(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118576700 A
(43)申请公布日 2024.09.03

(21)申请号 202410492606.5

(22)申请日 2016.09.16

(30)优先权数据
14/859,292 2015.09.19 US
15/185,564 2016.06.17 US

(62)分案原申请数据
201680064903.3 2016.09.16

(71)申请人 洛桑聚合联合学院
地址 瑞士洛桑

(72)发明人 J·A·哈贝尔 D·S·威尔逊

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉

(51)Int.Cl.
A61K 39/35(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 47/54(2017.01)
A61K 47/58(2017.01)
A61K 38/28(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 3/10(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

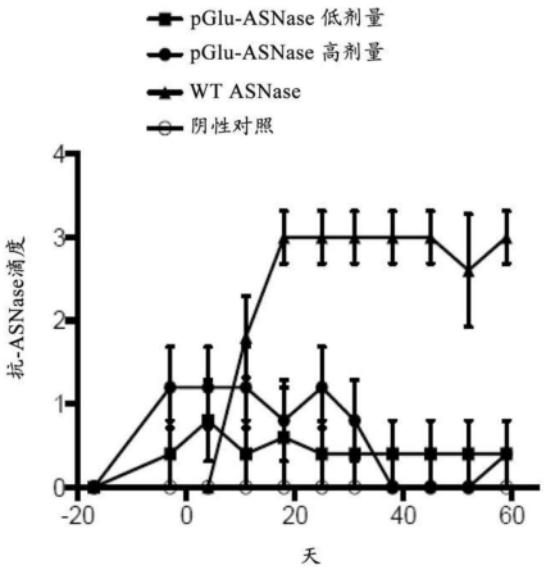
权利要求书3页 说明书146页
序列表（电子公布） 附图25页

(54)发明名称

糖靶向治疗剂

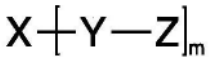
(57)摘要

本发明涉及糖靶向治疗剂。本发明的一些实施方案涉及治疗性组合物，其配置为靶向受试者的肝并且可用于治疗或预防移植物排斥、自身免疫性疾病、食物变态反应、和针对治疗剂的免疫应答中的一种或多种。在一些实施方案中，组合物配置为靶向肝，并且递送期望耐受的抗原。在一些实施方案中，组合物配置为用于清除与一种或多种上文提及的疾病有关的循环蛋白或肽或抗体。本发明中还公开用于诱导免疫耐受性的组合物的方法和用途。



CN 118576700 A

1.包含式1的化合物：

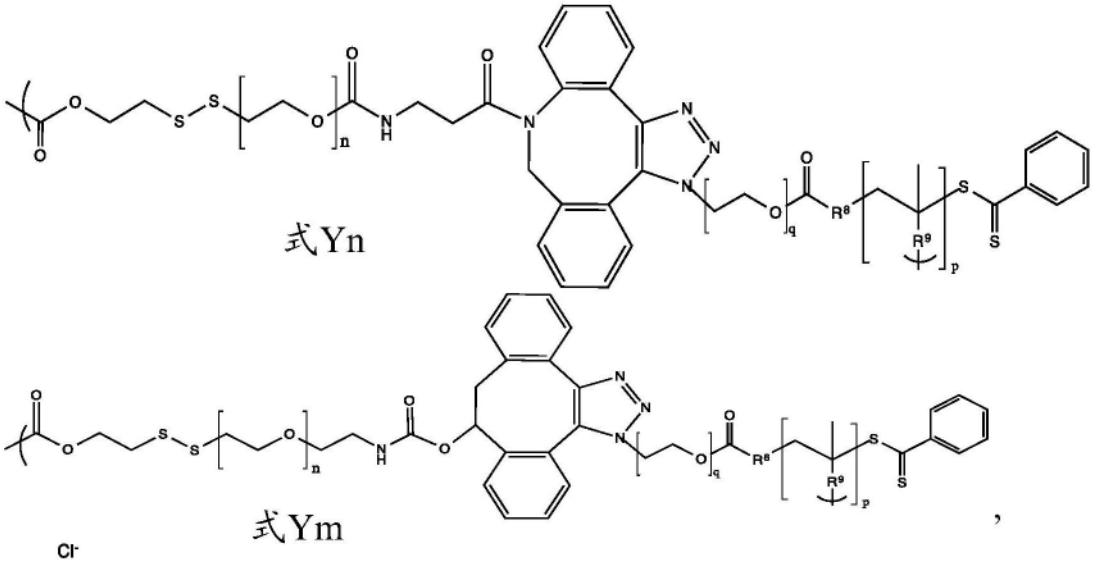


式1

其中：

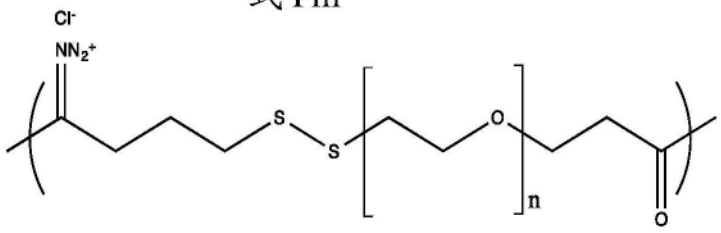
m是约1至10的整数；

X包含含有抗原性区域的蛋白质或蛋白质片段；Y是具有选自下组的式的连接基部分：

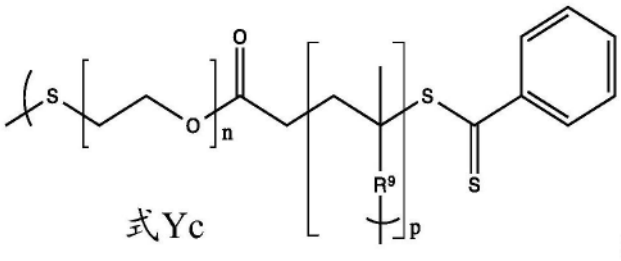


式Yn

式Ym，



式Ya，和



式Yc；

其中：

左括号“(”指示与X的键；

右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键；n是约1至100的整数；

其中存在的p是约2至150的整数；

其中存在的q是约1至44的整数；

其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-；并且

其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-；并且

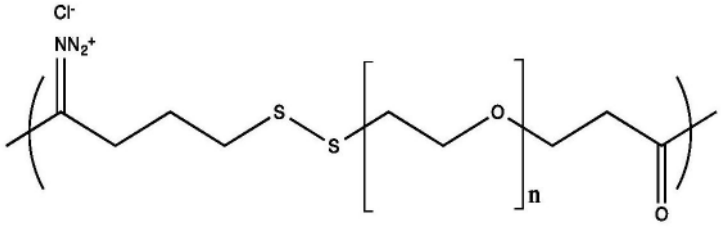
Z包含肝靶向部分。

2.权利要求1的化合物,其中Z是半乳糖或葡萄糖。

3.权利要求1的化合物,其中Z是半乳糖胺或葡糖胺。

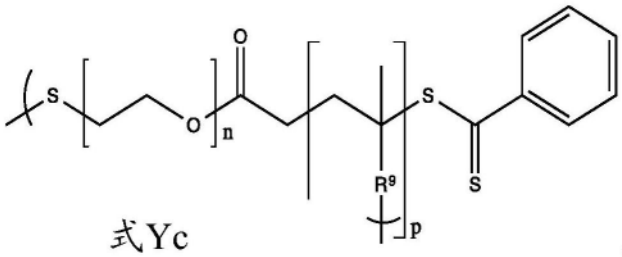
4.权利要求1的化合物,其中Z是N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

5.权利要求1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:



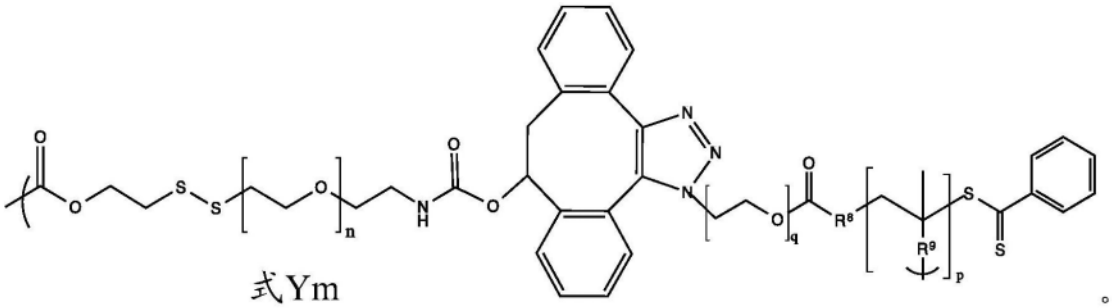
式Ya

6.权利要求1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:



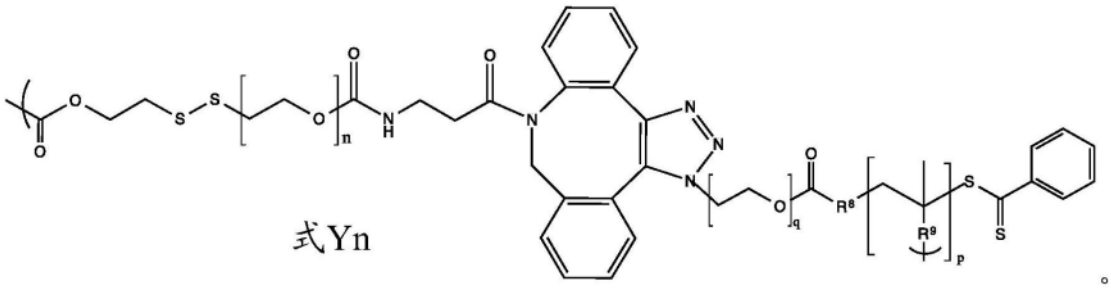
式Yc

7.权利要求1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:



式Ym

8.权利要求1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:



式Yn

9.权利要求1的化合物,其中X是选自下组的食物抗原:伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、蓝豆蛋白(Ara h 6)、a-乳清蛋白(ALA)、乳运铁蛋白、Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快同种型、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白及其片段。

10.权利要求9的化合物,其中X选自下组:谷蛋白、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋

白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白及其片段。

糖靶向治疗剂

[0001] 本申请是基于申请日为2016年9月16日,优先权日为2015年9月19日,申请号为201680064903.3,发明名称为:“糖靶向治疗剂”的专利申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求题目为“糖靶向治疗剂”、于2015年9月19日提交的美国专利申请号14/859,292和2016年6月17日提交的美国专利申请15/185,564的权益,每篇的全部内容在此通过引用并入。

[0004] 引用序列表

[0005] 根据35U.S.C.§1.52(e)在此通过引用并入经由EFS-Web作为ASCII文本发明件提交的序列表。序列表的ASCII文本发明件的名称为ANOK001P1WO_ST25.TXT,ASCII文本发明件的创建日期为2016年9月14日,并且ASCII文本发明件的大小为47.4KB。

发明背景

技术领域

[0007] 本发明中公开的一些实施方案涉及药学可接受组合物,其可用于治疗移植物排斥、自身免疫性疾病、变态反应(例如食物变态反应)、和针对治疗剂的免疫应答。

[0008] 相关技术的描述

[0009] 已经使用各种方法来诱导对引发不期望的免疫应答的抗原的耐受性。一些方法采用针对特定细胞的抗原。申请US 2012/0039989、US 2012/0178139和WO 2013/121296描述了将抗原靶向红细胞以利用红细胞在用于致耐受性的抗原呈递中的作用。

发明概述

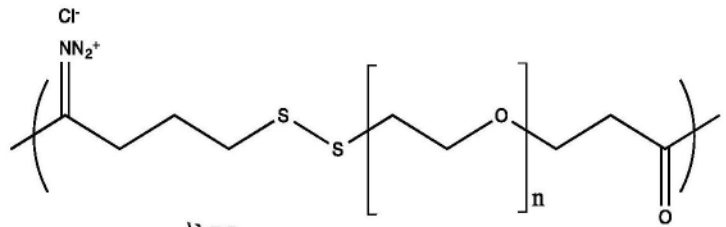
[0011] 尽管迄今为止使用细胞靶向方法产生了积极的结果,但替换方法的可能性仍然受到关注。具体而言,本发明公开的一些实施方案涉及被配置为靶向肝中的一种或多种细胞类型的组合物,并且因此将期望耐受的抗原递送至靶向的一种或多种细胞类型,并且由此诱导抗原的处理并诱导对抗原的免疫耐受性。如下文更详细公开的抗原可包括治疗剂,蛋白质,蛋白质片段,蛋白质或蛋白质片段的抗原模拟物(例如模拟表位)。以下更详细地讨论其它类型的抗原。在一些实施方案中,还提供了这种组合物的方法和用途。

[0012] 在一些实施方案中,提供了包含式1的化合物:

[0013] $X\text{-}Y\text{-}Z]_m$

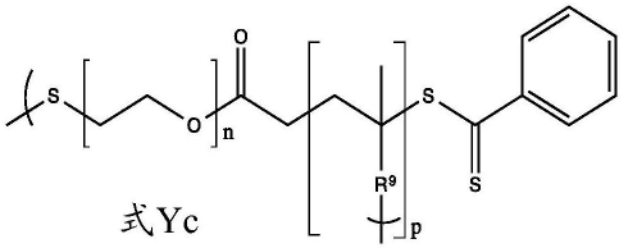
式1

[0014] m是约1至10的整数,X包含含有抗原性区域的分子,Y是具有选自下组的式的连接基部分:



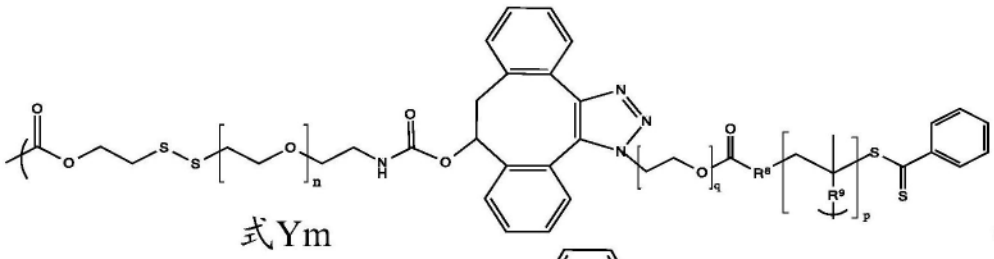
式Ya

，



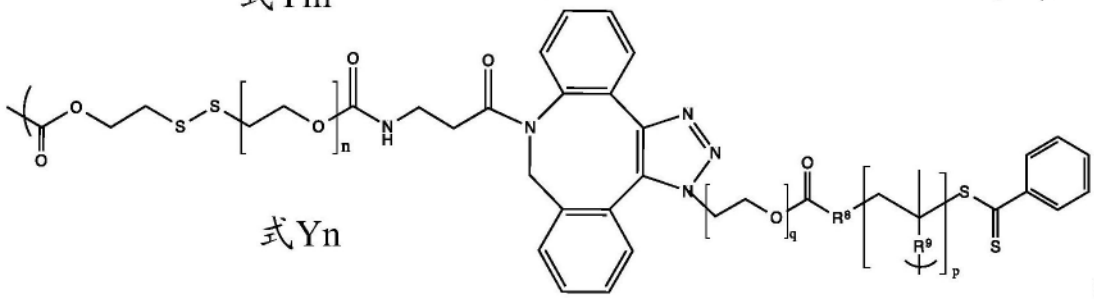
式Yc

[0015]



式Ym

，和



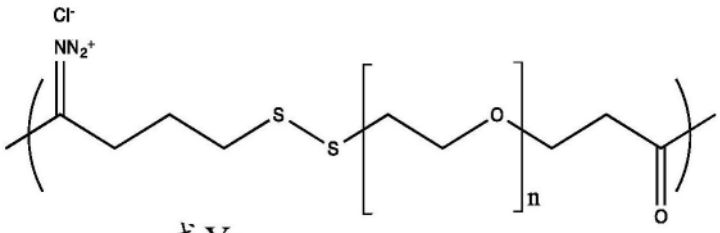
式Yn

；

[0016] 其中左括号“(”指示与X的键,右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键,n是约1至100的整数,其中存在的p是约2至150的整数,其中存在的q是约1至44的整数,其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-;并且其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-,并且Z包含肝靶向部分。在一些实施方案中,X是包含抗原性区域的蛋白质或蛋白质片段。在一些实施方案中,Z是半乳糖,而在一些实施方案中,Z是葡萄糖。在一些实施方案中,Z是半乳糖胺,而在一些实施方案中,Z是葡糖胺。在一些实施方案中,组合物中使用葡萄糖或半乳糖的α异头物。在一些实施方案中,组合物中使用葡萄糖或半乳糖的β异头物。在一些实施方案中,使用α和β异头物的混合物,包括任选地葡萄糖和半乳糖的混合物。在一些实施方案中,Z是N-乙酰基半乳糖胺,而在一些实施方案中,Z是N-乙酰基葡糖胺。在一些实施方案中,组合物中使用葡糖胺或半乳糖胺的α异头物。在一些实施方案中,组合物中使用葡糖胺或半乳糖胺的α异头物。在一些实施方案中,使用α和β异头物的混合物,包括任选地葡糖胺和半乳糖胺的混合物。同样地,在一些实施方案中,使用N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺的α异头物、β异头物、或α和β异头物的组合。在各个实施方案中,可以采用任何肝靶向糖的α或β异头物形式中任一种的组合以及糖的任何组合。在一些实施方案中,Y包含Y_m或Y_n,m是1-5,n是75-85,p是85-95,并且q是2-6。在一些实施方案中,m是1-3,n是79,p是90,并且q是4。在一些实施方案中,X选自下组:胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷蛋白、麦醇溶蛋白、髓磷脂碱蛋

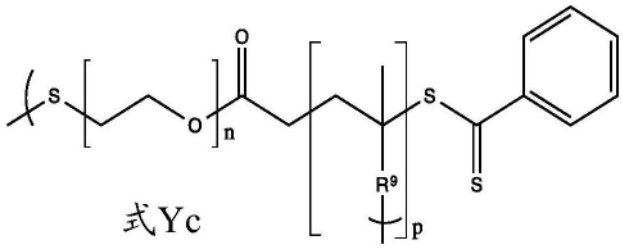
白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白和蛋白脂质蛋白、因子VIII、因子IX、天冬酰胺酶、尿酸酶及任何前述的片段。在一些实施方案中,抗原X不是全长蛋白。例如,在一些实施方案中,抗原不是全长麦醇溶蛋白、胰岛素或胰岛素原。在一些实施方案中,抗原X不是蛋白质的片段。在一些实施方案中,m不大于3,n不大于80,p不大于100并且q不超过5。

[0017] 在一些实施方案中,Y是具有下式的连接基部分:

[0018] 

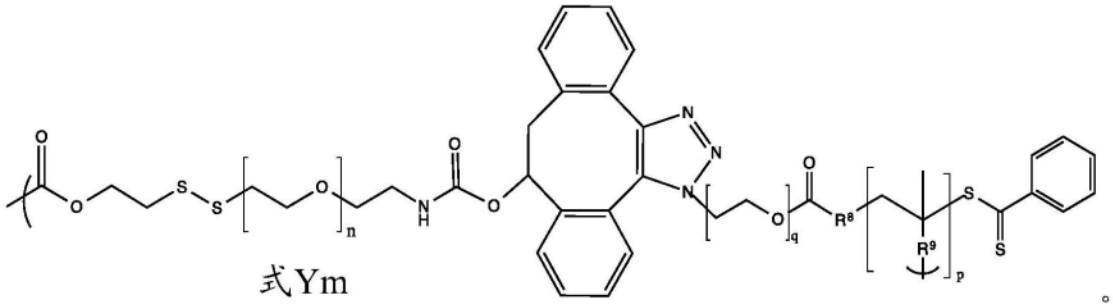
式Ya

[0019] 在一些实施方案中,Y是具有下式的连接基部分:

[0020] 

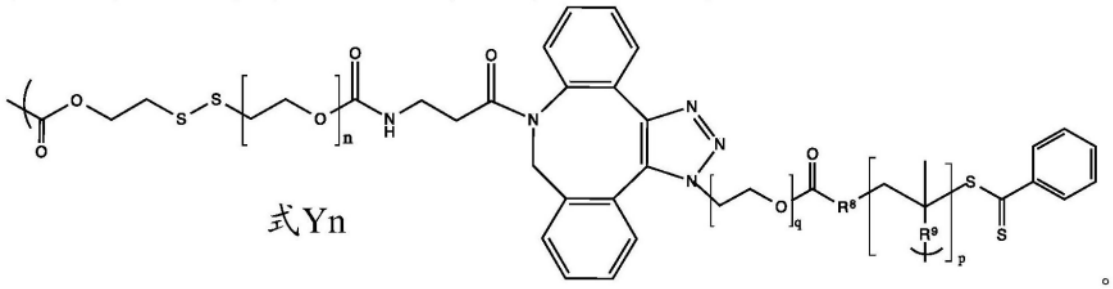
式Yc

[0021] 在一些实施方案中,Y是具有下式的连接基部分:

[0022] 

式Ym

[0023] 在一些实施方案中,Y是具有下式的连接基部分:

[0024] 

式Yn

[0025] 在一些实施方案中,可以使用本发明中公开的连接基的组合,就像可以采用肝靶向部分的组合一样。

[0026] 如下文更为详细讨论,存在可以期望耐受的多种抗原。这些可以包括但不限于当将受试者暴露于抗原时导致不利的免疫应答的外源抗原。在一些实施方案中,不利的免疫应答可以是抗原摄入(例如口服或经鼻,或者经由一些其它粘膜路径)的结果。这些路径可

以是例如食物抗原的情况。在一些实施方案中,可以有目的地对受试者施用抗原,例如,施用治疗性组合物以治疗受试者患有的疾病或病症。在另外的实施方案中,抗原可以由受试者生成,例如自身免疫抗原。例如,在一些实施方案中,X包含外来移植物抗原或其致耐受性部分,移植物受体针对该抗原形成不期望的免疫应答。在一些实施方案中,X包含外来食物、动物、植物或环境抗原或其致耐受性部分,患者针对该抗原形成不期望的免疫应答。在一些实施方案中,X包含外来治疗剂或其致耐受性部分,患者针对该抗原形成不期望的免疫应答。在一些实施方案中,X包含合成的自身抗原或其致耐受性部分,患者针对其的内源形式形成不期望的免疫应答。

[0027] 在上文的进一步详情中,在一些实施方案中,提供了化合物,其中X是食物抗原。在一些此类实施方案中,X是下列一种或多种:伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、蓝豆蛋白(Ara h 6)、a-乳清蛋白(ALA)、乳运铁蛋白、Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快同种型、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱(seclain)和燕麦蛋白。在一些实施方案中,也使用任何这些抗原的片段和/或任何这些抗原的模拟表位。在一些实施方案中,X选自下组:谷蛋白、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白及其片段。在一些实施方案中,X选自下组:谷蛋白、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、和Ω-麦醇溶蛋白及其片段。在一些实施方案中,X是谷蛋白或其片段。在一些实施方案中,X是麦醇溶蛋白或其片段。

[0028] 在一些实施方案中,提供了化合物,其中X是治疗剂。在一些实施方案中,X选自下组:因子VII、因子IX、天冬酰胺酶、和尿酸酶及其片段。在一些实施方案中,X是选自下组的治疗剂:因子VII和因子IX及其片段。在一些实施方案中,X是选自下组的治疗剂:因子VIII或其片段。在一些实施方案中,当X是治疗剂时,化合物可以用于治疗、预防、降低或以其它方式减轻针对用于血友病的治疗剂形成的免疫应答。如本发明中讨论,可以在一些实施方案中使用上述抗原的任何抗原性部分的模拟表位。

[0029] 在一些实施方案中,X包含天冬酰胺酶或其片段。在一些实施方案中,X包含尿酸酶或其片段。在几个此类实施方案中,化合物可以用于治疗、预防、降低或以其它方式减轻针对抗癌剂形成的免疫应答。如本发明中讨论,可以在一些实施方案中使用上述抗原的任何抗原性部分的模拟表位。

[0030] 在一些实施方案中,X与自身免疫性疾病有关。例如,在一些实施方案中,相关的自身免疫性疾病是下列一种或多种:I型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、白癜风、葡萄膜炎、寻常型天疱疮和视神经脊髓炎。

[0031] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是I型糖尿病,并且X包含胰岛素或其片段。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是I型糖尿病,并且X包含胰岛素原或其片段。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是I型糖尿病,并且X包含前胰岛素原或其片段。如本发明中讨论,可以在一些实施方案中使用上述抗原的任何抗原性部分的模拟表位。在一些实施方案中,可以将这些抗原的组合掺入致耐受性化合物中,所述致耐受性化合物可以辅助降低对沿着胰岛素途径的多个点处的自身抗原的免疫应答。

[0032] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化,并且X包含髓磷脂碱蛋白或其

片段。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化。并且X包含髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白或其片段。在一些实施方案中,自身免疫性疾病是多发性硬化,并且X包含髓磷脂蛋白脂质蛋白或其片段。如本发明中讨论,可以在一些实施方案中使用上述抗原的任何抗原性部分的模拟表位。在一些实施方案中,可以将这些抗原的组合掺入致耐受性化合物中,所述致耐受性化合物可以辅助降低对沿着控制髓鞘形成或髓磷脂修复的酶促途径的几个点处的自身抗原的免疫应答。

[0033] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是类风湿性关节炎,并且X选自下组:血纤蛋白原、波形蛋白、II型胶原、α烯醇化酶及其片段。

[0034] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是白癜风,并且X选自下组:Pmel17、酪氨酸酶及其片段.

[0035] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是葡萄膜炎,并且X选自下组:视黄醛抑制蛋白和感光器间受体类视色素结合蛋白(IRBP)及其片段.

[0036] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是寻常型天疱疮,并且X选自下组:桥粒芯蛋白3、1和4、天疱膜联蛋白(pemphaxin)、桥粒糖蛋白、斑珠蛋白、斑周蛋白(perplakin)、桥粒斑蛋白、乙酰胆碱受体及其片段。

[0037] 在一些实施方案中,自身免疫性疾病是视神经脊髓炎,并且X是水通道蛋白-4或其片段。

[0038] 如本发明中讨论,可以在一些实施方案中使用上述(或本发明中另外公开的)自身抗原的任何抗原性部分的模拟表位。

[0039] 在一些实施方案中,还提供了上述(或本发明中另外公开)化合物用于诱导对X的耐受性的用途。

[0040] 在一些实施方案中,本发明中还提供了药学可接受组合物,其包含上述(或本发明中另外公开)化合物。还提供了此类组合物在诱导对X的耐受性中的用途。在一些实施方案中,药学可接受组合物由化合物组成,或主要由化合物组成,在该化合物中X是食物抗原、治疗剂、自身抗原或其片段,Y为连接基,且肝靶向部分Z选自葡萄糖、半乳糖、葡糖胺、半乳糖胺、N-乙酰基葡糖胺、和N-乙酰基半乳糖胺。

[0041] 本发明中还提供了诱导对抗原的耐受性的方法,受试者能够针对该抗原形成不期望的免疫应答,其包括施用上文公开(或本发明中另外公开)的化合物。在一些实施方案中,在将受试者暴露于所述抗原前施用所述化合物。然而,在一些实施方案中,在将受试者暴露于所述抗原后施用所述化合物。在一些实施方案中,施用包括所述化合物的至少一次静脉内施用(例如推注剂量,接着是一系列任选的维持剂量)。

[0042] 在一些实施方案中,提供了上文公开(或本发明中另外公开)的化合物在制备药物中的用途,所述药物用于诱导对抗原或其致耐受性部分的耐受性,受试者针对该抗原形成不期望的免疫应答。

[0043] 在本发明中公开的一些实施方案中,提供了在受试者中诱导免疫耐受性的组合物以及实现所述免疫耐受性的组合物的方法和用途。在一些实施方案中,免疫耐受性是期望的,因为受试者针对抗原形成不期望的免疫应答。根据实施方案,抗原可以是多种抗原中的一种或多种,例如外来抗原,诸如摄入的食物抗原,或者对受试者给予的治疗性药物的抗原性部分。在另外的实施方案中,抗原可以是受试者的免疫系统无法识别(或者仅在有限程度

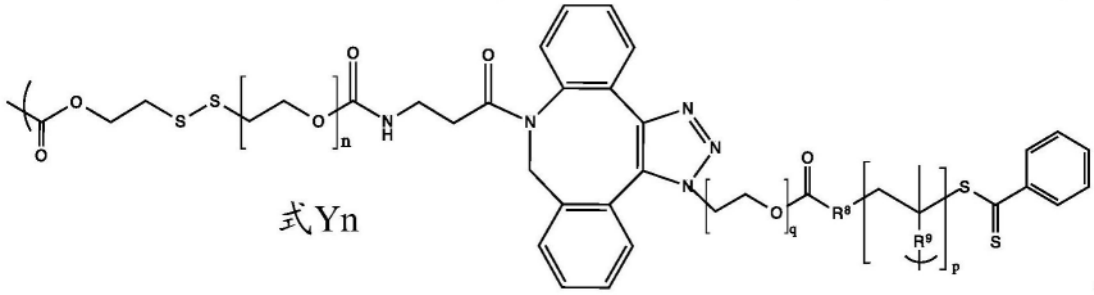
上识别为自身)并且因此引发针对性的免疫应答、导致自身免疫性病症的自身抗原。

[0044] 在一些实施方案中,提供了包含式1的组合物:

[0045] $X\left[Y-Z\right]_m$

式1

[0046] 其中m是约1-10的整数,X包含食物抗原、治疗剂、自身抗原、任何此类抗原的片段、或任何此类抗原的模拟表位,Y是具有下式的连接基部分:

[0047] 

