및 Yarrowia 속의 기타 유기체를 통상적으로 사용하고, 덜 통상적으로 사용되는 유기체로 곰팡이(filamentous fungi)인 Aspergillus, Trichoderma, 또는 Myceliophthora thermophila C1 등이 있다. 곤충 발현 시스템은 바큐로바이러스 감염된 곤충 세포 또는 비-용균성 곤충 세포 발현을 이용하여 단백질 발현율을 높은 수준으로 성취할 수 있고; 가장 일반적인 곤충 세포는 Sf9 및 Sf21(Spodoptera frugiperda로부터), Hi-5(Trichoplusia ni로부터), 및 Schneider 2와 3(Drosophila melanogaster로부터)를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0467] 발현된 융합단백질 생성물은 친화 크로마토그래피(예컨대, His-태그된 융합단백질을 위해 GE 헬스케어 사의 HisTrap Ni^{2+} 세파로스 컬럼을 사용)에 의해 배양 상등액으로부터 정제될 수 있고, 이후 크기배제 크로마토그래피(예컨대, GE 헬스케어 사의 Superdex 75 컬럼) 또는 이온교환 크로마토그래피와 같은 기타 크로마토그래피 정제 단계를 거친다. 단백질 순도는 예컨대 SDS-PAGE 겔의 쿠마시 브릴리언트 블루 염색 및 웨스턴블로팅(예컨대, His-태그된 융합단백질을 위해 안티-6xHis 태그 웨스턴블로팅)에 의해 확인될 수 있다. 단백질 농도는 비어-램버트 법칙을 사용하여 정량될 수 있고, 이를 위해 280nm에서 흡광도를 측정한다(예컨대, 써모 사이언티픽 사의 NanoDrop 2000을 사용함). 분자량 및 흡광계수는, 예컨대 ExPASy ProtParam 툴을 사용하여, 단백질의 아미노산 시퀀스로부터 측정한다. 엔도톡신 레벨은, 예컨대 인비보젠 사의 HEK-Blue TLR4 리포터 셀라인을 사용하여, 제조사의 지시사항에 따라 측정할 수 있다.

[0468] 탈시알릴화 항원, 항체, 항체 프래그먼트 및 리간드의 제조

[0469] 탈시알릴화 단백질은 상업적으로 입수가능한 뉴라미니다제(neuraminidase)(또한 아세틸-뉴라미닐 하이드로라제 또는 시알리다제로도 알려짐) 효소 또는 황산을 사용하여 당업계에 채택된 방법을 통해 제조될 수 있다. 관심 단백질의 효소적 탈시알릴화를 위해, 단백질은 뉴라미니다제와 함께 37℃에서 1시간동안 또는 필요한 경우 더 오래 인큐베이션 될 수 있다. 산가수분해를 통한 화학적 탈시알릴화를 위해, 관심 단백질을 0.025N 황산으로 80℃에서 1시간동안 또는 필요한 경우 더 오래 처리할 수 있다. 그 후 탈시알릴화 단백질은 고정 금속이온 친화 크로마토그래피(예컨대, GE 헬스케어 사의 HisTrap Ni^{2+} 세파로스 컬럼을 사용함) 후 크기배제 크로마토그래피(예컨대, GE 헬스케어사의 수퍼덱스 75 컬럼을 사용함)하여 반응 혼합물로부터 정제될 수 있다.단백질 순도는, 예컨대 SDS-PAGE 겔의 쿠마시 브릴리어트 블루 염색 및 안티-6xHis 태그 웨스턴 블로팅에 의해 확인될 수 있다. 탈시알릴화는 웨스턴 블롯에서 단백질 시알산의 렉틴-기반 검출 및 상업적으로 입수가능한 키트(예컨대, Abcam,

ProZyme 또는 Sigma)를 사용하여 시알산 함량의 비색(colorimetric) 정량에 의해 확인될 수 있다. 탈시알릴화 단백질 농도는, 예컨대 써모 사이언티픽 사의 NanoDrop 2000을 사용하여, 280nm의 흡광도를 측정하고 비어램버트 법칙을 이용하여 정량될 수 있다. 분자량 및 흡광계수(extinction coefficient)는 예컨대 ExPASy ProtParam 툴을 사용하여, 단백질의 아미노산 서열로부터 측정될 수 있다. 엔도톡신 레벨은 예컨대 인비보젠 사의 HEK-Blue TLR4 리포터 세포주를 사용하여 제조사의 지시사항에 따라 측정될 수 있다.

[0470] 특정 공정 및 최종 단계(Particular Processes and Last Steps)

[0471] 화학식 103'의 화합물이 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 106의 화합물과 접촉하여 화학식 1a의 대응하는 생성물을 수득한다.

[0472] 화학식 103'의 화합물이 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 201의 화합물과 접촉하여 화학식 1b의 대응하는 생성물을 수득한다.

[0473] 화학식 802, 902 또는 1002의 화합물이 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 803의 화합물과 접촉하여 화학식 1h의, 화학식 1i 또는 화학식 1k의 대응하는 생성물을 각각 생성한다.

[0474] 화학식 1109의 화합물이 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 1107의 화합물과 접촉하여 화학식 1m의 상응하는 생성물, 특히 n이 약 80, p가 약 30, q가 약 4이고, 항원의 기능인 m이 약 2 내지 10인 화합물을 생성한다.

[0475] 화학식 1202의 화합물은 과잉의(m 값에 상응함) 화학식 1107의 화합물과 접촉하여 화학식 1n의 대응하는 생성물, 특히 n이 약 1, p가 약 30, q가 약 4이고, 항원의 기능인 m이 약 2 내지 10인 화합물을 생성한다.

[0476] 특정 조성물(Particular Compositions)

[0477] 비제한적인 예에 의해, 본원의 조성물, 약제학적 제형, 제조방법 및 용도에 선호되는 특정 그룹은 화학식 1의 하기 조합 및 치환기의 변경 그룹(선호도의 증가순서로 각각 서브그룹화됨)이다:

[0478] ● X는 이식 수용체가 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 이식 항원, 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 항원, 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 치료 단백질, 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 셀프항원, 또는 그의 면역관용성 부분이다.

[0479] ● X는 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 치료 단백질로서 하기로부터 선택된다: 아바타셉트(Abatacept), 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아데노신 디아미나제(Adenosine deaminase), 아도-트라스투주맙 엠탄신((Ado-trastuzumab emtansine), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루세라제(Alglucerase), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), α-1-프로테이나제 억제제(α-1-proteinase inhibitor), 아나킨라(Anakinra), 아니스트렙라제(Anistreplase, 아니소일레이티드 플라스미노겐 스트렙토키나제 액티베이터 컴플렉스(anisoylated plasminogen streptokinase activator complex)), 안티트롬빈 III(Antithrombin III), 안티티모사이트 글로불린(Antithymocyte globulin), 아텝라제(Ateplase), 베바시주맙(Bevacizumab), 비발리루딘(Bivalirudin), 보툴리눔 톡신 타입 A(Botulinum toxin type A), 보툴리눔 톡신 타입 B(Botulinum toxin type B), C1-에스테라제 억제제(C1-esterase inhibitor), 카나키누맙(Canakinumab), 카르복시펩티다제 G2(Carboxypeptidase G2, 글루카르피다제(Glucarpidase) 및 보락사제(Voraxaze), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol), 세툭시맙(Cetuximab), 콜라게나제(Collagenase), 크로탈리다에 이뮨 팹(Crotalidae immune Fab), 다르베포에틴-α(Darbepoetin-α), 데노수맙(Denosumab), 디곡신 이뮨 팹(Digoxin immune Fab), 도르나제 알파(Dornase alfa), 에쿨리주맙(Eculizumab), 에타너셉트(Etanercept), 인자 VIIa(Factor VIIa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인자 XI(Factor XI), 인자 XIII(Factor XIII), 피브리노겐(Fibrinogen), 필그라스팀(Filgrastim), 갈설파제(Galsulfase), 골리무맙(Golimumab), 히스테린 아세테이트(Histrelin acetate), 히알루로니다제(Hyaluronidase), 이두르설파제(Idursulphase), 이미글루세라제(Imiglucerase), 인플릭시맙(Infliximab), 인슐린(Insulin) [rHu 인슐린 및 소 인슐린(bovine insulin)을 포함함], 인터페론-α2a(Interferon-α2a), 인터페론-α2b(Interferon-α2b), 인터페론-β1a(Interferon-β1a), 인터페론-β1b(Interferon-β1b), 인터페론-γ1b(Interferon-γ1b), 이필리무맙(Ipilimumab), L-아르기나제(L-arginase), L-아스파라지나제(L-asparaginase), L-메티오나제(L-methionase), 락타제(Lactase), 라로니다제(Laronidase), 레피루딘/히루딘(Lepirudin/hirudin), 메카세르민(Mecasermin), 메카세르민 린파베이트(Mecasermin rinfabate), 메톡시 오파투무맙(Ofatumumab), 나탈리주맙(Methoxy Natalizumab), 옥트레오타이드(Octreotide), 오프렐베킨(Oprelvekin), 판크레아틱 아밀라제(Pancreatic amylase), 판크레아틱 리파제(Pancreatic lipase), 파파인(Papain), 페그-아스파라지나제(Peg-asparaginase), 페그-독소루비신 HCl(Peg-doxorubicin HCl), PEG-에포에틴-β(PEG-

epoetin-β), 페그필그라스팀(Pegfilgrastim), 페그-인터페론-α2a(Peg-Interferon-α2a), 페그-인터페론-α2b(Peg-Interferon-α2b), 페글로티카제(Pegloticase), 페그비소만트(Pegvisomant), 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 프로테인 C(Protein C), 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase)), 사크로시다제(Sacrosidase), 연어 칼시토닌(Salmon calcitonin), 사르그라모스팀(Sargramostim), 스트렙토키나제(Streptokinase), 테넥텝라제(Tenecteplase), 테리파라타이드(Teriparatide), 토실리주맙(Tocilizumab)(아트리주맙(atlizumab)), 트라스투주맙, 타입 1 알파-인터페론(Trastuzumab, Type 1 alpha-interferon), 우스테키누맙(Ustekinumab), vW 인자(vW factor).

[0480] ○ 특히 X는 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인플리시맙(Infliximab), L-아스파라지나제(L-asparaginase), 라로니다제(Laronidase), 나탈리주맙(Natalizumab), 옥트레오타이드(Octreotide), 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 또는 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase))이다.

[0481] ■ 특히 X는 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 우리카아제(uricase), PAL 또는 아스파라지나제(asparaginase)이다.

[0482] ● X는 유형 1 당뇨병, 소아성 다발성 경화증, 소아 류마티스 관절염, 셀리악병, 또는 전신탈모증을 치료하기 위해 선택되는 셀프항원 폴리펩타이드이다.

[0483] ○ 특히 X는 신규한 발병(new onset) 유형 1 당뇨병, 소아 다발성 경화증 또는 셀리악병을 치료하기 위해 선택되는 셀프항원 폴리펩타이드이다.

[0484] ● X는 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 항원이다.

[0485] ○ 땅콩으로부터, 코나라킨(Ara h1)을 포함함.

[0486] ○ 밀로부터, 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24), 알파-글리아딘 "33- mer" 디아미데이티드(deamidated) (SEQ ID NO:25), 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) (SEQ ID NO:26) 및 오메가-글리아딘(Omega-gliadin) (SEQ ID NO:27)을 포함함.

[0487] ○ 고양이로부터, Fel d 1 A (UNIPROT P30438) 및 고양이 알부민(Cat albumin) (UNIPROT P49064)을 포함함.

[0488] ○ 개로부터, Can f 1 (UN IPROT 018873) 및 개 알부민(Dog albumin) (UN IPROT P49822)을 포함함.

[0489] ● X는 이식 수용체가 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 이식 항원으로, 예컨대 인간 백혈구 항원 단백질이다.

[0490] ● X는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드이고, 상기 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환 및/또는 알러지를 유발한다.

[0491] ○ 특히 X는 내인성 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 결합한다.

[0492] ● Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Yh, 화학식 Yi, 화학식 Yk, 화학식 Ym, 화학식 Yn, 화학식 Yo 및 화학식 Yp로부터 선택되는 링커이다.

[0493] ○ 특히 n은 8 내지 90 ±10%이고, p는 20 내지 100 ±10%이고, q는 3 내지 20 ±3이다.

[0494] ■ 특히 n은 40 내지 80 ±10%이고, p는 30 내지 40 ±10%이고, q는 4 내지 12 ±3이다.

[0495] ○ 특히 Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Ym 또는 화학식 Yn이다.

[0496] ■ 특히 n은 8 내지 90 ±10%이고, p는 20 내지 100 ±10%이고, q는 3 내지 20 ±3이다.

[0497] ● 보다 특히 n은 40 내지 80 ±10%이고, p는 30 내지 40 ±10%이고, q는 4 내지 12 ±3이다.

[0498] ■ 특히 Z는 에틸아세트아미도기를 경유하여 Y에 접합된다.

[0499] ● 보다 특히 Z는 C1에서 Y에 접합된다.

[0500] ○ 보다 특히 R^8은 CMP이다.

[0501] ● 보다 특히 R^8은 CMP이다.

[0502] ■ 특히 R^8은 CMP이다.

[0503] ● Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0504] ○ 특히 Z는 C1, C2 또는 C6에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0505] ■ 특히 Z는 C1 또는 C2에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0506] ● 보다 특히 Z는 C1에 접합된 N-아세틸갈락토사민이다.

[0507] 상기 기술된 그룹 및 서브그룹의 각각은 개별적으로 선호되며 조합되어 본원의 추가의 바람직한 양태를 기술할 수 있는데 예컨대 다음과 같으며 이에 의해 제한되는 것은 아니다:

[0508] ● X는 유형 1 당뇨병, 소아성 다발성 경화증, 소아 류마티스 관절염, 셀리악병, 전신탈모증을 치료하기 위해 선택되는 셀프항원 폴리펩타이드이다.

[0509] ○ 특히 X는 신규한 발병(new onset) 유형 1 당뇨병, 소아 다발성 경화증 또는 셀리악병을 치료하기 위해 선택되는 셀프항원 폴리펩타이드이다.

[0510] ■ 특히 Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Yh, 화학식 Yi, 화학식 Yk, 화학식 Ym, 화학식 Yn, 화학식 Yo 및 화학식 Yp로부터 선택되는 링커이다.

[0511] ● 특히 n은 8 내지 90 ±10%이고, p는 20 내지 100 ±10%이고, q는 3 내지 20 ±3이다.

[0512] ○ 특히 n은 40 내지 80 ±10%이고, p는 30 내지 40 ±10%이고, q는 4 내지 12 ±3이다.

[0513] ● 특히 Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Ym 또는 화학식 Yn이다.

[0514] ○ 특히 n은 8 내지 90 ±10%이고, p는 20 내지 100 ±10%이고, q는 3 내지 20 ±3이다.

[0515] ■ 보다 특히 n은 40 내지 80 ±10%이고, p는 30 내지 40 ±10%이고, q는 4 내지 12 ±3이다.

[0516] ● 보다 더 특히 Z는 에틸아세트아미도기를 경유하여 Y에 접합된다.

[0517] ■ 보다 특히 Z는 에틸아세트아미도기를 경유하여 Y에 접합된다.

[0518] ○ 특히 Z는 에틸아세트아미도기를 경유하여 Y에 접합된다.

[0519] ● 특히 Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0520] ○ 특히 Z는 C1, C2 또는 C6에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0521] ■ 보다 특히 Z는 C1 또는 C2에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0522] ● 보다 더 특히 Z는 C1에 접합된 N-아세틸갈락토사민이다.

[0523] ■ 특히 Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0524] ● 특히 Z는 C1, C2 또는 C6에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0525] ○ 특히 Z는 C1 또는 C2에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0526] ■ 보다 특히 Z는 C1에 접합된 N-아세틸갈락토사민이다.

[0527] ○ 특히 Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Yh, 화학식 Yi, 화학식 Yk, 화학식 Ym, 화학식 Yn, 화학식 Yo 및 화학식 Yp로부터 선택되는 링커이다.

[0528] ■ 특히 n은 8 내지 90 ±10%이고, p는 20 내지 100 ±10%이고, q는 3 내지 20 ±3이다.

[0529] ● 보다 특히 n은 40 내지 80 ±10%이고, p는 30 내지 40 ±10%이고, q는 4 내지 12 ±3이다.

[0530] ■ 특히 Y는 화학식 Ya, 화학식 Yb, 화학식 Ym 또는 화학식 Yn이다.

[0531] ● 보다 특히 n은 8 내지 90 ±10%이고, p는 20 내지 100 ±10%이고, q는 3 내지 20 ±3이다.

[0532] ○ 보다 특히 n은 40 내지 80 ±10%이고, p는 30 내지 40 ±10%이고, q는 4 내지 12 ±3이다.

[0533] ● 보다 특히 Z는 에틸아세트아미도기를 경유하여 Y에 접합된다.

[0534] ○ 특히 Z는 갈락토스, 갈락토사민 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0535] ■ 특히 Z는 C1, C2 또는 C6에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0536] ● 보다 특히 Z는 C1 또는 C2에 접합된 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민이다.

[0537] ○ 보다 특히 Z는 C1에 접합된 N-아세틸갈락토사민이다.

[0538] ● m은 약 1 내지 100의 정수이다.

[0539] ○ m은 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 또는 110이다.

[0540] ○ 특히 m은 약 1 내지 20이다.

[0541] ■ m은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 또는 22이다.

[0542] ■ 특히 m은 약 10이다.

[0543] ● m은 9, 10 또는 11이다.

[0544] ● n은 약 1 내지 100을 포함하는 혼합물을 나타내는 정수이다.

[0545] ○ n은 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 또는 110이다.

[0546] ■ 특히 n은 약 8 내지 90이다.

[0547] ■ 특히 n은 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 또는 99이다.

[0548] ● 보다 특히 n은 약 40 내지 80이다.

[0549] ● 보다 특히 n은 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 또는 88이다.

[0550] ○ n은 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 및 107-113의 범위를 포괄하는 혼합물을 나타낸다.

[0551] ■ 특히 n은 7-13, 6-14, 15-25, 26-30, 42-50, 46-57, 60-82, 85-90 및 82-99의 범위를 포괄하는 혼합물을 나타낸다.

[0552] ● 보다 특히 n은 36-44, 42-50, 46-57, 60-82 및 75-85의 범위를 포괄하는 혼합물을 나타낸다.

[0553] ○ p는 약 2 내지 150을 포함하는 혼합물을 나타내는 정수이다.

[0554] ■ p는 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 또는 165이다.

[0555] ■ 특히 n이 약 1 내지 100을 포함하는 혼합물을 나타내는 정수인 경우이다.

[0556] ● 특히 n은 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 또는 110이다.

[0557] ○ 보다 특히 n은 약 8 내지 90인 경우이다.

[0558] ○ 보다 특히 n은 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 또는 99이다.

[0559] ■ 보다 더 특히 n은 약 40 내지 80인 경우이다.

[0560] ■ 보다 더 특히 n은 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 또는 88이다.

[0561] ● 보다 특히 p는 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 또는 110이다.

[0562] ○ 특히 n은 약 1 내지 100을 포함하는 혼합물을 나타내는 정수인 경우이다.

[0563] ■ 특히 n은 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 또는 110이다.

[0564] ● 보다 특히 n은 약 8 내지 90인 경우이다.

[0565] ● 보다 특히 n은 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 또는 99이다.

[0566] ○ 보다 더 특히 n은 약 40 내지 80인 경우이다.

[0567] ○ 보다 더 특히 n은 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 또는 88이다.

[0568] ○ 보다 특히 p는 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 또는 44이다.

[0569] ■ 특히 n은 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 또는 110이다.

[0570] ● 보다 특히 n은 약 8 내지 90이다.

[0571] ● 보다 특히 n은 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 또는 99이다.

[0572] ○ 보다 더 특히 n은 약 40 내지 80이다.

[0573] ○ 보다 더 특히 n은 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 또는 88이다.