式Yn

,

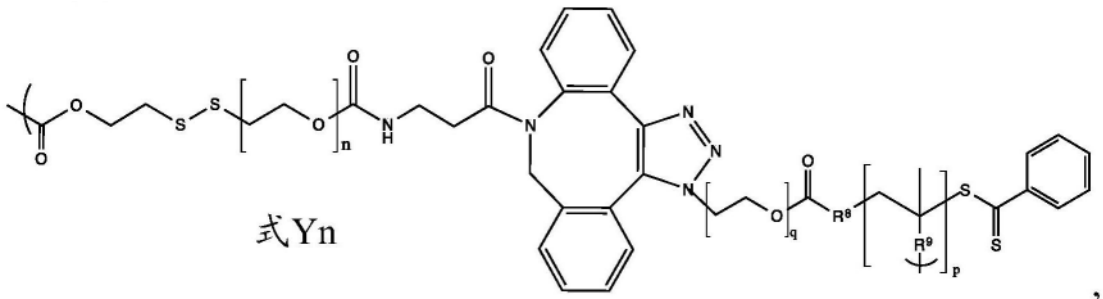
[0048] 其中:左括号“(”指示与X的键,右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键,n是约70至85的整数,其中存在的p是约85至95的整数;其中存在的q是约1至10的整数,其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-;并且其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-;并且Z包含肝靶向部分,其包含葡萄糖或半乳糖。在一些实施方案中,m是1-3,n是79,p是90,并且q是4。在一些实施方案中,X选自下组:胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷蛋白、麦醇溶蛋白、髓磷脂碱蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白和蛋白脂质蛋白、因子VIII、因子IX、天冬酰胺酶、尿酸酶及任何前述的片段。在一些实施方案中,组合物:包含抗原X、连接基Y和肝靶向部分Z;由抗原X、连接基Y和肝靶向部分Z组成;或基本上由抗原X、连接基Y和肝靶向部分Z组成。

[0049] 在一些实施方案中,提供了包含式1的化合物:

[0050] $X\left[Y-Z\right]_m$

式1

[0051] 其中m是约1至10的整数,X选自下组:胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷蛋白、麦醇溶蛋白、髓磷脂碱蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白和蛋白脂质蛋白、因子VIII、因子IX、天冬酰胺酶、尿酸酶及任何前述的片段,Y是具有下式的连接基部分:

[0052] 

式Yn

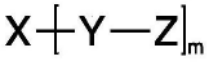
,

[0053] 其中左括号“(”指示与X的键,右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键,n是约70至85的整数,其中存在的p是约85至95的整数,其中存在的q是约1至10的整数,其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-;并且其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-,

并且Z包含肝靶向部分,其包含糖部分。在一些实施方案中,m是1-3,n是79,p是90,并且q是4。在一些实施方案中,Z选自下组:葡萄糖、葡糖胺、半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺和N-乙酰基葡糖胺。

[0054] 在一些实施方案中,可以使用2,5-二氧代吡咯烷-1-基碳酸丙酯-连接基和/或2-(乙基二硫烷基)乙基氨基甲酸乙酯-连接基。

[0055] 在一些实施方案中,提供了组合物,其包含式1的化合物:

[0056] 

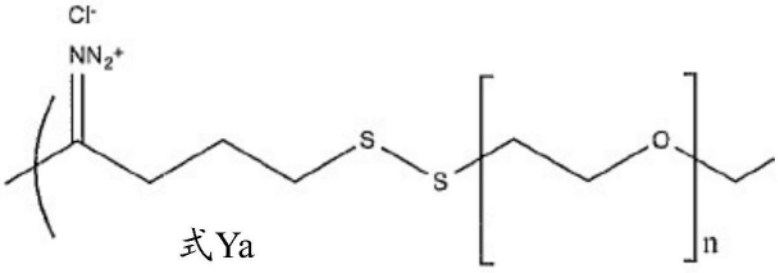
式1

[0057] 其中:

[0058] m是约1至10的整数;

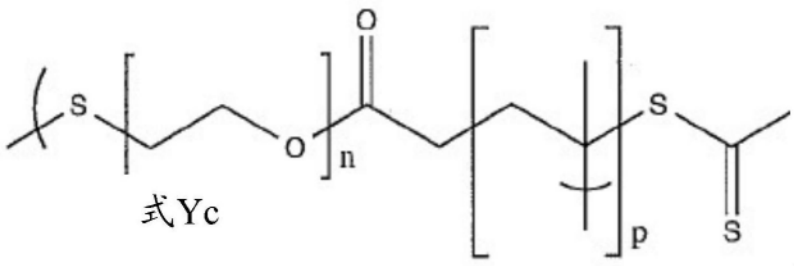
[0059] X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,其中抗原是食物抗原、治疗剂、自身抗原、或任何此类抗原的片段;

[0060] Y是具有选自下组的式的连接基部分:



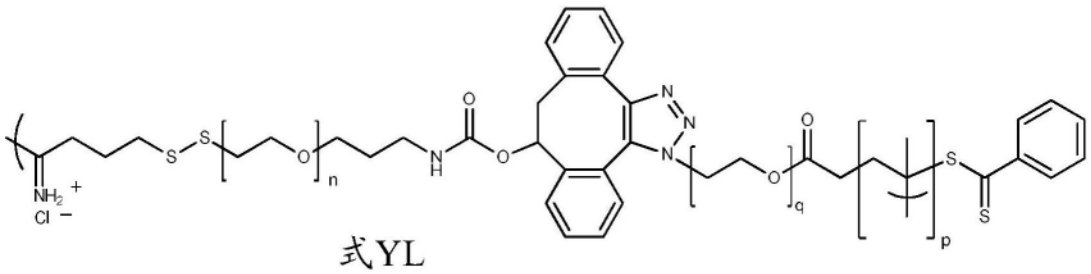
式Ya

,

[0061] 

式Yc

, 和

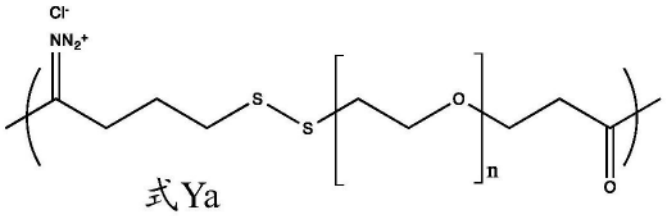


式YL

;

[0062] 其中左括号“(”指示与X的键,其中存在的右“)”指示与Z的键,其中存在的底部“)”指示与Z的键,其中存在的n是约1至约80的整数,其中存在的q是约1至约4的整数,其中存在的p是约1至约90的整数,其中存在的R_8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,并且Z包含一个或多个肝靶向部分,其特异性靶向表达无唾液酸糖蛋白受体的肝细胞。

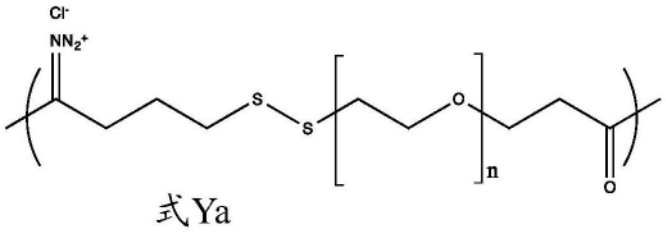
[0063] 在本发明的一些实施方案中,m是1至4,Y是具有下式的连接基部分:

[0064] 

式Ya

[0065] 并且Z包含肝靶向部分,所述肝靶向部分包含下列一项或多项:半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺。

[0066] 在一些实施方案中,m解析为1至4的整数,Y是具有下式的连接基部分:

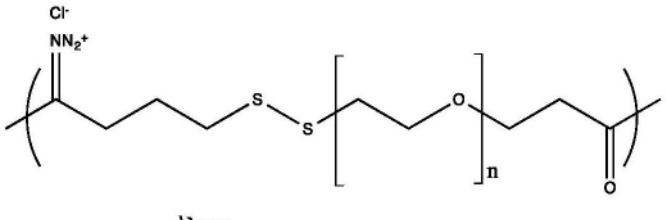
[0067] 

式Ya

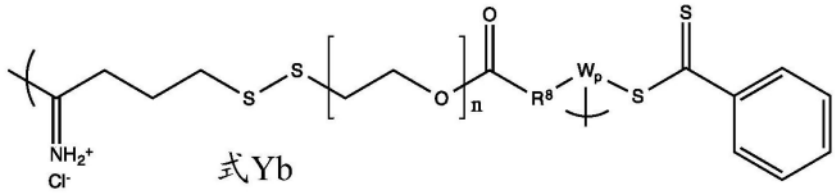
并且Z包含肝靶向部分,其包含下列一项或多项:葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0068] 在一些实施方案中,提供了式1(X-[-Y---Z]$_m$)的组合物,其中m是约1至100的整数,X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,或其致耐受性部分或X包含特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体,所述循环蛋白或肽或抗体由此原因参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应,Y包含连接基部分,并且Z包含肝靶向部分。在一些实施方案中,Z包含半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

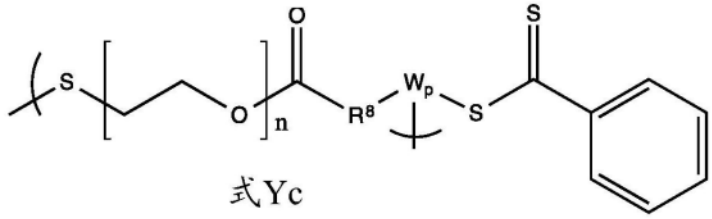
[0069] 在一些实施方案中,Y选自N-羟基琥珀酸酰胺基(N-hydroxysuccinamidyl)连接基、马来酰亚胺连接基、乙烯基砜连接基、吡啶基二-硫醇-聚(乙二醇)连接基、吡啶基二-硫醇连接基、n-硝基苯基碳酸酯连接基、NHS-酯连接基、和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯连接基。在一些实施方案中,Y包含特异性结合X的抗体、抗体片段、肽或其它配体、二硫烷基乙酯、由式Ya至Yp之一表示的结构:

[0070] 

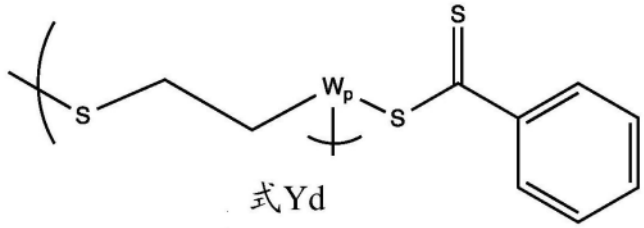
式Ya



式Yb

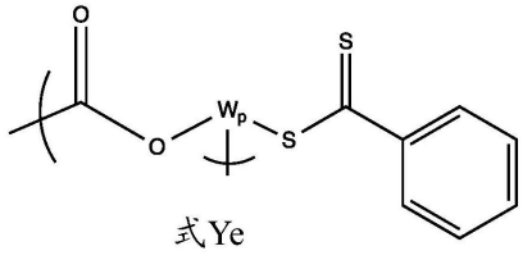


式Yc

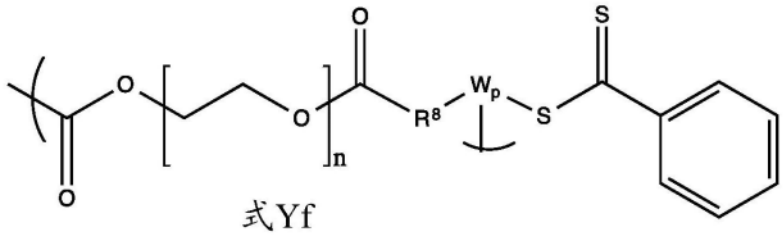


式Yd

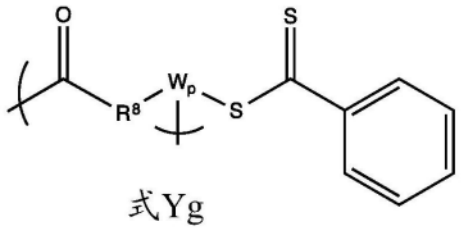
[0071]



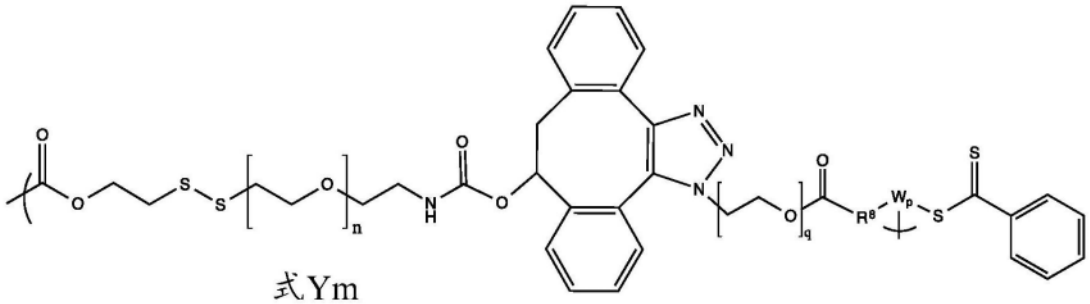
式Ye



式Yf

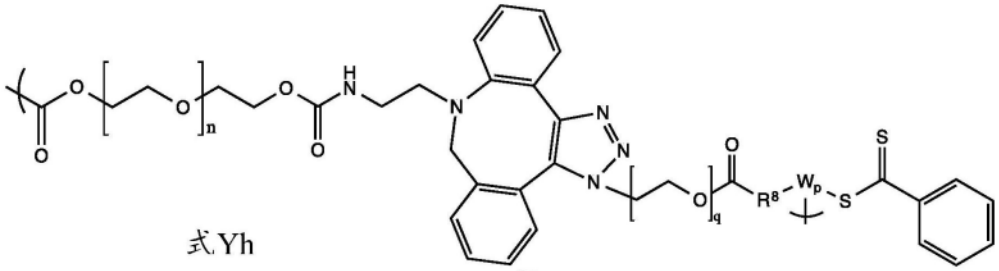


式Yg

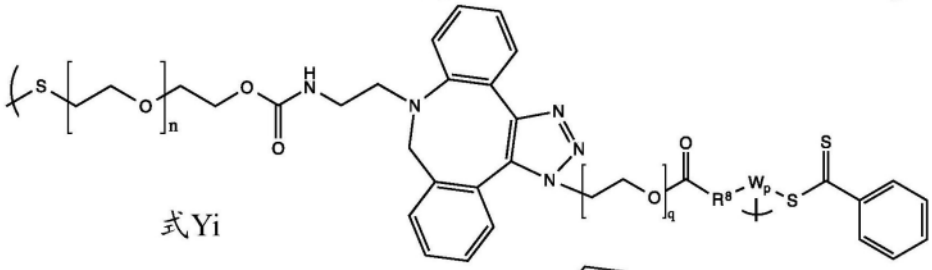


式Ym

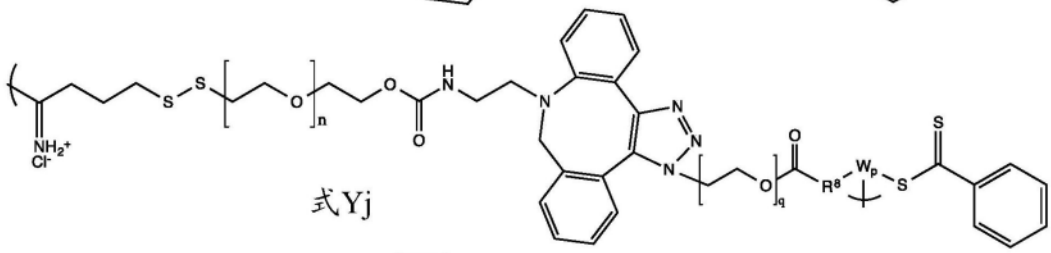
[0072]



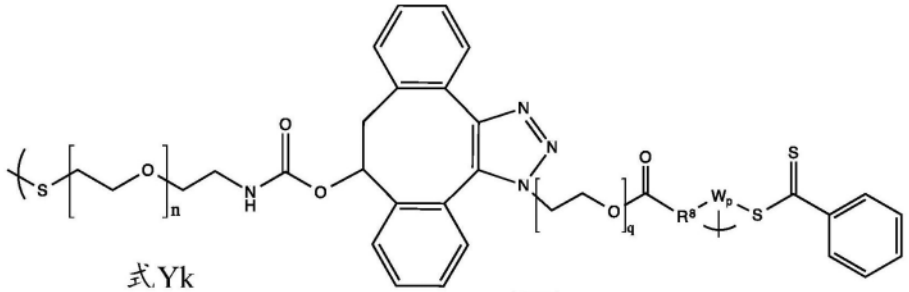
式Yh



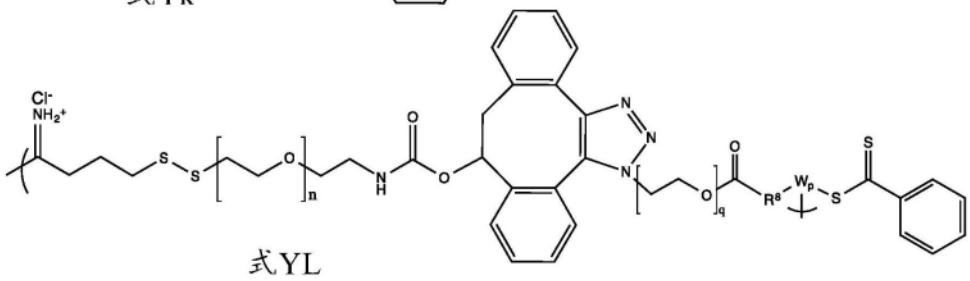
式Yi



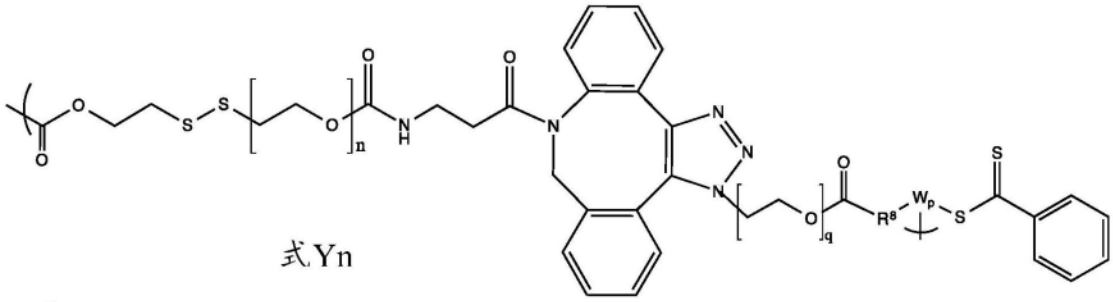
式Yj



式Yk

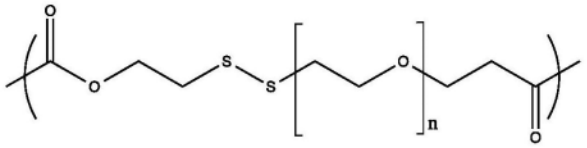


式YL

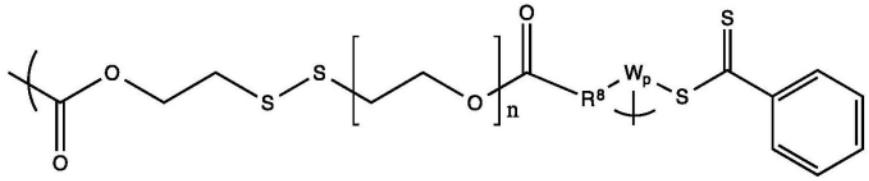


式Yn

[0073]



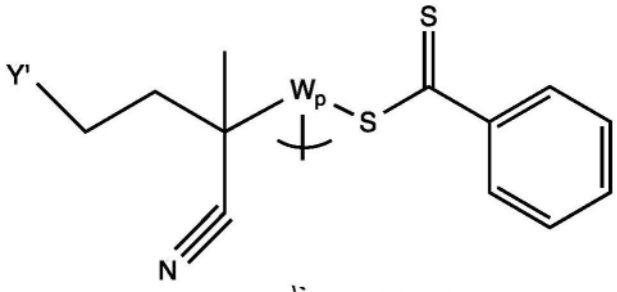
式Yo 和



式Yp

[0074] 或Y具有以式Y'-CMP表示的部分:

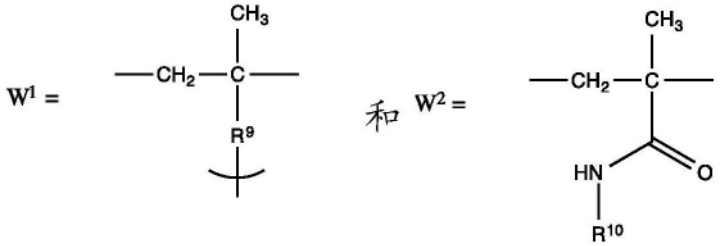
[0075]



式 Y'-CMP

[0076] 在此类实施方案中,左括号"("指示X和Y之间的键,右括号或底部括号和")"指示Y和Z之间的键,n是约1至100的整数,q是约1至44的整数,R^8 is-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,Y' 表示Y的剩余部分;并且W表示相同W^1基团的聚合物,或W是相同或不同W^1和W^2基团的共聚物或无规共聚物,其中:

[0077]

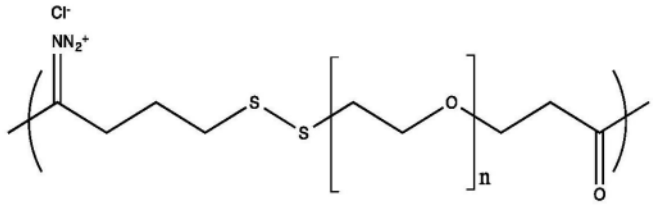


和

[0078] 并且其中p是2至约150的整数,R^9是直接的键、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-或-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-,t是1至5的整数;并且R^{10}是脂肪族基团、醇或脂肪族醇。在一个此类实施方案中,m是1至3,Y由式Ym表示,其中R^8是-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,并且W由W^1和W^2的嵌段共聚物表示,其中R^9是-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-,t是1,并且R^{10}是2-羟基丙基;并且Z包含肝靶向部分,其包含下列一项或多项:半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡

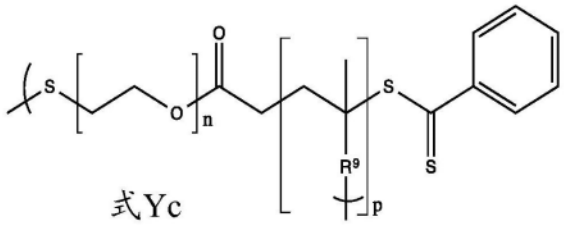
糖胺、N-乙酰基葡糖胺。在一些实施方案中,Z是相应糖的β-异头物。

[0079] 在几个另外的实施方案中,提供了用于诱导对抗原的耐受性的组合物,受试者针对该抗原形成不期望的免疫应答,所述组合物包含式1(式1(X-[-Y---Z]$_m$)的化合物,其中m是约1至10的整数,X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,其中抗原是食物抗原、治疗剂、自身抗原、或任何此类抗原的片段,Y是具有选自下组的式的连接基部分:



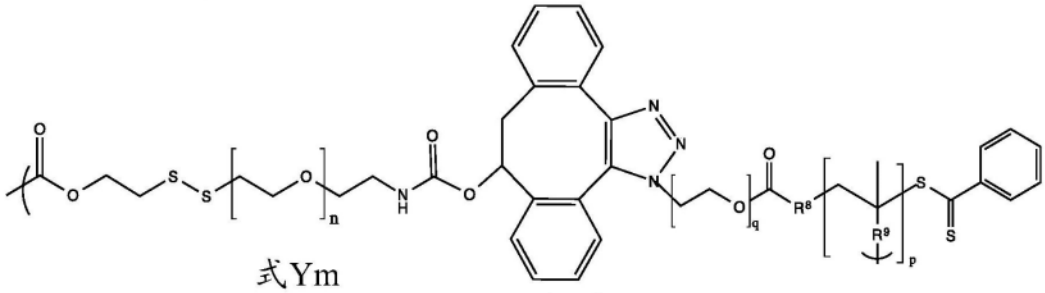
式Ya

,



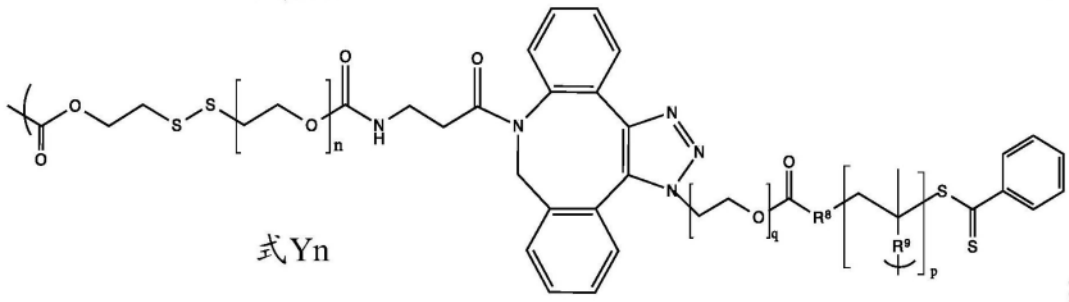
式Yc

[0080]



式Ym

, 和



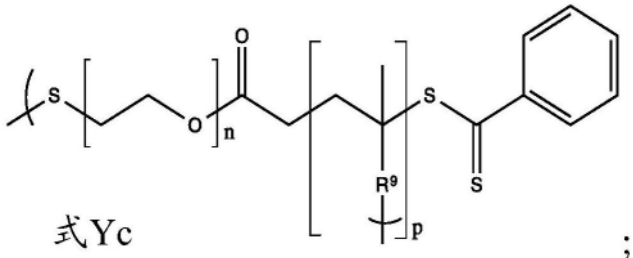
式Yn

;

[0081] 其中左括号“(“指示与X的键,右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键,n是约1至100的整数,其中存在的p是约2至150的整数,其中存在的q是约1至44的整数,其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,并且其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-,并且Z包含半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺。

[0082] 在此类组合物的一些实施方案中,m是1至3,Y是具有下式的连接基部分:

[0083]



式Yc

;

[0084] 其中CH_2-CH_2-NH-C(O)-;并且Z包含肝靶向部分,其包含下列一项或多项:半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺。在一些实施方案中,Z是选择的部分的β-异头物。

[0085] 如上文讨论,在一些实施方案中,X是自身抗原,并且不期望的免疫应答是自身免疫应答。

[0086] 本发明中公开了多种自身抗原,但是在几个具体的实施方案中,X是髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白或髓磷脂蛋白脂质蛋白。在此类实施方案中,受试者经历的不期望的免疫应答与多发性硬化有关。在另外的实施方案中,X是胰岛素、胰岛素原、或前胰岛素原,并且其中不期望的免疫应答与糖尿病有关。应当理解,与多发性硬化、糖尿病或其它自身免疫性疾病有关并不必然需要此类自身免疫性病症的正式诊断,而是可以与特定自身免疫性病症的共同症状或特征有关。

[0087] 在另外的实施方案中,如本发明中讨论,可以针对治疗剂,诸如蛋白质药物或源自非人和/或非哺乳动物物种的药物产生不期望的免疫应答。例如,在一些实施方案中,X是治疗剂,诸如因子VIII、因子IX、或其它止血诱导剂。在此类实施方案中,不期望的免疫应答针对试剂,并且相关的疾病是血友病,其由于自身免疫应答而无法改善(在缺乏组合物的情况下)。然而,在施用组合物后,血友病可以改善,因为组合物有助于诱导对试剂的耐受性,减少对试剂的响应,并允许血友病症状减少。在另外的实施方案中,X是治疗剂,如天冬酰胺酶和尿酸酶。如上文讨论,不期望的免疫应答可以源自此类试剂的施用,因为它们源自非人来源。本发明公开的组合物诱导对这些试剂的耐受性的能力允许这些试剂继续被需要治疗的受试者使用,而减少、减轻、消除或以其它方式改善来自免疫反应的副作用。

[0088] 在一些实施方案中,X是食物抗原。已知许多食物抗原在摄入后引起变态反应,然而,在一些实施方案中,X选自下组:伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、蓝豆蛋白(Ara h 6)、a-乳清蛋白(ALA)、乳运铁蛋白、Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快同种型、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白。在一些实施方案中,用其中X是食物抗原的本发明中公开的组合物进行的治疗容许受试者具有显著降低的对抗原的免疫应答,例如许多花生变态反应如此严重,使得对花生粉尘或花生油的暴露可以引起过敏反应。在一些实施方案中,治疗降低和/或消除对抗原的此类偶然暴露的响应。在另外的实施方案中,治疗允许受试者摄入抗原来源的食物,而产生有限免疫应答或无免疫应答。

[0089] 在一些实施方案中,与仅施用抗原导致的抗原特异性T细胞的增殖相比,对受试者施用该组合物导致抗原特异性T细胞更大程度的增殖。在此类实施方案中,抗原特异性T细胞的增殖指示,相对于仅施用抗原,向加工自身/非自身抗原的分子加工机制的抗原(经由组合物)递送增强。换言之,在此类实施方案中,靶向递送是有效的。在另外的实施方案中,与仅施用抗原导致的抗原特异性T细胞上的耗竭标记物或凋亡标记物的表达相比,本发明中公开的化合物的施用导致抗原特异性T细胞上的耗竭标记物或凋亡标记物的更大表达。此结果指示针对感兴趣的抗原的T细胞的活性的特异性降低和/或针对感兴趣的抗原的T细胞的删除。在一些实施方案中,耐受性诱导的这些分子标志是先前受试者在暴露于抗原时会经历的免疫应答症状的降低或改善的前体。

[0090] 在一些实施方案中,Z包含肝靶向部分,其是碳水化合物。在一些实施方案中,碳水

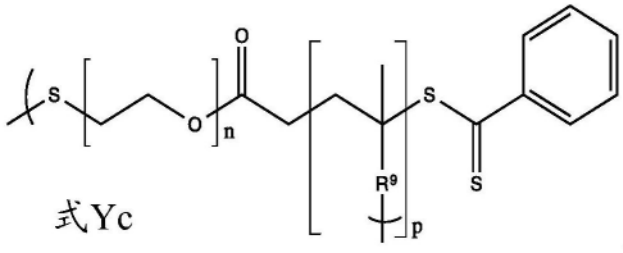
化合物是短链碳水化合物。在一些实施方案中,Z是糖。在一些实施方案中,Z是半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺、或N-乙酰基葡糖胺。在一些实施方案中,当葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺用作Z时,免疫耐受性的诱导更大。在另外的实施方案中,当肝靶向部分是糖并且糖为β-异头物构型时,可以实现免疫耐受性诱导的增强。在一些实施方案中,Z是半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺、或N-乙酰基葡糖胺,并且在其C1、C2或C6与Y缀合。

[0091] 本发明中还提供了诱导对抗原的耐受性的方法,所述抗原单独施用(例如,不用目前公开的组合物)时会导致不利的免疫应答。根据实施方案,此类方法涉及暴露于抗原之前或之后的施用。在一些实施方案中,暴露前施用发挥预防效果,其在一些实施方案中基本上避免或显著降低了免疫应答。组合物的施用可以经由多种方法进行,包括但不限于静脉内、肌肉内、口服、透皮或其它输注途径。施用可以是每日、每周、每天多次或根据需要(例如在预期暴露之前)。