[0574] ○ q는 약 1 내지 44를 포함하는 혼합물을 나타내는 정수이다.

[0575] ■ q는 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 또는 48이다.

[0576] 비제한적인 예에 의해, 본원의 조성물, 약제학적 제형, 제조방법 및 용도에 선호되는 특정 그룹은 화학식 2의 하기 조합 및 치환기의 변경 그룹(선호도의 증가순서로 각각 서브그룹화됨)이다

[0577] ● X는 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 치료 단백질로서 하기로부터 선택된다: 아바타셉트(Abatacept), 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아데노신 디아미나제(Adenosine deaminase), 아도-트라스투주맙 엠탄신((Ado-trastuzumab emtansine), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루세라제(Alglucerase), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), α-1-프로테이나제 억제제(α-1-proteinase inhibitor), 아나킨라(Anakinra), 아니스트렙라제(Anistreplase, 아니소일레이티드 플라스미노겐 스트렙토키나제 액티베이터 컴플렉스(anisoylated plasminogen streptokinase activator complex)), 안티트롬빈 III(Antithrombin III), 안티티모사이트 글로불린(Antithymocyte globulin), 아텝라제(Ateplase), 베바시주맙(Bevacizumab), 비발리루딘(Bivalirudin), 보툴리눔 톡신 타입 A(Botulinum toxin type A), 보툴리눔 톡신 타입 B(Botulinum toxin type B), C1-에스테라제 억제제(C1-esterase inhibitor), 카나키누맙(Canakinumab), 카르복시펩티다제 G2(Carboxypeptidase G2, 글루카르피다제(Glucarpidase) 및 보락사제(Voraxaze), 세르톨리주맙 페골(Certolizumab pegol), 세툭시맙(Cetuximab), 콜라게나제(Collagenase), 크로탈리다에 이뮨 팹(Crotalidae immune Fab), 다르베포에틴-α(Darbepoetin-α), 데노수맙(Denosumab), 디곡신 이뮨 팹(Digoxin immune Fab), 도르나제 알파(Dornase alfa), 에쿨리주맙

(Eculizumab), 에타너셉트(Etanercept), 인자 VIIa(Factor VIIa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인자 XI(Factor XI), 인자 XIII(Factor XIII), 피브리노겐(Fibrinogen), 필그라스팀(Filgrastim), 갈설파제(Galsulfase), 골리무맙(Golimumab), 히스테린 아세테이트(Histrelin acetate), 히알루로니다제(Hyaluronidase), 이두르설파제(Idursulphase), 이미글루세라제(Imiglucerase), 인플릭시맙(Infliximab), 인슐린(Insulin) [rHu 인슐린 및 소 인슐린(bovine insulin)을 포함함], 인터페론-α2a(Interferon-α2a), 인터페론-α2b(Interferon-α2b), 인터페론-β1a(Interferon-β1a), 인터페론-β1b(Interferon-β1b), 인터페론-γ1b(Interferon-γ1b), 이필리무맙(Ipilimumab), L-아르기나제(L-arginase), L-아스파라지나제(L-asparaginase), L-메티오나제(L-methionase), 락타제(Lactase), 라로니다제(Laronidase), 레피루딘/히루딘(Lepirudin/hirudin), 메카세르민(Mecasermin), 메카세르민 린파베이트(Mecasermin rinfabate), 메톡시 오파투무맙(Ofatumumab), 나탈리주맙(Methoxy Natalizumab), 옥트레오타이드(Octreotide), 오프렐베킨(Oprelvekin), 판크레아틱 아밀라제(Pancreatic amylase), 판크레아틱 리파제(Pancreatic lipase), 파파인(Papain), 페그-아스파라지나제(Peg-asparaginase), 페그-독소루비신 HCl(Peg-doxorubicin HCl), PEG-에포에틴-β(PEG-epoetin-β), 페그필그라스팀(Pegfilgrastim), 페그-인터페론-α2a(Peg-Interferon-α2a), 페그-인터페론-α2b(Peg-Interferon-α2b), 페글로티카제(Pegloticase), 페그비소만트(Pegvisomant), 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 프로테인 C(Protein C), 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase)), 사크로시다제(Sacrosidase), 연어 칼시토닌(Salmon calcitonin), 사르그라모스팀(Sargramostim), 스트렙토키나제(Streptokinase), 테넥텝라제(Tenecteplase), 테리파라타이드(Teriparatide), 토실리주맙(Tocilizumab)(아트리주맙(atlizumab)), 트라스투주맙, 타입 1 알파-인터페론(Trastuzumab, Type 1 alpha-interferon), 우스테키누맙(Ustekinumab), vW 인자(vW factor);단, interferon (interferon alpha 2, interferon alpha 5, interferon alpha 6, 또는 consensus interferon), Ribavirin, Nexavar/ Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatin/bevacizumab, 및 Herceptin/trastuzumab은 m'+m" 가 1이고 Z가 DOM 26h-196-61 또는 미국특허출원공개 제2013/0078216호에 기술된 다른 간-타겟팅 분자들인 경우 화학식 2의 범위에서 제외된다.

[0578] ○ 특히 X는 압시시맙(Abciximab), 아달리무맙(Adalimumab), 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa), 아갈시다제 베타(Agalsidase beta), 알데스루킨(Aldeslukin), 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa), 인자 VIII(Factor VIII), 인자 IX(Factor IX), 인플릭시맙(Infliximab), L-아스파라지나제(L-asparaginase), 라로니다제(Laronidase), 나탈리주맙(Natalizumab), 옥트레오타이드(Octreotide), 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL), 또는 라스부리카제(Rasburicase)(우리카아제(uricase))인 경우이다.

[0579] ■ 특히 X는 인자 VIII, 인자 IX, 우리카아제(uricase), PAL 또는 아스파라지나제인 경우이다.

[0580] ● X는 유형 1 당뇨병, 소아성 다발성 경화증, 소아 류마티스 관절염, 셀리악병, 또는 전신탈모증을 치료하기 위해 선택되는 셀프항원 폴리펩타이드이다.

[0581] ○ 특히 X는 신규한 발병(new onset) 유형 1 당뇨병, 소아 다발성 경화증 또는 셀리악병을 치료하기 위해 선택되는 셀프항원 폴리펩타이드이다.

[0582] ● X는 환자가 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 항원이다.

[0583] ○ 땅콩으로부터, 코나라킨(Ara h1)을 포함함.

[0584] ○ 밀로부터, 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24), 알파-글리아딘 "33- mer" 디아미데이티드(deamidated) (SEQ ID NO:25), 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) (SEQ ID NO:26) 및 오메가-글리아딘(Omega-gliadin) (SEQ ID NO:27)을 포함함.

[0585] ○ 고양이로부터, Fel d 1 A (UNIPROT P30438) 및 고양이 알부민(Cat albumin) (UNIPROT P49064)을 포함함.

[0586] ○ 개로부터, Can f 1 (UNIPROT 018873) 및 개 알부민(Dog albumin) (UNIPROT P49822)을 포함함.

[0587] ● X는 이식 수용체가 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 이식항원으로, 예컨대 인간 백혈구 항원 단백질이다.

[0588] ● X는 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 특이적으로 결합하는 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드이고, 상기 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체는 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환 및/또는 알러지를 유발한다.

[0589] ○ 특히 X는 내인성 순환 단백질 또는 펩타이드 또는 항체에 결합한다.

[0590] ● Y는 Gly_3Ser이다.

[0591] ● Z는 안티-ASGPR Dom26h-196-61 또는 보존적 치환체이다.

[0592] ● m'+m"는 1 또는 2이고 X는 단백질치료제를 포함한 완전장(full-length) 단백질이다.

[0593] ● m'+m"는 1 또는 2이고, 여기서 m'는 1이고 m"는 0 또는 1이다.

[0594] ● m'+m"는 2 내지 약 10이고, 여기서 X는 특정 자가면역질환과 연관된 것으로 알려지거나 유전적으로 다양한 타겟 집단을 치료하기 위한 셀프항원 펩타이드(에피토프)의 그룹이다.

[0595] ○ m'+m"는 약 4 내지 7이고, 여기서 자가면역질환은 다발성 경화증이고 X는 하기로부터 독립적으로 선택된다: 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) 및 PLP139-154 (SEQ ID NO:17).

[0596] ■ m'+m"는 7이고 X는 각각 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) 및 PLP139-154 (SEQ ID NO:17)이다.

[0597] 화학식 1에 관해 상기 논의된 바와 같이, 화학식 2에 대한 상기 기술된 그룹 및 서브그룹 각각은 개별적으로 바람직하고, 본원의 추가의 바람직한 양태를 기술하기 위해 조합될 수 있다.

[0598] **유용성, 테스트 및 투여**

[0599] **일반적 유용성**

[0600] 본원의 조성물은 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 이식거부, 치료제에 대한 면역반응, 자가면역질환 및 식품 알러지의 치료를 포함한 다양한 적응증에 용도를 갖는다.

[0601] 바람직한 양태에서, 본원의 조성물은 항원-특이적인 바람직하지 않은 면역반응을 조절, 특히 억제하기 위해 사용된다.

[0602] 본원의 조성물은, 자가면역을 일으키거나 관련 병변, 알러지, 염증성 면역반응 및 과민증(anaphylaxis)을 야기하는, 환자에서 내인적으로 생성되는 항체(즉, 환자에 투여되는 외인성 항체가 아님)를 포함한 바람직하지 않은 특정 단백질, 펩타이드 등에 결합하고 이를 순환에서 제거시키는데 유용하다.

[0603] 본원에서, 항원은 간으로 타겟팅되고 항원-제시 세포를 경유하여 제시되어 면역시스템을 특이적으로 억제하거나 원치않는 순환단백질을 클리어런스한다. 이는 간 타겟팅의 이전 용도와 구분되는데, 예컨대 미국특허출원공개 제2013/0078216호에서와 같이, DOM26h-196-61와 같은 간-타겟팅 분자의 목적은 섬유증, 간염, 간경변증 및 간암과 같은 간 질환을 치료하기 위해 치료제를 수송하는 것이었다.

[0604] 본원은, 이식 수용자가 원치않는 면역반응(예컨대, 이식거부)을 일으키는 외래 이식항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 알러지 또는 과민증)을 일으키는 외래 항원, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 과민증 및/또는 감소된 치료 활성)을 일으키는 치료제, 환자가 원치않는 면역반응(예컨대, 자가면역질환)을 일으키는 셀프항원을 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌, 셀프항원 및 외래 항원에 대한 원치않는 면역반응을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

[0605] 본원에서 제공되는 방법 및 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 자가면역질환은 하기를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다: 급성횡단성 척수염(Acute Disseminated Encephalomyelitis, ADEM); 급성간질성 알러지신염(Acute interstital allergic nephritis)(약물 알러지); 급성괴사출혈 백색질뇌염(Acute necrotizing hemorrhagic leukoencephalitis); 애디슨병(Addison's Disease); 원형탈모증(Alopecia areata); 전신탈모증(Alopecia universalis); 강직성척추염(Ankylosing Spondylitis); 소아관절염(Arthritis, juvenile); 건선성관절염(Arthritis, psoriatic); 류마티스관절염(Arthritis, rheumatoid); 아토피성피부염(Atopic Dermatitis); 자가면역성 재생불량성빈혈(Autoimmune aplastic anemia); 자가면역성 위염(Autoimmune gastritis); 자가면역성 간염(Autoimmune hepatitis); 자가면역성 뇌하수체염((Autoimmune hypophysitis); 자가면역성 난소염(Autoimmune oophoritis); 자가면역성 고환염(Autoimmune orchitis); 1형 자가면역성 다선증후군(Autoimmune polyendocrine syndrome type 1); 2형 자가면역성 다선증후군(Autoimmune polyendocrine syndrome type 2); 자가면역성 갑상샘염(Autoimmune thyroiditis); 베체트병(Behcet's disease); 폐색성세기관지염(Bronchiolitis obliterans);

수포성유사천포창(Bullous pemphigoid); 셀리악병(Celiac disease); 척-스트라우스증후군(Churg-Strauss syndrome); 만성염증성 탈수초성 다발성신경병증(Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy); 반흔성유천포창(Cicatricial pemphigoid); 크론병(Crohn's disease); 콕사키심근염(Coxsackie myocarditis); 듀링포진상피부염(Dermatitis herpetiformis Duhring); 1형 당뇨병(Diabetes mellitus, Type 1); 결절성홍반(Erythema nodosum); 후천성표피수포증(Epidermolysis bullosa acquisita), 거대세포동맥염(Giant cell arteritis)(측두동맥염((temporal arteritis)); 거대세포심근염(Giant cell myocarditis); 구드파스트어증후군(Goodpasture's syndrome); 그레이브스병(Graves' disease); 길랭-바레증후군(Guillain-Barre syndrome); 하시모토 뇌염(Hashimoto's encephalitis); 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis); IgG4-관련 경화성질환(IgG4-related sclerosing disease); 램버트-이튼증후군(Lambert-Eaton syndrome); 혼합결합조직병(Mixed connective tissue disease); 무차-하버만병(Mucha-Habermann disease); 다발성경화증(Multiple sclerosis); 중증근무력증(Myasthenia gravis); 시신경염(Optic neuritis); 시신경척수염(Neuromyelitis optica); 심상성천포창(Pemphigus vulgaris) 및 변이형; 악성빈혈(Pernicious angemis); 뇌하수체 자가면역질환(Pituitary autoimmune disease); 다발근육염(Polymyositis); 심막절개술후증후군(Postpericardiotomy syndrome); 조기폐경(Premature ovarian failure); 일차성 담즙성 간경화증(Primary Biliary Cirrhosis); 원발 경화성 담관염(Primary sclerosing cholangitis); 건선(Psoriasis); 류마티스성 심질환(Rheumatic heart disease); 쇼그렌증후군(Sjogren's syndrome); 루푸스(Systemic lupus erythematosus); 경피증(Systemic sclerosis); 궤양성대장염(Ulcerative colitis); 미분화 결합조직 질환(Undifferentiated connective tissue disease, UCTD); 포도막염(Uveitis); 백반증(Vitiligo); 및 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis).

[0606] 본원에서 제공되는 방법 및 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 자가면역질환의 특정 그룹은 하기를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다: 급성괴사출혈 백색질뇌염(Acute necrotizing hemorrhagic leukoencephalitis); 애디슨병(Addison's Disease); 건선성관절염(Arthritis, psoriatic); 류마티스관절염(Arthritis, rheumatoid); 자가면역성 재생불량성빈혈(Autoimmune aplastic anemia); 자가면역성 뇌하수체염(Autoimmune hypophysitis); 자가면역성 위염(Autoimmune gastritis); 1형 자가면역성 다선증후군(Autoimmune polyendocrine syndrome type 1); 수포성유사천포창(Bullous pemphigoid); 셀리악병(Celiac disease); 콕사키심근염(Coxsackie myocarditis); 듀링포진상피부염(Dermatitis herpetiformis Duhring); 1형 당뇨병(Diabetes mellitus, Type 1); 후천성표피수포증(Epidermolysis bullosa acquisita); 거대세포심근염(Giant cell myocarditis); 구드파스트어증후군(Goodpasture's syndrome); 그레이브스병(Graves' disease); 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis); 혼합결합조직병(Mixed connective tissue disease); 다발성경화증(Multiple sclerosis); 중증근무력증(Myasthenia gravis); 시신경척수염(Neuromyelitis optica); 악성빈혈(Pernicious angemis); 심상성천포창(Pemphigus vulgaris) 및 변이형; 뇌하수체 자가면역질환(Pituitary autoimmune disease); 조기폐경(Premature ovarian failure); 류마티스성 심질환(Rheumatic heart disease); 경피증(Systemic sclerosis); 쇼그렌증후군(Sjogren's syndrome); 루푸스(Systemic lupus erythematosus); 및 백반증(Vitiligo).

[0607] 원치않는 면역반응을 일으키는 항원(예컨대, 식품 항원)을 사용하는 양태에서, 치료는 예컨대, 땅콩, 사과, 우유, 계란 흰자, 계란 노른자, 머스타드, 셀러리, 새우, 밀 (및 기타 곡물), 딸기 및 바바나에 대한 반응에 대해 제공될 수 있다.

[0608] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 환자는 원치않는 면역반응을 일으키는 외래 항원을 규명하기 위해 테스트될 수 있으며 본원의 조성물은 항원에 기반하여 개발될 수 있다.

[0609] **테스트**

[0610] 본원의 조성물 및 방법의 유용성을 확립하는데 있어서, 간에서 항원-제시세포에 결합(특히 헤파토사이트에 결합, 특이적으로 ASGPR에 결합)하는 특이성(specificity)이 먼저 측정되어야 한다. 이는 본원 조성물에서, 예컨대 마커(예컨대 형광 마커 피코에리트린(phycoerythrin, "PE")을 사용하여, 달성될 수 있다. 조성물은 적절한 실험 개체에 투여된다. 대조군, 예컨대 비접합 PE 또는 비히클(식염수)이 다른 개체군에 투여된다. 조성물 및 대조군은 1 내지 5시간의 기간동안 순환한 후 개체의 비장 및 간이 적출되어 형광 측정된다. 그 후 형광이 발견되는 특정 세포가 확인된다. 본원의 조성물은, 이러한 방식으로 테스트될 때, 비접합 PE 또는 비히클에 비해 간의 항원-제시세포에서 더 높은 수준의 농도를 보인다.

[0611] 면역조절에서 효율성은, 항원 단독 또는 비히클만 투여한 것에 비해, 오브알부민("OVA")과 같은 기지의 항원을 포함하는 본원의 조성물의 투여에 반응하는 (호스트 마우스에 이식된) OT-I CD8+ 세포의 증식을 측정함으로써 테스트될 수 있다. 본원의 조성물은, 이러한 방식으로 테스트될 때, 항원 단독 또는 비히클과 비교하여 OT1 세

포 증식의 증가를 보이는데, 이는 증가된 CD8+ T-세포 교차 감작(cross-priming)을 입증한다. 기능 작용인자(functional effector) 표현형으로 성장하는 T 세포를, 성장하고 제거되는 것과 구분하기 위해, 증식하는 OT-I CD8+ T 세포는 소진의 분자 사인(예컨대, 프로그램된 사멸-1 (programmed death-1, PD-1), FasL 및 기타) 및 아포토시스(apoptosis) 및 제거의 홀마크로서 아넥신-V에 대해 표현형으로 분석될 수 있다. OT-I CD8+ T 세포는 또한 보조제 및 항원 챌린지에 대한 그 반응성이 평가됨으로써 항원에 대한 기능적인 비-반응성, 즉 면역관용을 입증할 수 있다. 이를 위해, 호스트 마우스에 본원의 조성물을 투여한 다음 항원 챌린지를 하여 염증 표지(inflammatory signature)에 대해 세포를 분석한다. 본원의 조성물은, 이러한 방식으로 테스트될 때, OVA에 대해 염증성 OT-I CD8+ T 세포 반응의 매우 낮은(예컨대 백그라운드) 수준을 나타내므로 면역관용을 입증한다.

[0612] 체액 면역반응은, OVA와 같은 기지의 항원을 포함하는 본원의 조성물을 투여하고 얻어지는 항체의 수준을 측정함으로써, 항원 단독 또는 비히클만 투여한 것과 비교하여, 테스트될 수 있다. 이러한 방식으로 테스트될 때, 본원 조성물의 투여 및 비히클의 투여에 대해서는 매우 낮은(예컨대 백그라운드) 수준의 항체 형성 반응을 보이는데 반해, 항원의 투여에 대해서는 유의적으로 더 높은 항체 형성 반응이 나타난다.

[0613] 항원에 대한 면역관용에서의 유효성이 체액 면역반응에 대한 상기와 같이 테스트될 수 있는데, 본원 조성물로 처리하고 수 주 후에 개체군은 항원 단독의 투여로 챌린지되고 그 다음 항원에 대한 항체의 수준을 측정한다. 본원의 조성물은, 이러한 방식으로 테스트될 때, 본원의 조성물로 전처리 하지 않은 그룹에 비해, 본원의 조성물로 전처리된 그룹에서 항원 챌린지에 대해 낮은 수준의 항체 생성 반응을 보인다.