[0092] 本发明还提供了本发明公开的组合物在暴露于抗原后用于治疗不期望的免疫应答的用途。如本发明中讨论,此类用途可以用于预防效果和/或用于减少来自先前暴露于抗原(或先前的不利免疫效应,诸如自身免疫环境中的那些)的症状。例如,本发明提供了根据式1的组合物用于治疗由于暴露于治疗性抗原,暴露于食物抗原或来自针对自身抗原的免疫应答的不利效应所致的不期望的副作用的用途。本发明公开的组合物适合于以此类用途施用于患者,例如通过口服、IV、IM或其它合适的途径。在一些实施方案中,本发明公开的组合物的用途出乎意料地导致对感兴趣的抗原的不利免疫应答的减少、消除或改善。

[0093] 本发明中提供了另外的组合物和其使用方法。例如,在一些实施方案中,提供了药学可接受的组合物,用于在具有功能性类似天然蛋白质的生成缺陷的受试者中诱导对治疗性蛋白质的耐受性,所述药学可接受组合物包含式1(X-[-Y---Z]$_m$)的化合物,其中m是约1至10的整数,X包含抗原性蛋白质或蛋白质片段,Y是具有选自下组的式的连接基部分:式Ya、式Yc、式Ym、式Yn,其中左括号“(“指示与X的键,右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键,n是约1至100的整数,其中存在的p是约2至150的整数,其中存在的q是约1至44的整数,其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-,并且Z包含半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺。

[0094] 在组合物的一些实施方案中,m是1至3,Y是具有下式的连接基部分:

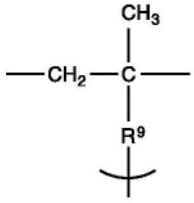
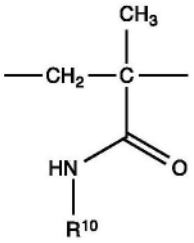
[0095] 

式Yc ,

[0096] 其中CH_2-CH_2-NH-C(O)-,并且Z包含肝靶向部分,其包含下列一项或多项:葡萄糖、葡糖胺、N-乙酰基葡糖胺、半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺。在一些实施方案中,半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺是β-异头物。在一些实施方案中,使用半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺、或N-乙酰基葡糖胺的组合。

[0097] 本发明中还提供了药学可接受组合物,用于在具有功能性类似天然蛋白质的生成

缺陷的受试者中诱导对治疗性蛋白质的耐受性,所述组合物包含式1(X-[-Y---Z]$_m$)的化合物,其中m是约1至10的整数,X包含抗原性蛋白质或蛋白质片段,Y是具有选自下组的式的连接基部分:式Ya、式Yc、式Ym、或式Ym,其中左括号"("指示与X的键,其中存在的右括号")"指示与Z的键,其中存在的底部")"指示与Z的键,其中存在的n是约1至约80的整数,其中存在的q是约1至约4的整数,其中存在的p是约1至约90的整数,其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,并且其中存在的W表示式W^1或W^2基团的聚合物或W是式W^1或W^2的共聚物,其中:

[0098] W^1 =  和 W^2 =  ,

[0099] 其中R^9是直接的键、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-或-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-,t是1至5的整数,R^{10}是脂肪族基团、醇或脂肪族醇;并且Z包含葡萄糖、葡糖胺、N-乙酰基葡糖胺、半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺。在一些实施方案中,半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺是β-异头物。在一些实施方案中,使用半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺、或N-乙酰基葡糖胺的组合。在组合物的一些实施方案中,m是1至3,Y由式Ym表示,其中R^8是-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,并且W由W^1和W^2的嵌段共聚物表示,其中R^9是-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-,t是1,并且R^{10}是2-羟基丙基;并且Z包含肝靶向部分,其包含下列一项或多项:葡萄糖、葡糖胺、N-乙酰基葡糖胺、半乳糖、半乳糖胺、或N-乙酰基半乳糖胺。在一些实施方案中,半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺是β-异头物。在一些实施方案中,使用半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺的组合。

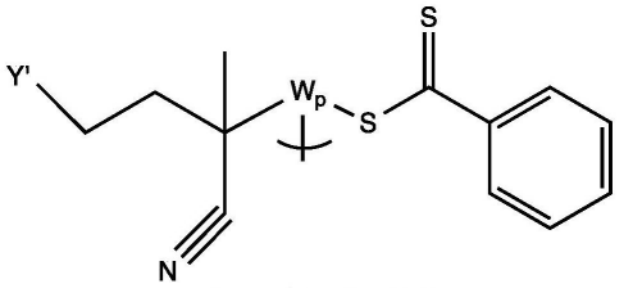
[0100] 在一些实施方案中,X包含髓磷脂碱蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白、或髓磷脂蛋白脂质蛋白的抗原性区域。在另外的实施方案中,X包含因子VIII、因子IX、胰岛素、尿酸酶、PAL、或天冬酰胺酶的抗原性区域。在另外的实施方案中,X包含外来抗原,如伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、蓝豆蛋白(Ara h 6)、a-乳清蛋白(ALA)、乳运铁蛋白、Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快同种型、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白。

[0101] 另外,本发明中提供了组合物,其包含式1(X-[-Y---Z]m)的化合物,其中m是约1至100的整数,X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,或其致耐受性部分,或X包含特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体,所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应,Y包含连接基部分,并且Z包含肝靶向部分。

[0102] 在一些实施方案中,Z是半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。在一些实施方案中,也可以使用半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺的组合。此外,在一些实施方案中,半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺任选是β异头物。在一些实施方案中,Z在

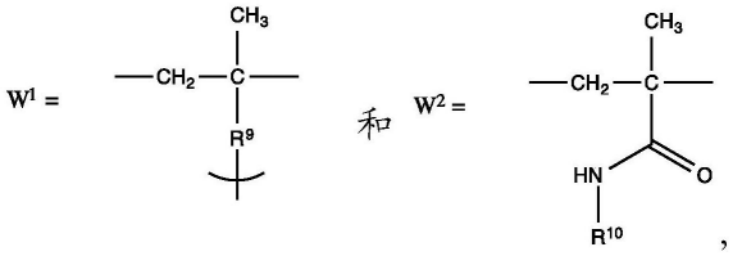
其C1、C2或C6处与Y缀合。

[0103] 在一些实施方案中,Y选自N-羟基琥珀酸酰胺基连接基、马来酰亚胺连接基、乙烯基砜连接基、吡啶基二-硫醇-聚(乙二醇)连接基、吡啶基二-硫醇连接基、n-硝基苯基碳酸酯连接基、NHS-酯连接基、和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯连接基。在一些实施方案中,Y包含特异性结合X的抗体、抗体片段、肽或其它配体、二硫烷基乙酯、由式Ya至Yp之一表示的结构,或者Y具有以式Y'-CMP表示的部分:

[0104] 

式 Y'-CMP ,

[0105] 其中左括号"("指示X和Y之间的键,右括号或底部括号和")"指示Y和Z之间的键,n是约1至100的整数,q是约1至44的整数,R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,Y'表示Y的剩余部分,并且W表示相同W^1基团的聚合物,或者W是相同或不同W^1和W^2基团的共聚物或无规共聚物,其中:

[0106] 

,

[0107] 其中p是2至约150的整数,R^9是直接的键、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-或-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-,t是1至5的整数;并且R^{10}是脂肪族基团、醇或脂肪族醇。

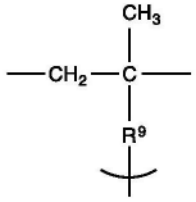
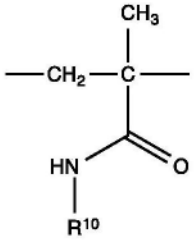
[0108] 在一些此类实施方案中,n是约40至80,p是约10至100,q是约3至20,R^8是-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-,当R9是-CH_2-CH_2-NH-C(O)-时,Z是葡萄糖、半乳糖、N-乙酰基半乳糖胺或在其C1缀合的N-乙酰基葡糖胺,并且当W是共聚物时,R10是2-羟基丙基。在一些实施方案中,Y包含式Ya、式Yb、式Yc、式Yf、式Yg、式Yh、式Yi、式Yk、式Ym或式Yn。在一些实施方案中,Y包含式Ya、式Yb、式Yc、式Ym或式Yn。仍在另外的实施方案中,Y包含式Ya、式Yb、式Yc、式Ym或式Yn。

[0109] 在一些实施方案中,X包含移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原、患者针对其形成不期望的免疫应答的外来食物、动物、植物或环境抗原、患者针对其形成不期望的免疫应答的外来治疗剂、或合成自身抗原,针对所述合成自身抗原的内源形式,患者形成不期望的免疫应答,或其致耐受性部分,本发明中公开了各种抗原的具体实例。

[0110] 本发明中还提供了治疗针对抗原的不期望的免疫应答的方法,其通过对需要此类治疗的哺乳动物施用有效量的组合物进行,所述组合物包含式1(X-[-Y---Z]m)的化合物,其中m是约1至100的整数,X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原、或其致耐受性部分或X包含特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体,所述循环蛋白或肽

或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应,Y包含连接基部分,并且Z包含葡糖基化的肝靶向部分。

[0111] 在几个此类实施方案中,X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原或其致耐受性部分,并且Y包含特异性结合X的抗体、抗体片段、肽或其它配体、二硫烷基乙酯、由式Ya至Yp之一表示的结构或者Y具有以式Y'-CMP表示的部分,其中左括号"("指示X和Y之间的键,右括号或底部括号和")"指示Y和Z之间的键,n是约1至100的整数,q是约1至44的整数,R^8是$-CH_2-$或$-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$,Y'表示Y的剩余部分,并且W表示相同W^1基团的聚合物,或W是相同或不同W^1和W^2基团的共聚物或无规共聚物,其中:

[0112] $W^1=$  和 $W^2=$ 

[0113] 其中p是2至约150的整数,R^9是直接的键、$-CH_2-CH_2-NH-C(O)-$或$-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_t-NH-C(O)-$,t是1至5的整数,并且$R^{10}$是脂肪族基团、醇或脂肪族醇。在几个此类治疗方法实施方案中,X包含抗体、抗体片段或配体,并且施用组合物以清除特异性结合X的循环蛋白或肽或抗体,所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应。

[0114] 在另外的实施方案中,X包含抗体、抗体片段或配体,并且以有效量施用所述组合物,所述有效量将所述患者血液中由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应的抗体的浓度降低至少50%w/w,其在所述施用后约12至约48小时之间的时间测量。

[0115] 在几个此类治疗实施方案中,施用所述组合物以就抗原部分X而言使所述患者致耐受化。

[0116] 在一些实施方案中,X包含移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原、患者针对其形成不期望的免疫应答的外来食物、动物、植物或环境抗原、患者针对其形成不期望的免疫应答的外来治疗剂或合成自身抗原,针对所述合成自身抗原的内源形式,患者形成不期望的免疫应答,或其致耐受性部分。

[0117] 本发明中公开的一些实施方案提供了组合物,其包含式1的化合物:

[0118] $$X\left[Y-Z\right]_m$$

式1

[0119] 其中:

[0120] m是约1至100的整数;

[0121] X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,或其致耐受性部分;或

[0122] X包含特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体,所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应;

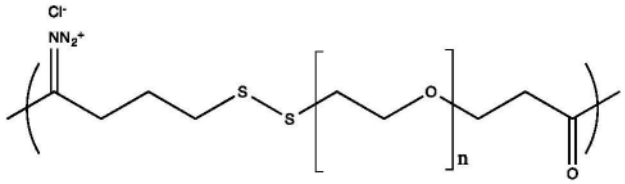
[0123] Y包含连接基部分;并且

[0124] Z包含肝靶向部分。

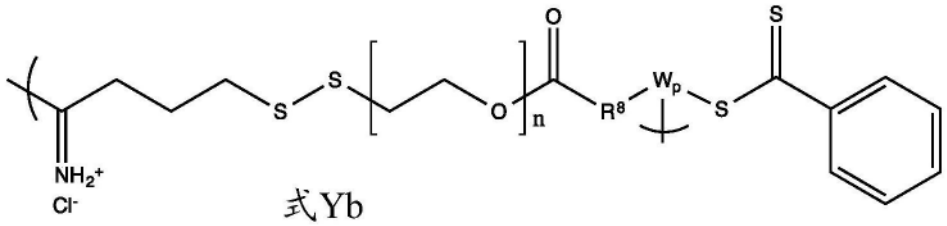
[0125] Z还可以包含半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺,例如,在其C1、C2或C6与Y缀合。N-乙酰基葡糖胺和葡萄糖与N-乙酰基半乳糖胺和半乳糖结合不同凝集素受体。在下述实施例中,实验数据(以及本申请的完全公开)指示选择Z为N-乙酰基葡糖胺导致与用N-乙酰基半乳糖胺实现的水平相比升高的调节T细胞应答水平。在一些实施方案中,出乎意料地,这导致增强的免疫耐受性的诱导和/或从受试者的血液中的抗原清除。

[0126] Y可以选自:N-羟基琥珀酸酰胺基连接基、马来酰亚胺连接基、乙烯基砜连接基、吡啶基二-硫醇-聚(乙二醇)连接基、吡啶基二-硫醇连接基、n-硝基苯基碳酸酯连接基、NHS-酯连接基和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯连接基。

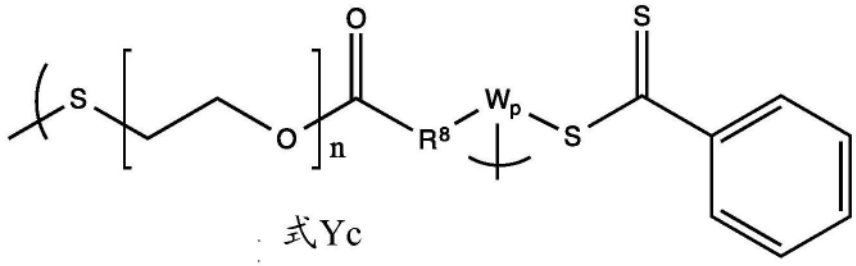
[0127] Y还可以包含:特异性结合X的抗体、抗体片段、肽或其它配体;二硫烷基乙酯;由式Ya至Yp之一表示的结构:

[0128] 

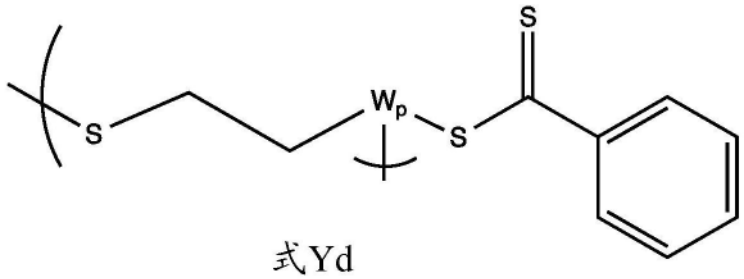
式Ya



式Yb

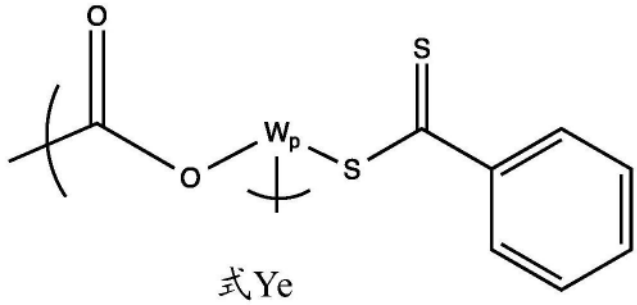


式Yc

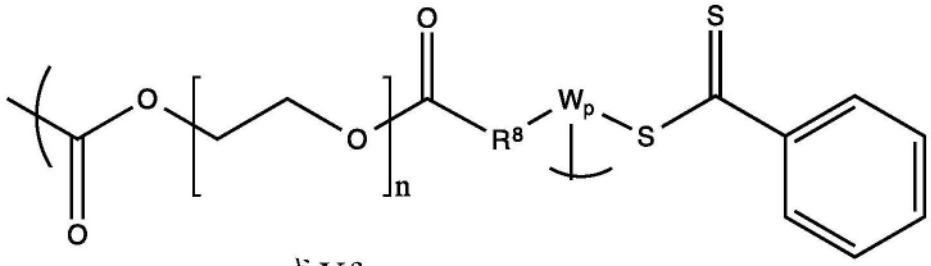


式Yd

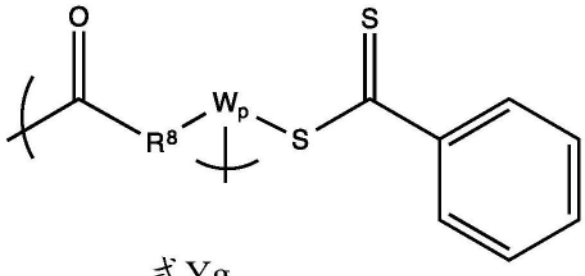
[0129]



式Ye

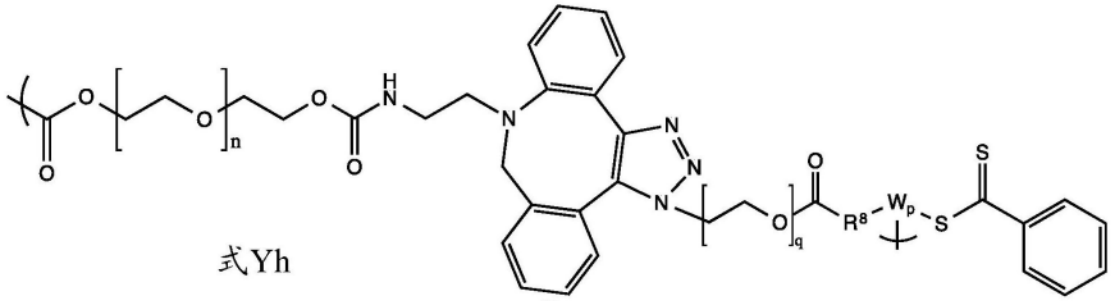


式Yf

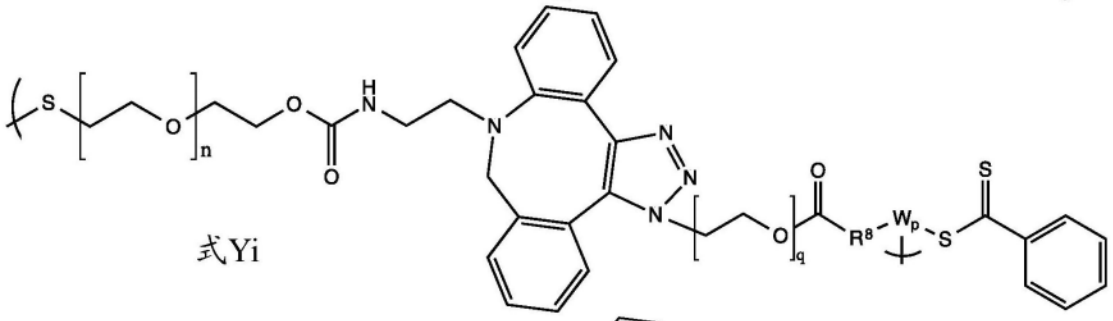


式Yg

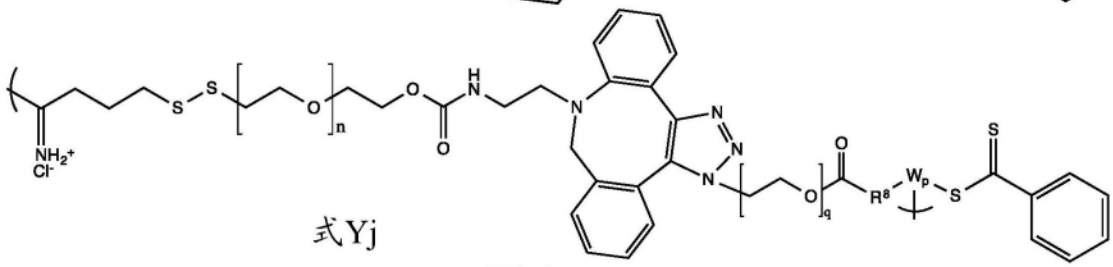
[0130]



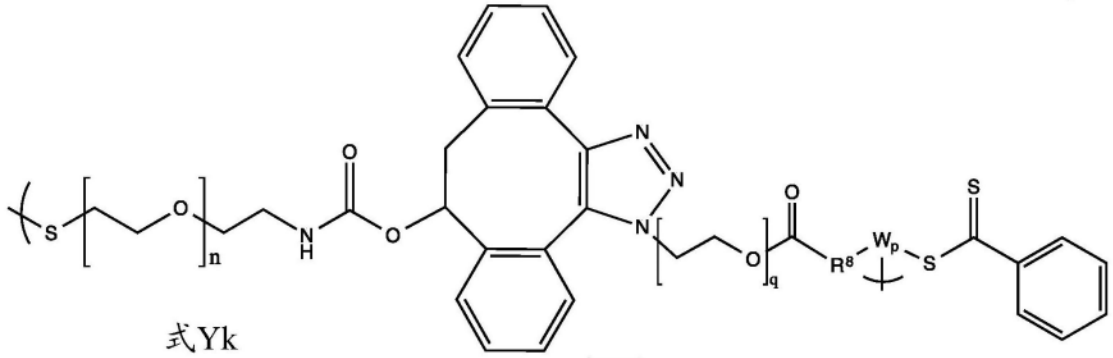
式Yh



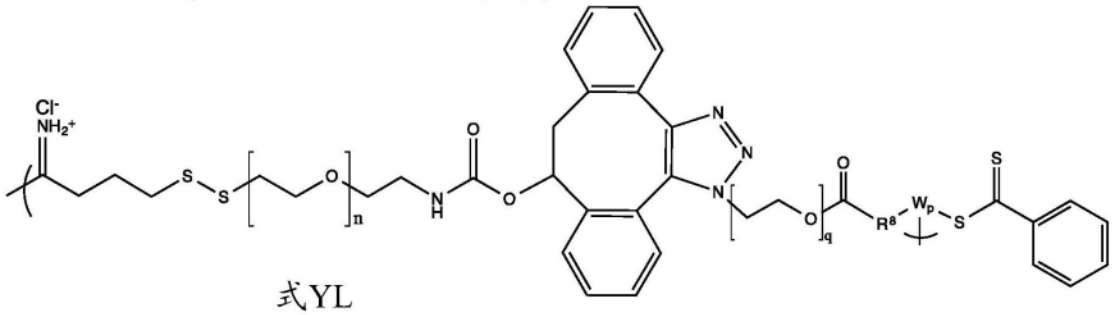
式Yi



式Yj

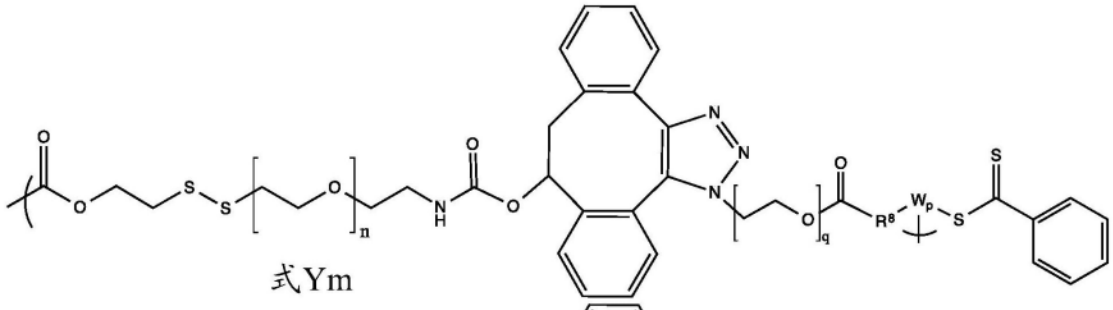


式Yk

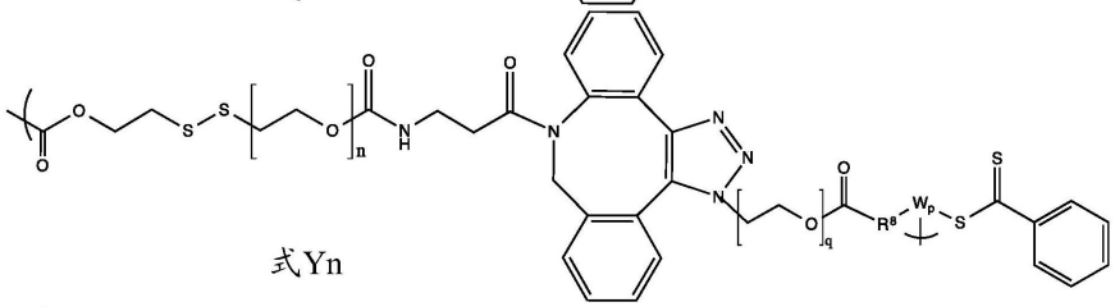


式YL

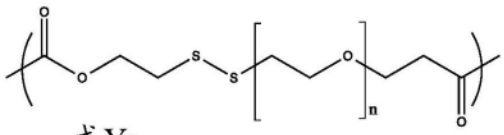
[0131]



式Ym

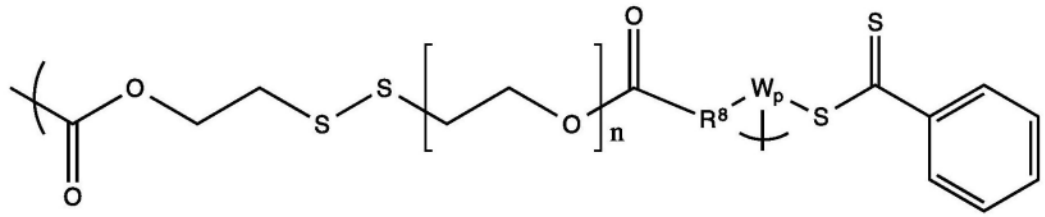


式Yn



式Yo

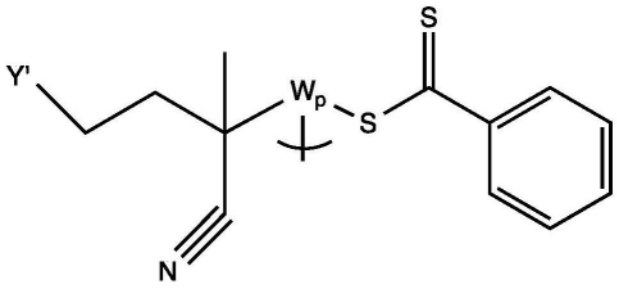
和



式Yp

[0132] 或Y具有以式Y'-CMP表示的部分：

[0133]



式 Y'-CMP

[0134] 其中：

[0135] 左括号“(“指示X和Y之间的键；

[0136] 右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键；

[0137] n是约1至100的整数；

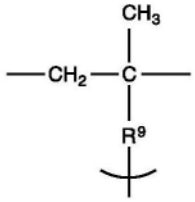
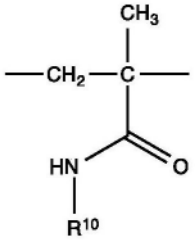
[0138] q是约1至44的整数；

[0139] R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-；

[0140] Y'表示Y的剩余部分(例如HS-PEG)；并且

[0141] W表示相同W^1基团的聚合物，或W是相同或不同W^1和W^2基团的共聚物(优选无规共聚

物),其中:

[0142] $W^1=$  和 $W^2=$ 

[0143] 其中:

[0144] p是2至约150的整数;

[0145] R^9是直接的键、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-(即乙基乙酰氨基基团或"EtAcN")或-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-(即PEG化的乙基乙酰氨基基团或"Et-PEG_t-AcN")。

[0146] t是1至5(特别地1至3,且更特别地1或2)的整数;并且

[0147] R^{10}是脂肪族基团、醇或脂肪族醇。在一些实施方案中,R^{10}是C_f烷基或C_f烷基OH_g,其中f独立地是0-10的整数,并且g独立地是0-10的整数。在一些实施方案中,R^{10}是2-羟基丙基。

[0148] 在一些实施方案中,特定的连接基是优选的。例如,在一些实施方案中,出乎意料地,根据Ym的连接基产生有效的耐受性端点。在另外的实施方案中,出乎意料地,根据Yn的连接基产生有效的耐受性端点。在另外的实施方案中,F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$的制剂实现特别有效的耐受性相关端点。在一些实施方案中,这些连接基的组合导致协同结果和免疫耐受性诱导的进一步出乎意料的增加。

[0149] 在上述的另一个方面,n是约40至80,p是约10至100,q是约3至20,R^8是-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-;并且当R^9是-CH_2-CH_2-NH-C(O)-时,Z是半乳糖或在其C1缀合的N-乙酰基半乳糖胺。

[0150] 在上述的又一个方面,Y包含式Ya、式Yb、式Yh、式Yi、式Yk、式Ym或式Yn,特别是式Ya、式Yb、式Ym或式Yn。

[0151] X还可以包含:移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原;患者针对其形成不期望的免疫应答的外来食物、动物、植物或环境抗原;患者针对其形成不期望的免疫应答的外来治疗剂;或合成自身抗原,针对所述合成自身抗原的内源形式,患者形成不期望的免疫应答,或其致耐受性部分。

[0152] 本发明还涉及治疗针对抗原的不期望的免疫应答的方法,其通过对需要此类治疗的哺乳动物施用有效量的组合物进行,所述组合物包含如本发明中公开的式1的化合物。在一些此类方法中,可以施用组合物以清除特异性结合抗原部分X的循环蛋白或肽或抗体,所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应。可以有效量施用所述组合物,所述有效量将所述患者血液中由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应的抗体的浓度降低至少50%w/w,其在所述施用后约12至约48小时之间的时间测量。可以施用所述组合物以就抗原部分X而言使所述患者致耐受化。

[0153] 此外,本发明还涉及以下实施方式。

[0154] 1.包含式1的化合物:

[0155] $X\left[Y-Z\right]_m$

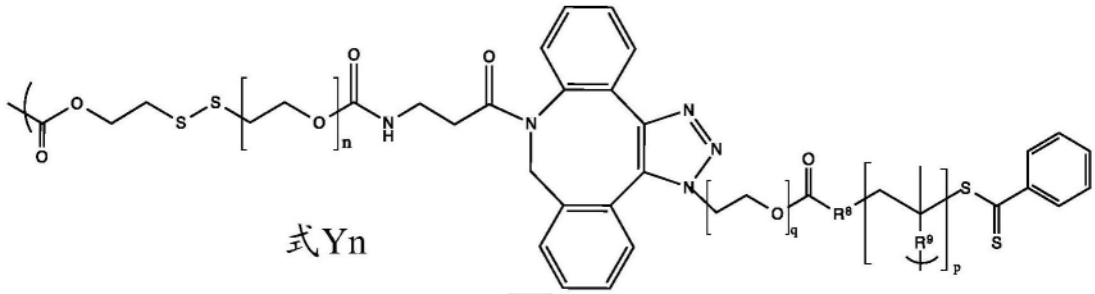
式1

[0156] 其中：

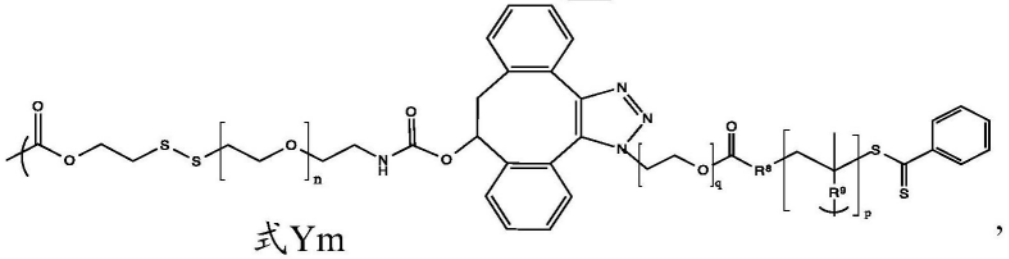
[0157] m是约1至10的整数；

[0158] X包含含有抗原性区域的蛋白质或蛋白质片段；

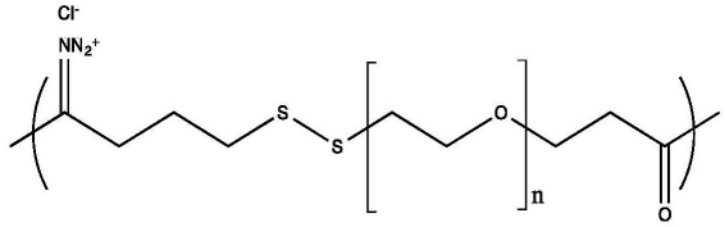
[0159] Y是具有选自下组的式的连接基部分：

[0160] 

式Yn

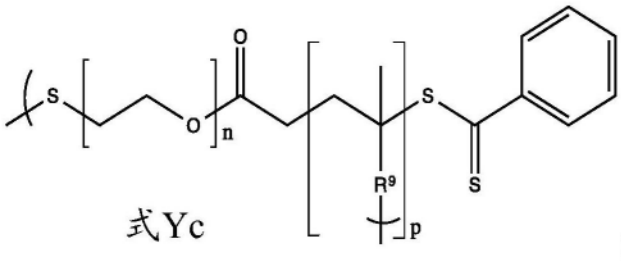


式Ym，



式Ya

[0161] ，和



式Yc；

[0162] 其中：

[0163] 左括号“(”指示与X的键；

[0164] 右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键；

[0165] n是约1至100的整数；

[0166] 其中存在的p是约2至150的整数；

[0167] 其中存在的q是约1至44的整数；

[0168] 其中存在的R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-；并且

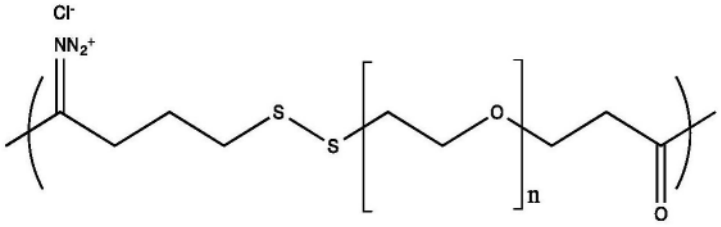
[0169] 其中存在的R^9是直接的键或-CH_2-CH_2-NH-C(O)-；并且Z包含肝靶向部分。

[0170] 2.实施方式1的化合物,其中Z是半乳糖或葡萄糖。

[0171] 3.实施方式1的化合物,其中Z是半乳糖胺或葡糖胺。

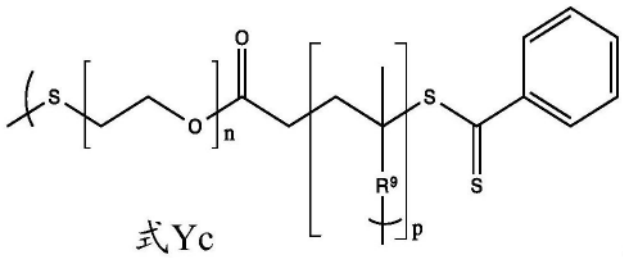
[0172] 4.实施方式1的化合物,其中Z是N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0173] 5.实施方式1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:

[0174] 

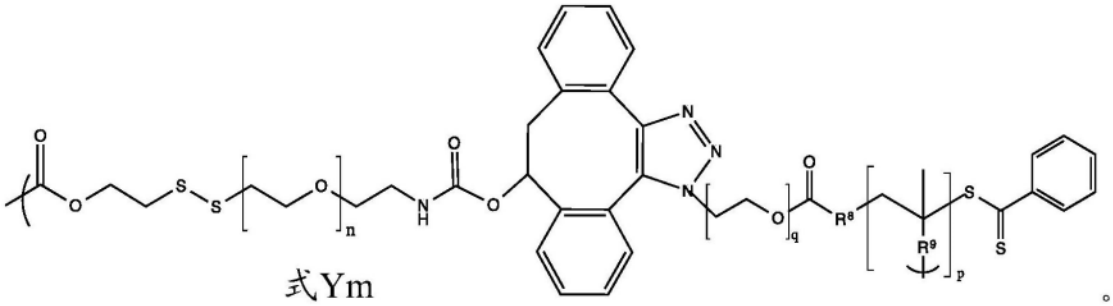
式Ya。

[0175] 6.实施方式1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:

[0176] 

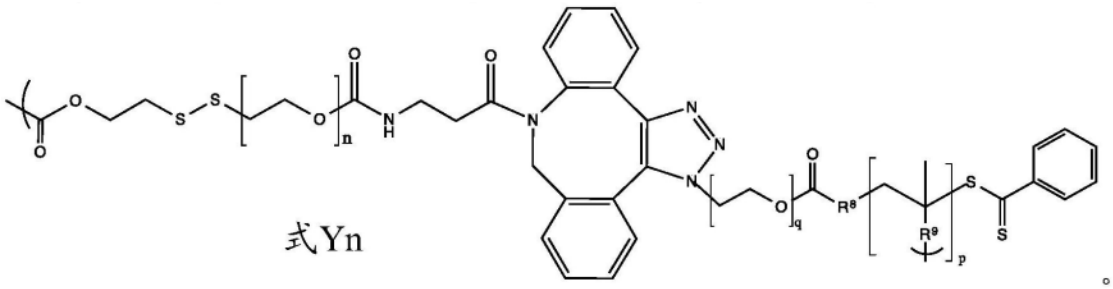
式Yc。

[0177] 7.实施方式1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:

[0178] 

式Ym。

[0179] 8.实施方式1的化合物,其中Y是具有下式的连接基部分:

[0180] 

式Yn。

[0181] 9.实施方式1的化合物,其中X是选自下组的食物抗原:伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、蓝豆蛋白(Ara h 6)、a-乳清蛋白(ALA)、乳运铁蛋白、Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快同种型、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白及其片段。

[0182] 10.实施方式9的化合物,其中X选自下组:谷蛋白、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦

谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、Ω-麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和燕麦蛋白及其片段。

[0183] 11.实施方式10的化合物,其中X选自下组:谷蛋白、高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-麦醇溶蛋白、γ-麦醇溶蛋白、和Ω-麦醇溶蛋白及其片段。

[0184] 12.实施方式11的化合物,其中X是谷蛋白或其片段。

[0185] 13.实施方式11的化合物,其中X是麦醇溶蛋白或其片段。

[0186] 14.实施方式1的化合物,其中X是选自下组的治疗剂:因子VII、因子IX、天冬酰胺酶、和尿酸酶及其片段。

[0187] 15.实施方式14的化合物,其中X是选自下组的治疗剂:因子VII和因子IX及其片段。

[0188] 16.实施方式15的化合物,其中X是选自下组的治疗剂:因子VIII或其片段。

[0189] 17.实施方式14的化合物,其中X包含天冬酰胺酶或其片段。

[0190] 18.实施方式14的化合物,其中X包含尿酸酶或其片段。

[0191] 19.实施方式1的化合物,其中X与自身免疫性疾病有关。

[0192] 20.实施方式19的化合物,其中所述自身免疫性疾病选自下组:I型糖尿病、多发性硬化、类风湿性关节炎、白癜风、葡萄膜炎、寻常型天疱疮和视神经脊髓炎。

[0193] 21.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是I型糖尿病,并且X包含胰岛素或其片段。

[0194] 22.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是I型糖尿病,并且X包含胰岛素原或其片段。

[0195] 23.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是I型糖尿病,并且X包含前胰岛素原或其片段。

[0196] 24.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化,并且X包含髓磷脂碱蛋白或其片段。

[0197] 25.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化,并且X包含髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白或其片段。

[0198] 26.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是多发性硬化,并且X包含髓磷脂蛋白脂质蛋白或其片段。

[0199] 27.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是类风湿性关节炎,并且X选自下组:血纤蛋白原、波形蛋白、II型胶原、α烯醇化酶及其片段。

[0200] 28.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是白癜风,并且X选自下组:Pmel17、酪氨酸酶及其片段。

[0201] 29.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是葡萄膜炎,并且X选自下组:视黄醛抑制蛋白和感光器间受体类视色素结合蛋白(IRBP)及其片段。

[0202] 30.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是寻常型天疱疮,并且X选自下组:桥粒芯蛋白3、1和4、天疱膜联蛋白、桥粒糖蛋白、斑珠蛋白、斑周蛋白、桥粒斑蛋白、乙酰胆碱受体及其片段。

[0203] 31.实施方式20的化合物,其中所述自身免疫性疾病是视神经脊髓炎,并且X是水通道蛋白-4或其片段。

[0204] 32.根据实施方式1至31中任一项的化合物用于诱导对X的耐受性的用途。

[0205] 33.组合物,其包含实施方式1至8中任一项的化合物。

[0206] 34.根据实施方式33的组合物,其用于诱导对X的耐受性。

[0207] 35.诱导对受试者能够针对其形成不期望的免疫应答的抗原的耐受性的方法,其包括施用根据实施方式1至31中任一项的化合物。

[0208] 36.实施方式35的方法,其中在将受试者暴露于所述抗原前施用所述化合物。

[0209] 37.实施方式35的方法,其中在将受试者暴露于所述抗原后施用所述化合物。

[0210] 38.实施方式35的方法,其中所述施用包括所述化合物的至少一次静脉内施用。

[0211] 39.根据实施方式1至31中任一项的化合物在制备药物中的用途,所述药物用于诱导对抗原或其致耐受性部分的耐受性,受试者针对该抗原形成不期望的免疫应答。

[0212] 40.实施方式1至8中任一项的组合物,其中X包含移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原或其致耐受性部分。

[0213] 41.实施方式1至8中任一项的组合物,其中X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的外来食物、动物、植物或环境抗原或其致耐受性部分。

[0214] 42.实施方式1至8中任一项的组合物,其中X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的外来治疗剂或其致耐受性部分。

[0215] 43.实施方式1至8中任一项的组合物,其中X包含合成自身抗原或其致耐受性部分,针对所述合成自身抗原的内源形式,患者形成不期望的免疫应答。

[0216] 44.包含式1的化合物:

[0217] $$X\text{-}Y\text{-}Z]_m$$

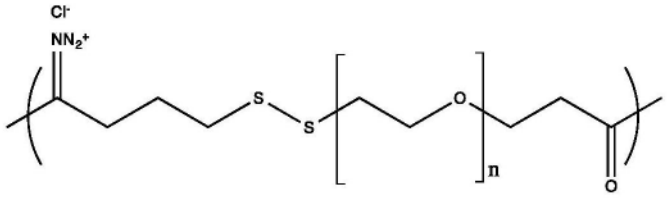
式1

[0218] 其中:

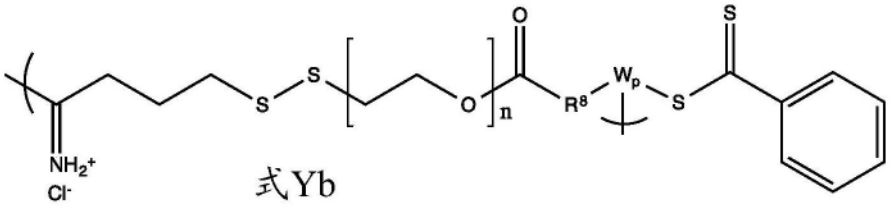
[0219] m是约1至10的整数;

[0220] X包含蛋白质或蛋白质片段,其包含选自下组的治疗性蛋白质的抗原性区域:因子VIII、因子IX、胰岛素、尿酸酶、PAL和天冬酰胺酶;

[0221] Y是具有选自下组的式的连接基部分的:

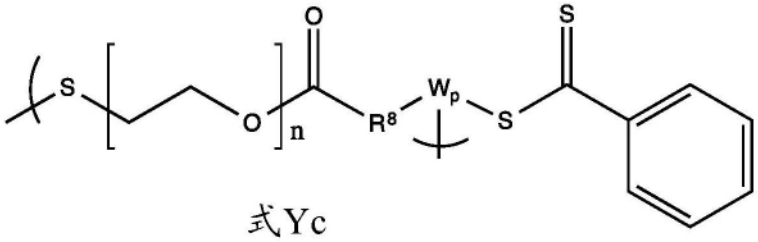


式Ya

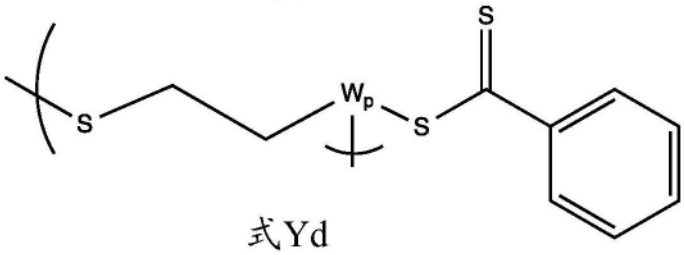


式Yb

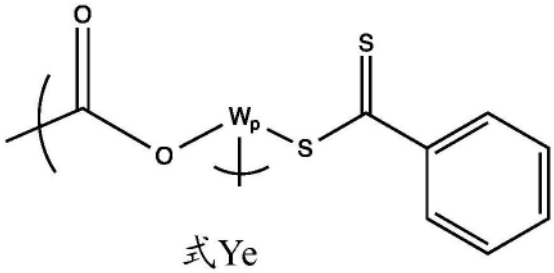
[0222]



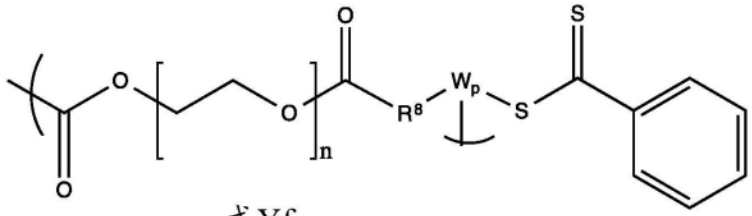
式Yc



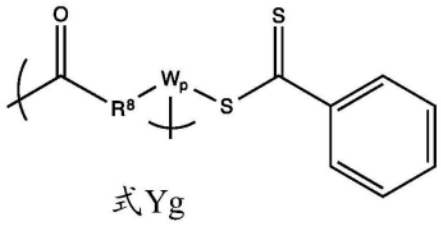
式Yd



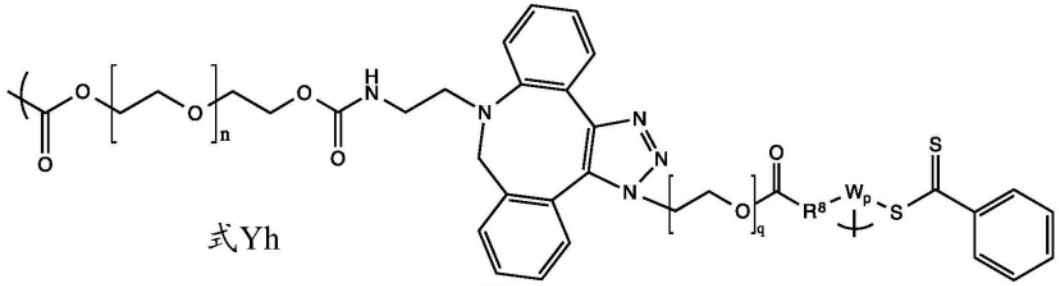
式Ye



式Yf

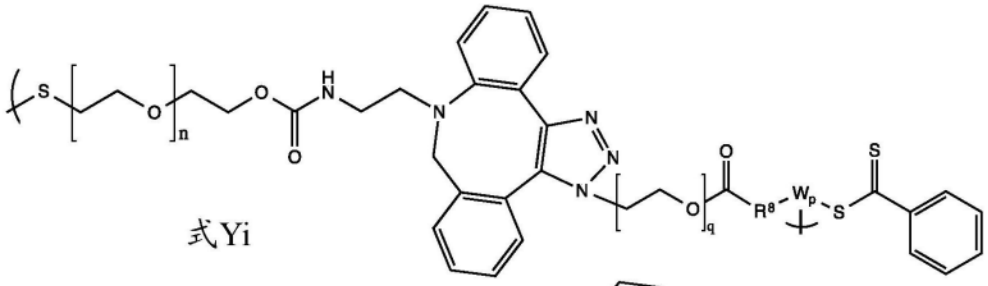


式Yg

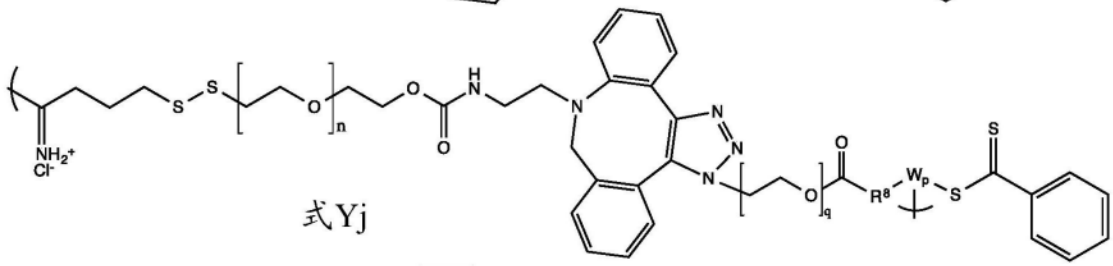


式Yh

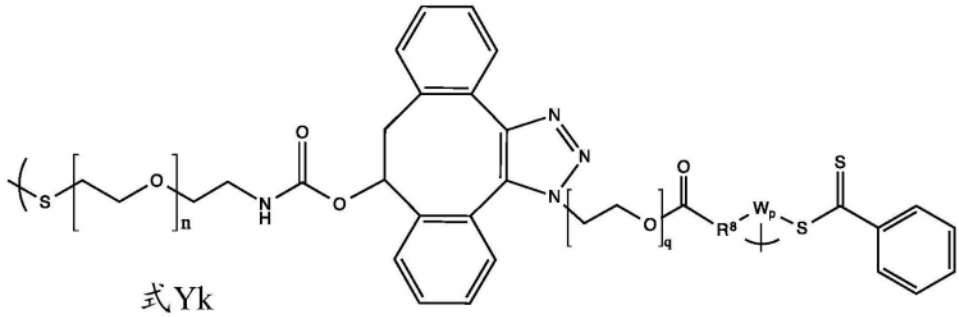
[0223]



式Yi

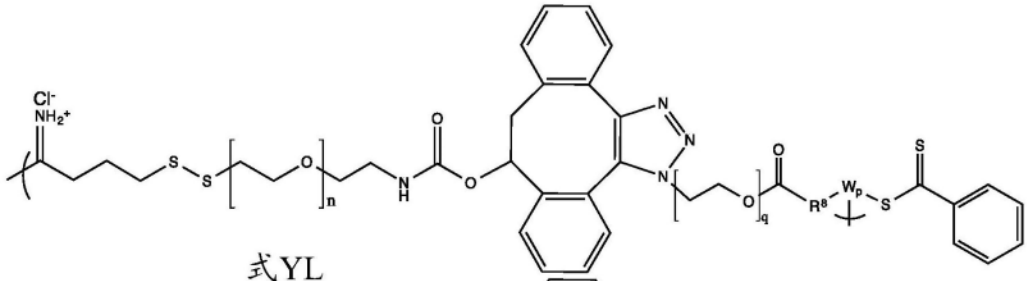


式Yj

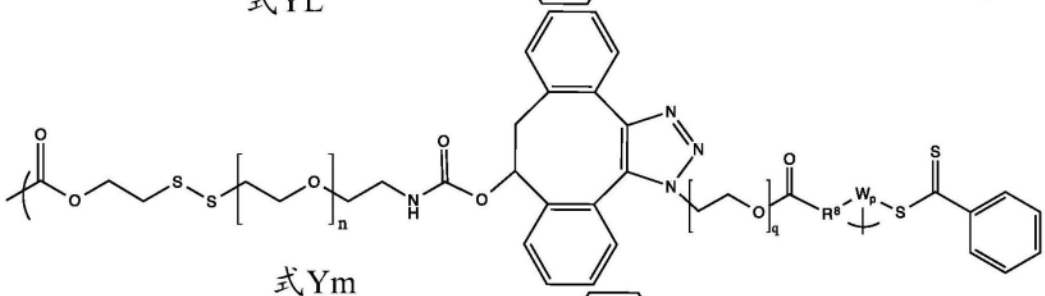


式Yk

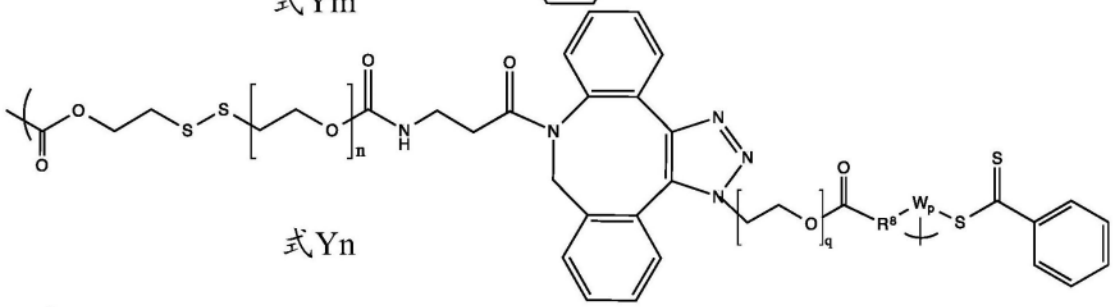
[0224]



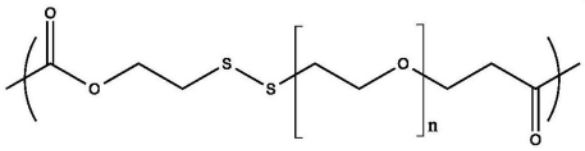
式YL



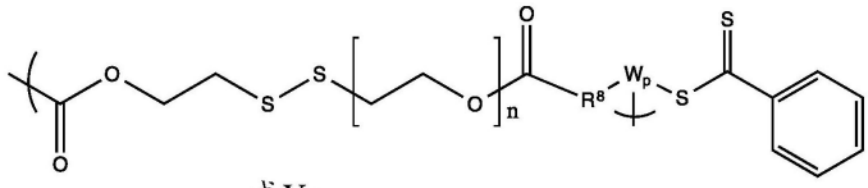
式Ym



式Yn



式Yo 和



式Yp

[0225] 其中：

[0226] 左括号“(“指示与X的键；

[0227] 其中存在的右括号“)”指示与Z的键；

[0228] 其中存在的底部括号“)”指示与Z的键；

[0229] 其中存在的n是约1至约80的整数；

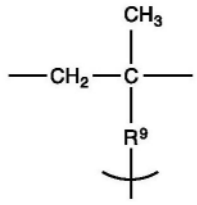
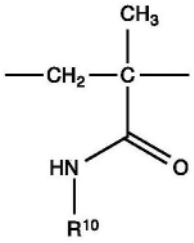
[0230] 其中存在的q是约1至约4的整数；

[0231] 其中存在的p是约1至约90的整数；

[0232] 其中存在的R8是-CH2-或-CH2-CH2-C(CH3)(CN)-；并且

[0233] 其中存在的W表示式W1或W2基团的聚合物或

[0234] W是式W1或W2的共聚物，其中：

[0235] W^1 =  a 和 = 

[0236] 其中：

[0237] R9是直接的键、-CH2-CH2-NH-C(O)-或-CH2-CH2-(O-CH2-CH2)t-NH-C(O)-；

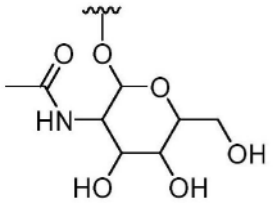
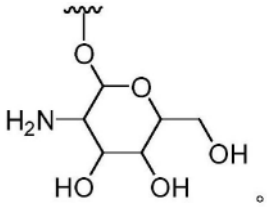
[0238] t是1至5的整数；

[0239] R10是脂肪族基团、醇或脂肪族醇；并且

[0240] Z包含一个或多个肝靶向部分。

[0241] 45.实施方式44的化合物，其中所述一个或多个肝靶向部分包含下列一种或多种：半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0242] 46.实施方式44或45的化合物，其中所述一个或多个肝靶向部分包含一个或多个具有选自下组的式的部分：

[0243]  和  。

[0244] 47.实施方式44至46中任一项的化合物，其中Y选自下组：式Ya、式Yb、式Yc、式Ym或式Yn。

[0245] 48.实施方式44至47中任一项的化合物，其中Y选自下组：式Ya、式Yc、和式Ym。

[0246] 49.实施方式44至48中任一项的化合物，其中X包含特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体，所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应。

[0247] 50.实施方式44至49中任一项的组合物，其中Z在其C1、C2或C6处与Y缀合。

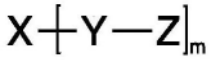
[0248] 51.实施方式44至50中任一项的组合物，其中Y选自N-羟基琥珀酸酰胺基连接基、马来酰亚胺连接基、乙烯基砜连接基、吡啶基二-硫醇-聚(乙二醇)连接基、吡啶基二-硫醇连接基、n-硝基苯基碳酸酯连接基、NHS-酯连接基、和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯连接基。

[0249] 52.药学可接受组合物，其用于在具有功能性类似天然蛋白质的生成缺陷的受试者中诱导对治疗性蛋白质的耐受性，所述药学可接受组合物包含实施方式44至51中任一项的化合物。

[0250] 53.实施方式23至31中任一项的化合物或组合物用于治疗针对抗原的不期望的免疫应答的用途。

[0251] 54.实施方式44至52中任一项的化合物或组合物，用于制备用于治疗针对抗原的不期望的免疫应答的药物。

[0252] 55.式1的化合物：

[0253] 

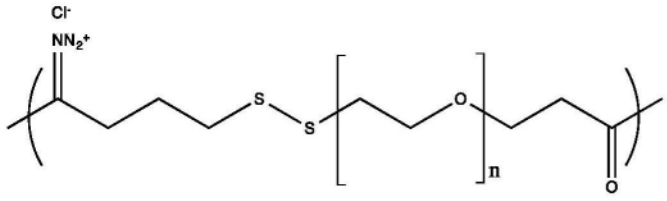
式1

[0254] 其中：

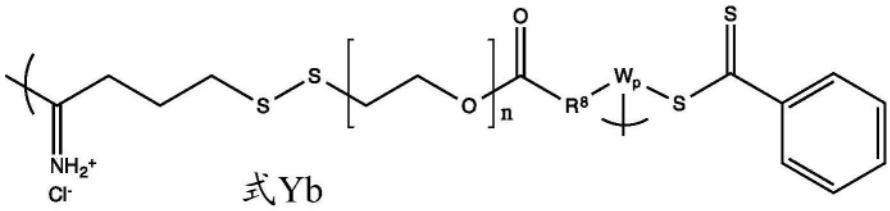
[0255] m是约1至10的整数；

[0256] X包含含有抗原性区域的蛋白质或蛋白质片段；

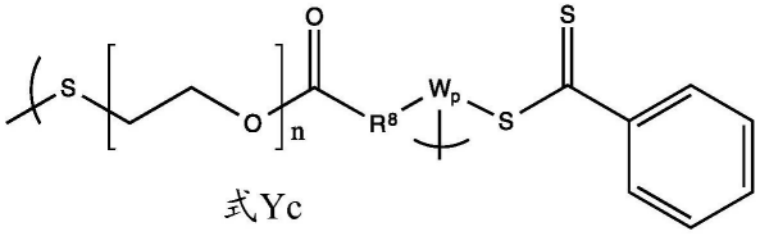
[0257] Y是具有选自下组的式的连接基部分的：



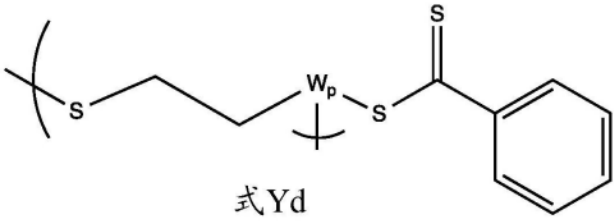
式Ya

[0258] 