[0614] 질병-포커스된 실험 모델은 당업자에게 잘 알려져 있고, 자가면역 및 면역관용의 NOD (또는 비-비만성 당뇨) 마우스 모델 및 인간 염증성 탈수초성 질병인 다발성 경화증에 대한 EAE (실험적 자가면역 뇌수막염) 모델을 포함한다. 특히, NOD 마우스는 자발적 자가면역 당뇨병(인간의 유형 1a 당뇨병과 유사함)을 일으킨다. NOD 마우스 그룹은 테스트 화합물 또는 음성 대조군으로 처리된 후 혈중 글루코스를 측정한다. 성공적인 치료는 인간의 당뇨병 치료 가능성 또는 다른 자가면역 질환의 치료에 대한 접근 메커니즘의 증거에 해당한다. (예컨대, 문헌 [Anderson and Bluestone, Annu. Rev. Immunol. 2005:23:447-85] 참조.)

[0615] **투여**

[0616] 본원의 조성물은 치료적으로 유효한 용량, 예컨대 앞서 기술된 질병 상태에 대한 치료를 제공하기에 충분한 용량에서 투여된다. 본원 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 유사한 용도를 제공하는 제제에 대한 투여의 허용가능한 임의의 형태를 통해 투여된다.

[0617] 인간 용량 수준은 본원 화합물에 대해 최적화 되어야 하는데, 이는 처음에는 마우스에 대해 투여되는 약 10 ㎍ 내지 100 ㎍ 용량으로부터 외삽될 수 있다. 일반적으로, 인간의 개별 용량은 체중당 약 0.01 내지 2.0 mg/kg, 바람직하게는 약 0.1 내지 1.5 mg/kg, 및 보다 바람직하게는 약 0.3 내지 1.0 mg/kg이다. 치료는 하루동안 또는 며칠동안 투여될 수 있고, 수일의 간격으로, 1주 또는 수 주, 1달 또는 수 개월의 간격으로 반복될 수 있다. 투여는 일회량(예컨대, 볼러스(bolus))으로서 또는 초기 볼러스 후 전체 용량에 대한 잔여 부분의 일정 시간동안 (예컨대 1 내지 7일) 연속적 주입으로서 이루어질 수 있다. 투여되는 활성 화합물의 양은 물론 하기의 어느 것 또는 모든 것에 의존적일 것이다: 치료되는 대상 및 질병 상태, 고통의 심각성, 투여 방식 및 스케쥴, 및 처방 의사의 판단. 투여량은 항원, 항체, 항체 프래그먼트 또는 리간드의 분자량 및 링커의 사이즈에 의지할 것이라는 점 역시 이해될 수 있다.

[0618] 본원 조성물은 단독 또는 다른 약제학적으로 허용가능한 첨가제와 조합하여 투여될 수 있다. 모든 전형적인 투여 경로가 고려될 수 있으며, 주사에 적절한 액체 제형(dosage form)을 제공하는 것이 현재로서는 바람직하다. 제제는 일반적으로 통상적인 약제학적 담체 또는 첨가제 및 본원의 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 조성물은, 본원 조성물에 사용되는 항원(X)에 대응하는 치료 단백질, 펩타이드, 항체 또는 항체-유사 분자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아닌, 다른 약물, 약제, 담체 등을 포함할 수 있고, 또한 항폴린산제(anti-folates), 면역억제제, 세포증식억제제(cytostatics), 유사분열억제제(mitotic inhibitor) 및 항-대사체 또는 이의 조합을 포함하는, 면역 조절제로 작용할 수 있고, 보다 특이적으로 B-세포에 억제효과를 나타낼 수 있는, 다른 활성물질을 포함할 수 있다.

[0619] 일반적으로, 투여의 의도된 양식에 따라, 약제학적으로 허용가능한 조성물은 본원 조성물의 중량으로 약 0.1% 내지 95%, 바람직하게는 약 0.5% 내지 50%를 포함할 수 있고, 잔여물은 적절한 약제학적 첨가제, 담체 등이다. 0.005% 내지 95%의 범위로 활성 성분을 함유하는 제형 또는 조성물은 비-독성 담체로 균형적으로 보충되어 제조될 수 있다.

[0620] 약제학적으로 투여가능한 액체 조성물은, 예컨대, 본원의 활성 조성물(예컨대, 동결건조된 분말) 및 임의적인 약제학적 보조제를, 예컨대 물(주사용 물), 식염수, 수성 덱스트로스, 글리세롤, 글리콜, 에탄올 등(갈락토스 제외)과 같은 담체에 용해하고, 분산하는 등에 의해 용액 또는 현탁액으로 제조될 수 있다. 필요한 경우, 투여되는 약제학적 조성물은 또한 소량의 비독성 보조 물질, 예컨대 습윤제, 유화제, 안정화제, 가용화제, pH 완충제 등(예컨대, 소듐 아세테이트, 소듐 시트레이트, 사이클로덱스트린 유도체, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 아세테이트 및 트리에탄올아민 올리에이트 등), 삼투물질, 아미노산, 당 및 탄수화물, 단백질 및 중합체, 염, 계면활성제, 킬레이트제 및 항산화제, 방부제, 및 특정 리간드를 함유할 수 있다. 이러한 제형을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 알려져 있거나 자명할 것이다: 예컨대, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, 22nd Edition, 2012] 참조. 좌우간, 투여되는 조성물 또는 제제는 치료되는 개체의 증상을 치료하기에 유효한 양으로 활성 화합물의 양을 함유할 것이다.

[0621] **실시예**

[0622] 하기 실시예는 상기 기술된 본원 발명을 사용하는 양태를 보다 상세히 기술하며 본원의 다양한 양태를 실행하기 위해 고려되는 최선 양태를 설명하기 위한 것이다. 이러한 실시예들은 결코 본원 발명의 진실한 범위를 제한하기 위한 것이 아니며, 예시적인 목적으로 제시되는 것이다. 본원에서 인용되는 모든 문헌은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0623] **실시예 1**

[0624] **F1aA-OVA-m_4-n_{80} (또는 F1a-OVA-m_4-n_{80}-2NGGAL)**

[0625] 1A. X'가 OVA이고 m이 4인, 화학식 103'

[0626] 엔도톡신-프리(endotoxin-free) 튜브에서, OVA (5.0 mg, 0.00012 mmol)를 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 100 ㎕에 가하고 교반하였다. 별도로, 트라우트 시약(Traut's Reagent) 1 mg을 pH 7.0의 PBS 100 ㎕ 에 용해하고, 얻어지는 트라우트 시약 용액 16 ㎕ (0.00119 mmol)를 OVA 교반 용액에 계속 교반하면서 가하였다. 1 시간 후, 과잉의 트라우트 시약을 원심분리 크기배제 컬럼으로 제거하여 화학식 103'의 대응하는 화합물을 수득하였다.

[0627] 1B. n이 80인, 화학식 106A

[0628] 엔도톡신-프리 튜브에서, 갈락토사민(10.0 mg, 0.04638 mmol)을 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 100 ㎕에 교반 용해시켰다. pH 7.0의 PBS 100 ㎕에 용해된 피리딜 다이티올-폴리(에틸렌 글리콜)-NHS 에스테르(n이 80인 화학식 104) (16.23 mg, 0.00464 mmol)를 갈락토사민의 교반 용액에 첨가하였다. 1시간 후, 얻어지는 피리딜 다이티올-폴리(에틸렌 글리콜)-아세틸갈락토사민(화합물 106A)는 추가 정제 없이 사용할 준비가 되었다.

[0629] 1C. X'가 OVA이고 m이 4이고 n이 80인 (또한 Z'가 C2 갈락토사민인), 화학식 1aA

[0630] 실시예 1A에서 제조한 화학식 103'의 정제된 OVA-트라우트 접합체를 실시예 1B에서 제조한 화학식 106A의 교반 생성물에 직접 첨가하였다. 1시간 후, 얻어진 화학식 1a의 생성물을, 반응 혼합물을 원심 크기배제 컬럼에 통과시킴으로써 정제하였다. 캐릭터리제이션(characterization)(UHPLC SEC, 겔 전기영동)을 통해 생성물을 규명하였다. (도 5 참조.)

[0631] 1D. 화학식 103'의 기타 화합물

[0632] 실시예 1A에 기술된 순서에 따르되 OVA를 하기 화합물로 치환함으로써:

[0633] ● 압시시맙(Abciximab),

[0634] ● 아달리무맙(Adalimumab),

[0635] ● 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa),

[0636] ● 아갈시다제 베타(Agalsidase beta),

[0637] ● 알데스루킨(Aldeslukin),

[0638] ● 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa),

[0639] ● 인자 VIII(Factor VIII),

[0640] ● 인자 IX(Factor IX),

[0641] ● L-아스파라지나제(L-asparaginase),

[0642] ● 라로니다제(Laronidase),

[0643] ● 옥트레오타이드(Octreotide),

[0644] ● 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase),

[0645] ● 라스부리카제(Rasburicase),

[0646] ● 인슐린(Insulin) (SEQ ID NO:5),

[0647] ● GAD-65 (SEQ ID NO:6),

[0648] ● IGRP (SEQ ID NO:7)

[0649] ● MBP (SEQ ID NO:8),

[0650] ● MOG (SEQ ID NO:9),

[0651] ● PLP (SEQ ID NO:10),

[0652] ● MBP13-32 (SEQ ID NO:11),

[0653] ● MBP83-99 (SEQ ID NO:12),

[0654] ● MBP111-129 (SEQ ID NO:13),

[0655] ● MBP146-170 (SEQ ID NO:14),

[0656] ● MOG1 -20 (SEQ ID NO:15),

[0657] ● MOG35-55 (SEQ ID NO:16),

[0658] ● PLP139-154 (SEQ ID NO:1 7),

[0659] ● MART1 (SEQ ID NO:18),

[0660] ● 티로시나제(Tyrosinase) (SEQ ID NO:19),

[0661] ● PMEL (SEQ ID NO:20),

[0662] ● 아쿠아포린-4(Aquaporin-4) (SEQ ID NO:21),

[0663] ● S-아레스틴(S-arrestin) (SEQ ID NO:22),

[0664] ● IRBP (SEQ ID NO:23),

[0665] ● 코나라킨(Conarachin) (UNIPROT Q6PSU6),

[0666] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24),

[0667] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미네이티드(deamidated) (SEQ ID NO:25),

[0668] ● 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) (SEQ ID NO:26),

[0669] ● 오메가-글리아딘(Omega-gliadin) (SEQ ID NO:27),

[0670] ● Fel d 1 A (UNIPROT P30438),

[0671] ● 고양이 알부민(Cat albumin) (UNIPROT P49064),

[0672] ● Can f 1 (UNIPROT 018873),

[0673] ● 개 알부민(Dog albumin) (UNIPROT P49822), 및

[0674] ● RhCE example (UNIPROT P18577),

[0675] 하기 대응하는 화학식 103'의 화합물을 수득하였다.

[0676] ● X는 압시시맙(Abciximab)이고 m은 10인 화합물,

[0677] ● X는 아달리무맙(Adalimumab)이고 m은 11인 화합물,

[0678] ● X는 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa)이고 m은 14인 화합물,

[0679] ● X는 아갈시다제 베타(Agalsidase beta)이고 m은 14인 화합물,

[0680] ● X는 알데스루킨(Aldeslukin)이고 m은 6인 화합물,

[0681] ● X는 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa)이고 m은 13인 화합물,

[0682] ● X는 인자 VIII(Factor VIII)이고 m은 100인 화합물,

[0683] ● X는 인자 IX(Factor IX)이고 m은 18인 화합물,

[0684] ● X는 L-아스파라지나제(L-asparaginase)이고 m은 5인 화합물,

[0685] ● X는 라로니다제(Laronidase)이고 m은 7인 화합물,

[0686] ● X는 옥트레오타이드(Octreotide)이고 m은 1인 화합물,

[0687] ● X는 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase)이고 m은 12인 화합물,

[0688] ● X는 라스부리카제(Rasburicase)이고 m은 12인 화합물,

[0689] ● X는 인슐린(Insulin) (SEQ ID NO:5)이고 m은 2인 화합물,

[0690] ● X는 GAD-65 (SEQ IDNO:6)이고 m은 8인 화합물,

[0691] ● X는 IGRP (SEQ ID NO:7)이고 m은 7인 화합물,

[0692] ● X는 MBP (SEQ ID NO:8)이고 m은 6인 화합물,

[0693] ● X는 MOG (SEQ ID NO:9)이고 m은 5인 화합물,

[0694] ● X는 PLP (SEQ IDNO:10)이고 m은 8인 화합물,

[0695] ● X는 MBP13-32 (SEQ ID NO:11)이고 m은 1인 화합물,

[0696] ● X는 MBP83-99 (SEQ ID NO:12)이고 m은 1인 화합물,

[0697] ● X는 MBP111-129 (SEQ ID NO:13)이고 m은 1인 화합물,

[0698] ● X는 MBP146-170 (SEQ ID NO:14)이고 m은 2인 화합물,

[0699] ● X는 MOG1-20 (SEQ ID NO:15)이고 m은 1인 화합물,

[0700] ● X는 MOG35-55 (SEQ ID NO:16)이고 m은 2인 화합물,

[0701] ● X는 PLP139-154 (SEQ ID NO:17)이고 m은 3인 화합물,

[0702] ● X는 MART1 (SEQ ID NO:18)이고 m은 4인 화합물,

[0703] ● X는 티로시나제(Tyrosinase) (SEQ ID NO:19)이고 m은 8인 화합물,

[0704] ● X는 PMEL(SEQ ID NO:20)이고 m은 5인 화합물,

[0705] ● X는 아쿠아포린-4(Aquaporin-4) (SEQ ID NO:21)이고 m은 4인 화합물,

[0706] ● X는 S-아레스틴(S-arrestin) (SEQ ID NO:22)이고 m은 12인 화합물,

[0707] ● X는 IRBP (SEQ ID NO:23)이고 m은 21인 화합물,

[0708] ● X는 코나라킨(Conarachin)이고 m은 21인 화합물,

[0709] ● X는 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24)이고 m은 1인 화합물,

[0710] ● X는 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드 (SEQ ID NO:25)이고 m은 1인 화합물,

[0711] ● X는 알파-글리아딘 (SEQ ID NO:26)이고 m은 1인 화합물,

[0712] ● X는 오메가-글리아딘 (SEQ ID NO:27)이고 m은 1인 화합물,

[0713] ● X는 Fel d 1이고 m은 4인 화합물,

[0714] ● X는 고양이 알부민이고 m은 16인 화합물,

[0715] ● X는 Can f 1이고 m은 6인 화합물,

[0716] ● X는 개 알부민이고 m은 23인 화합물, 및

[0717] ● X는 RhCE example이고, m은 10인 화합물.

[0718] 1E. 화학식 1aA의 기타 화합물

[0719] 실시예 1C에 기술된 순서를 따르되, 예컨대 실시예 1D에서 얻어진 바와 같은, 화학식 103'의 화합물을 치환함으로써, 화학식 1aA의 하기 대응하는 화합물을 수득한다:

[0720] ● FlaA-압시시맙-m_{10}-n_{80},

[0721] ● FlaA-아달리무맙-m_{11}-n_{80},

[0722] ● FlaA-아갈시다제 알파-m_{14}-n_{80},

[0723] ● FlaA-아갈시다제 베타-m_{14}-n_{80},

[0724] ● FlaA-알데스루킨-m_{6}-n_{80},

[0725] ● FlaA-알글루코시다제 알파-m_{13}-n_{80},

[0726] ● FlaA-인자 VIII-m_{100}-n_{80},

[0727] ● FlaA-인자 IX-m_{18}-n_{80},

[0728] ● FlaA-L-아스파라지나제-m_{5}-n_{80},

[0729] ● FlaA-라로니다제-m_{7}-n_{80},

[0730] ● FlaA-옥트레오타이드-m_{1}-n_{80},

[0731] ● FlaA-페닐알라닌 암모니아-리아제-m_{12}-n_{80},

[0732] ● FlaA-라스부리카제-m_{12}-n_{80},

[0733] ● FlaA-인슐린-m_{2}-n_{80},

[0734] ● FlaA-GAD-65-m_{8}-n_{80},

[0735] ● FlaA-IGRP-m_{7}-n_{80},

[0736] ● FlaA-MBP-m_{6}-n_{80},

[0737] ● FlaA-MOG-m_{5}-n_{80},

[0738] ● FlaA-PLP-m_{8}-n_{80},

[0739] ● FlaA-MBP13-32-m_{1}-n_{80},

[0740] ● FlaA-MBP83-99-m_{1}-n_{80},

[0741] ● FlaA-MBP111-129-m_{1}-n_{80},

[0742] ● FlaA-MBP146-170-m_2-n_{80},

[0743] ● FlaA-MOG1-20-m_1-n_{80},

[0744] ● FlaA-MOG35-55-m_2-n_{80},

[0745] ● FlaA-PLP139-154-m_3-n_{80},

[0746] ● FlaA-MART1-m_4-n_{80},

[0747] ● FlaA-티로시나제-m_8-n_{80},

[0748] ● FlaA-PMEL-m_5-n_{80},

[0749] ● FlaA-아쿠아포린-4-m_4-n_{80},

[0750] ● FlaA-S-아레스틴-m_{12}-n_{80},

[0751] ● FlaA-IRBP-m_{21}-n_{80},

[0752] ● FlaA-코나라킨-m_{21}-n_{80},

[0753] ● FlaA-알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브-m_1-n_{80},

[0754] ● FlaA-알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-m_1-n_{80},

[0755] ● FlaA-알파-글리아딘-m_1-n_{80},

[0756] ● FlaA-오메가-글리아딘-m_1-n_{80},

[0757] ● FlaA-Fel d 1-m_4-n_{80},

[0758] ● FlaA-고양이 알부민-m_{16}-n_{80},

[0759] ● FlaA-Can f 1-m_6-n_{80},

[0760] ● FlaA-개 알부민-m_{23}-n_{80}, 및

[0761] ● FlaA-RhCE-m_{10}-n_{80}.

[0762] 1F. 화학식 106A의 기타 화합물

[0763] 실시예 1B에 기술된 순서에 따르되 피리딜 다이티올-폴리(에틸렌 글리콜)-NHS 에스테르(n이 80인 화학식 104)를 하기로 치환함으로써:

[0764] ● n이 12인 화학식 104,

[0765] ● n이 33인 화학식 104,

[0766] ● n이 40인 화학식 104,

[0767] ● n이 43인 화학식 104,

[0768] ● n이 50인 화학식 104,

[0769] ● n이 60인 화학식 104,

[0770] ● n이 75인 화학식 104, 및

[0771] ● n이 80인 화학식 104,

[0772] 화학식 106A의 하기 대응하는 화합물을 수득한다:

[0773] ● n이 12인 화합물,

[0774] ● n이 33인 화합물,

[0775] ● n이 40인 화합물,

[0776] ● n이 43인 화합물,

[0777] ● n이 50인 화합물,

[0778] ● n이 60인 화합물,

[0779] ● n이 75인 화합물, 및

[0780] ● n이 84인 화합물.

[0781] 1G. 화학식 1aA의 기타 화합물

[0782] 실시예 1E에 기술된 순서를 따르되 화학식 106A의 화합물을 실시예 1F에서 수득한 화합물로 치환함으로써, 예컨대 하기와 같이 n이 12, 33, 40, 43, 50, 60, 75 및 84인 화학식 1aA의 대응하는 화합물을 수득한다:

[0783] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{12},

[0784] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{33},

[0785] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{40},

[0786] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{43},

[0787] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{50},

[0788] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{60},

[0789] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{75}, 및

[0790] ● F1aA-인슐린-m_2-n_{84}.

[0791] **실시예 2**

[0792] **F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL**

[0793] 2A. X'가 오브알부민이고 m이 1인, 화학식 103'

[0794] 엔도톡신-프리 튜브에서, OVA (6.5 mg, 0.000155 mmol)를 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 200 ㎕에 가하고 교반하였다. 별도로, 트라우트 시약 1 mg을 pH 7.0의 PBS 100 ㎕에 용해시키고 얻어지는 트라우트 시약 용액 43 ㎕ (0.00310 mmol)를 OVA 교반용액에 계속 교반하면서 가하였다. 1시간 후, 미반응 트라우트 시약을 원심분리 크기배제 컬럼을 사용하여 제거하고 화학식 103'의 생성물을 수득하였다.

[0795] 2B. X'가 오브알부민이고 m이 1이고 n이 4이고 p가 34이고 R^9가 직접결합이고 Z"가 2NAcGAL인, 화학식 1b

[0796] 마이크로 원심분리 튜브에서, 폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트)-(피리딜 다이설파이드) (화학식 201) (20.0 mg, 0.0020 mmol)을 5mM EDTA 함유 pH 8.0의 PBS 50 ㎕에 용해시켰다. 여기에 실시예 2A의 정제된 OVA-트라우트 생성물을 가하고 1시간동안 교반하였다. 얻어지는 화학식 1b의 생성물을, 원심분리 크기배제 컬럼에 반응 혼합물을 통과시킴으로써, 정제하였다. 캐릭터리제이션(UHPLC SEC, 겔 전기영동)을 통해 생성물을 규명하였다. (도 5 참조.)

[0797] 2C. 화학식 1b의 기타 화합물

[0798] 실시예 2B의 순서를 따르되 화학식 103'의 화합물, 예컨대 실시예 1D에서 수득한 화합물을 치환함으로써, 화학식 1b의 하기 대응하는 화합물을 수득한다:

[0799] ● F1b-압시시맙-m_{10}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0800] ● F1b-아달리무맙-m_{11}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0801] ● F1b-아갈시다제 알파-m_{14}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0802] ● F1b-아갈시다제 베타-m_{14}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0803] ● F1b-알데스루킨-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0804] ● F1b-알글루코시다제 알파-m_{13}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0805] ● F1b-인자 VIII-m_{100}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0806] ● F1b-인자 IX-m_{18}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0807] ● F1b-L-아스파라지나제-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0808] ● F1b-라로니다제-m_7-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0809] ● F1b-옥트레오타이드-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0810] ● F1b-페닐알라닌 암모니아-리아제-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0811] ● F1b-라스부리카제-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0812] ● F1b-인슐린-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0813] ● F1b-GAD-65-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0814] ● F1b-IGRP-m_7-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0815] ● F1b-MBP-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0816] ● F1b-MOG-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0817] ● F1b-PLP-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0818] ● F1b-MBP13-32-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0819] ● F1b-MBP83-99-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0820] ● F1b-MBP111-129-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0821] ● F1b-MBP146-170-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0822] ● F1b-MOG1-20-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0823] ● F1b-MOG35-55-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0824] ● F1b-PLP139-154-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0825] ● F1b-MART1-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0826] ● F1b-티로시나제-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0827] ● F1b-PMEL-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0828] ● F1b-아쿠아포린-4-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0829] ● F1b-S-아레스틴-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0830] ● F1b-IRBP-m_{21}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0831] ● F1b-코나라킨-m_{21}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0832] ● F1b-알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0833] ● F1b-알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0834] ● F1b-알파-글리아딘-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0835] ● F1b-오메가-글리아딘-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0836] ● F1b-Fel d 1-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0837] ● F1b-고양이 알부민-m_{16}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0838] ● F1b-Can f 1 -m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0839] ● F1b-개 알부민-m_{23}-n_4-p_{34}-2NAcGAL, 및

[0840] ● F1b-RhCE-m_{10}-n_4-p_{34}-2NAcGAL.

[0841] **실시예 3**

[0842] **F1f-OVA-m_1-n_4-p_{33}-2NAcGAL**

[0843] 3A. X'가 오브알부민이고 m이 1이고 n이 4이고 p가 33이고 R^9가 직접결합이고 Z"가 2NAcGAL인, 화학식 1f

[0844] 엔도톡신-프리 튜브에서, OVA (4.0 mg, 0.0000952381 mmol)를 pH 7.4의 PBS 0.1 ml에 가하고 교반하였다. 별도로, n이 4이고 p가 33인 화학식 601의 폴리-(n-아세틸갈락토사민)-p-니트로페놀 카보네이트 (33.0 mg, 0.002380952 mmol)를 pH 7.5의 PBS 100 ㎕에 가하고 용해될 때까지 보르텍스(vortex)하였다. 상기 두 용액을 합하고 1시간동안 격렬히 교반하였다. 그 후 혼합물을 수집하여 pH 7.4의 PBS에서 3일동안 투석(30 kDa 분자량 컷오프)하여 화학식 1f의 생성물을 얻었다.

[0845] **실시예 4**

[0846] **F1g-PVA-m_1-p_{90}-2NAcGAL**

[0847] 4A. X'가 오브알부민이고 m이 1이고 p가 90이고 R^9가 직접결합이고 Z"가 2NAcGAL인, 화학식 1g

[0848] 엔도톡신-프리 튜브에서, OVA (5.0 mg, 0.000119048 mmol)를 pH 7.4의 PBS 0.2 ml에 가하고 교반하였다. 상기 교반 용액에, pH 7.4의 PBS 0.4 ml에 용해된 폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트)-NHS (화학식 701) 75 mg (0.00297619 mmol)을 가하였다. 혼합물을 2시간동안 교반하였다. 그 후 혼합물을 수집하여 pH 7.4의 PBS에서 3일동안 투석(30 kDa 분자량 컷오프)하여 화학식 1g의 생성물을 얻었다.

[0849] **실시예 5**

[0850] **F1h-OVA-m_2-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL**

[0851] 5A. X'가 오브알부민이고 m이 2이고 n이 45인, 화학식 802'

[0852] 엔도톡신-프리 튜브에서, OVA (3.0 mg, 0.0000714286 mmol)를 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 150 ㎕에 첨가하고 교반하였다. DMF에 용해된 다이벤조사이클로옥틴-PEG-(p-니트로페닐 카보네이트) (화학식 801) (5.265 mg, 0.002142857 mmol)를 OVA 용액에 가하고 1시간동안 교반하였다. 과잉의 다이벤조사이클로옥틴-PEG-(p-니트로페닐 카보네이트)를 원심분리 크기배제 컬럼을 사용하여 제거하고 화학식 802'의 생성물을 얻었다.

[0853] 5B. X'가 오브알부민이고 m이 2이고 n이 45이고 p가 55이고 q가 4이고 R^8이 CH2이고 R^9가 직접결합이고 Z"는 2NAcGAL인, 화학식 1h

[0854] 폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트)-N3 (p가 55이고, q가 4이고, Z"가 N-아세틸갈락토사민인, 화학식 803) (33

mg, 0.002142857 mmol)를 pH 7.4의 PBS 100 ㎕에 용해하고 실시예 5A의 생성물에 교반하면서 첨가하였다. 1시간 후, 얻어지는 화학식 1h의 생성물을 원심분리 크기배제 크로마토그래피로 정제하였다.

[0855] **실시예 6**

[0856] **F1j-OVA-m_{10}-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL**

[0857] 6A. X'가 오브알부민이고 m이 10인, 화학식 103'

[0858] 엔도톡신-프리 튜브에서, OVA (5.0 mg, 0.00019 mmol)를 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 150 ㎕에 첨가하고 교반하였다. 별도로, 트라우트 시약 1 mg을 pH 7.0의 PBS 100 ㎕에 용해하고, 얻어진 트라우트 시약 용액 16 ㎕ (0.0019 mmol)를 OVA 교반 용액에 교반하면서 가하였다. 1시간 후, 미반응 트라우트 시약을 원심분리 크기배제 컬럼을 사용하여 제거하고 화학식 103'의 생성물을 얻었다.

[0859] 6B. X'가 오브알부민이고 m이 10이고 n이 45인, 화학식 902"

[0860] 다이벤조사이클로옥틴-PEG-(피리딜 다이설파이드) (n이 45인 화학식 901) (6.0 mg, 0.00238 mmol)를 DMF에 용해하고 얻어지는 용액을 실시예 6A에서 얻어진 OVA 용액에 가하고 1시간동안 교반하였다. 과잉의 다이벤조사이클로옥틴-PEG-(피리딜 다이설파이드)를 원심분리 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 제거하고 화학식 902"의 생성물을 얻었다.

[0861] 6C. X'가 오브알부민이고 m이 10이고 n이 45이고 p가 55이고 q가 4이고 R^8이 CH_2이고 R^9가 직접결합이고 Z"가 2NAcGAL인, 화학식 1j

[0862] 폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트)-N3 (p가 55이고 q가 4이고 Z"가 N-아세틸갈락토사민인, 화학식 803) (36 mg, 0.00238 mmol)를 pH 7.4의 PBS 150 ㎕에 용해하고 실시예 6B의 생성물에 교반하면서 첨가하였다. 1시간 후, 얻어지는 화학식 1j의 생성물을 원심분리 크기배제 크로마토그래피로 정제하였다(과잉의 p(GMA)-N3를 제거). 캐릭터리제이션 (UHPLC SEC, 겔 전기영동)으로 생성물을 규명하였다.

[0863] **실시예 7**

[0864] **F1L-OVA-m_2-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL**

[0865] 7A. X'가 오브알부민이고 m이 2이고 n이 80인, 화학식 1002

[0866] 다이벤조사이클로옥틴-PEG-(피리딜 다이설파이드) (n이 80인, 화학식 1001) (9.0 mg, 0.00238 mmol)를 DMF에 용해하고, 얻어지는 용액을, 예컨대 실시예 6A에서 기술된 바와 같이 제조된, 화학식 103'(X'가 오브알부민이고, m이 2임)의 정제된 OVA 용액에 가하고, 1시간동안 교반하였다. 과잉의 다이벤조사이클로옥틴-PEG-(피리딜 다이설파이드)를 원심분리 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 제거하고 화학식 1002의 생성물을 얻었다.

[0867] 7B. X'가 오브알부민이고 m이 2이고 n이 80이고 p가 55이고 q가 4이고 R^8이 CH_2이고 R^9가 직접결합이고 Z"가 2NAcGAL인, 화학식 1L

[0868] 폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트)-N3 (p가 55이고 q가 4이고 Z"가 N-아세틸갈락토사민인, 화학식 803) (36 mg, 0.00238 mmol)를 pH 7.4의 PBS 150 ㎕에 용해하고 실시예 7A의 생성물에 교반하면서 첨가하였다. 1시간 후, 얻어지는 화학식 1L의 생성물을 원심분리 크기배제 크로마토그래피로 정제하였다(과잉의 폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트)-N3를 제거). 캐릭터리제이션(UHPLC SEC, 겔 전기영동)으로 생성물을 규명하였다.

[0869] **실시예 8**

[0870] **폴리(갈락토사민 메트아크릴레이트) 중합체의 제조**

[0871] 8A. 갈락토사민 메트아크릴레이트

[0872] 교반한 갈락토사민 염산염(2.15 g, 10.0 mmol)에 0.5M의 소듐 메톡사이드(22ml, 11.0 mmol)을 가하였다. 30분 후, 메트아크릴레이트 무수물(14.694 g, 11.0 mmol)을 가하고 4시간동안 계속해서 교반하였다. 얻어지는 갈락토사민 메트아크릴레이트를 진공회전농축기(rotovap)를 거쳐 실리카겔에 로딩하고 DCM:MeOH (85:15)를 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0873] 8B. n이 4이고 p가 30인, 화학식 201

[0874] 갈락토스 메트아크릴레이트 (600 mg, 2.43 mmol), 2-(2-(2-(2-(피리딘-2-일다이설파닐)에톡시)에톡시)에톡시)에틸 2-((페닐카르보노티오일)티오)아세테이트(44.8 mg, 0.081 mmol) 및 AIBN(3.174089069 mg, 0.016 mmol)을 쉬링크 플라스크(Schlenk flask)에서 DMF 1.5 ml에 가하였다. 반응 혼합물에 대해 4회의 동결-해동 사이클을 시행한 다음, 70℃에서 6시간동안 교반하였다. 화학식 201의 목적하는 중합체 생성물을 메탄올 12 ml에서 침전시키고, 과잉의 용매를 감압 제거하였다.

[0875] **실시예 9**

[0876] **F1aA-PE-m_3-n_{80}의 제조**

[0877] 9A. X'이 피코에리트린(phycoerythrin)인, 화학식 103'

[0878] 엔도톡신-프리 튜브에서, 피코에트린("PE")(피어스(Pierce) 사에서 구입)(200 ㎕, 0.000004 mmol)를 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 50 ㎕에 가하고 교반하였다. 별도로, 트라우트 시약 1 mg을 pH 7.0의 PBS 100 ㎕에 용해하고, 얻어지는 트라우트 시약 용액 2 ㎕(0.00013 mmol)를 PE 교반 용액에 계속 교반하면서 첨가하였다. 1시간 후, 과잉의 트라우트 시약을 원심분리 크기배제 컬럼을 이용하여 제거하고 화학식 103'의 생성물을 얻었다.

[0879] 9B. n이 80인, 화학식 106A

[0880] 엔도톡신-프리 튜브에서, 갈락토사민(7.0 mg, 0.03246 mmol)을 5 mM EDTA를 함유하는 pH 8.0의 PBS 100 ㎕에 교반하면서 용해시켰다. pH 7.0의 PBS 50 ㎕에 용해된 피리딜 다이티올-폴리(에틸렌 글리콜)-NHS 에스테르(n이 80인, 화학식 104) (16.23 mg, 0.00464 mmol)를 갈락토사민의 교반 용액에 첨가하였다. 1시간 후, 얻어지는 화학식 106A의 생성물은 추가의 정제 없이 사용할 준비가 되었다.

[0881] 9C. X'이 피코에리트린이고 m이 3이고 n이 80이고 Z'이 갈락토사민인, 화학식 1a

[0882] 실시예 9A에서 제조한 정제된 PE-트라우트 접합체를 실시예 9B에서 제조한 화학식 106A의 교반 생성물에 직접 가하였다. 1시간 후, 얻어지는 화학식 1a의 생성물을, 반응 혼합물을 원심분리 크기배제 컬럼에 통과시킴으로써, 정제하였다. 캐릭터리제이션(UHPLC SEC, 겔 전기영동)으로 생성물을 규명하였다.

[0883] **실시예 10**

[0884] **OVA-DOM**

[0885] 10A. 발현벡터의 제조

[0886] 포유류 세포 발현벡터 pSecTag A를 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) 사로부터 구입하였다. 안티-ASGPR 도메인 항체를 인코딩하는 유전자, Dom26h-196-61(이하, "DOM"이라 함)을 인간 세포에서 단백질 발현을 위한 코돈-최적화된 시퀀스로서 젠스크립트(Genscript) 공급업체로부터 구입하였다. OVA, DOM, 플렉서블 링커 Gly_3Ser, 및 6xHis 태그를 인코딩하는 시퀀스를 포유동물 발현벡터 pSecTag A에 lg κ-체인 분비 리더 시퀀스의 C-말단으로 부위 특이적 변이를 통해 클로닝한 후 퀵체인지(QuikChange) 프로토콜(가이저 등(Geiser, et al.))을 변형 적용하였다.

[0887] 10B. m'가 1이고 m"가 0이고 X가 오브알부민이고 Y가 Gly_3Ser이고 Z가 안티-ASGPR DOM26h-196-61인, 화학식 2의 발현 및 정제

[0888] HEK293 세포를 폴리에틸렌이민을 사용하여, 예컨대 실시예 10A에서 기술된 바와 같이 제조된, 변형된(modified) pSecTag A 벡터로 일시적으로 트랜스펙션(transfection)시켰다. 트랜스펙션된 세포를 발프로산으로 보충된 프리스타일(FreeStyle) 293 배지(라이프 테크놀러지스)에서 배양한 다음, 원심분리로 세포를 제거하고 배양 상등액을 수집하여 여과 멸균하였다. 화학식 2의 OVA/DOM융합 단백질을 HisTrap Ni^{2+} 세파로스 컬럼(GE 헬스케어)을 이용한 고정 금속이온 친화 크로마토그래피로 배양 상등액으로부터 정제한 다음, 세파덱스 75 컬럼(GE 헬스케어)을 사용한 크기배제 크로마토그래피를 하였고, 이는 하기 일반화된 구조: 및

[0889] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C

[0890] 하기 아미노산 시퀀스를 갖는다:

[0891] GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLA SRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQE SKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVF SSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSG GGSHHHHHH (SEQ ID NO:28).

[0892] 단백질 순도는 SDS-PAGE 겔의 쿠마시 브릴리언트 블루 염색 및 안티-6xHis 태그 웨스턴 블로팅에 의해 확인하였다. 단백질 농도는 비어-램버트 법칙을 이용하여 정량하였는데, 이를 위해 NanoDrop 2000(써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 사용하여 280 nm의 흡광도를 측정하였고, 분자량(57.3 kDa) 및 흡광계수(extinction coefficient) (57,090 M^{-1} cm^{-1})를 ExPASy ProtParam 툴을 사용하여 단백질의 아미노산 시퀀스로부터 평가하였다. 엔도톡신 수준은 HEK-BLUE TLR 리포터 세포주(인비보젠)를 사용하여 제조사의 지시사항에 따라 측정하였다.

[0893] 10C. 화학식 2의 기타 조성물

[0894] 실시예 10A 및 10B에 기술된 순서를 따르되 pSecTag A 벡터를 치환함으로써, 하기 화학식 2의 융합 단백질을 얻는다:

[0895] N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C

[0896] 이는 하기의 아미노산 시퀀스를 갖는다:

[0897] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRH EHTRFDSWGQGTLVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVH SSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKG LWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPR MKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPG GGSHHHHHH (SEQ ID NO:29); 및

[0898] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C

[0899] 이는 하기의 아미노산 시퀀스를 갖는다:

[0900] GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLA SRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQE SKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVF SSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSG GGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSF SLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVT EQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGIT DVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:30).

[0901] 10D. 화학식 2의 기타 조성물

[0902] 실시예 10A 및 10B에 기술된 순서를 따르되 Gly_3Ser를 면역프로테오솜 절단 부위(immunoproteosome cleavage site, "IPC")를 갖는 링커에 대한 벡터로 치환하고, OVA를 하기에 대한 벡터로 치환하거나:

[0903] MBP13-32 (SEQ ID NO:11),

[0904] MBP83-99 (SEQ ID NO:12),

[0905] MBP111 -129 (SEQ ID NO:13),

[0906] MBP146-170 (SEQ ID NO:14),

[0907] MOG1-20 (SEQ ID NO:15),

[0908] MOG35-55 (SEQ ID NO:16), 및

[0909] PLP139-154 (SEQ ID NO:17),

[0910] 또는 하기에 대한 벡터로 치환함으로써:

[0911] 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드 (SEQ ID NO:25)

[0912] 알파-글리아딘 (SEQ ID NO:26), 및

[0913] 오메가-글리아딘 (SEQ ID NO:27),

[0914] 하기 화학식 2의 융합 단백질을 얻었다:

[0915] ● MBP13-32-IPC-MBP83-99-IPC-MBP111-129-IPC-MBP146-170-IPC-MOG1-20-IPC-MOG35-55-IPC-PLP139-154-IPC-DOM, 및

[0916] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-IPC-알파-글리아딘-IPC-오메가-글리아딘-IPC-DOM.

[0917] **실시예 11**

[0918] **탈시알릴화된 OVA(Desialylated OVA)**

[0919] 11A. 발현벡터의 제조

[0920] 포유동물 세포 발현벡터 pSecTag A를 라이프 테크놀로지스 사로부터 구입하였다. OVA, 플렉서블 링커 Gly_3Ser, 및 6xHis 태그를 인코딩하는 시퀀스를 pSecTag A에 lg κ-체인 분비 리더 시퀀스의 C-말단으로 부위 특이적 변이를 통해 클로닝한 후 퀵체인지(QuikChange) 프로토콜(가이저 등)을 변형 적용하였다.