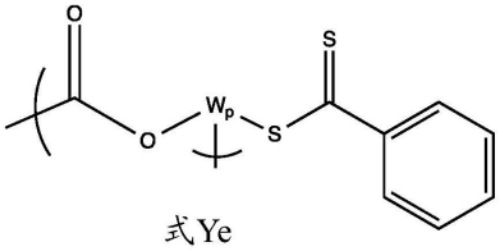
式Yb



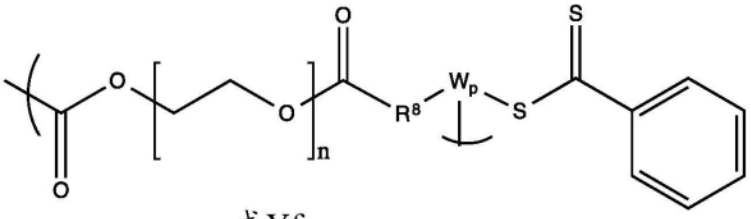
式Yc



式Yd

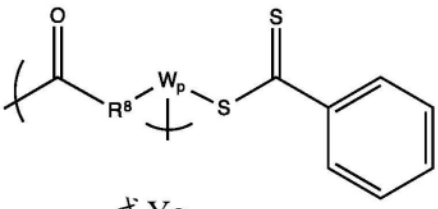


式Ye

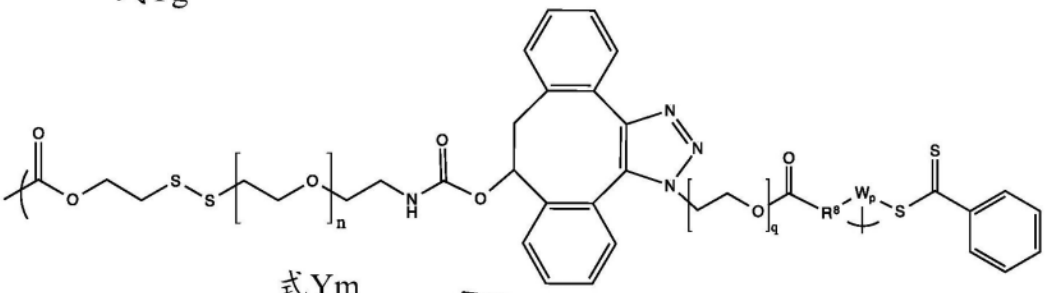


式Yf

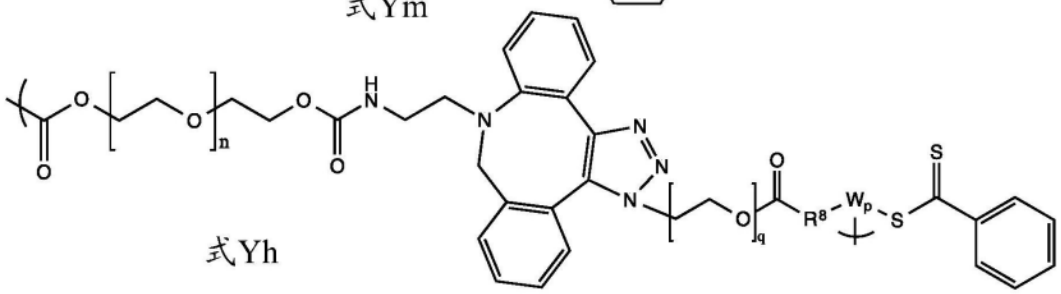
[0259]



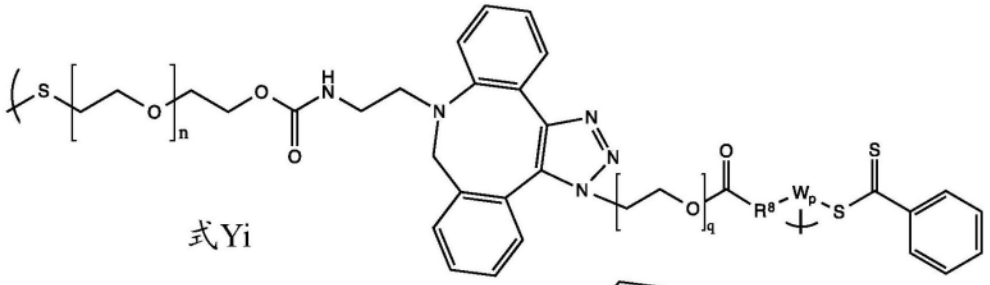
式Yg



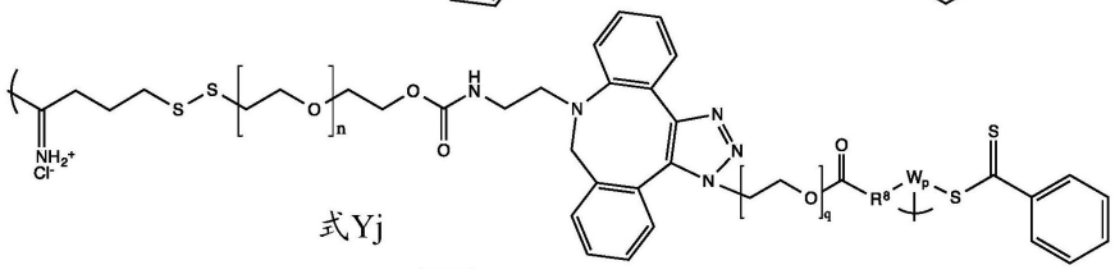
式Ym



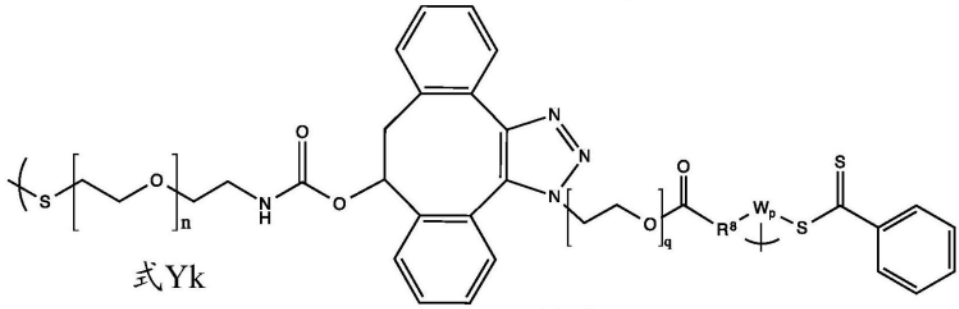
式Yh



式Yi

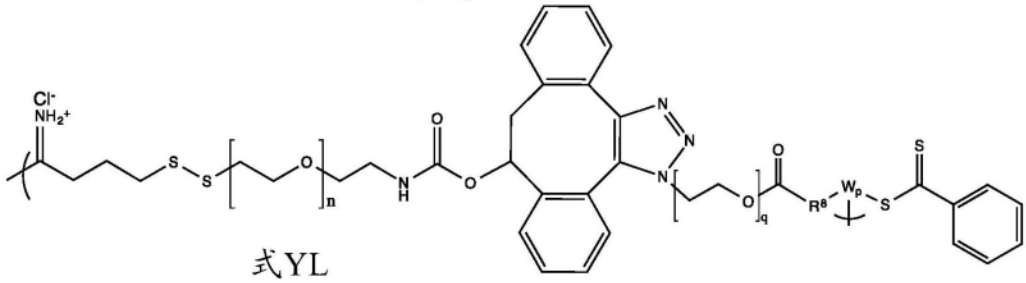


式Yj

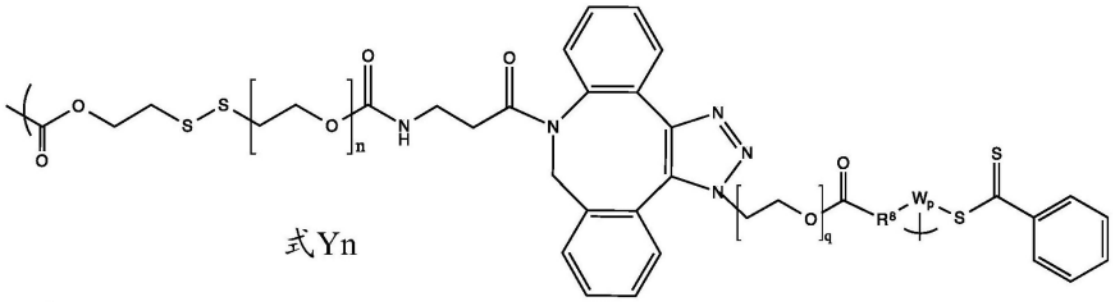


式Yk

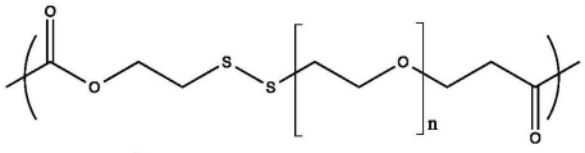
[0260]



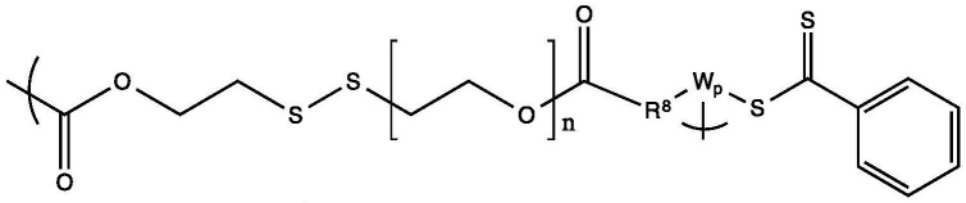
式YL



式Yn



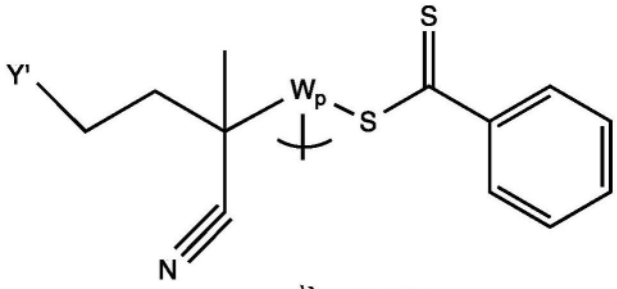
式Yo 和

[0261] 

式Yp

，

[0262] 或Y具有以式Y'-CMP表示的部分：

[0263] 

式 Y'-CMP

[0264] 其中：

[0265] 左括号“(”指示X和Y之间的键；

[0266] 右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键；

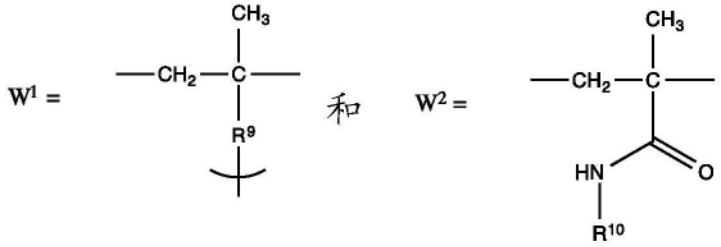
[0267] n是约1至100的整数；

[0268] q是约1至44的整数；

[0269] R8是-CH2-或-CH2-CH2-C(CH3)(CN)-；

[0270] Y'表示Y的剩余部分；并且

[0271] W表示相同W1基团的聚合物，或者W是相同或不同W1和W2基团的共聚物或无规共聚物，其中：

[0272] 

[0273] 其中：

[0274] p是2至约150的整数；

[0275] R9是直接的键、-CH2-CH2-NH-C(O)-或-CH2-CH2-(O-CH2-CH2)t-NH-C(O)-；

[0276] t是1至5的整数；并且

[0277] R10是脂肪族基团、醇或脂肪族醇。

[0278] 56.实施方式54的化合物，其中：

[0279] n是约40至80；

[0280] p是约10至100；

[0281] q是约3至20；

[0282] R8是-CH2-CH2-C(CH3)(CN)-；

[0283] 当R9是-CH2-CH2-NH-C(O)-时,Z是下列一种:半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺;并且

[0284] 当W是共聚物时,R10是2-羟基丙基。

[0285] 57.实施方式55或56的化合物,其中Y包含式Ya、式Yb、式Yc、式Yf、式Yg、式Yh、式Yi、式Yk、式Ym或式Yn。

[0286] 58.实施方式55至57中任一项的组合物,其中Y包含式Ya、式Yb、式Yc、式Ym或式Yn。

[0287] 59.实施方式55至58中任一项的组合物,其中Y包含式Ya、式Yb、式Yc、式Ym或式Yn。

[0288] 60.实施方式55至59中任一项的组合物,其中X包含:

[0289] 移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原;

[0290] 患者针对其形成不期望的免疫应答的外来食物、动物、植物或环境抗原;

[0291] 患者针对其形成不期望的免疫应答的外来治疗剂;或

[0292] 合成自身抗原,针对所述合成自身抗原的内源形式,患者形成不期望的免疫应答,

[0293] 或其致耐受性部分。

[0294] 61.组合物,其包含实施方式55至60中任一项的化合物。

[0295] 62.实施方式55至61中任一项的组合物用于治疗不期望的免疫应答的用途。

[0296] 63.式1的化合物用于治疗针对抗原的不期望的免疫应答的用途:

[0297] $$X\left[Y-Z\right]_m$$

式1

[0298] 其中:

[0299] m是约1至100的整数;

[0300] X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,或其致耐受性部分;或

[0301] X包含特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体、所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应;

[0302] Y包含连接基部分;并且

[0303] Z包含葡糖基化肝靶向部分;

[0304] 所述治疗通过对需要此类治疗的哺乳动物施用有效量的构成的药物组合物。

[0305] 64.实施方式63的用途,其中:

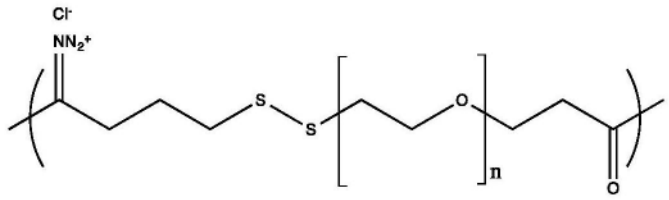
[0306] X包含患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原,或其致耐受性部分;并且

[0307] Y包含:

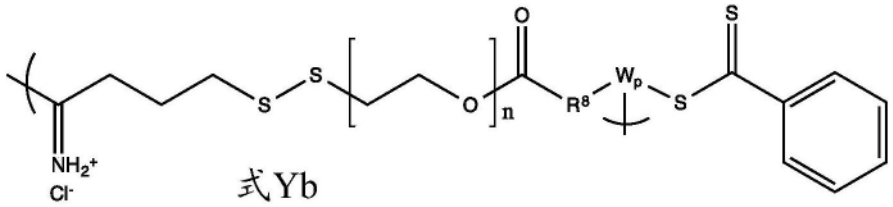
[0308] 特异性结合X的抗体、抗体片段、肽或其它配体;

[0309] 二硫烷基乙酯;

[0310] 由式Ya至Yp之一表示的结构:

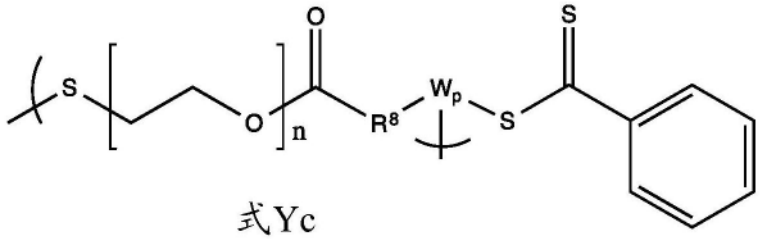


式Ya

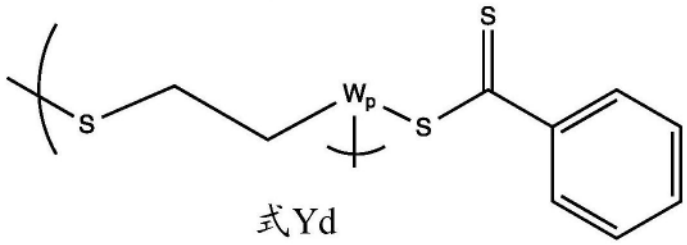


式Yb

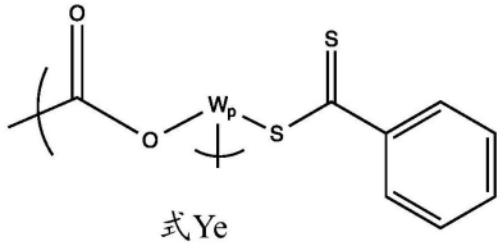
[0311]



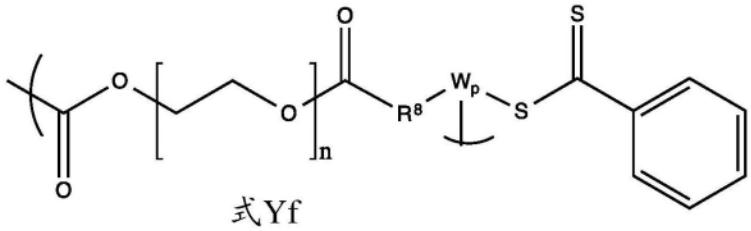
式Yc



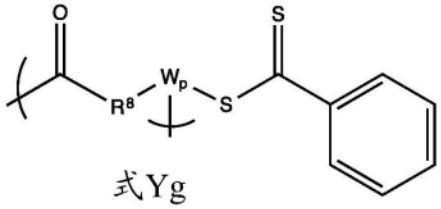
式Yd



式Ye

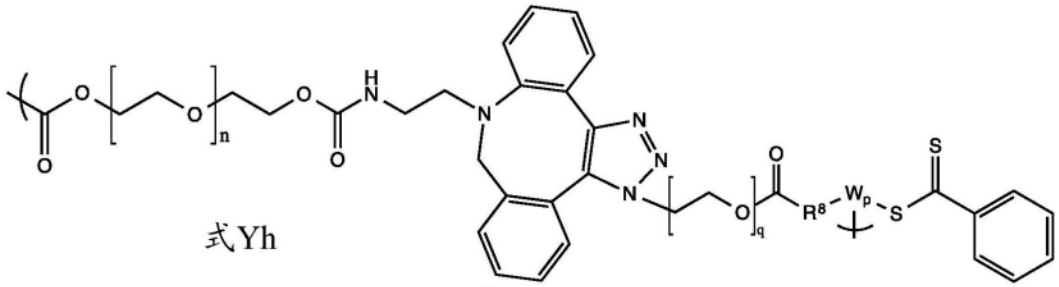


式Yf

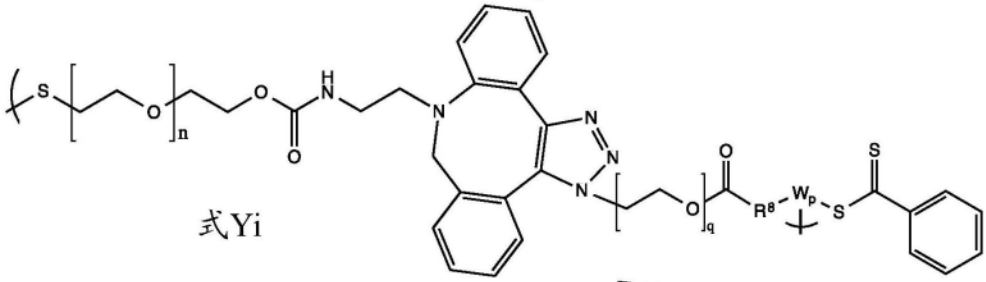


式Yg

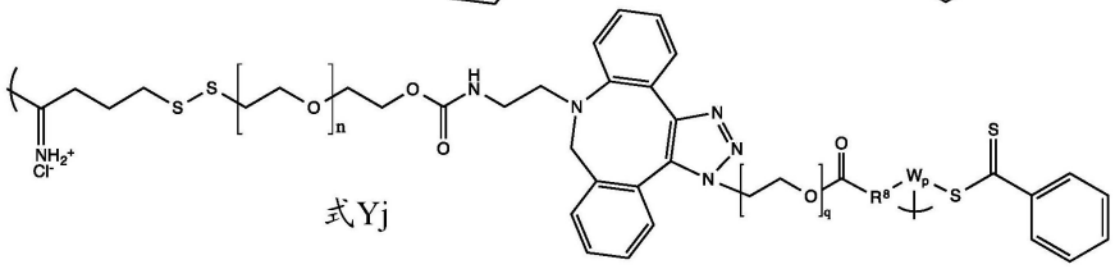
[0312]



式Yh

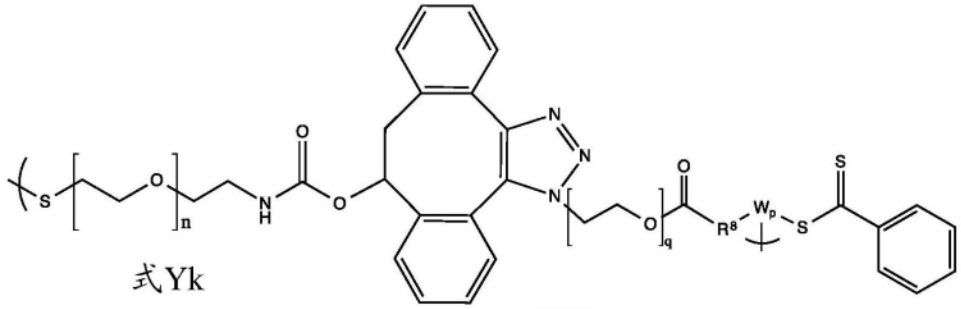


式Yi

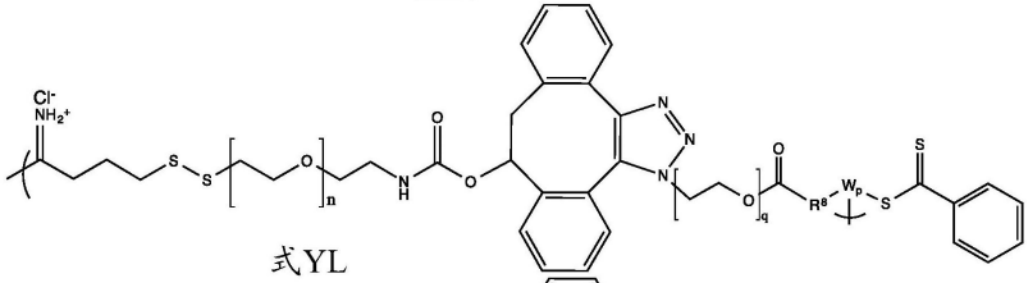


式Yj

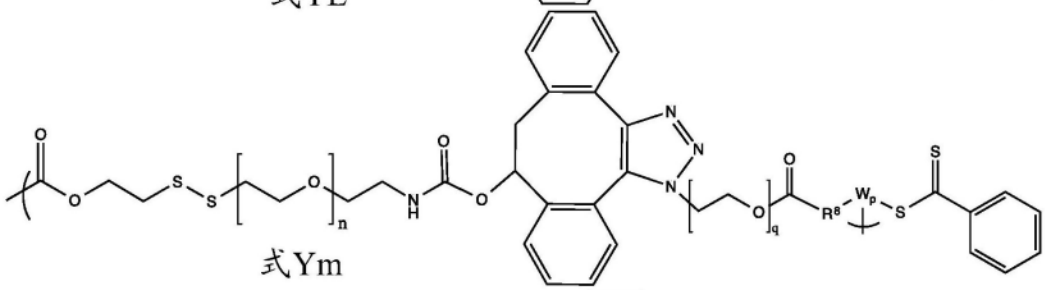
[0313]



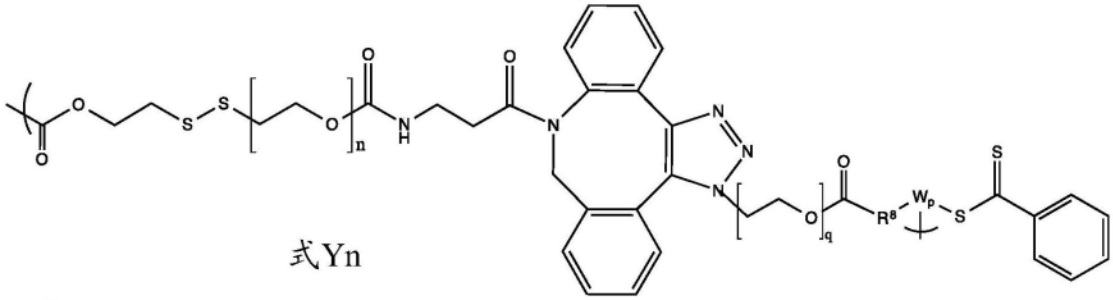
式Yk



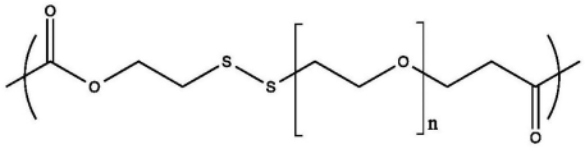
式YL



式Ym

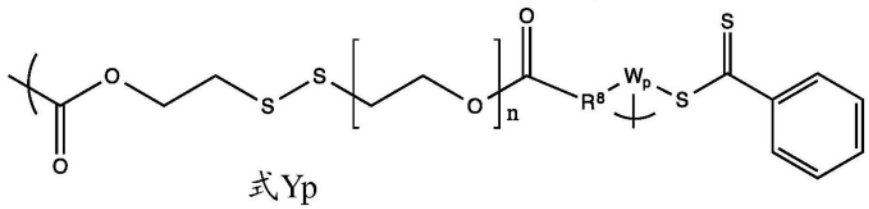


式Yn



式Yo

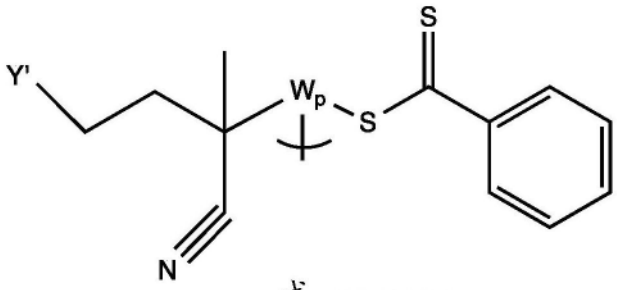
和



式Yp

，

[0314] 或者Y具有以式Y'-CMP表示的部分：

[0315] 

式 Y'-CMP

[0316] 其中：

[0317] 左括号“(“指示X和Y之间的键；

[0318] 右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键；

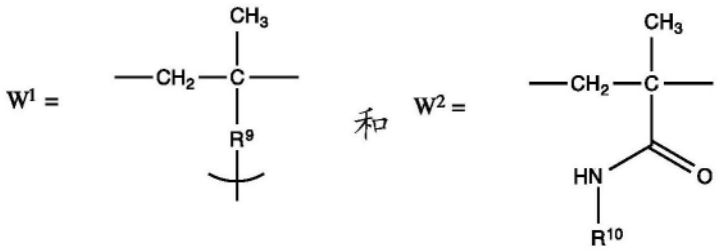
[0319] n是约1至100的整数；

[0320] q是约1至44的整数；

[0321] R8是-CH2-或-CH2-CH2-C(CH3)(CN)-；

[0322] Y’表示Y的剩余部分；并且

[0323] W表示相同W1基团的聚合物，或者W是相同或不同W1和W2基团的共聚物或无规共聚物，其中：

[0324] 

[0325] 其中：

[0326] p是2至约150的整数；

[0327] R9是直接的键、-CH2-CH2-NH-C(O)-或-CH2-CH2-(O-CH2-CH2)t-NH-C(O)-；

[0328] t是1至5的整数；并且

[0329] R10是脂肪族基团、醇或脂肪族醇。

[0330] 65.实施方式63或64的用途，其中X包含所述抗体、抗体片段或配体，并且施用所述组合物以清除特异性结合X的循环蛋白或肽或抗体，所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应。

[0331] 66.实施方式63至65中任一项的用途，其中X包含抗体、抗体片段或配体，并且以有效量施用所述组合物，所述有效量将所述患者血液中由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应的抗体的浓度降低至少50％w/w，其在所述施用后约12至约48小时之间的时间测量。

[0332] 67.实施方式63至66中任一项的用途，其中施用所述组合物以使所述患者对抗原部分X致耐受化。

[0333] 68.实施方式63至67中任一项的用途，其中X包含：

[0334] 移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原；

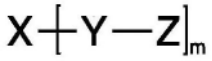
[0335] 患者针对其形成不期望的免疫应答的外来食物、动物、植物或环境抗原；

[0336] 患者针对其形成不期望的免疫应答的外来治疗剂;或

[0337] 合成自身抗原,针对所述合成自身抗原的内源形式,患者形成不期望的免疫应答,

[0338] 或其致耐受性部分。

[0339] 69.包含式1的化合物:

[0340] 

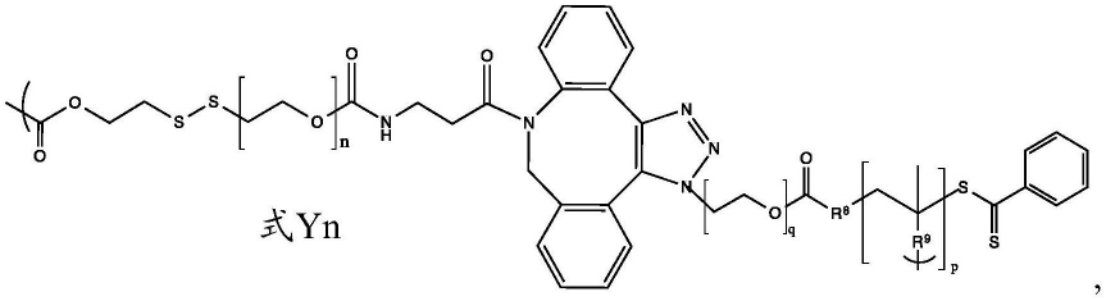
式1

[0341] 其中:

[0342] m是约1至10的整数;

[0343] X包含食物抗原、治疗剂、自身抗原、任何此类抗原的片段、或任何此类抗原的模拟表位;

[0344] Y是具有下式的连接基部分:

[0345] 

式Yn

[0346] 其中:

[0347] 左括号“(“指示与X的键;

[0348] 右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键;

[0349] n是约70至85的整数;

[0350] 其中存在的p是约85至95的整数;

[0351] 其中存在的q是约1至10的整数;

[0352] 其中存在的R8是-CH2-或-CH2-CH2-C(CH3)(CN)-;并且

[0353] 其中存在的R9是直接的键或-CH2-CH2-NH-C(O)-;并且

[0354] Z包含肝靶向部分,其包含葡萄糖或半乳糖。

[0355] 70.实施方式69的化合物,其中:

[0356] m是1-3,

[0357] n是79,

[0358] p是90,并且

[0359] q是4。

[0360] 71.实施方式70的化合物,其中X选自下组:胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷蛋白、麦醇溶蛋白、髓磷脂碱蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白和蛋白脂质蛋白、因子VIII、因子IX、天冬酰胺酶、尿酸酶及任何前述的片段。

[0361] 72.包含式1的化合物:

[0362] $X\left[Y-Z\right]_m$

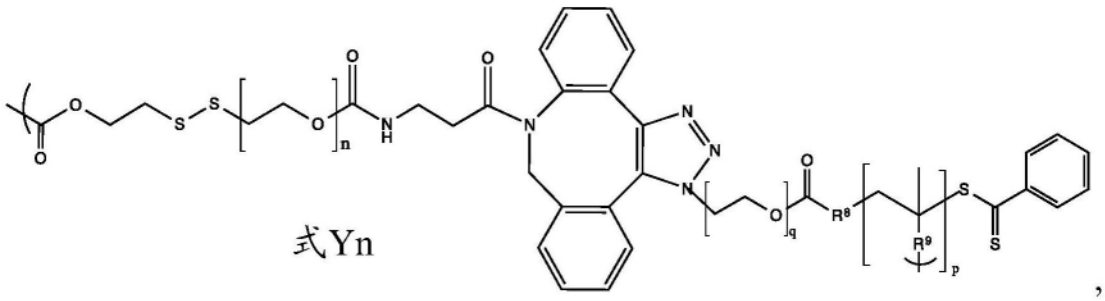
式1

[0363] 其中：

[0364] m是约1至10的整数；

[0365] X选自下组：胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷蛋白、麦醇溶蛋白、髓磷脂碱蛋白、髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白和蛋白脂质蛋白、因子VIII、因子IX、天冬酰胺酶、尿酸酶及任何前述的片段；

[0366] Y是具有下式的连接基部分：

[0367] 

式Yn

[0368] 其中：

[0369] 左括号“(“指示与X的键；

[0370] 右括号或底部括号和“)”指示Y和Z之间的键；

[0371] n是约70至85的整数；

[0372] 其中存在的p是约85至95的整数；

[0373] 其中存在的q是约1至10的整数；

[0374] 其中存在的R8是-CH2-或-CH2-CH2-C(CH3)(CN)-；并且

[0375] 其中存在的R9是直接的键或-CH2-CH2-NH-C(O)-；并且

[0376] Z包含肝靶向部分，其包含糖部分。

[0377] 73.实施方式69的化合物，其中：

[0378] m是1-3，

[0379] n是79，

[0380] p是90，并且

[0381] q是4。

[0382] 74.实施方式73的化合物，其中Z选自下组：葡萄糖、葡糖胺、半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺和N-乙酰基葡糖胺。

附图简述

[0384] 图1A-1D是显示半乳糖缀合物的不同细胞摄取的一系列图。图1A显示了F1aA-PE-m_4-n_{80}(Gal-PE)将PE优先靶向至肝的窦内皮细胞(LSEC)。图1B显示了F1aA-PE-m_4-n_{80}(Gal-PE)将PE优先靶向至肝的库普弗细胞(KC)。图1C显示了F1aA-PE-m_4-n_{80}(Gal-PE)将PE优先靶向至肝细胞。图1D显示了F1aA-PE-m_4-n_{80}(Gal-PE)将PE优先靶向至肝的其它抗原呈递细胞(APC)。*=P<0.05。

[0385] 图2的图显示了用F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)、OVA或盐水(即未处理)处理的小鼠中OT-I CD8+T细胞的增殖,在Gal-OVA处理组中看到最大增殖。

[0386] 图3A-3B是与T细胞上的标记物表达相关的数据的一系列图。图3A显示了用盐水、OVA或F1aA-OVA-m_4-n_{80}(GAL-OVA)处理的增殖T细胞世代中表达PD-1的OT-I $CD8^+$T细胞("PD1+")的百分比,gal-OVA处理组中PD-1水平最高。图3B显示了用盐水、OVA或F1aA-OVA-m_4-n_{80}(GAL-OVA)处理的增殖T细胞世代中表达磷脂酰丝氨酸的OT-I $CD8^+$T细胞(染色为"膜联蛋白V+")的百分比,gal-OVA处理组中膜联蛋白V+细胞水平最高。

[0387] 图4的图显示了半乳糖缀合物[F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)]降低OVA的免疫原性,如通过OVA特异性抗体滴度(以Ab滴度log^{-1}显示)测定。

[0388] 图5显示了随时间以重复剂量施用F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)能够从小鼠血清中使OVA特异性抗体耗竭。

[0389] 图6A-6F显示了与OVA特异性免疫应答的减轻相关的数据。图6A显示了用OVA和LPS攻击的小鼠中的免疫应答。图6B显示了用OVA处理的小鼠中的免疫应答,而图6C显示了未处理的小鼠中的免疫应答。图6D和6E(分别)显示了F1aA-OVA-m_4-n_{80}(mGal-OVA;6D)和F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}(pGal-OVA;6E)能够在用OVA和佐剂LPS的真皮内攻击后在引流淋巴结中减轻OVA特异性免疫应答。图6F来自母案,并且不形成本发明的部分。

[0390] 图7A-7B显示了F1aA-OVA-m_4-n_{80}和F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}的表征。图7A显示了F1aA-OVA-m_4-n_{80}(空心三角形)、F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}(实心圆圈)和未缀合的OVA(实线)的尺寸排阻HPLC曲线。向左偏移表示分子量的增加。图7B显示了聚丙烯酰胺凝胶,证明了OVA缀合后增加的分子量:(1.)未缀合的OVA、(2.)F1aA-OVA-m_4-n_{80}和(3.)F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}。

[0391] 图8A-8B显示了与施用F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为OVA-p(Glu-HPMA)并且显示为实心圆圈]或F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为OVA-p(Gal-HPMA)并且显示为实心菱形]后的抗原特异性免疫应答降低相关的数据。图8A显示了$CD45.1^+$小鼠中的抗原攻击后4天从引流淋巴结(腹股沟和腘)量化的OTI CD8+T细胞群体($CD3e^+$/$CD8\alpha^+$/$CD45.2^+$)的流式细胞术检测。在施用OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)后检出OT-I CD8+T细胞的显著减少。图8B显示了$CD45.1^+$小鼠中的抗原攻击后4天从引流淋巴结(腹股沟和腘)量化的OTIICD4+T细胞群体($CD3e^+$/$CD4^+$/$CD45.2^+$)的流式细胞术检测。在施用OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)后检出OT-IICD4+T细胞的显著减少。*=P<0.05,**=P<0.01;#=P<0.05,##=P<0.01(#表示与未处理的动物相比的显著性)。

[0392] 图9A-B显示了与抗原攻击后小鼠的淋巴结和脾中抗原特异性调节T细胞的增加相关的数据。图9A显示了,CD45.1+小鼠中的抗原攻击后4天,从淋巴结收集的OTII T调节细胞(CD3e+CD4+CD45.2+CD25+FoxP3+)中F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为OVA-p(Glu-HPMA)并且显示为实心圆圈]和F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为OVA-p(Gal-HPMA)并且显示为实心菱形]诱导的增加的流式细胞术检测。图9B显示了与用OVA或盐水(即攻击)处理的动物相比来自用OVA-p(Glu-HPMA)或OVA-p(Gal-HPMA)处理的小鼠的脾的相应分析。*=P<0.05,**=P<0.01;***=P<0.001;#=P<0.01,##=P<0.01;###=P<0.001(#表示与未处理的动物相比的显著性)。

[0393] 图10显示了与CD45.1+小鼠中抗原攻击后4天的抗原特异性效应细胞(IFNγ+OTI CD8+T细胞(CD3e+CD8α+CD45.2+IFNγ+)百分比降低相关的流式细胞术数据。用F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为OVA-p(Glu-HPMA)并且显示为实心圆圈]或F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为OVA-p(Gal-HPMA)并且显示为实心菱形]缀合物处理的小鼠与用OVA或盐水(即攻击)处理的动物相比在抗原攻击后产生显著更少的IFNγ+OTI CD8+T细胞。*=P<0.01,**=P<0.01;##=P<0.01(#表示与未处理的动物相比的显著性)。

[0394] 图11A-11B显示了与OTII过继转移模型中的T细胞消减和调节相关的数据,其中将OTII细胞(来自CD45.2$^+$小鼠的CD4$^+$T细胞)过继性转移到CD45.1$^+$接受体中,所述CD45.1$^+$接受体用F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Gal-HPMA)"]或F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Glu-HPMA)"]或不与聚合物连接的OVA["OVA"]处理以诱导T调节应答并且防止对疫苗介导的抗原攻击的后续应答。在第0天将3x10^{5}CFSE标记的OTI和3x10^{5}CFSE标记的OTII细胞均过继性转移到CD45.1$^+$小鼠(n=8只小鼠每组)。在第1、4和7天,施用致耐受性剂量或对照剂量。在一个方案中,以以下剂量提供OVA:第1天2.5μg,第4天以2.5μg,并且第7天16μg。在另一个方案中,以以下剂量提供OVA:第1天7μg,第4天7μg,并且第7天7μg,实现相同的总剂量。同样地,以第1天2.5μg、第4天2.5μg、和第7天16μg或第1天7μg、第4天7μg、和第7天7μg的相同给药在其它组中各自施用pGal-OVA和pGlu-OVA,所有剂量基于OVA等同剂量。在最终组中,在同一天施用盐水。在第14天,然后通过真皮内注射用以脂多糖(50ng)做佐剂的OVA(10μg)攻击接受体小鼠。在第19天完成引流淋巴结的表征,以允许确定是否实际发生消减并且是否从过继转移细胞诱导了调节T细胞。图11A显示了攻击后存在的OTII细胞的数目,并且图11B显示了FoxP3$^+$CD25$^+$细胞(T调节细胞的标记物)的频率。*和#指示p<0.05,**和##指示p<0.01,以及###指示P<0.001。

[0395] 图12A-12B显示了与OTI过继转移模型中的T细胞消减和调节相关的数据,其中将OTI细胞(来自CD45.2$^+$小鼠的CD8$^+$T细胞)过继性转移到CD45.1$^+$接受体,所述CD45.1$^+$接受体用F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Gal-HPMA)"]或F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Glu-HPMA)"]或不与聚合物连接的OVA["OVA"]处理以诱导T调节应答并且防止对疫苗介导的抗原攻击的后续应答。在第0天将3x10^{5}CFSE标记的OTI和3x10^{5}CFSE标记的OTII细胞两者过继性转移到CD45.1$^+$小鼠(n=8只小鼠每组)。在第1、4和7天,施用致耐受性剂量或对照剂量。在一个方案中,以以下剂量提供OVA:第1天2.5μg,第4天2.5μg,并且第7天16μg。在另一个方案中,以以下剂量提供OVA:第1天7μg,第4天7μg,并且第7天7μg,实现相同的总剂量。同样地,以第1天2.5μg、第4天2.5μg、和第7天16μg或第1天7μg、第4天7μg、和第7天7μg的相同给药在其它组中各自施用pGal-OVA和pGlu-OVA,所有剂量基于OVA等同剂量。在最终组中,在同一天施用盐水。然后在第14天,通过真皮内注射用以脂多糖(50ng)做佐剂的OVA(10μg)攻击接受体小鼠。在第19天完成引流淋巴结的表征,以允许确定是否实际发生消减并且调节T细胞是否经由其细胞因子表达响应抗原再暴露。图12A显示了攻击后存在的OTII细胞的数目,并且图12B显示了IFNγ表达细胞(其缺乏无反应性指示)的频率。*和#指示p<0.05,**和##指示p<0.01。

[0396] 图13显示了与血糖水平相关的数据。用F1m'-P31-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为P31-p(Glu-HPMA)],F1m'-P31-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$[标记为P31-p(Gal-HPMA)]缀合物(或盐水)处理小鼠。接收P31-p(Glu-HPMA)或P31-p(Gal-HPMA)的动物维持正常血糖水平达42天,而用P31或盐水处理的动物在5-10天内形成快速的高血糖症,证明了本发明中公开的缀合物保护小鼠免于T细胞诱导的自身免疫性糖尿病。

[0397] 图14显示了与非肥胖糖尿病(NOD)小鼠中的自发糖尿病的产生相关的数据。用F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$处理的小鼠显示为实心方形。用F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$处理的小鼠显示为实心三角形。用盐水处理的小鼠显示为实心菱形。与用盐水处理的动物相比,用式1的化合物处理动物降低了NOD小鼠中糖尿病发作的发病率。

[0398] 图15A-15B显示了与连接到合成糖聚合物的模型抗原OVA的生物分布相关的数据,显示了在限制脾中摄取的情况下的肝中摄取。A.从用OVA(1)或与各种糖聚合物缀合的OVA(2-5)处理的动物采集的灌注肝的荧光信号。B.从用OVA(1)或与各种糖聚合物缀合的OVA(2-5)处理的动物采集的脾的荧光图片。制剂如下:1.OVA,2.OVA-p(Galβ-HPMA),3.OVA-p(Gal-HPMA),4.OVA-p(Gluβ-HPMA),5.OVA-p(Glu-HPMA)。

[0399] 图16A至图16F显示了与比较连接基部分的实验相关的数据。合成OVA-p(Gal-HPMA)、OVA-p(Glu-HPMA)、OVA-p(Galβ-HPMA)、和OVA-p(Gluβ-HPMA)缀合物,并且测试其诱导抗原特异性T细胞无反应性并且消除造成长期记忆的T细胞群体的能力。图16A显示了用于7天实验的治疗方案的示意图。图16B显示了增殖OTI脾T细胞的百分比,如通过CSFE稀释测定。图16C显示了用OVA-糖聚合物缀合物或游离OVA处理的动物的脾中膜联蛋白V+OTI T细胞的百分比。图16D显示了PD-1+脾OTI细胞的百分比。图16E显示了OTI群体中T记忆细胞的百分比,其中T记忆细胞定义为CD62L+和CD44+。图16F显示了表达CD127的OTI细胞的百分比。特别注意与α-构象相比,采用β-构象的葡萄糖或半乳糖的组合物的效力出乎意料地增强。*=P<0.05**=P<0.01;#=P<0.05,##=P<0.01和###=P<0.001(#表示与仅用OVA处理的动物相比的显著性)。

[0400] 图17显示了与未处理、对照和实验组中的糖尿病症状的发展相关的数据。

[0401] 图18显示了与评估转移T细胞中的长效耐受性诱导相关的实验中使用的各种处理组和实验时间线。

[0402] 图19A-19B显示了与淋巴结中的T细胞组成相关的数据。图19A显示了各种处理组中抗原攻击后剩余的OTI细胞(作为总$CD8^+$细胞的百分比)。图19B显示了各种处理组中抗原攻击后剩余的OTII细胞(作为总$CD4^+$细胞的百分比)。

[0403] 图20显示了与评估内源T细胞中的长效耐受性诱导相关的实验中使用的各种处理组和实验时间线。

[0404] 图21A-21B显示了与淋巴结中的T细胞组成相关的数据。图21A显示了各种处理组中抗原攻击后剩余的OTI细胞(作为总$CD8^+$细胞的百分比)。图21B显示了各种处理组中抗原攻击后剩余的OTII细胞(作为总$CD4^+$细胞的百分比)。

[0405] 图22显示了用于评估如本发明中公开的组合物预防性降低抗体应答的能力的实验设计。

[0406] 图23显示了与来自各种处理组中小鼠的抗天冬酰胺酶抗体的量相关的实验数据。

[0407] 图24A至图24B显示了用于评估对髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的耐受性的实验设计和组合物。图24A显示了用于使供体小鼠免疫化和处理接受体小鼠的实验方案。图24B显示了根据本发明中公开的一些实施方案的致耐受性组合物的一个实例。

[0408] 图25A至图25B显示了与使用第一浓度的致耐受性组合物获得的针对MOG的耐受性诱导相关的实验数据。图25A显示了与各种处理组中的疾病发作延迟相关的数据。图25B显示了与各种处理组中重量减轻的降低相关的数据。

[0409] 图26A至图26B显示了与使用其它浓度的致耐受性组合物获得的针对MOG的耐受性诱导相关的实验数据。图26A显示了与各种处理组中的疾病发作延迟相关的数据。图26B显示了与各种处理组中重量减轻的降低相关的数据。

[0410] 图27A至图27E显示了与β构象的pGal和pGlu组合物的生物分布相关的实验数据。图27A显示了经由各种缀合物将OVA靶向到肝中的LSEC。图27B显示了经由各种缀合物将OVA靶向到肝中的库普弗细胞。图27C显示了经由各种缀合物将OVA靶向到肝中的CD11c+细胞。图27D显示了经由各种缀合物将OVA靶向到肝中的肝细胞。图27E显示了经由各种缀合物将OVA靶向到肝中的星形细胞。

发明详述

[0412] 两种已知的无唾液酸糖蛋白受体(“ASGPR”)在肝细胞和肝窦内皮细胞(或“LSEC”)上表达。其它半乳糖/半乳糖胺/N-乙酰基半乳糖胺受体的各种形式可以在多种细胞类型[例如,树突细胞、肝细胞、LSEC和库普弗细胞]中找到。虽然葡萄糖、葡糖胺和N-乙酰基葡糖胺的分子和细胞靶标可以与相应的半乳糖异构体的的分子和细胞靶标不同,但是已经发现了在一些情况下,Z是葡糖基化部分的式1的相应化合物是同样有效的,而在本发明中公开的一些实施方案中,它们出乎意料地有效。认为树突细胞是“专门的抗原呈递细胞”,因为它们的主要功能是将抗原呈递至免疫系统用于产生免疫应答。已知肝内的一些细胞能够呈递抗原,但更已知肝参与致耐受性。肝被理解为是致耐受性器官。例如,在多器官移植物的情况下当肝是所移植的器官之一时,报告了较低的排斥发生率。对于文献,LSEC是新得多的;因此它们在致耐受性和/或减轻炎性免疫应答中的作用尚未获得广泛承认或充分理解。然而,越来越清楚的是,它们也可以在抗原特异性耐受性的诱导中发挥显著作用。

[0413] 红细胞表面的显著特征之一是它的糖基化,即存在相当大数量的糖基化蛋白。事实上,已利用血型糖蛋白(例如,血型糖蛋白A)作为红细胞结合的靶标。血型糖蛋白是具有许多共价连接的糖链的蛋白质,其末端是唾液酸。当红细胞成长并且变得成熟而清除,其血型糖蛋白的末端唾液酸趋于丧失,在自由端留下N-乙酰基半乳糖胺。N-乙酰基半乳糖胺是由与肝细胞相关的ASGPR选择性接收的配体,这导致含N-乙酰基半乳糖胺的物质被肝细胞结合和它们随后在肝中的摄取和加工。

[0414] 迄今为止,本领域技术人员已经理解,由于由肝的首次通过清除(first-pass clearance)导致治疗剂的循环半衰期较差,应当避免以导致肝靶向的方式的治疗剂的糖基化。出于同样的原因,一些单克隆抗体需要在Asn297上被特异性糖基化以实现与其Fc受体的最佳结合。现在已令人惊讶地发现并且在本发明中公开了,半乳糖苷化和葡糖基化可以以诱导致耐受性的方式使用。

[0415] 在一些实施方案中,本发明提供了一些治疗性组合物,其靶向递送至肝,特别是肝细胞、LSEC、库普弗细胞和/或星形细胞,更特别地肝细胞和/或LSEC(并且由这些摄取),且甚至更具体地特异性结合ASGPR。肝靶向促进治疗的两种机制:耐受化(tolerization)和清除。耐受化利用了肝在清除凋亡细胞并处理其蛋白质以被免疫系统识别为“自身”中的作用,以及肝在取样外周蛋白以用于免疫耐受性中的作用。清除利用了肝在通过快速除去和分解毒素、多肽等的血液净化中的作用。使这些组合物靶向肝是由以下完成的:糖基化部分(例如,半乳糖、半乳糖胺和N-乙酰基半乳糖胺,特别是在C_1、C2或C6缀合,尽管一些实施方案涉及在分子中的其它或任何碳处的缀合),葡糖基化部分(例如葡萄糖、葡糖胺和N-乙酰基葡糖胺,特别是在C_1、C2或C6缀合,尽管一些实施方案涉及在分子中的其它或任何碳处的缀合),或通过对期望此类肝靶向的多肽进行脱唾液酸化。可以将半乳糖苷化或葡糖基化部分化学缀合至或重组融合至抗原,而脱唾液酸化(desialylation)暴露了抗原多肽上的半乳糖样部分。抗原可以是内源(自身抗原)或外源(外来抗原),包括但不限于:移植接受体针对其形成不期望的免疫应答(例如,移植物排斥)的外源移植物抗原、患者针对其形成不期望的免疫(例如,变应性或超敏性)应答的外来食物、动物、植物或环境抗原、患者针对其形成不期望的免疫应答(例如,超敏性和/或降低治疗活性)的治疗剂、患者针对其形成不期望的免疫应答(例如,自身免疫性疾病)的自身抗原,或其致耐受性部分(例如,片段或表位);这些组合物可用于诱导对抗原的耐受化。或者,半乳糖苷化或其它肝靶向部分可以与特异性结合循环蛋白或肽或者抗体的抗体、抗体片段或配体缀合,所述循环蛋白或肽或者抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病,和/或变态反应(如上讨论);这些组合物可用于清除循环蛋白、肽或抗体。因此,根据实施方案,本发明的组合物可用于治疗不期望的免疫应答,例如,移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、和/或变态反应。还提供了药物组合物,其含有与至少一种药学可接受赋形剂混合的治疗有效量的本发明的组合物。在另一个方面,本发明提供了用于治疗不期望的免疫应答,如移植物排斥、对治疗剂的响应、自身免疫性疾病或变态反应的方法。

[0416] 定义

[0417] 如在本说明书中使用,以下词语和短语通常旨在具有如下文列出的含义,除非在使用它们的上下文另有指出的意义上。

[0418] 单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数提及物,除非上下文清楚地另外指出。

[0419] 术语“约”在与数值结合使用时意图涵盖范围内的数值,该范围的下限通常例如比指示的数值小5-10%,该范围的上限通常例如比指示的数值大5-10%。还包括公开的范围内的任何数值,包括列出的端点。

[0420] 如本发明中使用,“抗原”是充当适应性免疫应答的受体的靶标的任何物质,如T细胞受体、主要组织相容性复合物I和II类、B细胞受体或抗体。在一些实施方案中,抗原可以来源于机体内(例如,“自身”、“自体”或“内源”)。在另外的实施方案中,抗原可以来源于机体外(“非自身”、“外来”或“外源”),例如,通过吸入、摄取、注射、或移植、经皮等进入。在一些实施方案中,外源抗原可以在机体内经生物化学修饰。外来抗原包括但不限于食物抗原、动物抗原、植物抗原、环境抗原、治疗剂、以及同种异体移植物中存在的抗原。

[0421] 如本发明中使用,“抗原结合分子”指含有提供与表位的结合(在一些实施方案中

为特异性结合)的抗体可变区的分子,特别指蛋白质,如免疫球蛋白分子。抗体可变区可以存在于例如完整的抗体、抗体片段、和抗体或抗体片段的重组衍生物中。如本发明中使用,抗体的术语“抗原结合片段”(或“结合部分”)指保留特异性结合靶序列的能力的抗体的一个或多个片段。含有抗体可变区的抗原结合片段包括(但不限于)“Fv”、“Fab”、和“$F(ab')_2$”区、“单结构域抗体(sdAB)”、“纳米抗体”、“单链Fv(scFv)”片段、“串联scFv”(V_HA-V_LA-V_HB-V_LB)、“双抗体”、“三抗体(triabodies)”或“三重体(tribodies)”、“单链双抗体(scDb)”和“双特异性T细胞衔接剂(BiTE)”。

[0422] 如本发明中使用,“化学修饰”指在多肽的一个或多个氨基酸的天然存在的化学结构中的变化。此类修饰可以对侧链或末端进行,例如,改变氨基末端或羧基末端。在一些实施方案中,修饰可用于创建化学基团,其可以方便地用于将多肽连接到其它材料,或附接至治疗剂。

[0423] 术语“包含”,与“包括”、“含有”、或“特征在于”同义,是包括的或开放性的,并且不排除额外的、未陈述的要素或方法步骤。短语“由...组成”排除未规定的任何元素、步骤或成分。短语“基本上由…组成”将描述的主题范围限制到规定的材料或步骤和那些不实质上影响其基础和新特征的材料或步骤。应当理解,无论在何处用术语“包括”描述实施方案,则还提供了以术语“由...组成”和/或“基本上由...组成”描述的其它方面类似的实施方案。当在权利要求书中用作过渡性短语时,每项应当分开并且在适当的法律和事实背景下解读(例如,认为“包含”更多是开放式的短语,而“由...组成”更为排他的,并且“基本上由...组成”达到中间地带)。

[0424] 一般可以在不改变活性的情况下对氨基酸序列进行“保守变化”。这些变化称作“保守取代”或突变;也就是说,可以用属于具有特定大小或特征的氨基酸群组的氨基酸取代另一个氨基酸。氨基酸序列的取代可以选自该氨基酸所属的类别的其它成员。例如,非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸和酪氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。此类取代预期不会实质影响如通过聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的表观分子量或等电点。保守取代还包括用序列的光学异构体取代其它光学异构体,具体地,对于序列的一个或多个残基用D氨基酸取代L氨基酸。此外,序列中的所有氨基酸可以经历D-L异构体取代。示例性的保守取代包括但不限于用Lys取代Arg及反之亦然,以维持正电荷;用Glu取代Asp及反之亦然,以维持负电荷;用Ser取代Thr,以维持游离的OH;以及用Gln取代Asn以维持游离的NH_2。另一种类型的保守取代构成下述情况,其中如果需要进行化学衍生化(derivatization),那么引入具有所需的化学反应性的氨基酸以赋予用于化学缀合反应的反应位点。此类氨基酸包括但不限于Cys(以插入巯基)、Lys(以插入伯胺)、Asp和Glu(以插入羧酸基团)、或含有酮、叠氮化物、炔、烯烃和四嗪侧链的专用的非规范氨基酸。保守取代或添加携带游离-NH_2或-SH的氨基酸对于与式1的连接基和半乳糖苷化部分的化学缀合可以是特别有利的。此外,在一些情况中,可以进行多肽序列或相应的核酸序列的点突变、缺失和插入而不丧失多肽或核酸片段的功能。取代可以包括例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50或更多个残基(包括那些列出者之间的任何数目的取代)。本发明中可使用的变体可以表现出在氨基酸序列中的总数目高达200(例如,高达1、2、3、4、5、

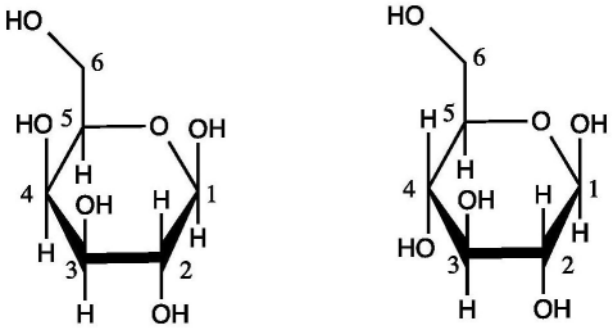
6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或200，包括那些列出者之间的任何数目)处变化(例如，交换、插入、缺失、N-末端截短和/或C-末端截短)。在一些实施方案中，变化的数目大于200。另外，在一些实施方案中，变体包括与参照(例如未修饰或天然序列)表现出功能等同性程度的多肽序列或相应的核酸序列。在一些实施方案中，变体与未修饰或天然参照序列表现出约80％、约85％、约90％、约95％、约97％、约98％、约99％功能等同性(和那些列出者之间任何程度的功能等同性)。为了与标准多肽命名J.Biol.Chem.,(1969),243,3552-3559一致，本发明中所描述的氨基酸残基采用单字母氨基酸标志符或三字母缩写。所有氨基酸残基序列在本发明中以左和右取向按照常规的氨基端至羧基端方向通过通式表示。

[0425] 术语“有效量”或“治疗有效量”指当对需要此类治疗的哺乳动物施用时足以实现如下面所定义的治疗的本发明的组合物的量。该量会随治疗的受试者和疾病病症、受试者的体重和年龄、疾病病症的严重程度、所选择的本发明的特定组合物、待遵循的给药方案、施用时机、施用方式等变化，所有这些都可以由本领域普通技术人员容易确定。

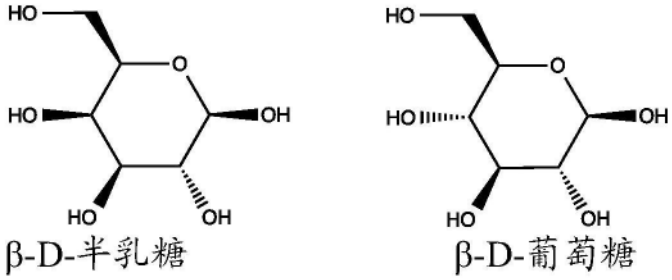
[0426] “表位”，也称为抗原决定簇，是大分子(例如蛋白质)中由适应性免疫系统识别，诸如由抗体、B细胞、主要组织相容性复合物分子、或T细胞识别的区段。表位是大分子中能够结合抗体或其抗原结合片段的部分或区段。在此上下文中，术语“结合”特别指特异性结合。在本发明的一些实施方案的上下文中，优选的是，术语“表位”指由免疫系统识别的蛋白质或多聚蛋白的区段。

[0427] 术语半乳糖指以开链形式和环状形式两者存在、具有D-和L-异构体的单糖。在环状形式中有两种异头物，即α和β。在α形式中，C1醇基处于轴向位置，而在β形式中，C1醇基处于赤道位置。特别地，“半乳糖”指环状六元吡喃糖，更具体地，D-异构体和甚至更具体地α-D型(α-D-半乳吡喃糖)，其正式名称是(2R,3R,4S,5R,6R)-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2,3,4,5-四醇。葡萄糖是半乳糖的差向异构体；正式名称是(2R,3R,4S,5S,6R)-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2,3,4,5-四醇。显示了半乳糖和葡萄糖的结构和编号，给出立体化学显示的两种非限制性实例。

[0428]



[0429]



[0430] 术语“半乳糖苷化部分”指一种特定类型的肝靶向部分。半乳糖苷化部分包括但不限于:半乳糖、半乳糖胺和/或N-乙酰基半乳糖胺残基。“葡糖基化部分”指另一种特定类型的肝靶向部分,并且包括但不限于葡萄糖、葡糖胺和/或N-乙酰基葡糖胺。

[0431] 术语“肝靶向部分”指具有将例如多肽导向至肝的能力的部分。肝包含不同类型的细胞,包括但不限于肝细胞、肝窦上皮细胞、库普弗细胞、星状细胞、和/或树突状细胞。通常,肝靶向部分将多肽导向至这些细胞中的一个或多个。在相应的肝细胞的表面上,存在识别和特异性结合肝靶向部分的受体。肝靶向可以通过以下来实现:抗原或配体与半乳糖苷化或葡糖基化部分的化学缀合;抗原或配体的脱唾液酸化(desialylation)以暴露下面的半乳糖基或葡糖基部分;或内源抗体与抗原或配体的特异性结合,其中将抗原或配体脱唾液酸化以暴露下面的半乳糖基或葡糖基部分;缀合到半乳糖苷化或葡糖基化部分。天然存在的脱唾液酸化蛋白不涵盖在本发明的一些实施方案的范围内。