[0921] 11B. OVA의 발현 및 정제

[0922] HEK293 세포를 폴리에틸렌이민을 사용하여, 예컨대 실시예 10A에서 기술된 바와 같이 제조된, 변형된(modified) pSecTag A 벡터로 일시적으로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션된 세포를 발프로산으로 보충된 프리스타일(FreeStyle) 293 배지(라이프 테크놀러지스)에서 배양한 다음, 원심분리로 세포를 제거하고 배양 상등액을 수집하여 여과 멸균하였다. OVA 단백질을 HisTrap Ni^{2+} 세파로스 컬럼(GE 헬스케어)을 이용한 고정화 금속이온 친화 크로마토그래피 한 다음, 세파덱스 75 컬럼(GE 헬스케어)을 사용한 크기배제 크로마토그래피를 하여 배양 상등액으로부터 정제하였고, 이는 하기 일반화된 구조: 및

[0923] N'-OVA Gly_3Ser 6xHis-C'

[0924] 하기 아미노산 시퀀스를 갖는다:

[0925] GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLA SRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQE SKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVF SSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:31).

[0926] 단백질 순도는 SDS-PAGE 겔의 쿠마시 브릴리언트 블루 염색 및 안티-6xHis 태그 웨스턴 블로팅에 의해 확인하였다. 단백질 농도는 비어-램버트 법칙을 이용하여 정량하였는데, 이를 위해 NanoDrop 2000(써모 사이언티픽(Thermo Scientific))를 사용하여 280 nm의 흡광도를 측정하였고, 분자량(43.8 kDa) 및 흡광계수(extinction coefficient)(57,090 M^{-1} cm^{-1})를 ExPASy ProtParam 툴을 사용하여 단백질의 아미노산 시퀀스로부터 평가하였다.

[0927] 11C. 탈시알릴화(Desialylation)

[0928] OVA를 뉴라미니다제와 함께 37℃에서 1시간동안 배양함으로써 탈시알릴화한다(뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)). 탈시알릴화된 OVA는 고정화 금속이온 친화 크로마토그래피(예컨대, GE 헬스케어 사의 HisTrap Ni^{2+} 세파로스 컬럼을 사용)한 다음 크기배제 크로마토그래피(예컨대, GE 헬스케어 사의 세파덱스 75 컬럼을 사용)하여 반응 혼합물로부터 정제된다.

[0929] 단백질 순도는 SDS-PAGE 겔의 쿠마시 브릴리언트 블루 염색 및 안티-6xHis 태그 웨스턴 블로팅에 의해 확인한다. 탈시알릴화는 웨스턴 블롯에서 단백질 시알산 함량의 삼버커스 니그라(Sambucus nigra) 렉틴-기반 검출 (벡터 바이오랩스(Vector Biolabs)) 및 시알산-매개된 형광 분석(프로자임(ProZyme))에 의해 확인한다. 탈시알릴화 단백질 농도는, 탈시알릴화 전 단백질에 대해 상기 기술된 바와 같이, 비어-램버트 법칙을 이용하여 측정한다. 엔도톡신 수준은 HEK-BLUE TLR 리포터 세포주(인비보젠)를 사용하여 제조사의 지시사항에 따라 측정하였다.

[0930] **실시예 12**

[0931] **간 분포(Hepatic Distribution)**

[0932] 12A. F1aA-PE-m_3-n_{80}을, 예컨대 실시예 9에 기술된 바와 같이, 제조하였다. 멸균 식염수 중 30 ㎍/100 ㎕ 용액을 주사용으로 제조하였다.

[0933] F1aA-PE-m_3-n_{80} 용액 (30 ㎍)을 3 그룹의 C57 블랙 중 한 그룹에 꼬리정맥주사(tail vein injection)로 투여하였다. 마우스의 다른 두 그룹에는 동등한 부피의 식염수 100 ㎕ 중 피코에리트린 또는 식염수 비히클을 투여하였다. 투여 후 3시간 경과시점에서, 상기 동물의 간과 비장을 적출하고 상기 기관의 세포 형광 수준을 유동세포계수법(flow cytometry)에 의해 측정하였고, 세포의 PE 함량을 나타낸다.

[0934] 도 1에 나타난 바와 같이, F1aA-PE-m_3-n_{80}로 처리한 마우스의 간에 굴내피세포(sinusoidal endothelial cells, LSECs), 헤파토사이트, 쿠퍼셀(Kupffer cells, KC), 및 기타 항원-제시세포(APCs)는 PE 용액을 투여한 동물에 비교하여 3배 이상의 형광 증가를 나타냈다. 세 그룹에서 적출한 비장 세포에서는 검출가능한 형광 차이가 발견되지 않았다. 이러한 결과는 F1aA-PE-m_3-n_{80}가 간의 항원-제시 세포에 결합하기에 충분한 특이성을 갖는다는 점을 확인하여 준다.

[0935] 12B. 실시예 12A에서 기술된 순서를 따르되 F1aA-PE-m_3-n_{80}를, 예컨대 실시예 9에서 기술된 바와 같이 실시예 2B, 3, 4, 5B, 6B, 7B, 19G, 19L, 20B 및 20F에서 X의 치환에 의해 제조된 F1b-PE-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL, F1f-PE-m_3-n_4-p_{33}-2NAcGAL, F1g-PE-m_3-p_{90}-2NAcGAL, F1h-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL, F1j-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL, F1L-PE-m_3-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL, F1m-PE-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc, F1m-PE-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH, F1n-PE-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc 및 F1n-PE-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH로 각각 치환함으로써, 화합물 F1aA-PE-m_3-n_{80}는 화합물 F1b-PE-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL, F1f-PE-m_3-n_4-p_{33}-2NAcGAL, F1g-PE-m_3-p_{90}-2NAcGAL, F1h-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL, F1j-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL, F1L-PE-m_3-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL, F1m-PE-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc, F1m-PE-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH, F1n-PE-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc 및 F1n-PE-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH와 함께 간에서 항원-제시 세포에 결합하기에 충분한 특이성을 갖는다는 점이 확인된다.

[0936] **실시예 13**

[0937] **항원-특이적인 OT1 CD8+ T 세포의 증식**

[0938] 13A. 예컨대, 실시예 1에 기술된 바와 같이 합성된 F1aA-OVA-m_4-n_{80}를 주사용으로 식염수 용액 10 ㎍/100 ㎕으로 제조하였다. 0일째(Day 0) 날에, 10^6 OT-1 T 세포를 형광 표지하고 3 그룹의 CD 45.2 마우스(그룹 당 5마리)에 꼬리정맥주사하여 입양전달(adoptively transfer)하였다. 그 다음날(즉, Day 1), 3 그룹의 마우스의 각 그룹에 F1aA-PE-m_4-n_{80} 10 ㎍, OVA 또는 식염수를 꼬리정맥주사로 투여하였다. 6일째 되는 날(Day 6), 동물을 희생시키고 비장의 증식 OT-1 세포의 백분율을 형광 활성화된 세포 분류를 통해 측정하였다.

[0939] 이러한 연구의 결과(도 2 참조)는 F1aA-OVA-m_4-n_{80}으로 처리된 마우스(도 2에서 "GAL-OVA")에서 증식 OTI T 세포의 백분율이, OVA 또는 식염수로 처리된 마우스(도 2에서 "naive")의 비장에서 증식 OTI 세포의 백분율보다 유의적으로 더 크다는 점을 보여준다. OTI 세포 증식의 증가는 다른 치료법에 비해 F1aA-OVA-m_4-n_{80}으로 처리된 동물에서 CD8+ T-세포 교차감작(cross-priming)이 증가되었음을 보여준다. 실시예 12의 결과와 함께, 이러한 결과는 간으로 항원을 타겟팅하는 F1aA-OVA-m_4-n_{80}의 능력이 간의 항원제시세포에 의한 OVA-특이적인 OTI T세포로 OVA 제시를 증가시킨다는 것을 보여준다.

[0940] 13B. 기능 작용인자(functional effector) 표현형으로 성장하는 T 세포를 성장 및 제거되는 것과 구분하기

위해, 증식 OTI CD8+ T 세포를, 세포사멸 후 제거의 홀마크인 아넥신-V(annexin-V) 및 소진 마커(exhaustion marker)인 PD-1(programmed death-1)에 대해 분석하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, F1aA-OVA-m_4-n_{80}(도 3에서 "GAL-OVA")은 가용성 OVA(soluble OVA)보다 훨씬 더 많은 수의 아넥신-V+ 및 PD-1+ 증식 OTI CD8+ T 세포를 유도하였다.

[0941] 13C. 실시예 13A 및 13B에 기술된 순서를 따르되, F1aA-OVA-m_4-n_8을, 예컨대 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G에 기술된 바와 같이 수득한, 화학식 1의 화합물로 치환함으로써, 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G의 화합물이 가용성 OVA보다 훨씬 더 많은 수의 아넥신-V+ 및 PD-1+ 증식 OTI CD8+ T 세포를 유도한다는 것을 보여준다.

[0942] 13D. 실시예 13A 및 13B에 기술된 순서에 따르되 F1aA-OVA-m_4-n_8을, 예컨대 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F에 기술된 바와 같이 수득한, 화학식 1 및 2의 화합물로 치환하고, OVA를 X(또는 X' 또는 X")에 대응하는 항원으로 치환함으로써, 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F의 화합물이 가용성 항원 X보다 훨씬 더 많은 수의 아넥신-V+ 및 PD-1+ 증식 OTI CD8+ T 세포를 유도한다는 것을 보여준다.

[0943] **실시예 14**

[0944] **F1aA-OVA-m_4-n_8은 OVA-특이적인 항체 반응을 유도하지 않는다.**

[0945] 14A. F1aA-OVA-m_4-n_8에 대한 체액 면역반응을 평가하기 위해, 마우스에 F1aA-OVA-m_4-n_8 또는 OVA를 매주 i.v. 주사한 다음, 혈중 OVA-특이적인 항체의 수준을 측정하였다. 실험 0, 7 및 14일째 되는 날에, 마우스에게 하기의 어느 하나를 함유하는 식염수 100 ㎕를 i.v. 주사하였다: 1) OVA 6 ㎍; 2) F1aA-OVA-m_4-n_8 6 ㎍; 3) OVA 30 ㎍; 4) F1aA-OVA-m_4-n_8 30 ㎍; 또는 5) 식염수 단독. 각 그룹은 5마리의 마우스를 포함하였다. 19일째 날(Day 19)에, 마우스에 대해 볼 천자(cheek puncture)로 채혈하고 각 마우스 혈액에서 OVA-특이적인 항체의 역가(titer)를 ELISA로 측정하였다. 본 연구의 결과에서, OVA 6 ㎍ 및 30 ㎍으로 처리한 마우스는 OVA-특이적인 항체 역가가 증가하였으나, F1aA-OVA-m_4-n_8 6 ㎍ 및 30 ㎍로 처리된 마우스(도 4에서 "Gal-OVA")는 식염수로 처리된 마우스(즉, 비히클로 처리된 동물)와 유사한 혈액 역가를 보였다(도 4). 예컨대, OVA 6 ㎍ 및 30 ㎍로 처리된 마우스는 각각 3.5 및 2.5의 평균 항체 역가를 가졌는데 반하여, F1aA-OVA-m_4-n_8 6 ㎍ 및 30 ㎍로 처리된 마우스는 각각 0.75 및 0.25의 평균 항체 역가를 가졌다.

[0946] 14B. 실시예 14A에 기술된 순서를 따르되 F1aA-OVA-m_4-n_8를, 예컨대 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G에 기술된 대로 얻어진 화학식 1의 화합물로 치환함으로써, 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G의 화합물로 처리된 마우스는 식염수로 처리된 마우스와 유사한 OVA-특이적인 항체 역가를 가짐을 보여준다.

[0947] 14C. 실시예 14A에 기술된 순서를 따르되 F1aA-OVA-m_4-n_8를, 예컨대 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F에 기술된 대로 얻어진 화학식 1 및 2의 화합물로 치환하고, OVA를 X(또는 X' 또는 X")에 대응하는 항원으로 각각 치환함으로써, 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F의 화합물로 처리한 마우스는 식염수로 처리한 마우스와 유사한 항원 X-특이적인 항체 역가(antigen X-specific antibody titers)를 가짐을 보여준다.

[0948] **실시예 15**

[0949] **F1aA-OVA-m_4-n_8는 OVA-특이적인 항체를 고갈시킨다.**

[0950] 15A. 다른 OVA-항체 혈액 역가(OVA-antibody blood titers)를 갖는 마우스(각 마우스는 0 내지 4.5의 역가를 가짐)를 100 ㎕의 식염수 중 가용화된 F1aA-OVA-m_4-n_8 20 ㎍의 i.v. 주사로 처리하였다. 마우스에게 0, 5, 7, 12 및 14일째 되는 날(Day 0, 5, 7, 12 및 14)에 F1aA-OVA-m_4-n_8의 i.v. 주사를 투약하였다(F1aA-OVA-m_4-n_8 주사는 "Gal-OVA"로 라벨되어 도 5의 X축에 녹색 화살표로 표시됨). F1aA-OVA-m_4-n_8의 혈청 OVA-특이적인 항체를 고갈시키는 능력을 측정하기 위해, 마우스를 -1일째 되는 날에(Day -1)에 채혈하여 초기 항체 역가를 확립한 다음 2, 6, 9, 13 및 16일째 되는 날(Day 2, 6, 9, 13 및 16)에 F1aA-OVA-m_4-n_8를 각각 주사한 다음, 후속 채혈을 실행하였다. 각 마우스에 대한 항체 역가는 ELISA로 측정하였다. 본 연구의 결과는 F1aA-OVA-m_4-n_8가 마우스에서 혈청 항체 수준을 고갈시킬 수 있다는 것을 보인다. 예컨대, 첫번째 F1aA-OVA-m_4-n_8 주사후 다음날(즉, Day 2)에, 양성 OVA-항체 역가를 갖는 마우스는 혈청 항체 수준에서 5 내지 100배 감소를 경험한다(도 5). 본 결과는,

19일의 실험과정을 통해 항체 역가는 어떤 마우스에 대해서는 증가했지만, 역가 수준은 Day -1에 측정한 초기 항체 역가에 결코 도달하지 않았고, F1aA-OVA-m_4-n_8의 후속 투약은 이러한 일시적인 항체 역가의 증가를 감소시키는데 유효하였다. 이러한 결과는 F1aA-OVA-m_4-n_8가 혈청 OVA-특이적인 항체에 결합하는 특이성 및 OVA-특이적인 혈청 항체를 고갈시키는데 요구되는 속도론(kinetics)을 가짐을 입증한다.

[0951] 15B. 실시예 15A에 기술된 순서를 따르되 F1aA-OVA-m_4-n_8를, 예컨대 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G에 기술된 바와 같이 수득한 화학식 1의 화합물로 치환함으로써, 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G의 화합물은 혈청 OVA-특이적인 항체에 결합하는 특이성 및 OVA-특이적인 혈청 항체를 고갈시키는데 요구되는 속도론을 가짐을 보여준다.

[0952] 15C. 실시예 15A에 기술된 순서를 따르되 F1aA-OVA-m_4-n_8를, 예컨대 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F에 기술된 바와 같이 수득한 화학식 1 및 2의 화합물로 치환하고, OVA를 X(또는 X' 또는 X")에 대응하는 항원으로 각각 치환함으로써, 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F의 화합물은 혈청 항원 X-특이적인 항체에 결합하는 특이성 및 항원 X-특이적인 혈청 항체를 고갈시키는데 요구되는 속도론을 가짐을 보여준다.

[0953] **실시예 16**

[0954] **OT-1 챌린지-투-면역관용 모델(OT-1 challenge-to-tolerance model)**

[0955] 16A. 확립된 OT-1 챌린지-투-면역관용 모델(문헌 [Liu, lyoda, et al., 2002] 참조)을 사용하여, 백신-매개된 항원 챌린지에 대한 후속 면역반응을 억제하는 F1aA-OVA-m_4-n_8 (mGal-OVA), F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34} (pGal-OVA), 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C (Dom-OVA)의 능력을 박테리아로-유도된 매우 강한 보조제(즉, 리포폴리사카라이드)를 포함한 챌린지로 입증하였다. 면역관용화를 위해, 식염수 100 ㎕ 중 233 nmol의 F1aA-OVA-m_4-n_8, F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}, N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C, 또는 가용성 OVA를, OTI CD8+(CD45.2+) T 세포의 CD45.1+ 마우스(그룹당 n = 5마리)로의 입양전달(adoptive transfer)후 1일째 및 6일째 되는 날에 정맥투여하였다. 전달된 T 세포의 잠재적 제거(potential deletion)를 허용하는 추가적인 9일 후에, 수용체 마우스를 리포폴리사카라이드(LPS)(50ng)로 보강된 OVA(10 ㎍)의 피내주사로 챌린지하였다. 챌린지 후 4일째에 배출 림프절(draining lymph nodes)의 캐릭터리제이션으로 제거(deletion)가 실제로 일어났는지 여부에 대해 판단한다.

[0956] 16B. F1aA-OVA-m_4-n_8, F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}, 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C의 정맥 투여는, LPS 항원 챌린지 전에 비-변형(unmodified) OVA로 처리한 마우스에 비해, 배출 림프절에서 OTI CD8+ T 세포수의 심대한 감소를 일으켰으며, 이는 제거적 면역관용(deletional tolerance)을 입증한다. 예컨대, 도 6은 F1aA-OVA-m_4-n_8 (mGal-OVA), F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34} (pGal-OVA), 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C (Dom-OVA) 중의 어느 하나로 처리한 마우스의 배출 림프절이 OVA-처리된 마우스에 비해 9배 더 적은 수의 OTI CD8+ T 세포를 함유하며 항원을 정맥 주사로 투여받지 않은 챌린지 대조 마우스(challenge control mice)보다 43배 더 작은 수의 OTI CD8+ T 세포를 함유하였으며, 비장 세포에서의 반응은 비슷하였음을 보여준다. 이러한 결과는 F1aA-OVA-m_4-n_8, F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}, 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C는 증강된(adjuvanted) OVA 챌린지 후 OVA-특이적인 면역반응을 감소시켰음을 보여준다.

[0957] 16C. 실시예 16A 및 16B에 기술된 순서를 따르되, F1aA-OVA-m_4-n_8, F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}, 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C를, 예컨대 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G에 기술된 바와 같이 수득한 화학식 1의 화합물로 치환함으로써, 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G의 화합물은 증강된 OA 챌린지 후 OVA-특이적인 면역반응을 감소시킴을 보여준다.

[0958] 16D. 실시예 16A 및 16B에 기술된 순서를 따르되, F1aA-OVA-m_4-n_8, F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}, 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Glv_3Ser-6xHis-C를, 예컨대 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F에 기술된 바와 같이 수득한 화학식 1 및 2의 화합물로 대체하고, OVA를 X(또는 X' 또는 X")에 대응하는 항원으로 각각 치환함으로써, 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F의 화합물이 증강된 항원 X 챌린지 후 항원 X-특이적인 면역반응을 감소시킴을 보여준다.

[0959] **실시예 17**

[0960] **약물속도론**

[0961] 17A. OVA 및 융합 단백질 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 및 N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C(예컨대, 실시예 10에 기술된 바와 같이 제조됨)을 IRDye 800CW(LI-COR 바이오사이언시스(LI-COR Biosciences))로 제조사의 지시사항에 따라 표지한다. 미반응 염료를 제바 탈염 컬럼(Zeba desalting columns)(써모 사이언티픽)을 사용하여 제거한다. 투여량(dose)당 PBS 100 ㎕ 중 표지된 단백질 50 ㎕를 C57BL/6 마우스(그룹당 5마리)에 i.v. 또는 s.c. 투여한다. 주사 후 시간 = 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 및 96 시간 경과시점에서, 혈액 샘플을 꼬리 끝으로부터 취하여 헤파린-코팅된 모세관에 모은다. 샘플은 분석시까지 차광하여 4℃에서 저장한다.

[0962] 분석일에, 혈액 샘플을 원심분리하여 세포성분을 제거한다. 혈장을 신선한 모세관으로 옮기고 오디세이 적외선 이미징 시스템(Odyssey Infrared Imaging System)(LI-COR 바이오사이언시스)을 사용하여 스캔한다. 시그널을 800 nm 채널에서 수집한다. 이미지-프로세싱 프로그램인 ImageJ(미국 국립보건원)를 사용하여, 각 샘플을 폭 2의 라인(a line of width 2)으로 어림하여 각 라인을 따라 평균 강도를 그 시점에서의 순환 단백질의 양의 상대적인 척도로서 결정한다.

[0963] 도 8에서, OVA 및 융합단백질인 DOM-OVA 및 OVA-DOM에 대한 형광 시그널(시간 = 0에서의 형광으로 정규화됨(normalized)) vs. 시간은, 이중지수감쇠(bi-exponential decays) 형태의 곡선 핏(curve fits)과 함께, ASGPR-타겟팅된 OVA 융합 단백질이 비변형(unmodified) OVA보다 더 빨리 순환에서 클리어런스됨을 보여준다.

[0964] 17B. 실시예 17A에 기술된 순서를 따르되 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 융합 단백질 및 OVA를 아시알로-인자 VIII 및 인자 VIII(asialo-Factor VIII 및 Factor VIII)로 각각 치환함으로써, 아시알로-인자 VIII은 비변형된 인자 VIII보다 훨씬 더 빨리 순환에서 클리어런스됨을 보여준다.

[0965] **실시예 18**

[0966] **생체내분포(Biodistribution)**

[0967] 18A. OVA 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(예컨대, 실시예 10에서 기술된 바와 같이 제조)를 Alexa Fluor 647(라이프 테크놀로지스)로 제조사의 지시사항에 따라 표지한다. 미반응 염료를 제바 탈염 컬럼(써모 사이언티픽)을 사용하여 제거한다. 용량 당 PBS 100 ㎕ 중 표지된 단백질 50 ㎍을 C57BL/6 마우스(그룹당 5마리)에 i.v. 또는 s.c.로 투여한다. 주사 후 2시간 시점에, 마우스를 CO_2 질식(CO_2 asphyxiation)으로 안락사시킨다. 혈액, 심장, 장, 신장, 간, 폐, 위, 비장 및 잔해를 IVIS 스펙트럼 이미징 시스템(IVIS Spectrum imaging system)(칼리퍼 라이프 사이언시스(Caliper Life Sciences))을 사용하여 이미지화한다. 리빙 이미지 소프트웨어(Liviing Image software)(칼리퍼 라이프 사이언시스)를 사용하여 데이터를 획득 및 분석한다. 간 및 비장의 단일세포(single cell) 현탁액을 제조하고, 0.1% (w/v) BSA와 함께 PBS 중 MHC class II, CD1d, CD3, CD4, CD8α, CD11b, CD11c, CD14, CD19, CD45, CD123, 및/또는 Lin에 대한 형광접합된 항체로 염색한다. 샘플을 LSR II 유동세포계수기(flow cytometer) 및 FACS Diva 소프트웨어(BD 바이오사이언시스)를 사용하여 분석한다.

[0968] 각 기관 및 각 단백질에 대한 형광 시그널 밀도(광양자/질량, photons/weight)을 나타내는 히스토그램은, N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 융합 단백질을 주사한 동물에서, 비변형된 OVA로 처리된 동물과 비교하여, 간에서 가장 높은 형광 시그널이 있음을 보여준다.

[0969] N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 및 OVA-양성 세포의 백분율을 나타내는 히스토그램은, N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 융합 단백질을 주사한 동물이, 비변형 OVA로 처리한 동물과 비교하여, 유의적으로 더 높은 백분율의 양성 헤파토사이트를 가짐을 보여준다.

[0970] 18B. 실시예 18A에 기술된 순서를 따르되 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 융합 단백질 및 OVA를 아시알로-인자 VIII 및 인자 VIII(asialo-Factor VIII 및 Factor VIII)로 각각 치환함으로써, 아시알로-인자 VIII을 주사한 동물이, 비변형된 인자 VIII로 처리한 동물과 비교하여, 유의적으로 더 높은 백분율의 양성 헤파토사이트를 가짐을 보여준다.

[0971] 18C. 실시예 18A에 기술된 순서를 따르되 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C 융합 단백질을, 예컨대 실시예

3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G에서 기술된 바와 같이 수득한 화학식 1의 화합물로 치환함으로써, 실시예 3A, 4A, 5B, 6C, 7B 및 19G의 화합물을 주사한 동물이, OVA로 처리한 동물과 비교하여, 유의적으로 더 높은 백분율의 양성 헤파토사이트를 가짐을 보여준다.

[0972] 18D. 실시예 18A 및 18B에 기술된 순서를 따르되, F1aA-OVA-m_4-n_8, F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}, 및 N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C를, 예컨대 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F에서 기술된 바와 같이 수득한 화학식 1 및 2의 화합물로 치환하고, OVA를 X(또는 X' 또는 X")에 대응하는 항원으로 각각 치환함으로써, 실시예 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D 및 20F의 화합물을 주사한 동물이 항원 X로 처리한 동물과 비교하여 유의적으로 더 높은 백분율의 양성 헤파토사이트를 가짐을 보여준다.

[0973] **실시예 19**

[0974] **F1m-OVA-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc**

[0975] 19A. R^3이 NHAc이고 R^4가 OH인, 화학식 1102

[0976] N-아세틸-D-갈락토사민(R^3이 NHAc이고 R^4가 OH인, 화학식 1101)(5 g, 22.6 mmol)을 실온에서 클로로에탄올(200 ml)의 교반 용액에 가하였다. 용액을 4℃로 냉각하고 아세틸클로라이드를 용액에 적가하였다. 용액을 실온으로 한 다음 70℃로 가온하였다. 4시간 후, 미반응 클로로에탄올을 감압하 제거하였다. 에탄올 100 ml를 조 생성물에 가하고 얻어지는 용액을 2시간동안 탄소의 존재하에 교반하였다. 용액을 여과하고, 용매를 감압제거하였다. 화학식 1102의 대응하는 생성물인 N-(2-(2-클로로에톡시)-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아세트아마이드를 추가 정제 없이 사용하였다.

[0977] 19B. R^3이 NHAc이고 R^4가 OH인, 화학식 1103

[0978] 실시예 19A에서 제조된 N-(2-(2-클로로에톡시)-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아세트아마이드(2 g, 7.4 mmol)를 DMF(100 ml) 및 소듐 아자이드(4 g, 61.5 mmol)의 교반용액에 가하였다. 용액을 12시간동안 90℃로 가온한 다음 여과하였다. 잔여 용매를 감압 제거하고 조 생성물을 플래쉬 크로마토그래피(다이클로로메탄 중 10% MeOH)로 정제하여 화학식 1103의 대응하는 생성물 N-(2-(2-아자이도에톡시)-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아세트아마이드를 얻었다.

[0979] 19C. R^3이 NHAc이고 R^4가 OH인, 화학식 1104

[0980] 실시예 19B에서 제조된 N-(2-(2-아자이도에톡시)-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아세트아마이드(2 g, 6.9 mmol)를 탄소상 팔라듐 및 에탄올(50 ml)의 용액에 가하였다. 용액을 수소 기체(3 기압) 하에서 4시간동안 교반하였다. 얻어지는 용액을 여과하고 잔여 용매를 감압하 제거하여 화학식 1104의 대응하는 생성물 N-(2-(2-아미노에톡시)-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아세트아마이드를 얻었고, 추가의 정제 없이 사용하였다.

[0981] 19D. R^3이 NHAc이고 R^4가 OH인, 화학식 1105

[0982] 실시예 19C에서 제조된 N-(2-(2-아미노에톡시)-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-3-일)아세트아마이드(1.0 g, 3.78 mmol)을 DMF(50 ml) 중 메트아크릴레이트 무수물(0.583 g, 3.78 mmol)의 용액에 가하였다. 그 후 트리에틸아민을 상기 용액에 가하고 반응물을 실온에서 2시간동안 교반하였다. 2시간 후, 과잉의 용매를 감압 제거하고, 화학식 1105의 대응하는 생성물 N-(2-((3-아세트아미도-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)에틸)메트아크릴아마이드를 플래쉬 크로마토그래피를 통해 단리하였다.

[0983] 19E. p가 30이고 q가 4이고 R^3이 NHAc이고 R^4가 OH이고 R^8이 CMP인, 화학식 1107

[0984] q가 4인 화학식 1106의 아자이드-변형된 uRAFT(28 mg)를 DMF 중의 실시예 19D에서 제조된 N-(2-((3-아세트아미도-4,5-다이하이드록시-6-(하이드록시메틸)테트라하이드로-2H-피란-2-일)옥시)에틸)메트아크릴아마이드(579 mg, 1.74 mmol) 및 아조비스이소부티로니트릴 (2.2 mg, 0.0116 mmol)의 용액에 가하였다. 반응 혼합물에 대해 4회의 동결-펌프-해동 사이클을 실시한 다음 70℃에서 교반하였다. 12시간 후, p가 30이고 q가 4인 화학식 1107의 중합체 생성물을 메탄올 첨가를 통해 반응 혼합물로부터 침전시켰다. 고체로부터 용매를 따라내고 고체를 수집하

고 잔여 용매를 감압 제거하였다.

[0985] 19F. X'이 OVA이고 m이 2이고 n이 80인, 화학식 1109

[0986] 오브알부민(5 mg, 0.00012 mmol)을 소듐 포스페이트 완충액(pH 8.0) 100 ㎕에 가하고 교반하였다. 상기 용액에 n이 80인 화학식 1108의 화합물 5 mg을 첨가하였다. 1시간 후, 미반응 화학식 1108의 화합물을 원심분리 크기배제 크로마토그래피를 통해 용액으로부터 제거하였다. 얻어지는 화학식 1109의 대응하는 생성물을 함유하는 완충 용액을 추가의 정제 없이 다음 반응에 사용하였다.

[0987] 19G. X'이 OVA이고 m이 2이고 n이 80이고 p가 30이고 q가 4이고 R^3이 NHAc이고 R^8이 CMP인, 화학식 1m

[0988] 실시예 19F에서 제조된 용액을 실시예 19E에서 제조된 화학식 1107의 생성물 10 mg을 함유하는 소듐 포스페이트 완충액(pH 8.0) 100 ㎕에 가하였다. 반응물을 2시간동안 교반한 다음, 과잉의 화학식 1107을 원심분리 크기배제 크로마토그래피를 통해 제거하여 용액 중 화학식 1m의 대응하는 이성질체 생성물을 얻었고, 이를 추가의 정제 없이 생물학적 연구에 사용하였다. R^3 치환체는 표제 화합물의 명칭에서 2HAc로서 나타난다.

[0989] 19H. 화학식 1109의 기타 화합물

[0990] 실시예 19F에 기술된 순서를 따르되 OVA를 하기 화합물로 치환함으로써:

[0991] ● 압시시맙(Abciximab),

[0992] ● 아달리무맙(Adalimumab),

[0993] ● 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa),

[0994] ● 아갈시다제 베타(Agalsidase beta),

[0995] ● 알데스루킨(Aldeslukin),

[0996] ● 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa),

[0997] ● 인자 VIII(Factor VIII),

[0998] ● 인자 IX(Factor IX),

[0999] ● L-아스파라지나제(L-asparaginase),

[1000] ● 라로니다제(Laronidase),

[1001] ● 옥트레오타이드(Octreotide),

[1002] ● 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase),

[1003] ● 라스부리카제(Rasburicase),

[1004] ● 인슐린(Insulin) (SEQ ID NO:5),

[1005] ● GAD-65 (SEQ ID NO:6),

[1006] ● IGRP (SEQ ID NO:7)

[1007] ● MBP (SEQ ID NO:8),

[1008] ● MOG (SEQ ID NO:9),

[1009] ● PLP (SEQ ID NO:10),

[1010] ● MBP13-32 (SEQ ID NO:11),

[1011] ● MBP83-99 (SEQ ID NO:12),

[1012] ● MBP111-129 (SEQ ID NO:13),

[1013] ● MBP146-170 (SEQ ID NO:14),

[1014] ● MOG1-20 (SEQ ID NO:15),

[1015] ● MOG35-55 (SEQ ID NO:16),

[1016] ● PLP139-154 (SEQ ID NO:17),

[1017] ● MART1 (SEQ ID NO:18),

[1018] ● 티로시나제(Tyrosinase) (SEQ ID NO:19),

[1019] ● PMEL (SEQ ID NO:20),

[1020] ● 아쿠아포린-4(Aquaporin-4) (SEQ ID NO:21),

[1021] ● S-아레스틴(S-arrestin) (SEQ ID NO:22),

[1022] ● IRBP (SEQ ID NO:23),

[1023] ● 코나라킨(Conarachin) (UNIPROT Q6PSU6),

[1024] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24),

[1025] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미네이티드(deamidated) (SEQ ID NO:25),

[1026] ● 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) (SEQ ID NO:26),

[1027] ● 오메가-글리아딘(Omega-gliadin) (SEQ ID NO:27),

[1028] ● Fel d 1 A (UNIPROT P30438),

[1029] ● 고양이 알부민(Cat albumin) (UNIPROT P49064),

[1030] ● Can f 1 (UNIPROT 018873),

[1031] ● 개 알부민(Dog albumin) (UNIPROT P49822), 및

[1032] ● RhCE example (UNIPROT P18577),

[1033] 하기의 n이 80인 화학식 1109의 대응하는 화합물을 수득하였다:

[1034] ● X가 압시시맙(Abciximab)이고 m이 10인 화합물,

[1035] ● X가 아달리무맙(Adalimumab)이고 m이 11인 화합물,

[1036] ● X가 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa)이고 m이 14인 화합물,

[1037] ● X가 아갈시다제 베타(Agalsidase beta)이고 m이 14인 화합물,

[1038] ● X가 알데스루킨(Aldeslukin)이고 m이 6인 화합물,

[1039] ● X가 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa)이고 m이 13인 화합물,

[1040] ● X가 인자 VIII(Factor VIII)이고 m이 100인 화합물,

[1041] ● X가 인자 IX(Factor IX)이고 m이 18인 화합물,

[1042] ● X가 L-아스파라지나제(L-asparaginase)이고 m이 5인 화합물,

[1043] ● X가 라로니다제(Laronidase)이고 m이 7인 화합물,

[1044] ● X가 옥트레오타이드(Octreotide)이고 m이 1인 화합물,

[1045] ● X가 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase)이고 m이 12인 화합물,

[1046] ● X가 라스부리카제(Rasburicase)이고 m이 12인 화합물,

[1047] ● X가 인슐린(Insulin) (SEQ ID NO:5)이고 m이 2인 화합물,

[1048] ● X가 GAD-65 (SEQ IDNO:6)이고 m이 8인 화합물,

[1049] ● X가 lGRP (SEQ ID NO:7)이고 m이 7인 화합물,

[1050] ● X가 MBP (SEQ ID NO:8)이고 m이 6인 화합물,

[1051] ● X가 MOG (SEQ ID NO:9)이고 m이 5인 화합물,

[1052] ● X가 PLP (SEQ IDNO:10)이고 m이 8인 화합물,

[1053] ● X가 MBP13-32 (SEQ ID NO:11)이고 m이 1인 화합물,

[1054] ● X가 MBP83-99 (SEQ ID NO:12)이고 m이 1인 화합물,

[1055] ● X가 MBP111-129 (SEQ ID NO:13)이고 m이 1인 화합물,

[1056] ● X가 MBP146-170 (SEQ ID NO:14)이고 m이 2인 화합물,

[1057] ● X가 MOG1-20 (SEQ ID NO:15)이고 m이 1인 화합물,

[1058] ● X가 MOG35-55 (SEQ ID NO:16)이고 m이 2인 화합물,

[1059] ● X가 PLP139-154 (SEQ ID NO:17)이고 m이 3인 화합물,

[1060] ● X가 MART1 (SEQ ID NO:18)이고 m이 4인 화합물,

[1061] ● X가 티로시나제(Tyrosinase) (SEQ ID NO:19)이고 m이 8인 화합물,

[1062] ● X가 PMEL (SEQ ID NO:20)이고 m이 5인 화합물,

[1063] ● X가 아쿠아포린-4(Aquaporin-4) (SEQ ID NO:21)이고 m이 4인 화합물,

[1064] ● X가 S-아레스틴(S-arrestin) (SEQ ID NO:22)이고 m이 12인 화합물,

[1065] ● X가 IRBP (SEQ ID NO:23)이고 m이 21인 화합물,

[1066] ● X가 코나라킨(Conarachin)이고 m이 21인 화합물,

[1067] ● X가 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24)이고 m가 1인 화합물,

[1068] ● X가 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드 (SEQ ID NO:25)이고 m이 1인 화합물,

[1069] ● X가 알파-글리아딘 (SEQ ID NO:26)이고 m이 1인 화합물,

[1070] ● X가 오메가-글리아딘 (SEQ ID NO:27)이고 m이 1인 화합물,

[1071] ● X가 Fel d 1이고 m이 4인 화합물,

[1072] ● X가 고양이 알부민이고 m이 16인 화합물,

[1073] ● X가 Can f 1이고 m이 6인 화합물,

[1074] ● X가 개 알부민이고 m이 23인 화합물, 및

[1075] ● X가 RhCE example이고 m이 10인 화합물.

[1076] 19I. 화학식 1m의 기타 화합물

[1077] 실시예 19G에 기술된 순서에 따르되, 예컨대 실시예 19H에서 얻어진 바와 같은 화학식 1109의 화합물을 치환함으로써, 하기 화학식 1m의 대응하는 화합물을 얻었다:

[1078] ● F1m-압시시맙-m_{10}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1079] ● F1m-아달리무맙-m_{11}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1080] ● F1m-아갈시다제 알파-m_{14}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1081] ● F1m-아갈시다제 베타-m_{14}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1082] ● F1m-알데스루킨-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1083] ● F1m-알글루코시다제 알파-m_{13}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1084] ● F1m-인자 VIII-m_{100}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1085] ● F1m-인자 IX-m_{18}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1086] ● F1m-L-아스파라지나제-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1087] ● F1m-라로니다제-m_7-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1088] ● F1m-옥트레오타이드-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1089] ● F1m-페닐알라닌 암모니아-리아제-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1090] ● F1m-라스부리카제-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1091] ● F1m-인슐린-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1092] ● F1m-GAD-65-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1093] ● F1m-IGRP-m_7-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1094] ● F1m-MBP-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1095] ● F1m-MOG-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1096] ● F1m-PLP-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1097] ● F1m-MBP13-32-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1098] ● F1m-MBP83-99-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1099] ● F1m-MBP111-129-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1100] ● F1m-MBP146-170-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1101] ● F1m-MOG1-20-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1102] ● F1m-MOG35-55-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2N HAc,

[1103] ● F1m-PLP139-154-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1104] ● F1m-MART1-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2N HAc,

[1105] ● F1m-티로시나제-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1106] ● F1m-PMEL-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1107] ● F1m-아쿠아포린-4-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1108] ● F1m-S-아레스틴-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1109] ● F1m-IRBP-m_{21}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1110] ● F1m-코나라킨-m_{21}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1111] ● F1m-알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1112] ● F1m-알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1113] ● F1m-알파-글리아딘-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1114] ● F1m-오메가-글리아딘-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1115] ● F1m-Fel d 1-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1116] ● F1m-고양이 알부민-m_{16}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1117] ● F1m-Can f 1-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1118] ● F1m-개 알부민-m_{23}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc, 및

[1119] ● F1m-RhCE-m_{10}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc.

[1120] 19J. p가 30이고 q가 8이고 R^3이 OH이고 R^4가 OH이고 R^8이 CMP인, 화학식 1107

[1121] 실시예 19A에 기술된 순서를 따르되 N-아세틸-D-갈락토사민을 갈락토스로 치환하고, q가 8인 화학식 1106의 아자이드-변형된 uRAFT 시약을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 19E에 기술된 순서까지 따라, p가 30이고 q가 8이고 R^3이 OH이고 R^4가 OH이고 R^8이 CMP인, 화학식 1107의 화합물을 얻었다.

[1122] 19K. n이 62이고 X' 및 m이 실시예 19H에서와 같은, 화학식 1109

[1123] 실시예 19F에 기술된 순서를 따르되, OVA를 실시예 19H에 기술된 바와 같은 화합물로 치환하고 n이 62인 화학식 1108의 화합물을 사용함으로써, n이 62인 화학식 1109의 대응하는 화합물을 얻었다.

[1124] 19L. 화학식 1m의 기타 화합물

[1125] 실시예 19G에 기술된 순서를 따르되 화학식 1107의 화합물을 실시예 19J에서 수득한 화합물로 치환하고, 화학식 1109의 화합물을 실시예 19K에서 수득한 화합물로 치환함으로써, 화학식 1m의 하기 대응하는 화합물을 얻었다:

[1126] ● F1m-압시시맙-m_{10}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1127] ● F1m-아달리무맙-m_{11}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1128] ● F1m-아갈시다제 알파-m_{14}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1129] ● F1m-아갈시다제 베타-m_{14}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1130] ● F1m-알데스루킨-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1131] ● F1m-알글루코시다제 알파-m_{13}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1132] ● F1m-인자 VIII-m_{100}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1133] ● F1m-인자 IX-m_{18}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1134] ● F1m-L-아스파라지나제-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1135] ● F1m-라로니다제-m_7-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1136] ● F1m-옥트레오타이드-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1137] ● F1m-페닐알라닌 암모니아-리아제-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1138] ● F1m-라스부리카제-m_{12}-n_{62}-p_3-q_8-CMP-2OH,

[1139] ● F1m-인슐린-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1140] ● F1m-GAD-65-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1141] ● F1m-IGRP-m_7-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1142] ● F1m-MBP-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1143] ● Flm-MOG-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1144] ● Flm-PLP-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1145] ● Flm-MBP13-32-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1146] ● Flm-MBP83-99-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1147] ● Flm-MBP111-129-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1148] ● Flm-MBP146-170-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1149] ● Flm-MOG1-20-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1150] ● Flm-MOG35-55-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1151] ● Flm-PLP139-154-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1152] ● Flm-MART1-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1153] ● Flm-티로시나제-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1154] ● Flm-PMEL-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1155] ● Flm-아쿠아포린-4-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1156] ● Flm-S-아레스틴-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1157] ● Flm-IRBP-m_{21}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1158] ● Flm-코나라킨-m_{21}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1159] ● Flm-알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1160] ● Flm-알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1161] ● Flm-알파-글리아딘-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1162] ● Flm-오메가-글리아딘-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1163] ● Flm-Fel d 1-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1164] ● Flm-고양이 알부민-m_{16}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1165] ● Flm-Can f 1-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1166] ● Flm-개 알부민-m_{23}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH, and

[1167] ● Flm-RhCE-m_{10}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH.

[1168] **실시예 20**

[1169] **Fln-인슐린-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc**

[1170] 20A. X'이 인슐린이고 m이 2이고 n이 1인, 화학식 1202

[1171] 재조합 인간 인슐린(5 mg)을 트리에틸아민 10 ㎕를 함유하는 DMF 100 ㎕에 첨가하고 인슐린이 용해될 때까지 교반하였다. 상기 용액에 n이 1인 화학식 1201의 링커 전구체 10 mg(0.0161 mmol)을 가하고 반응물을 교반하였다. 1시간 후, 3급-부틸 메틸 에테르 1.3 ml를 가하여, 침전물로 얻어지는 화학식 1202의 대응하는 생성물을 단리하였다. 잔여 DMF 및 3급-부틸 메틸 에테르를 감압하에 제거하였다. 액체 크로마토그래피, 질량분광분석 및 폴리

아크릴아마이드 겔 전기영동을 통한 캐리터리제이션으로 생성물을 규명하였다. 화학식 1202의 변형된 인슐린 생성물을 추가의 정제 없이 사용하였다.

[1172] 20B. X'이 인슐린이고 m이 2이고 n이 1이고 p가 30이고 q가 4이고 R^8이 CMP인, 화학식 1n

[1173] 실시예 20A에서 수득한 화학식 1202의 생성물을 DMF 100 ㎕에 재현탁하였다. 실시예 19E에서 수득한 화학식 1107의 중합체 생성물(10 mg)을 가하고, 반응물을 1시간동안 교반하였다. 1시간 후, 반응 생성물을 디클로로메탄(1.3 ml)의 첨가로 침전시켰다. 생성물을 여과하고 잔영 용매를 감압하 제거하였다. 그 후 조 생성물을 PBS 500 ㎕에 재현탁시키고, 저분자량 성분을 원심분리 크기배제 크로마토그래피로 제거하여 화학식 1n의 대응하는 이성질체 생성물을 얻었다. 액체 크로마토그래피, 질량분광분석 및 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 통한 캐릭터리제이션으로 생성물을 규명하였다. 화학식 1202의 변형된 인슐린 생성물을 추가의 정제 없이 사용하였다.

[1174] 20C. 화학식 1202의 기타 화합물

[1175] 실시예 19F에 기술된 순서를 따르되 OVA 인슐린을 하기로 치환함으로써:

[1176] ● 압시시맙(Abciximab),

[1177] ● 아달리무맙(Adalimumab),

[1178] ● 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa),

[1179] ● 아갈시다제 베타(Agalsidase beta),

[1180] ● 알데스루킨(Aldeslukin),

[1181] ● 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa),

[1182] ● 인자 VIII(Factor VIII),

[1183] ● 인자 IX(Factor IX),

[1184] ● L-아스파라지나제(L-asparaginase),

[1185] ● 라로니다제(Laronidase),

[1186] ● 옥트레오타이드(Octreotide),

[1187] ● 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase),

[1188] ● 라스부리카제(Rasburicase),

[1189] ● GAD-65 (SEQ ID NO:6),

[1190] ● IGRP (SEQ ID NO:7)

[1191] ● MBP (SEQ ID NO:8),

[1192] ● MOG (SEQ ID NO:9),

[1193] ● PLP (SEQ ID NO:10),

[1194] ● MBP13-32 (SEQ ID NO:11),

[1195] ● MBP83-99 (SEQ ID NO:12),

[1196] ● MBP111-129 (SEQ ID NO:13),

[1197] ● MBP146-170 (SEQ ID NO:14),

[1198] ● MOG1 -20 (SEQ ID NO:15),

[1199] ● MOG35-55 (SEQ ID NO:16),

[1200] ● PLP139-154 (SEQ ID NO:17),

[1201] ● MART1 (SEQ ID NO:18),

[1202] ● 티로시나제(Tyrosinase) (SEQ ID NO:19),

[1203] ● PMEL (SEQ ID NO:20),

[1204] ● 아쿠아포린-4(Aquaporin-4) (SEQ ID NO:21),

[1205] ● S-아레스틴(S-arrestin) (SEQ ID NO:22),

[1206] ● IRBP (SEQ ID NO:23),

[1207] ● 코나라킨(Conarachin) (UNIPROT Q6PSU6),

[1208] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24),

[1209] ● 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미네이티드(deamidated) (SEQ ID NO:25),

[1210] ● 알파-글리아딘(Alpha-gliadin) (SEQ ID NO:26),

[1211] ● 오메가-글리아딘(Omega-gliadin) (SEQ ID NO:27),

[1212] ● Fel d 1 A (UNIPROT P30438),

[1213] ● 고양이 알부민(Cat albumin) (UNIPROT P49064),

[1214] ● Can f 1 (UNIPROT 018873),

[1215] ● 개 알부민(Dog albumin) (UNIPROT P49822), 및

[1216] ● RhCE example (UNIPROT P18577),

[1217] n이 1인 화학식 1202의 하기 대응하는 화합물을 얻었다:

[1218] ● X가 압시시맙(Abciximab)이고 m이 10인 화합물,

[1219] ● X가 아달리무맙(Adalimumab)이고 m이 11인 화합물,

[1220] ● X가 아갈시다제 알파(Agalsidase alfa)이고 m이 14인 화합물,

[1221] ● X가 아갈시다제 베타(Agalsidase beta)이고 m이 14인 화합물,

[1222] ● X가 알데스루킨(Aldeslukin)이고 m이 6인 화합물,

[1223] ● X가 알글루코시다제 알파(Alglucosidase alfa)이고 m이 13인 화합물,

[1224] ● X가 인자 VIII(Factor VIII)이고 m이 100인 화합물,

[1225] ● X가 인자 IX(Factor IX)이고 m이 18인 화합물,

[1226] ● X가 L-아스파라지나제(L-asparaginase)이고 m이 5인 화합물,

[1227] ● X가 라로니다제(Laronidase)이고 m이 7인 화합물,

[1228] ● X가 옥트레오타이드(Octreotide)이고 m이 1인 화합물,

[1229] ● X가 페닐알라닌 암모니아-리아제(Phenylalanine ammonia-lyase)이고 m이 12인 화합물,

[1230] ● X가 라스부리카제(Rasburicase)이고 m이 12인 화합물,

[1231] ● X가 GAD-65 (SEQ ID NO:6)이고 m이 8인 화합물,

[1232] ● X가 IGRP (SEQ ID NO:7)이고 m이 7인 화합물,

[1233] ● X가 MBP (SEQ ID NO:8)이고 m이 6인 화합물,

[1234] ● X가 MOG (SEQ ID NO:9)이고 m이 5인 화합물,

[1235] ● X가 PLP (SEQ ID NO:10)이고 m이 8인 화합물,

[1236] ● X가 MBP13-32 (SEQ ID NO:11)이고 m이 1인 화합물,

[1237] ● X가 MBP83-99 (SEQ ID NO:12)이고 m이 1인 화합물,

[1238] ● X가 MBP111-129 (SEQ ID NO:13)이고 m이 1인 화합물,

[1239] ● X가 MBP146-170 (SEQ ID NO:14)이고 m가 2인 화합물,

[1240] ● X가 MOG1-20 (SEQ ID NO:15)이고 m이 1인 화합물,

[1241] ● X가 MOG35-55 (SEQ ID NO:16)이고 m이 2인 화합물,

[1242] ● X가 PLP139-154 (SEQ ID NO:17)이고 m이 3인 화합물,

[1243] ● X가 MART1 (SEQ ID NO:18)이고 m이 4인 화합물,

[1244] ● X가 티로시나제(Tyrosinase) (SEQ ID NO:19)이고 m이 8인 화합물,

[1245] ● X가 PMEL(SEQ ID NO:20)이고 m이 5인 화합물,

[1246] ● X가 아쿠아포린-4(Aquaporin-4) (SEQ ID NO:21)이고 m이 4인 화합물,

[1247] ● X가 S-아레스틴(S-arrestin) (SEQ ID NO:22)이고 m이 12인 화합물,

[1248] ● X가 IRBP (SEQ ID NO:23)이고 m이 21인 화합물,

[1249] ● X가 코나라킨(Conarachin)이고 m이 21인 화합물,

[1250] ● X가 알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브 (SEQ ID NO:24)이고 m이 1인 화합물,

[1251] ● X가 알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드 (SEQ ID NO:25)이고 m이 1인 화합물,

[1252] ● X가 알파-글리아딘 (SEQ ID NO:26)이고 m이 1인 화합물,

[1253] ● X가 오메가-글리아딘 (SEQ ID NO:27)이고 m이 1인 화합물,

[1254] ● X가 Fel d 1이고 m이 4인 화합물,

[1255] ● X가 고양이 알부민이고 m이 16인 화합물,

[1256] ● X가 Can f 1이고 m이 6인 화합물,

[1257] ● X가 개 알부민이고 m이 23인 화합물, 및

[1258] ● X가 RhCE example이고 m이 10인 화합물.

[1259] 20D. 화학식 1n의 기타 화합물

[1260] 실시예 B에 기술된 순서를 따르되, 예컨대 실시예 20C에서 수득한 화학식 1202의 화합물을 대체함으로써, 화학식 1m의 하기 대응하는 화합물을 얻었다:

[1261] ● F1n-압시시맙-m_{10}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1262] ● F1n-아달리무맙-m_{11}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1263] ● F1n-아갈시다제 알파-m_{14}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1264] ● F1n-아갈시다제 베타-m_{14}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1265] ● F1n-알데스루킨-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1266] ● F1n-알글루코시다제 알파-m_{13}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1267] ● F1n-인자 VIII-m_{100}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1268] ● F1n-인자 IX-m_{18}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1269] ● F1n-L-아스파라지나제-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1270] ● F1n-라로니다제-m_7-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1271] ● Fln-옥트레오타이-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1272] ● Fln-페닐알라닌 암모니아-리아제-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1273] ● Fln-라스부리카제-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1274] ● Fln-GAD-65-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1275] ● Fln-IGRP-m_7-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1276] ● Fln-MBP-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1277] ● Fln-MOG-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1278] ● Fln-PLP-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1279] ● Fln-MBP13-32-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1280] ● Fln-MBP83-99-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1281] ● Fln-MBP111-129-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1282] ● Fln-MBP146-170-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1283] ● Fln-MOG1-20-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1284] ● Fln-MOG35-55-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1285] ● Fln-PLP139-154-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1286] ● Fln-MART1-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1287] ● Fln-티로시나제-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1288] ● Fln-PMEL-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1289] ● Fln-아쿠아포린-4-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1290] ● Fln-S-아레스틴-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1291] ● Fln-IRBP-m_{21}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1292] ● Fln-코나라킨-m_{21}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1293] ● Fln-알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1294] ● Fln-알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1295] ● Fln-알파-글리아딘-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1296] ● Fln-오메가-글리아딘-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1297] ● Fln-Fel d 1-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1298] ● Fln-고양이 알부민-m_{16}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1299] ● Fln-Can f 1-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1300] ● Fln-개 알부민-m_{23}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc, 및

[1301] ● F1n-RhCE-m_{10}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc.

[1302] 20E. n이 33이고 X' 및 m이 실시예 20C에서와 같은, 화학식 1202

[1303] 실시예 19F에 기술된 순서를 따르되, 인슐린을 실시예 20C에 기술된 바와 같은 화합물로 치환하고, n이 33인 화학식 1201의 화합물을 사용함으로써, n이 33인 화학식 1202의 대응하는 화합물을 얻었다.

[1304] 20F. 화학식 1n의 기타 화합물

[1305] 실시예 20B에 기술된 순서를 따르되 화학식 1107의 화합물을 실시예 19J에서 수득한 화합물로 대체하고, 화학식 1202의 화합물을 실시예 20E에서 수득한 화합물로 대체함으로써, 화학식 1n의 하기 대응하는 화합물을 얻었다:

[1306] ● F1n-압시시맙-m_{10}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1307] ● F1n-아달리무맙-m_{11}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1308] ● F1n-아갈시다제 알파-m_{14}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1309] ● F1n-아갈시다제 베타-m_{14}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1310] ● F1n-알데스루킨-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1311] ● F1n-알글루코시다제 알파-m_{13}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1312] ● F1n-인자 VIII-m_{100}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1313] ● F1n-인자 IX-m_{18}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1314] ● F1n-L-아스파라지나제-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1315] ● F1n-라로니다제-m_7-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1316] ● F1n-옥트레오타이드-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1317] ● F1n-페닐알라닌 암모니아-리아제-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1318] ● F1n-라스부리카제-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1319] ● F1n-GAD-65-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1320] ● F1n-IGRP-m_7-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1321] ● F1n-MBP-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1322] ● F1n-MOG-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1323] ● F1n-PLP-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1324] ● F1n-MBP13-32-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1325] ● F1n-MBP83-99-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1326] ● F1n-MBP111-129-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1327] ● F1n-MBP146-170-m_2-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1328] ● F1n-MOG1-20-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1329] ● F1n-MOG35-55-m_2-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1330] ● Fln-PLP139-154-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1331] ● Fln-MART1-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1332] ● Fln-티로시나제-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1333] ● Fln-PMEL-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1334] ● Fln-아쿠아포린-4-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1335] ● Fln-S-아레스틴-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1336] ● Fln-IRBP-m_{21}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1337] ● Fln-코나라킨-m_{21}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1338] ● Fln-알파-글리아딘 "33-mer" 네이티브-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1339] ● Fln-알파-글리아딘 "33-mer" 디아미데이티드-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1340] ● Fln-알파-글리아딘-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1341] ● Fln-오메가-글리아딘-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1342] ● Fl n-Fel d 1-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1343] ● Fln-고양이 알부민-m_{16}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1344] ● Fln-Can f 1-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1345] ● Fln-개 알부민-m_{23}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH, 및

[1346] ● Fln-RhCE-m_{10}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH.

[1347] **실시예 21**

[1348] **순환으로부터 OVA-특이적인 항체의 클리어런스**

[1349] 후속적인 고갈을 위한 OVA-특이적인 항체의 생성을 유도하기 위해, C57BL/6 마우스에 OVA 10 μg 용량을, 혈장 중 항-OVA IgG의 역가가 3에 도달할 때까지(ELISA로 측정함), 5회까지 i.v. 주사하였다(도 9A). EDTA-코팅된 튜브에 수집한 혈액을 실온에서 2000×g로 10분동안 원심분리하여 혈장 샘플을 제조하고 분석시까지 -20℃에서 저장하였다. 역가는 검출가능한 항-OVA IgG를 갖는 혈장의 최대 배수 희석의 $\log_{10}$으로 정의된다. 여기서 혈장 샘플은 10-, 50-, 100-, 500-, 1,000-, 5,000-, 10,000-, 및 50,000-배 희석하여 분석하였고, 0, 1, 1.7, 2, 2.7, 3, 3.7, 4, 및 4.7의 잠재적 역가 측정값을 보였다. OVA 10 μg 용량의 5회 투여후 3 이하의 역가를 갖는 마우스에게, 항-OVA IgG 생산 및 고갈에 이용가능한 순환 항-OVA IgG의 양을 증가시키기 위해, CpG-B 10 μg으로 증강된(adjuvanted) OVA 10 μg의 2회의 부가적인 용량을 투여하였다(도 9B).

[1350] 항-OVA 항체 클리어런스를 위한 헤파토사이트 ASGPR-표적화된 OVA의 효능을 측정하기 위해, 순환 항-OVA IgG를 갖는 마우스에 식염수, 또는 DOM 및 OVA, DOM-OVA, 또는 OVA-DOM의 몰 동등량을 함유하는 식염수를 i.v. 주사하였다. 특히, 도 9에 나타난 바와 같이, 마우스를 OVA 10, 50, 100 또는 200 μg의 몰 동등량으로 처리하였다. 주사 처리 시점에 상대적으로, t = -1일, +3시간, +1일, 및 +7일의 시점에서, 혈액 샘플을 수집하여 혈장 ELISA 분석에 의해 순환 항-OVA IgG의 양을 분석하였다. 순환으로부터 항-OVA IgG의 클리어런스는, ELISA로 측정하였을 때, 혈장 중 항-OVA-IgG의 양을 감소시켜 항-OVA IgG 역가를 감소시킬 것으로 기대된다. OVA 단독으로 면역화시킨 마우스 및 DOM-OVA 또는 OVA-DOM으로 처리한 마우스에서, 항-OVA IgG의 역가는 3 또는 2까지만큼 각각 감소하였고(decreased by up to 3 or 2), 이는 순환 항-OVA IgG의 양이 1000- 또는 100-배만큼 감소함을 의미하며, 식염수 또는 DOM 및 OVA를 사용한 대조군 처리보다 50배까지 더 효과적이다(도 9A). CpG-B로 증강된 OVA로 면역화시킨 마우스에서, 순환 항-OVA IgG의 클리어런스는 관찰되지 않았다(도 9B).

[1351] **실시예 22**

[1352] **NOD 마우스**

[1353] 비-비만성 당뇨병(non-obese diabetic, NOD) 마우스는 자가면역 당뇨병의 자발적 발병이 일어나기 쉽고, 이는 여러 췌장 자가항원에 대한 자가면역 반응의 결과이다. 당뇨병은 췌도염(insulitis)의 결과로 NOD 마우스에서 발병하며, 이는 여러 백혈구의 췌장소도로의 침입으로 특징지어진다.

[1354] 당뇨병의 치료의 효능을 평가하기 위해, 6주령에서 시작하여, NOD 마우스를 대조군 또는 시험군으로 분류하고 각각에 대해 시험 조성물(10 ㎍) 또는 비활성 대조약(예컨대, 식염수)을 매주 정맥 주사한다. 주사는 연속 18주 동안 계속된다.

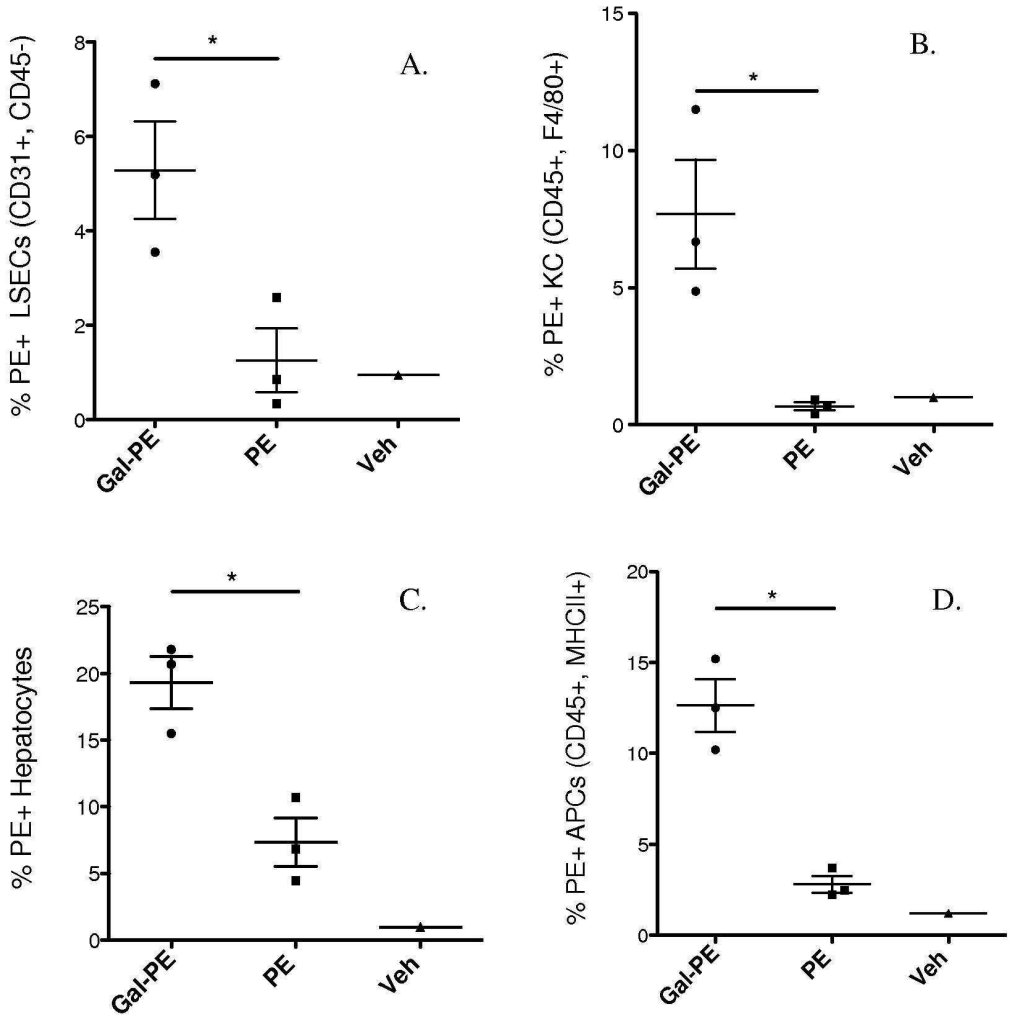
[1355] 마우스의 혈중 당 농도를 매주 측정한다. 실험중 300 mg/ml 미만의 혈중 당 농도를 유지하는 마우스는 당뇨병이 아니라고 간주된다. 또한, 본 연구의 마지막에, 마우스의 췌장을 적출하고 췌장 중 T 세포 침입을 췌도염(insulitis)의 평가로서 면역조직화학을 통해 판단한다. 면역관용 유도는, 식염수로 처리하여 당뇨병을 나타내는 마우스와 비교한, 자가항원 특이적인 CD8 T 세포의 고갈에 의해 평가된다.

[1356] 상기 기술된 바와 같이 시험할 때, X가 인슐린인 화학식 1 및 2의 조성물, 예컨대 Flm-인슐린-m_2-n_1-p_{30}-q_4-2NAcGAL는 당뇨병을 치료하는 효능을 나타낸다.

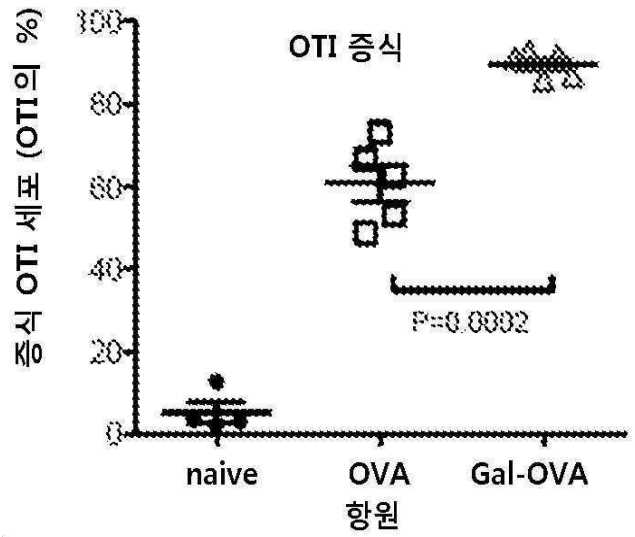
[1357] 본원의 개시내용은 특정적인 양태에 관하여 기술된 것으로, 당업자에 의해 다양한 변경이 가능하고 그 균등물은 본원 개시내용의 진실한 정신과 범위에서 벗어남이 없이 대체 가능하다. 또한, 많은 변형이 본원 개시내용의 목적, 정신 및 범위로 특정 상황, 재료, 재료의 조성물, 공정, 공정 단계 또는 단계에 적용될 수 있다. 모든 이러한 변형은 특허청구범위의 권리범위에 속하는 것으로 의도된다. 본원에서 인용된 모든 특허 및 간행물은 본원에 참조로 포함된다.

도면

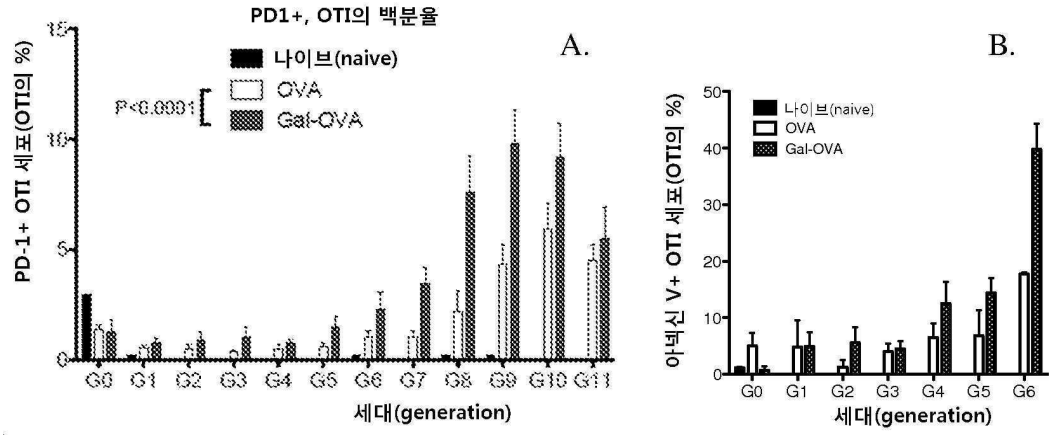
도면1


A.
% PE+ LSECs (CD31+, CD45-)
B.
% PE+ KC (CD45+, F4/80+)
C.
% PE+ Hepatocytes
D.
% PE+ APCs (CD45+, MHCII+)
Gal-PE
PE
Veh
*

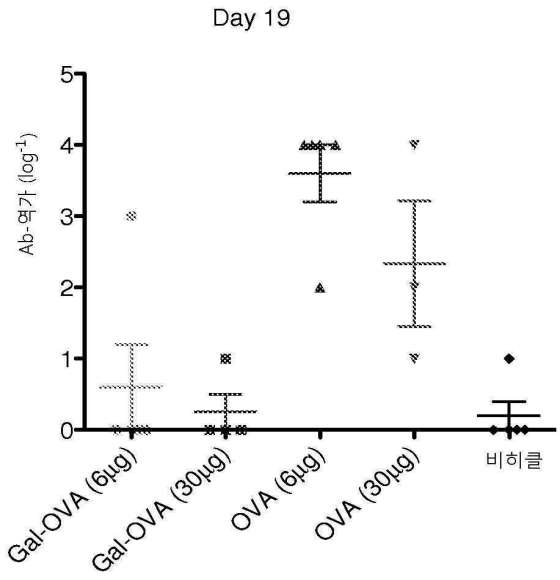
도면2


OTI 증식
증식 OTI 세포 (OTI의 %)
P=0.0002
naive
OVA
Gal-OVA
항원

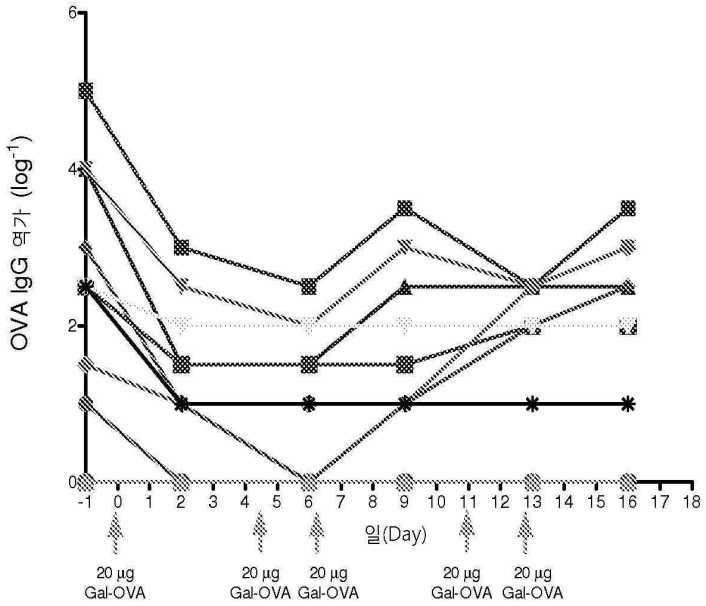
도면3


PD1+, OTI의 백분율
A.
나이브(naive)
OVA
Gal-OVA
P<0.0001
PD-1+ OTI 세포(OTI의 %)
G0 G1 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11
세대(generation)
B.
나이브(naive)
OVA
Gal-OVA
아넥신 V+ OTI 세포(OTI의 %)
G0 G1 G2 G3 G4 G5 G6
세대(generation)

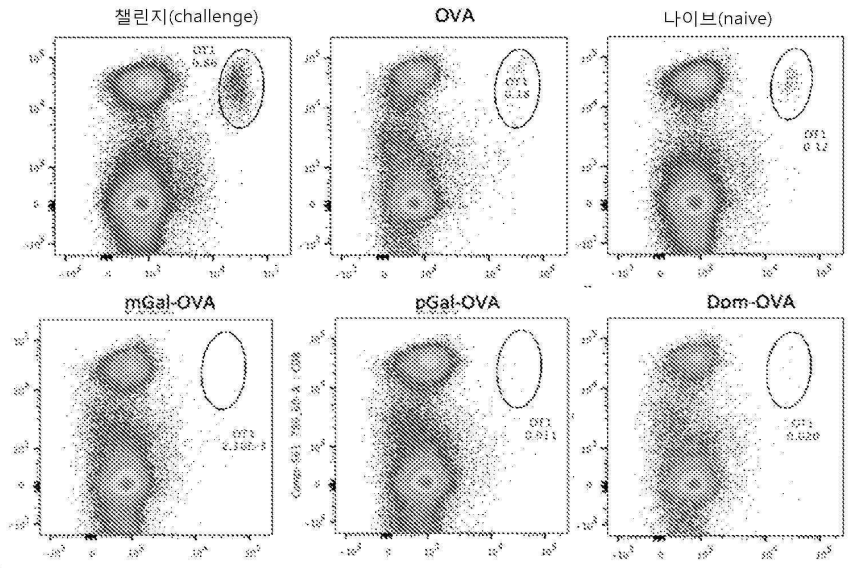
도면4


Day 19
Ab-역가 (log-1)
Gal-OVA (6μg)
Gal-OVA (30μg)
OVA (6μg)
OVA (30μg)
비히클

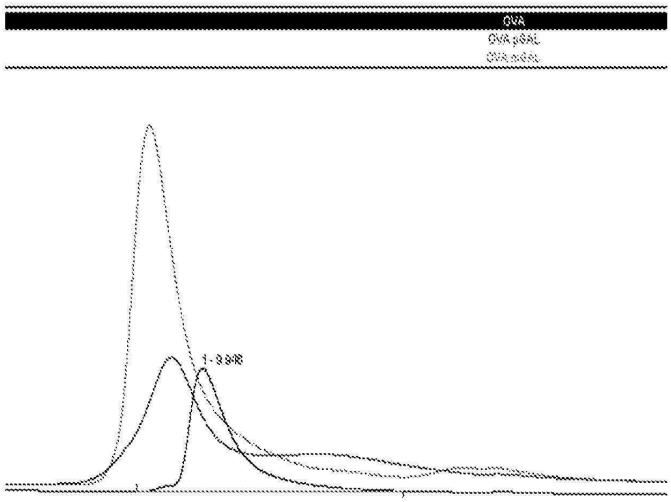
도면5


OVA IgG 역가 (log-1)
6
4
2
0
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
일(Day)
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA

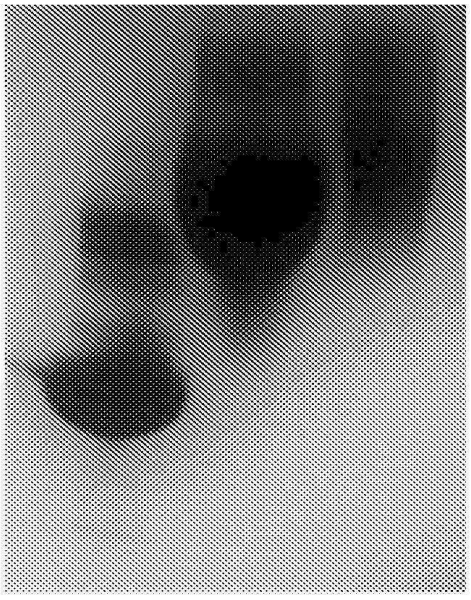
도면6


챌린지(challenge)
OVA
나이브(naive)
mGal-OVA
pGal-OVA
Dom-OVA

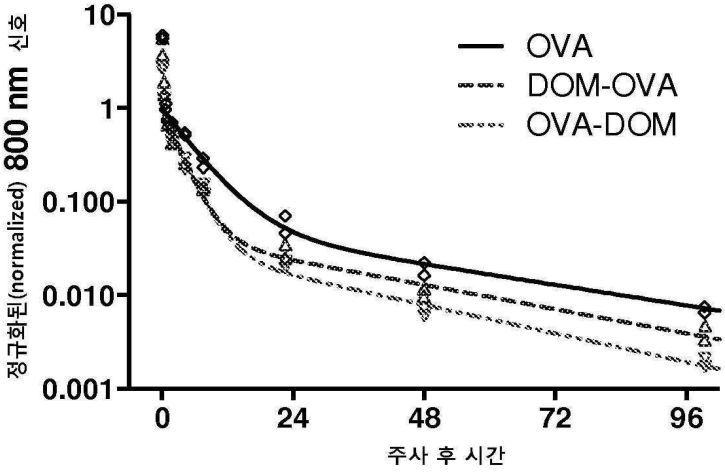
도면7a



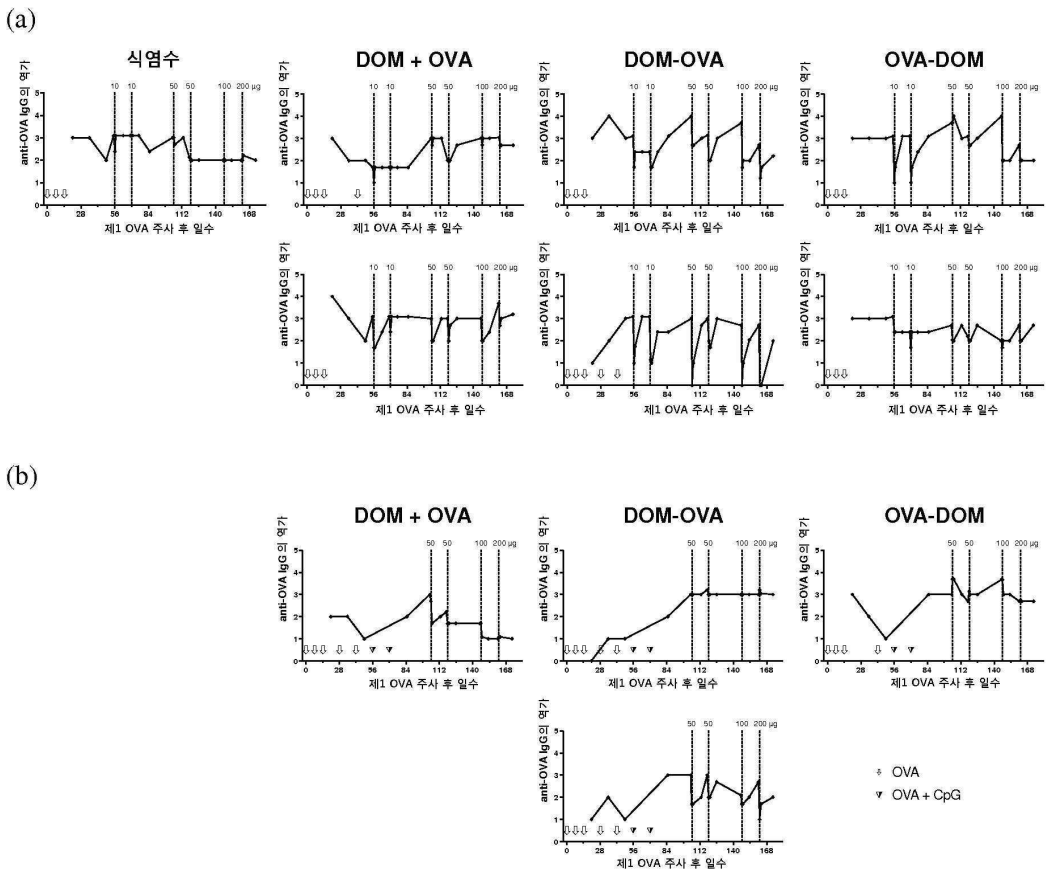
도면7b



도면8


정규화된(normalized) 800 nm 신호
10
1
0.100
0.010
0.001
0
24
48
72
96
주사 후 시간
OVA
DOM-OVA
OVA-DOM

도면9


(a)
식염수
DOM + OVA
DOM-OVA
OVA-DOM
anti-OVA IgG의 역가
제1 OVA 주사 후 일수
(b)
DOM + OVA
DOM-OVA
OVA-DOM
OVA
OVA + CpG