[0432] 为各种取代基提供的“数值”和“范围”旨在涵盖所述范围内的所有整数。例如,当定义n为表示包括约1至100,特别是约8至90,更特别是约40至80个乙二醇基团的混合的整数(其中混合物通常涵盖规定为n±约10%(或从1至约25的较小整数,±3)的整数)时,应当理解的是,n可以是约1至100的整数(例如,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或110,或那些列出者间的任一个,包括范围的端点),并且所公开的混合物涵盖范围如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和107-113个乙二醇基团。无论何处使用,组合的术语“约”和“±10%”或“±3”应当理解为公开并提供等同范围的具体的支持。

[0433] 术语“任选的”或“任选地”指随后描述的事件或情况可以发生或可以不发生,并且该描述包括其中所述事件或情况发生的情况和它不发生的情况。

[0434] 特异性结合特定靶标的肽称为所述靶标的“配体”。

[0435] “多肽”是下述术语,指氨基酸残基的链,无论是否有翻译后修饰(例如,磷酸化或糖基化),和/或与另外的多肽复合,和/或与核酸和/或碳水化合物或其它分子一起合成为多亚单元复合物。因此,蛋白聚糖在本发明中也称为多肽。长的多肽(具有超过约50个氨基酸)称为“蛋白质”。短的多肽(具有小于约50个氨基酸)称为“肽”。根据大小、氨基酸组成和三维结构,一些多肽可以称为“抗原结合分子”、“抗体”、“抗体片段”或“配体”。多肽可以通过许多方法产生,其中许多在本领域中是公知的。例如,可以通过(例如,由分离的细胞)提取、通过表达编码多肽的重组核酸,或通过化学合成获得多肽。可以通过例如重组技术并将编码多肽的表达载体导入用于表达编码多肽的宿主细胞(例如,通过转化或转染)来产生多肽。

[0436] 如本发明中使用,“药学可接受载体”或“药学可接受赋形剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。用于药学活性物质的此类介质和试剂的使用在本领域中是公知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则将涵盖其在治疗组合物中的用途。也可以将补充的活性成分加入组合物中。

[0437] 如在本发明中就多肽而言使用,术语“纯化的”指已经经过化学合成并且因此基本上不被其它多肽污染,或者已经自与其天然伴随的大多数其它细胞组分(例如,其它细胞蛋白质、多核苷酸、或细胞组分)分开或分离的多肽。纯化的多肽的实例是至少70%(按干重

计)不含与其天然关联的蛋白质和天然存在的有机分子的多肽。因此,纯化的多肽的制剂可以是例如至少80%、至少90%、或至少99%(按干重计)的多肽。多肽也可以经工程化改造而含有标签序列(例如,多组氨酸标签、myc标签、或FLAG®标签或其它亲和标签),其促进纯化或标记(例如,捕获到亲和基质上,在显微镜下显现)。因此,除非另有指示,包含多肽的纯化的组合物指纯化的多肽。术语"分离的"指示本发明的多肽或核酸不处于其天然环境中。因此,本发明的分离的产物可以是培养上清液中含有、部分富集、自异源来源产生、在载体中克隆、或者用媒介物(vehicle)配制的,等等。

[0438] 术语"无规共聚物"指混合物中的两个或更多个单体的同时聚合的产物,其中在聚合物链中的任何给定位点处发现给定单体单元的可能性不依赖于所述位置处相邻单元的性质(Bernoullian分布)。因此,当鉴定为W_p的可变基团表示无规共聚物时,链可以包含2个直至约150个W^1和W^2基团的任何序列,诸如-W^1-W^2-W^1-W^2-;-W^2-W^1-W^2-W^1-;-W^1-W^1-W^1-W^2-;-W^1-W^1-W^2-W^2-;-W^1-W^2-W^2-W^1-;-W^1-W^2-W^1-W^2-W^2-W^1-W^2-W^1-;-W^1-W^1-W^2-W^2-W^1-W^2-W^2-W^1-;和W^2-W^2-W^1-W^2-W^1-W^1-W^1-W^2-W^2-W^1-W^2-W^2-W^1;无限地,其中Z附接到各个W^1基团,并且W^1和W^2基团自身可以是相同或不同的。

[0439] 术语"序列同一性"就多肽(或核酸)序列的比较而言使用。具体地,这种表述指相对于相应的参照多肽或相应的参照多核苷酸的序列同一性的百分比,例如至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、在至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、在至少97%、至少98%、或至少99%。具体地,所讨论的多肽和参照多肽在20、30、40、45、50、60、70、80、90、100或更多个氨基酸的连续区段上或在参照多肽的全长上表现出指定的序列同一性。

[0440] "特异性结合",如该术语通常在生物学领域中使用一样,指与非靶标组织相比以相对较高的亲和力结合靶标的分子,并且一般涉及多种非共价相互作用,诸如静电相互作用、范德华相互作用、氢键键合,等等。特异性结合相互作用表征抗体-抗原结合、酶-底物结合、以及一些蛋白质-受体相互作用;虽然此类分子有时可以结合其特异性靶标以外的组织,但是如果此类非靶标结合无关紧要,高亲和力结合对仍可以落在特异性结合的定义内。

[0441] 术语"治疗"或"处理"指在哺乳动物中的疾病或病症的任何治疗,其包括:

[0442] 预防或防止疾病或病症,即,使临床症状不发展;

[0443] 抑制疾病或病症,即,阻止或抑制临床症状的发展;和/或

[0444] 减轻疾病或病症,即,使临床症状消退。

[0445] 术语"不期望的免疫应答"指受试者的免疫系统的反应,其在给定的情况下是不期望的。如果此类反应不导致预防,减轻或治愈疾病或病症,但反而引起、增强或恶化病症或疾病或在其它情况下与病症或疾病的诱导或恶化有关,那么免疫系统的反应是不期望的。通常,如果免疫系统的反应针对不恰当的靶标,那么该反应引起、增强或恶化疾病。示例性的不期望的免疫应答包括但不限于移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、和变态反应或超敏性。

[0446] 术语"变体"应当理解为与其衍生自的蛋白质相比的不同之处在于在其长度、序列或结构中的一个或多个改变的蛋白质(或核酸)。蛋白质变体衍生自的多肽也称为亲本多肽或多核苷酸。术语"变体"包括亲本分子的"片段"或"衍生物"。通常情况下,"片段"是在长度

或大小上比亲本分子更小,而“衍生物”与亲本分子相比在它们的序列或结构中表现出一个或多个差异。也涵盖经修饰的分子,如但不限于翻译后修饰的蛋白质(例如糖基化、磷酸化、泛素化、棕榈酰化、或经蛋白水解切割的蛋白质)和经修饰的核酸,如甲基化的DNA。术语“变体”也涵盖不同分子的混合物如但不限于RNA-DNA杂交体。如本发明中使用,天然存在的和人工构建的变体应当理解为由术语“变体”所涵盖。另外,本发明中可使用的变体也可以来源于亲本分子的同系物、直向同源物(ortholog),或侧向同源物(paralog)或人工构建的变体,条件是该变体表现出亲本分子的至少一种生物活性,例如是功能上有活性的。变体可以通过与从其来源的亲本多肽的一定程度的序列同一性来表征。更确切地说,在本发明内容的上下文中,蛋白质变体可以表现出与其亲本多肽至少80%的序列同一性。优选地,蛋白质变体的序列同一性在20、30、40、45、50、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸的连续区段上。如上文讨论,在一些实施方案中,变体与未修饰的或天然的参照序列相比表现出约80%、约85%、约90%、约95%、约97%、约98%、约99%功能等同性(以及那些列出者之间任何程度的功能等同性)。

[0447] 组合物

[0448] 本发明的一方面涉及如由式1表示的组合物、药物制剂、以及采用此类组合物的治疗方法:

[0449] $X\text{-}[Y\text{-}Z]_m$

式1

[0450] 其中:

[0451] m是约1至100的整数,特别是约1至20,且最优选1至约10;

[0452] X是患者针对其形成不期望的免疫应答的抗原部分,特别是外来抗原或自身抗原,或此类抗原部分的致耐受性部分(例如片段或表位);

[0453] Y是连接基部分或直接的键或特异性结合X的抗体、抗体片段、肽或其它配体;并且

[0454] Z是肝靶向部分,特别是半乳糖苷化或葡糖基化部分。

[0455] 在式1中m的值将取决于X的性质,因为每个抗原、抗体、抗体片段或配体将具有各数目和密度的位点(主要是N-末端胺、赖氨酸残基和半胱氨酸残基),所述位点可以与连接基、半乳糖苷化部分或葡糖基化部分结合。具有有限数目的此类位点的抗原可以例如通过加入赖氨酸或半胱氨酸残基(任选地通过可切割的连接基,特别是具有免疫蛋白体切割位点的连接基)在N或C末端衍生化。一般地,优选在式1的组合物中提供足够程度的半乳糖苷化/葡糖基化,从而促进肝细胞的吸收。本发明的药物制剂和方法可以使用式1的组合物的混合物,所述组合物分别携带不同的X部分(例如,与特定的不期望的免疫应答相关的几个表位)。

[0456] 式1的组合物包括亚属(sub-genus),其中X是移植接受体针对其形成不期望的免疫应答(例如移植物排斥)的外源移植物抗原;患者针对其形成不期望的免疫(例如,变应性或超敏性)应答的外来食物、动物、植物或环境抗原;患者针对其形成不期望的免疫应答(例如,超敏性和/或降低的治疗活性)的外来治疗剂;或患者针对其形成不期望的免疫应答(例如,自身免疫性疾病)的自身抗原;其中Y是式Ya至Yp的连接基;和/或其中Z是半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺,如通过下文参考反应方案描

述的式1a至1p所示。

[0457] 在另外的实施方案中,在式1的组合物中,X可以是特异性结合循环蛋白或肽或抗体的抗体、抗体片段或配体,所述循环蛋白或肽或抗体由于该原因而参与移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、超敏性和/或变态反应。

[0458] 抗原

[0459] 在式1的组合物中用作X的抗原可以是蛋白质或肽,例如抗原可以是完整的或部分的治疗剂、全长移植物蛋白或其肽、全长自身抗原或其肽、全长变应原或其肽、和/或核酸,或上述抗原的模拟物。所列的分类中的任何特定抗原或与任何特定疾病或反应的关联并不排除该抗原被视为另一类的一部分或与另一种疾病或反应有关。

[0460] 在本发明内容的实践中使用的抗原可以是下列一种或多种:

[0461] ●治疗剂,其是蛋白质、肽、抗体和抗体样分子,包括抗体片段和具有抗体和抗体片段的融合蛋白。这些包括人、非人(例如小鼠)和非天然(即,工程化改造的)蛋白质、抗体、嵌合抗体、人源化抗体和非抗体结合支架,如纤连蛋白、DARPins、knottins等。

[0462] ●人同种异体移植物抗原,移植接受体针对该人同种异体移植物抗原形成不期望的免疫应答。

[0463] ●自身抗原,其引起不期望的自身免疫应答。本领域的技术人员将理解,虽然自身抗原在自身免疫性疾病患者中是内源起源的,但是在所公开的组合物中使用的多肽通常是外源合成的(与从来源纯化并浓缩形成对比)。

[0464] ●患者针对其经历了不期望的免疫应答的外来抗原,如食物、动物、植物和环境抗原。本领域技术人员将理解,尽管治疗性蛋白质由于其外源起源也可以被认为是外来抗原,但为了本发明的描述中的清楚目的,此种治疗剂描述为不同的组。相似地,植物或动物抗原可以食用并认为是食物抗原,并且环境抗原可以来源于植物。然而,它们均是外来抗原。为简单起见,没有试图描述以区别和定义所有此类可能重叠的组,因为本领域技术人员可以理解在本发明的组合物中可利用的抗原,特别是根据详细描述和实施例。

[0465] 抗原可以是完整蛋白质、完整蛋白质的一部分、肽等,并且可以衍生化(如上文讨论)以用于附接到连接基和/或半乳糖苷化部分,可以是变体和/或可以包含保守取代,特别是维持序列同一性的保守取代,和/或可以是脱唾液酸化的。

[0466] 在抗原是治疗性蛋白质、肽、抗体或抗体样分子的实施方案中,特定抗原可以选自:阿巴西普(Abatacept)、阿昔单抗(Abciximab)、阿达木单抗(Adalimumab)、腺苷脱氨酶、Ado-曲妥珠单抗-美坦新(Ado-trastuzumab emtansine)、阿加糖酶α(Agalsidase alfa)、阿加糖酶β(Agalsidase beta)、阿地白介素(Aldeslukin)、阿糖脑苷酶(Alglucerase)、阿葡糖苷酶α(Alglucosidase alfa)、α-1-蛋白酶抑制剂、阿那白滞素(Anakinra)、阿尼普酶(Anistreplase)(茴香酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物(anisoylated plasminogen streptokinase activator complex))、抗纤维蛋白酶III(Antithrombin III)、抗胸腺细胞球蛋白(Antithymocyte globulin)、阿替普酶(Ateplase)、贝伐单抗、比伐卢定(Bivalirudin)、A型肉毒杆菌毒素(Botulinum toxin type A)、B型肉毒毒素(Botulinum toxin type B)、C1酯酶抑制剂、卡那单抗(Canakinumab)、羧肽酶G2(谷卡匹酶(Glucarpidase)和Voraxaze)、赛妥珠单抗(Certolizumab pegol)、西妥昔单抗(Cetuximab)、胶原酶、响尾蛇科免疫Fab(Crotalidae immune Fab)、达贝泊汀-α

(Darbepoetin-α)、地诺单抗(Denosumab)、地高辛免疫Fab(Digoxin immune Fab)、脱氧核糖核酸酶α(Dornase alfa)、艾库组单抗(Eculizumab)、依那西普(Etanercept)、因子VIIa、因子VIII、因子IX、因子XI、因子XIII、纤维蛋白原、非格司亭(Filgrastim)、Galsulfase、戈利木单抗(Golimumab)、组氨瑞林乙酸酯(Histrelin acetate)、透明质酸酶(Hyaluronidase)、Idursulphase、伊米苷酶(Imiglucerase)、英夫利昔单抗(Infliximab)、胰岛素[包括重组人胰岛素(“rHu胰岛素”)和牛胰岛素]、干扰素-α2a、干扰素α2b、干扰素-β1a、干扰素-β1b、干扰素-γ1b、伊匹单抗(Ipilimumab)、L-精氨酸酶、L-天冬酰胺酶、L-甲硫氨酸酶(methionase)、乳糖酶、拉罗尼酶(Laronidase)、来匹卢定(Lepirudin)/蛭素(hirudin)、美卡舍明(Mecasermin)、美卡舍明-林菲培(Mecasermin rinfabate)、甲氧基那他珠单抗(Methoxy Natalizumab)、奥曲肽(Octreotide)、奥法木单抗(Ofatumumab)、奥普瑞白介素(Oprelvekin)、胰淀粉酶(Pancreatic amylase)、胰脂肪酶、木瓜蛋白酶、Peg-天冬酰胺酶(Peg-asparaginase)、Peg-多柔比星HCl、PEG-红细胞生成素-β(PEG-epoetin-β)、培非司亭(Pegfilgrastim)、Peg-干扰素-α2a、Peg-干扰素-α2b、培戈洛酶(Pegloticase)、培维索孟(Pegvisomant)、苯丙氨酸氨裂解酶(Phenylalanine ammonia-lyase、PAL)、蛋白C、拉布立酶(Rasburicase)(尿酸酶(uricase))、沙克罗酶(Sacrosidase)、鲑鱼降钙素(Salmon calcitonin)、沙格司亭(Sargramostim)、链激酶(Streptokinase)、替奈普酶(Tenecteplase)、特立帕肽(Teriparatide)、托珠单抗(Tocilizumab)(atlizumab)、曲妥珠单抗、1型α-干扰素、乌司奴单抗(Ustekinumab)、vW因子。治疗性蛋白质可以从天然来源获得(例如,浓缩和纯化)或合成,例如重组合成,并包括通常是IgG单克隆抗体或片段或融合物的抗体治疗剂。

[0467] 特定的治疗蛋白质、肽、抗体或抗体样分子包括阿昔单抗、阿达木单抗、阿加糖酶α、阿加糖酶β、阿地白介素、阿葡糖苷酶α、因子VIII、因子IX、英夫利昔单抗、胰岛素(包括rHu胰岛素)、L-天冬酰胺酶、拉罗尼酶、那他珠单抗(Natalizumab)、奥曲肽(Octreotide)、苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)、或拉布立酶(尿酸酶)和通常其不同形式的IgG单克隆抗体。

[0468] 另一特定组包括止血剂(因子VIII和IX)、胰岛素(包括rHu胰岛素)、以及非人治疗性尿酸酶、PAL和天冬酰胺酶。

[0469] 在血液学和移植物中不期望的免疫应答包括自身免疫性再生障碍性贫血、移植物排斥(通常)、和移植物抗宿主病(骨髓移植排斥)。在抗原是人同种异体移植物抗原的实施方案中,具体的序列可以选自:各种MHC I类和MHC II类单倍型蛋白质(例如,在组织交叉匹配中鉴定的供体/接受体差异)的亚基,和在次要血型抗原(minor blood group antigen)上的单氨基酸多态性,包括RhCE、Kell、Kidd、Duffy和Ss。此类组合物可以单独制备以用于给定供体/接受体对。

[0470] 在抗原是自身抗原的实施方案中,特定抗原(以及与它们相关的自身免疫性疾病)可以选自:

[0471] ●在1型糖尿病中,已经鉴定出几种主要抗原:胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷氨酸脱羧酶-65(GAD-65或谷氨酸脱羧酶2)、GAD-67、葡萄糖-6-磷酸酶2(IGRP或胰岛特异性葡萄糖6磷酸酶催化亚基相关蛋白)、胰岛素瘤关联蛋白2(IA-2)、和胰岛素瘤关联蛋白2β(IA-2β);其它抗原包括ICA69、ICA12(SOX-13)、羧肽酶H、Imogen 38、GLIMA38、嗜铬粒蛋白-A、HSP-60、羧肽酶E、外周蛋白、葡萄糖转运蛋白2、肝癌-肠-胰/胰腺关联蛋白、S100β、胶质

细胞原纤维酸性蛋白、再生基因II、胰十二指肠同源框1、萎缩性肌强直病(dystrophia myotonica)激酶、胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白、和SST G蛋白偶联受体1-5。应当注意的是,胰岛素是可表征为自身抗原和治疗性蛋白质抗原两者的抗原的例子。例如,rHu胰岛素和牛胰岛素是治疗性蛋白质抗原(其是不期望的免疫攻击的对象),而内源人胰岛素为自身抗原(其是不期望的免疫攻击的对象)。由于内源人胰岛素不可用于在药物组合物中采用,本发明的一些实施方案的组合物中利用了重组形式。

[0472] ○人胰岛素,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P01308):

[0473] MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN (SEQ ID NO:1)。

[0474] ○GAD-65,包括可用于本发明的组合物的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT Q05329):

[0475] 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:2)。

[0476] ○IGRP,包括可用于本发明的组合物的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT QN9QR9):

[0477] MDFLHRNGVLIIQHLQKDYRAYYTFLNFMSNVGDPRNIFFIYFPLCFQFNQTVGTKMIW VAVIGDWLNLIFKWILFGHRPYWWVQETQIYPNHSSPCLEQFPTTCETGPGSPSGHAM GASCVWYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHRLTWSFLWSVFWLIQISVCISRVFIATHFP HQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGIQTASLGTYLKTNLFLFLFAVGFYLLLRVLNIDLLWSVP IAKKWCANPDWIHIDTTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLLSCRGGNNYTLSFRLLC ALTSLTILQLYHFLQIPTHEEHLFYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLMKQSGKKSQ (SEQ ID NO:3)。

[0478] ●在自身免疫性甲状腺疾病(包括桥本氏甲状腺炎和格雷夫斯氏病)中,主要抗原包括甲状腺球蛋白(TG)、甲状腺过氧化物酶(TPO)和促甲状腺激素受体(TSHR);其它抗原包

括钠碘转运体(symporter)(NIS)和兆蛋白(megalin)。在甲状腺相关眼病和皮肤病中,除了甲状腺自身抗原(包括TSHR)外,抗原是胰岛素样生长因子1受体。在甲状旁腺功能减退中,主要抗原是钙敏感性受体。

[0479] ●在阿狄森(Addison)氏病中,主要抗原包括21-羟化酶、17α-羟化酶、和P450侧链切割酶(P450scc);其它抗原包括ACTH受体、P450c21和P450c17。

[0480] ●在卵巢功能早衰中,主要抗原包括FSH受体和α-烯醇化酶。

[0481] ●在自身免疫性下垂体炎,或垂体自身免疫性疾病中,主要抗原包括垂体特异性蛋白质因子(PGSF)1a和2;另一种抗原是2型碘化甲腺氨酸脱碘酶。

[0482] ●在多发性硬化中,主要抗原包括髓鞘碱性蛋白("MBP")、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白("MOG")和髓磷脂蛋白脂质蛋白质("PLP")。

[0483] ○MBP,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P02686):

[0484] MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNNG TSSQDTAVTDSKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSE SDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGI LDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIV TPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPGFGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGT LSKIFKLGGRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:4)。

[0485] ○MOG,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT Q16653):

[0486] MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGKN ATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNV RFSDEGGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFL CLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWLHRRLA GQFLEELRNPF (SEQ ID NO:5)。

[0487] ○PLP,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P60201):

[0488] MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDY EYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTG GQKGRGSRGQHQAHSLERVCHCLGKWLGHPDKFVGITYALTVVWLLVFACSAVPVYI YFNTWTTCQSIAFPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCGSNLLSICKTAEFQ MTFHLFIAAFVGAAATLVSLLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF (SEQ ID NO:6)。

[0489] ○在本发明的组合物中可用于治疗多发性硬化的肽/表位包括下列序列中的一些或全部,这些序列单独地存在于式1的组合物中,或者一起存在于式1的组合物的混合物中:

[0490] ■MBP13-32:KYLATASTMDHARHGFLPRH(SEQ ID NO:7);

[0491] ■MBP83-99:ENPWHFFKNIVTPRTP(SEQ ID NO:8);

[0492] ■MBP111-129:LSRFSWGAEGQRPGFGYGG(SEQ ID NO:9);

[0493] ■MBP146-170:AQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR(SEQ ID NO:10);

[0494] ■MOG1-20:GQFRVIGPRHPIRALVGDEV(SEQ ID NO:11);

[0495] ■MOG35-55:MEVGWYRPPFSRWHLYRNGK(SEQ ID NO:12);和

[0496] ■PLP139-154:HCLGKWLGHPDKFVGI(SEQ ID NO:13)。

[0497] ●在类风湿性关节炎中,主要抗原包括II型胶原、免疫球蛋白结合蛋白、免疫球蛋白G的片段可结晶区域、双链DNA、以及在类风湿性关节炎的病理中牵涉的蛋白质的天然和瓜氨酸化(cirtullinated)形式,包括纤维蛋白/纤维蛋白原、波形蛋白、胶原I和II、和α-烯醇化酶。

[0498] ●在自体免疫性胃炎(autoimmune gastritis)中,主要抗原是H+,K+-ATP酶。

[0499] ●在恶性贫血(pernicious angemis)中,主要抗原是内在因子。

[0500] ●在乳糜泻中,主要抗原是组织转谷氨酰胺酶和谷蛋白或谷蛋白样蛋白质的天然形式和脱酰胺形式,如α-、γ-、和Ω-麦醇溶蛋白、麦谷蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱和燕麦蛋白。本领域技术人员应当理解,例如虽然乳糜泻的主要抗原是α-麦醇溶蛋白,但α-麦醇溶蛋白在体内通过组织谷氨酰胺酶的脱酰胺化而转变为更为免疫原性的,所述组织谷氨酰胺酶将α麦醇溶蛋白的谷氨酰胺转换为谷氨酸。因此,虽然α-麦醇溶蛋白原本是外来食物抗原,但是一旦它在体内经过修饰而变得更为免疫原性的,它可以表征为自身抗原。

[0501] ●在白癜风中,主要抗原是酪氨酸酶,和酪氨酸酶相关蛋白1和2。

[0502] ○MART1,由T细胞1,Melan-A识别的黑色素瘤抗原,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT Q16655):

[0503] MPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEEAAGIGILTVILGVLLLIGCWYCRRRNGYRALMD KSLHVGTQCALTRRCPQEGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPY SP (SEQ ID NO:14)。

[0504] ○酪氨酸酶,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P14679):

[0505] MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQ NILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNC TERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIY DLFVWMHYYVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGDENF TIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSHQSL CNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLE GFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFVDSIFEQWLRR HRPLQEVYPEANAPIGHNRESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSDPDSFQ DYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEEKQPLLMEKE DYHSLYQSHL (SEQ ID NO:15)。

[0506] ○黑色素细胞蛋白PMEL,gp100,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P40967):

[0507] MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQR
LDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQV
WGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSG
LSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDG
GNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGP
VTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTA
EPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLAEMSTPEATGMT
PAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGT
ATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGL
PKEACMEISSPGCQPPAQRLCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLA
VVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVLMAVVLASLIYRRRLMKQDFSVPQLPHSSSHW
LRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV (SEQ ID NO:16)。

[0508] ●在重症肌无力中,主要抗原是乙酰胆碱受体。

[0509] ●在寻常型天疱疮和变体中,主要抗原是桥粒芯蛋白(desmoglein)3、1和4;其它抗原包括天疱膜联蛋白(pemphaxin)、桥粒糖蛋白(desmocollin)、斑珠蛋白(plakoglobin)、斑周蛋白(perplakin)、桥粒斑蛋白(desmoplakin)、和乙酰胆碱受体。

[0510] ●在大疱性类天疱疮中,主要抗原包括BP180和BP230;其它抗原包括网蛋白(plectin)和层粘连蛋白5。

[0511] ●在杜林疱疹样皮炎(dermatitis herpetiformis Duhring)中,主要抗原包括肌内膜和组织转谷氨酰胺酶。

[0512] ●在获得性大疱性表皮松解(epidermolysis bullosa acquisita)中,主要抗原是胶原VII。

[0513] ●在系统性硬化病(systemic sclerosis)中,主要抗原包括基质金属蛋白质酶1和3、胶原特异性分子伴侣热休克蛋白47、微纤维蛋白-1、和PDGF受体;其它抗原包括Scl-70、U1 RNP、Th/To、Ku、Jo1、NAG-2、着丝粒蛋白、拓扑异构酶I、核仁蛋白(nucleolar protein)、RNA聚合酶I、II和III、PM-Slc、核仁纤维蛋白(fibrillarin)、和B23。

[0514] ●在混合性结缔组织病中,主要抗原是U1snRNP。

[0515] ●在斯耶格伦(Sjogren)氏综合征中,主要抗原是核抗原SS-A和SS-B;其它抗原包括胞衬蛋白(fodrin)、多聚(ADP-核糖)聚合酶和拓扑异构酶、毒蕈碱受体、以及Fc-γ受体IIIb。

[0516] ●在系统性红斑狼疮中,主要抗原包括核蛋白,包括“Smith抗原”、SS-A、高迁移率组框1(HMGB1)、核小体、组蛋白和双链DNA(在疾病进程中针对其生成自身抗体)。

[0517] ●在肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome)中,主要抗原包括肾小球基膜蛋白,包括胶原IV。

[0518] ●在风湿性心脏病中,主要抗原是心肌肌球蛋白。

[0519] ●在1型自身免疫性多内分泌腺综合征中,抗原包括芳香族L-氨基酸脱羧酶、组氨酸脱羧酶、半胱氨酸亚磺酸脱羧酶、色氨酸羟化酶、酪氨酸羟化酶、苯丙氨酸羟化酶、肝P450细胞色素P4501A2和2A6、SOX-9、SOX-10、钙感测受体蛋白、和1型干扰素干扰素α、β和Ω。

[0520] ●在视神经脊髓炎(neuromyelitis optica)中,主要抗原是AQP4。

[0521] ○水通道蛋白-4,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P55087):

[0522] MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTIN WGGTEKPLPVDMVLISLCFGLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFY IAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDS KRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHWIYWVGPIIG AVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGV VHVIDVDRGEEKKGKDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:17)。

[0523] ●在葡萄膜炎中,主要抗原包括视网膜S-抗原或“S-抑制蛋白”和光感受器间类视色素结合蛋白(interphotoreceptor retinoid binding protein)(IRBP)或视黄醇结合蛋白3。

[0524] ○S-抑制蛋白,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P10523):

[0525] 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:18)。

[0526] ○IRBP,包括用于本发明的组合物中的外源获得的形式,具有下列序列(UNIPROT P10745):

[0527] MMREWVLLMSVLLCGLAGPTHLFQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAIQQAIKS
HEILSISDPQTLASVLTAGVQSSLNDPRLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLSEEELLAWLQ
RGLRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDLRHCTG
GQVSGIPYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDVVVLTSSQ
TRGVAEDIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLRKLRIGESDFFFTVPVSRSLGPLGGGS
QTWEGSGVLPCVGTPAEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLKDYYTLVDRVPTLLQ
HLASMDFSTVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSWPAPDAAAEDSPG
VAPELPEDEAIRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDSFADASVLGVLAPYVLRQVWEPL
QDTEHLIMDLRHNPGGPSSAVPLLLSYFQGPEAGPVHLFTTYDRRTNITQEHFSHMEL
PGPRYSTQRGVYLLTSHRTATAAEEFAFLMQSLGWATLVGEITAGNLLHTRTVPLLDTP
EGSLALTVPVLTFIDNHGEAWLGGGVVPDAIVLAEEALDKAQEVLEFHQSLGALVEGTG
HLLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGAYRTAVDLESLASQLTADLQEVSGDHRLLVF
HSPGELVVEEAPPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEVLPGQLGYLRFDAMAELETVKAVG
PQLVRLVWQQLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIPLLCSYFFEAEPRQHLYSVFDRATSKV
TEVWTLPQVAGQRYGSHKDLYILMSHTSGSAAEAFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGAL
SVGIYQVGSSPLYASMPTQMAMSATTGKAWDLAGVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRA
KVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAKMATKLSGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLS
GDPHLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIPSPEVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMFGDG
ELLTQVSRLLVEHIWKKIMHTDAMIIDMRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRP
DDSVSELWTHAQVVGERYGSKKSMVILTSSVTAGTAEEFTYIMKRLGRALVIGEVTSG
GCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTARSVGASDGSSWEGVGVTPHVVVPAEEALARAKEML
QHNQLRVKRSPGLQDHL (SEQ ID NO:19)。

[0528] 在抗原是可以针对其形成不期望的免疫应答的外来抗原,如食物抗原的一些实施方案中,特定的抗原可以是:

[0529] ●来自花生:伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、蓝豆蛋白(Ara h 6);

[0530] ○伴花生球蛋白例如具有以UNIPROT Q6PSU6鉴定的序列

[0531] ●来自苹果:31kda主要变应原/疾病抗性蛋白同源物(Mal d 2)、脂质转运蛋白前体(Mal d 3)、主要变应原Mal d 1.03D(Mal d 1);

[0532] ●来自乳:α-乳清蛋白(ALA)、乳转铁蛋白;来自奇异果(kiwi):猕猴桃碱(actinidin)(Act c 1,Act d 1)、植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂(phytocystatin)、奇异果甜蛋白(thaumatin)样蛋白(Act d 2)、kiwellin(Act d 5);

[0533] ●来自蛋清:卵类粘蛋白,卵清蛋白,卵转铁蛋白,和溶菌酶;

[0534] ●来自蛋黄:卵黄蛋白,apovitillin和vosvetin;

[0535] ●来自芥菜:2S白蛋白(Sin a 1)、11S球蛋白(Sin a 2)、脂质转运蛋白(Sin a 3)、抑制蛋白(Sin a 4);

[0536] ●来自芹菜:抑制蛋白(Api g 4)、高分子量糖蛋白(Api g 5);

[0537] ●来自虾:Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快同

种型(fast isoform);

[0538] ●来自小麦和/或其它谷物:高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-、γ-和Ω麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、黑麦碱、和/或燕麦蛋白;

[0539] ○在本发明的组合物中可用于治疗乳糜泻的肽/表位包括下列序列中的一些或全部,这些序列单独地存在于式1的组合物中,或一起存在于式1的组合物的混合物中:

[0540] ■DQ-2相关,天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”:

[0541] LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO:20)

[0542] ■DQ-2相关,脱酰氨化的α-麦醇溶蛋白“33聚体”:

[0543] LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF (SEQ ID NO:21)

[0544] ■DQ-8相关,α-麦醇溶蛋白:

[0545] QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO:22)

[0546] ■DQ-8相关,Ω麦醇溶蛋白(小麦,U5UA46):

[0547] QPFPQPEQPFPW (SEQ ID NO:23)

[0548] ●来自草莓:主要草莓变态反应Fra a 1-E(Fra a 1),和

[0549] ●来自香蕉:抑制蛋白(Mus xp 1)。

[0550] 在抗原是针对其形成不期望的免疫应答的外来抗原(如针对动物、植物和环境抗原)的实施方案中,具体的抗原可以是例如:猫、小鼠、狗、马、蜂、灰尘、树和菊科植物(goldenrod),包括来源于以下的下述蛋白质或肽:

[0551] ●杂草(包括豚草变应原amb a、1、2、3、5、和6、和Amb t 5;藜Che a 2和5;以及其它杂草变应原Par j 1、2、3和Par o 1);

[0552] ●草(包括主要变应原Cyn d 1、7和12;Dac g 1、2和5;Hol I 1.01203;Lol p 1、2、3、5、和11;Mer a 1;Pha a 1;Poa p 1和5);

[0553] ●来自以下的花粉:豚草和其它杂草(包括皱叶酸模(curly dock)、灰菜(lambs quarters)、藜(pigweed)、车前草(plantain)、羊酸模(sheep sorrel)、和山艾树(sagebrush))、草(包括Bermuda、Johnson、Kentucky、Orchard、黄花草(Sweet vernal)、和猫尾草(Timothy grass))、和树(包括梓树(catalpa)、榆木(elm)、胡桃木(hickory)、橄榄(olive)、美洲山核桃(pecan)、悬铃木(sycamore)和胡桃(walnut));

[0554] ●粉尘(包括来自物种屋尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)的主要变应原,如Der p 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、14、15、18、20、21、和23;来自物种粉尘螨(Dermatophagoides farina),如Der f 1、2、3、6、7、10、11、13、14、15、16、18、22和24;来自物种热带无爪螨(Blomia tropicalis)、如Blo t 1、2、3、4、5、6、10、11、12、13、19、和21;以及来自欧宇尘螨(Euroglyphus maynei)的变应原Eur m 2、来自腐食酪螨(Tyrophagus putrescentiae)的Tyr p 13、和变应原Bla g 1、2、和4;来自蟑螂的Per a 1、3、和7)。

[0555] ●宠物(包括猫、狗、啮齿类、和农场动物,主要的猫变应原包括Fel d1至8、猫IgA、BLa g 2、和猫白蛋白;主要的狗变应原包括Can f 1至6、和狗白蛋白);

[0556] ●蜂蜇伤,包括主要变应原Api m 1至12;和

[0557] ●真菌,包括来源于以下物种的变应原:曲霉属(Aspergillus)和青霉属(Penicillium)的物种,以及物种链格孢属(Alternaria alternata)、Davidiella

tassiana、和红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)。

[0558] 如本领域的技术人员理解,可以测试患者以鉴定已经针对其形成不期望的免疫应答的抗原,并且可以基于该抗原开发蛋白质、肽等并且作为X掺入本发明的组合物中。

[0559] 唾液酸化抗原、抗体、抗体片段

[0560] 以下是特异性靶向ASGPR的具有可以除去以留下糖基化的唾液酸化的抗原、抗体、抗体片段的例子:促卵泡激素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、促黄体激素(LH)、骨桥蛋白、促甲状腺激素(TSH)、阿加糖酶α、阿加糖酶β(FABRAZYME®;Genzyme)、红细胞生成素α和红细胞生成素β、促滤泡素α(GONAL-F®;Merck/Serono)和促滤泡素β(FOLLISTIM®;Schering-Plough)、胰岛素生长因子结合蛋白6(IGFBP-6)、促黄体激素α(LUVERIS®;Merck/Serono)、转化生长因子β1、抗凝血酶(ATryn®/TROMBATE-III®;Genzyme/Talecris Biotherapeutics)、促甲状腺激素α(THYROGEN®;Genzyme)、来格司亭(lenograstim)、沙格司亭(sargramostim)(LEUKINE®;Genzyme)、白介素-3、尿激酶原、淋巴毒素、C1酯酶抑制剂(Berinert®;CSL)、IgG样抗体、干扰素β、凝血因子VIIa(NOVOSEVEN®;Novo Nordisk)、凝血因子VIII(莫罗凝血素α(moroctocog alfa))、凝血因子IX(诺那凝血素α(nonacog alfa))(BENEFIX®;Wyeth)和p55肿瘤坏死受体融合蛋白。(参见:Byrne等,Drug Discovery Today,Vol 12,No.7/8,第319-326页,2007年4月和Sola等,BioDrugs.2010;24(1):9-21)。此前已经高度糖基化并且可以脱唾液酸化以用于肝细胞-ASGPR靶向的药学上相关的蛋白质包括:干扰素α和γ、促黄体激素、Fv抗体片段、天冬酰胺酶、胆碱酯酶、达贝泊汀α(AraNESP®;Amgen)、血小板生成素、瘦素、FSH、IFN-α2、血清白蛋白和绒促卵泡素α(corifollitropin alfa)。

[0561] 具有通常不以唾液酸终止的聚糖的蛋白质,包括在细菌或酵母中产生的蛋白质(如精氨酸酶、一些胰岛素和尿酸酶)不会适合于脱唾液酸化。

[0562] 本领域的技术人员应当理解,公开可获得的参考文献,如UNIPROT,公开了在大多数的(如果不是全部)感兴趣的抗原、抗体、抗体片段和配体上脱唾液酸化的位点的存在和位置。

[0563] 抗体和肽配体

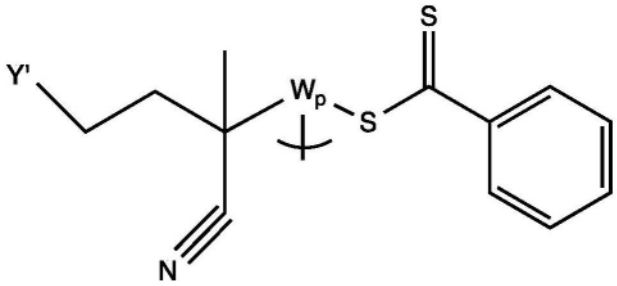
[0564] 在利用抗体、抗体片段或配体的实施方案中,此类部分选择为特异性结合靶定的循环蛋白或肽或抗体,并导致循环靶定部分的肝摄取,其可作为靶向部分的加合物,最终导致循环靶定部分的清除和失活。例如,肝靶向因子VIII将结合并清除循环抗因子VIII抗体。用于鉴定此类部分的方法是本领域的技术人员所熟悉的。

[0565] 连接基

[0566] 本发明的组合物中所使用的连接基(式1的"Y")可以包括N-羟基琥珀酸酰胺基(N-hydroxysuccinamidyl)连接基、马来酰亚胺(malaemide)连接基、乙烯基砜连接基、吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)连接基、吡啶基二硫醇连接基、n-硝基苯基碳酸酯连接基、NHS-酯连接基、硝基苯氧基聚(乙二醇)酯连接基,等等。

[0567] 特定的一组连接基包括下述式Y'-CMP的连接基(其中Y'指示连接基的剩余部分,且R^9和Z如定义)。更具体地,在包括式Y'-CMP的连接基的组中,在一些实施方案中,R^9取代基为乙基乙酰氨基基团,甚至更具体地,乙基乙酰氨基与N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖

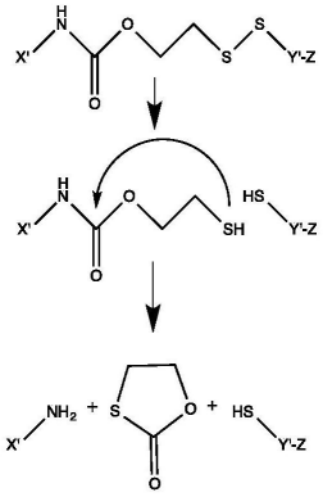
胺的C1缀合。

[0568] 

式Y'-CMP

式Y'-CMP

[0569] 含二硫醇的连接基,特别是含有二硫烷基氨基甲酸乙酯的连接基(命名中包括X的游离胺,或者命名为"二硫烷基乙酯"而不包括X的游离胺)在本组合物中是特别有利的,因为一旦在细胞内,其具有切割抗原并以其最初形式释放抗原的能力,例如,如下面显示的(其中Y'指示连接基的剩余部分,且X'和Z如定义)。

[0570] 

[0571] 具体地,关于下文在式Ya至Yp中显示的连接基:左括号"("指示X和Y之间的键;右括号或底部括号")"表示Y和Z之间的键;

[0572] n是整数,表示包括约1至100,特别是约8至90(例如、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或95),更特别是约40至80(例如、39、40、43、45、46、48、50、52、53、55、57、60、62、65、66、68、70、73、75、78、80或81)个乙二醇基团的混合物,其中该混合物通常涵盖规定为n±10%的整数;

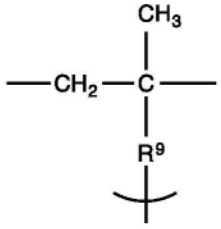
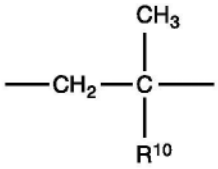
[0573] p是整数、表示包括约2至150,特别是约20至100(例如、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或105)、更特别是约30至40(例如、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43或44)的混合物,其中该混合物通常涵盖规定为p±10%的整数;

[0574] q是整数,表示包含约1至44,特别是约3至20(例如、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21或22),并且更特别是约4至12个(例如、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13)的混合物,其中该混合物通常涵盖规定为q±10%的整数;和

[0575] R^8是-CH_2-("甲基")或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-("1-氰基-1-甲基-丙基"或"CMP")。

[0576] Y'表示Y的剩余部分(例如HS-PEG);并且

[0577] W表示相同W^1基团的聚合物,或W是相同或不同W^1和W^2基团的共聚物(优选无规共聚物),其中:

[0578] W^1 =  W^2 = 

和

[0579] 其中:

[0580] p是2至约150的整数;

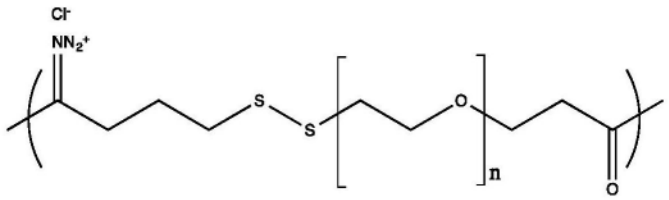
[0581] R^9是直接的键、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-(即乙基乙酰氨基基团或"EtAcN")或-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)$_t$-NH-C(O)-(即,Peg化乙基乙酰氨基基团或"Et-PEG_t-AcN")。

[0582] t是1至5(特别地1至3,且更特别地1或2)的整数;并且

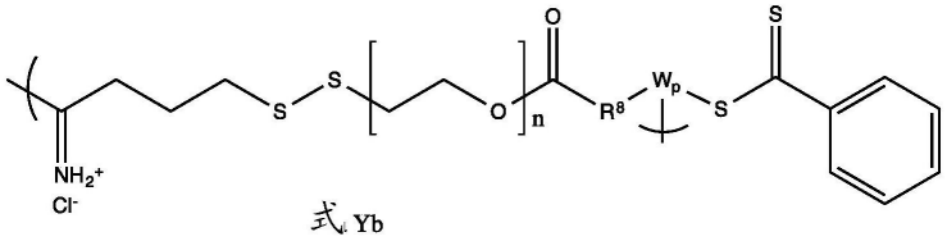
[0583] R^{10}是脂肪族基团、醇或脂肪族醇,特别是N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺;并且

[0584] Z(未显示)是半乳糖、葡萄糖、半乳糖胺、葡糖胺、N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

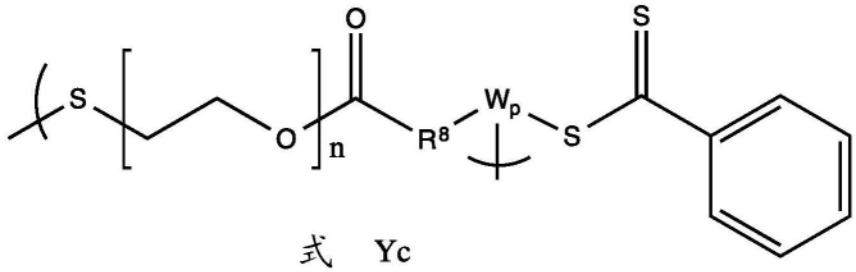
[0585] 式Ya到Yp

[0586] 

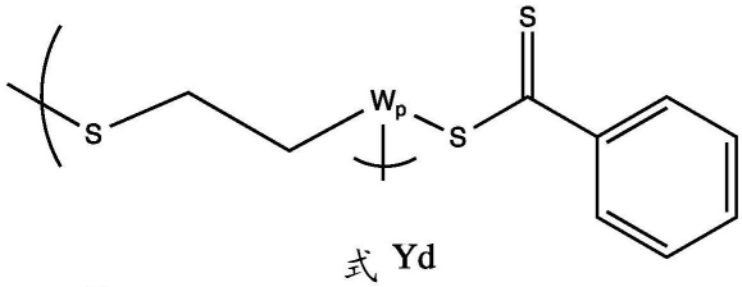
式 Ya



式 Yb

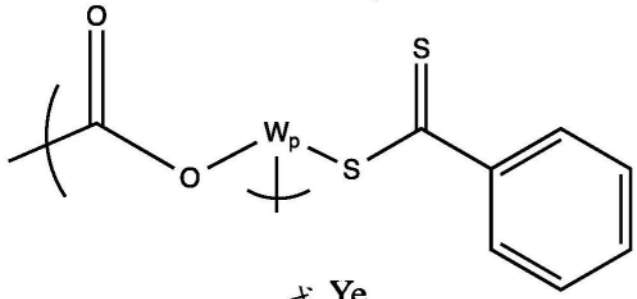


式 Yc

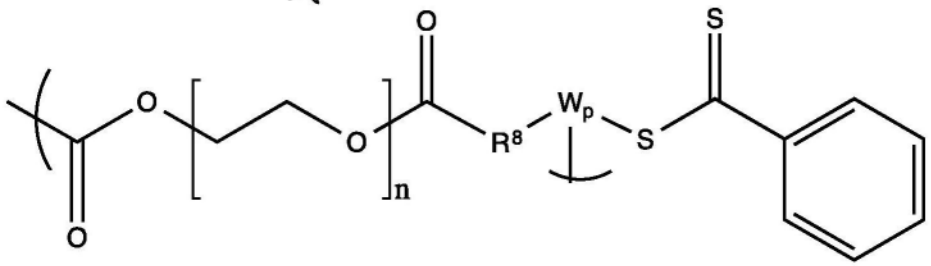


式 Yd

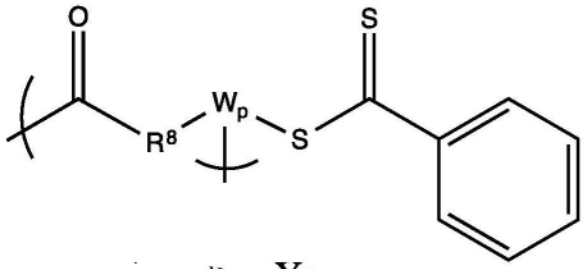
[0587]



式 Ye

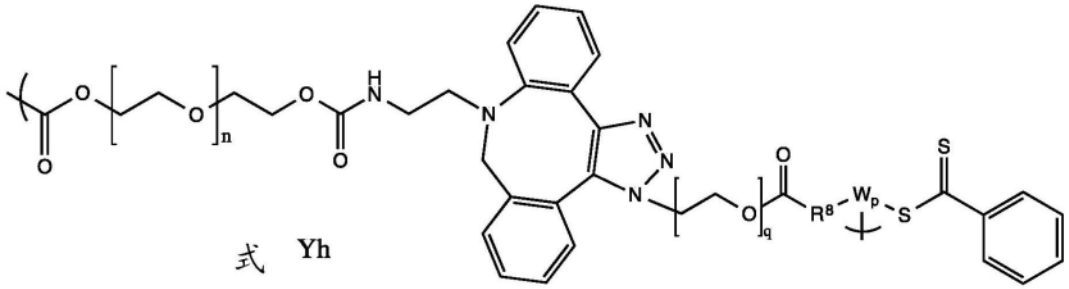


式 Yf

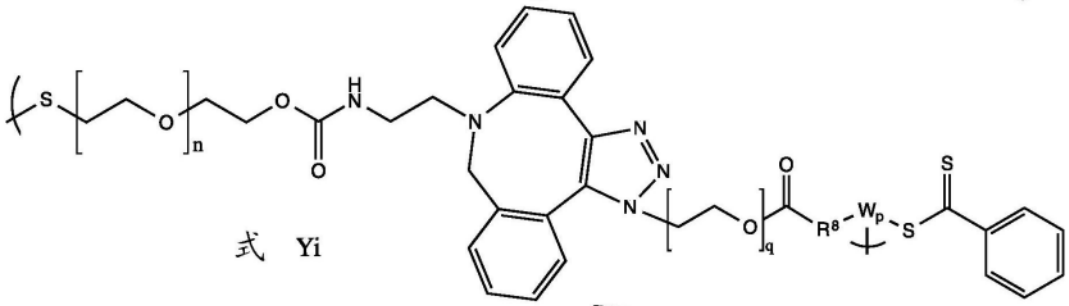


式 Yg

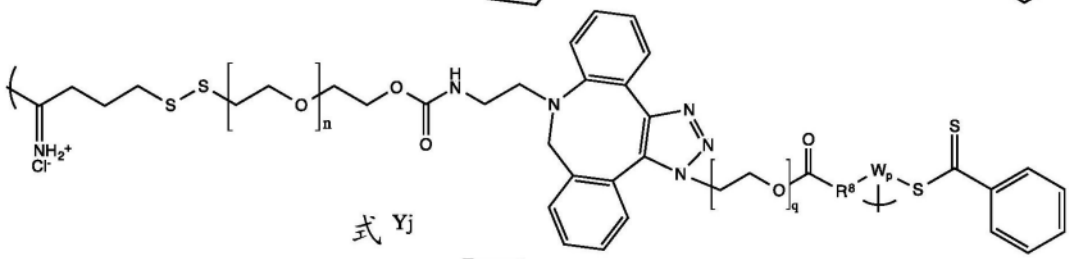
[0588]



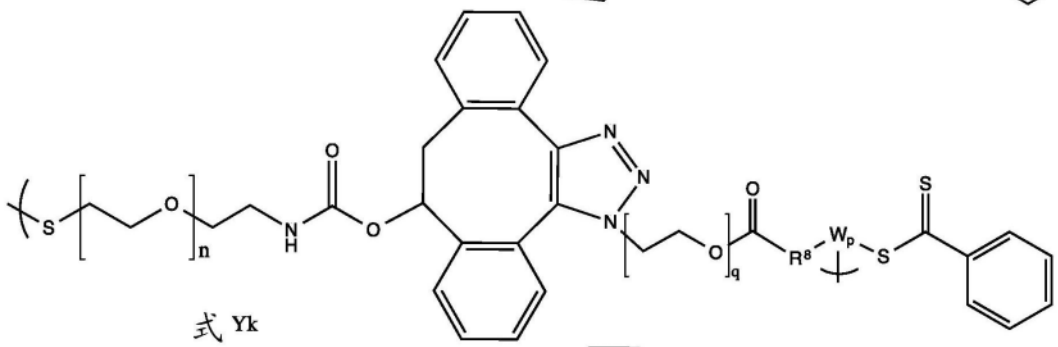
式 Yh



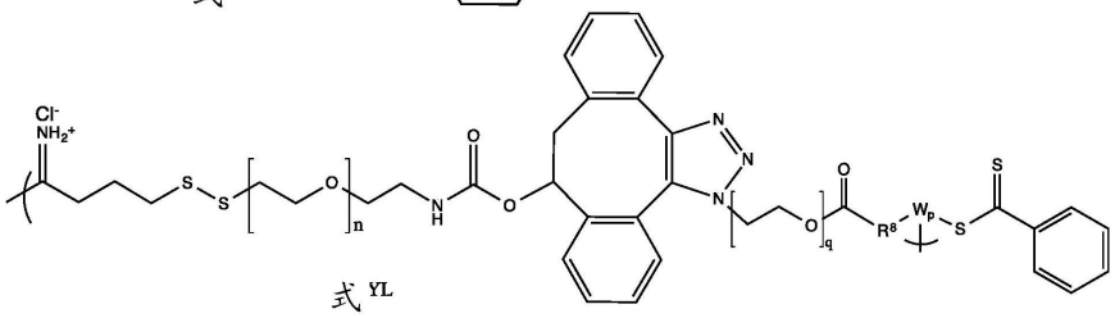
式 Yi



式 Yj

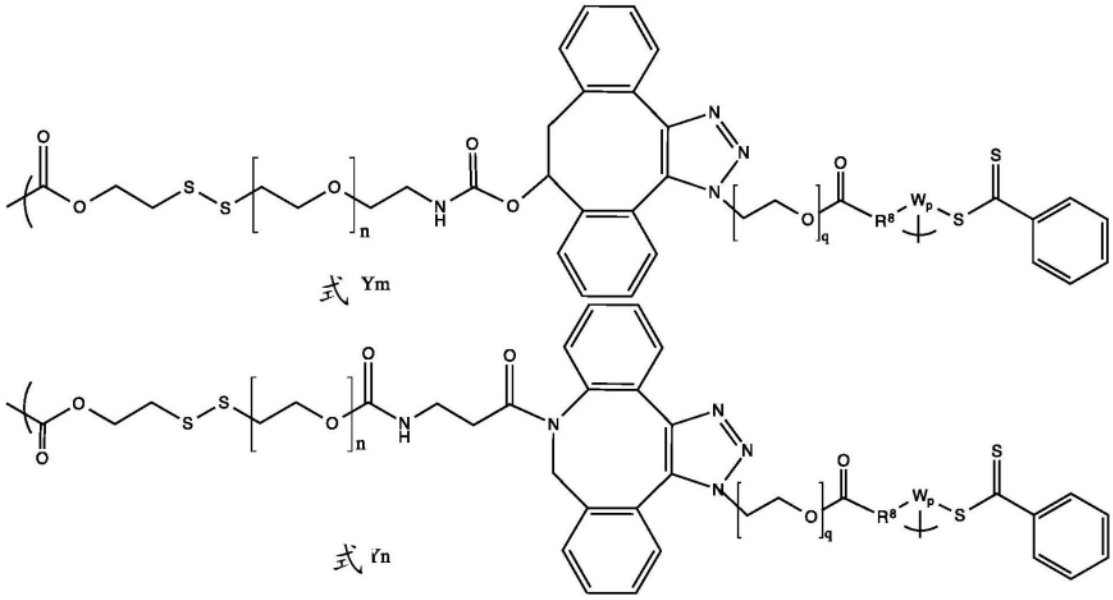


式 Yk



式 YL

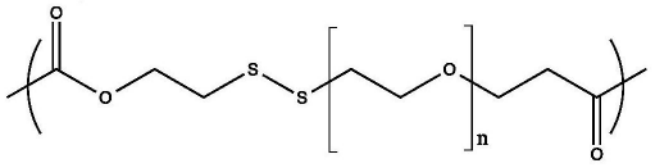
[0589]



式 Ym

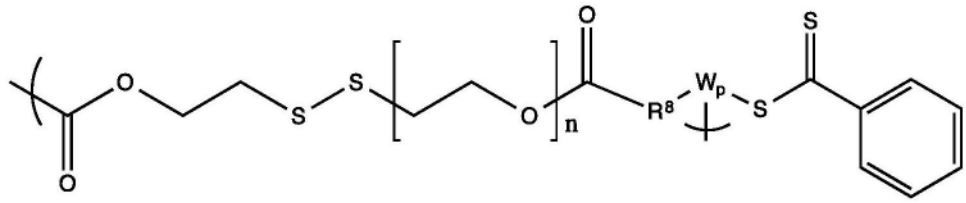
式 Yn

[0590] (可以通过使Yn特别适合于缀合到疏水性抗原的一些前体合成式Yn的连接基。)



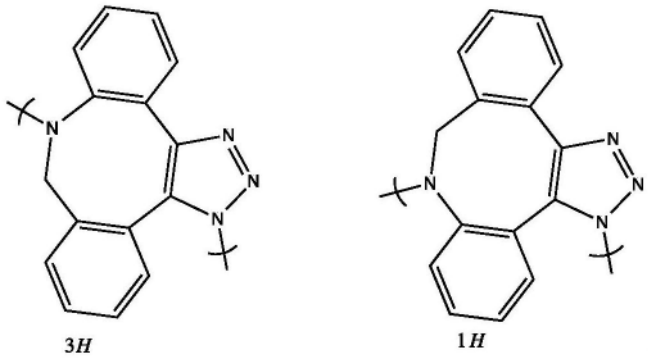
式Yo 和

[0591]

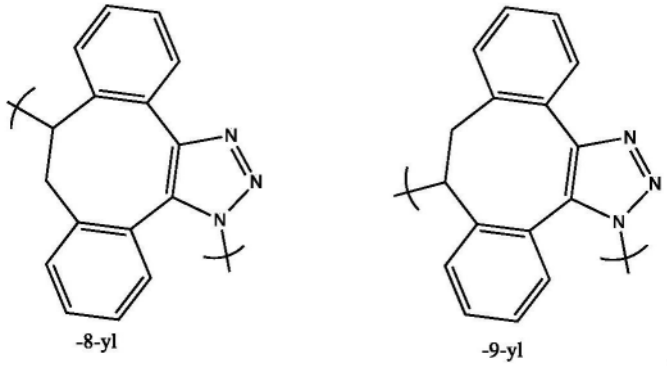


式Yp

[0592] 将上文以式Yh至Yn所示的连接基合成为在不分离的情况下使用的异构体。例如，式Yh、Yi、Yj和Yn的连接基是下文显示的8,9-二氢-1H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]吖辛因-8-基(8,9-dihydro-1H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8yl)和8,9-二氢-3H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]吖辛因-8基(8,9-dihydro-3H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8yl)结构的混合物：

[0593] 

[0594] 式Yk、YL和Ym的连接基将是下文显示的8,9-二氢-1H-二苯并[3,4:7,8]环辛[1,2-d][1,2,3]三唑-8-基和8,9-二氢-1H-二苯并[3,4:7,8]环辛[1,2-d][1,2,3]三唑-9-基结构的混合物:

[0595] 

[0596] 此类异构体混合物的存在不损害采用此类连接基的组合物的功能性。

[0597] 肝靶向部分

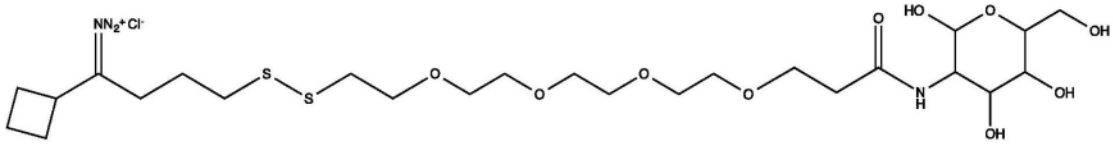
[0598] 本发明的组合物中采用的半乳糖苷化部分用来将组合物靶向到肝细胞(例如,特异性结合肝细胞)并且可以选自:半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺。本发明的组合物中采用的葡糖基化部分用来将组合物靶向到肝细胞(例如,特异性结合肝细胞或LSEC)并且可以选自:葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。已经报告了ASGPR亲和力可以在修饰半乳糖的C3/C4-二醇锚定的任一侧的情况下获得保留(Mamidyala,Sreeman K.,等,J.Am.Chem.Soc.2012,134,1978-1981),因此在一些实施方案中,使用的缀合点特别是位于C1、C2和C6。

[0599] 特定的肝靶向部分包括在C1或C6处缀合的半乳糖或葡萄糖、在C2处缀合的半乳糖胺或葡糖胺、和在C6处缀合的N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺。其它特定的肝靶向部分包括在C2处缀合的N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺,更特别地与携带作为CH_2的R^9取代基的连接基缀合。其它特定的肝靶向部分还包括在C1处缀合的半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺,更特别地与携带作为乙基乙酰氨基基团的R^9取代基的连接基缀合。

[0600] 命名法

[0601] 可以使用IUPAC和惯用名的组合来命名式1的组合物。例如,对应于式1的化合物可以命名为(Z)-(21-环丁基-1-氧代-1-(2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-4,7,10,13-四氧杂-16,17-二硫代二十一烷-21-亚基)三氮-1-炔-2-阳离子氯化物((Z)-(21-cyclobutyl-1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-

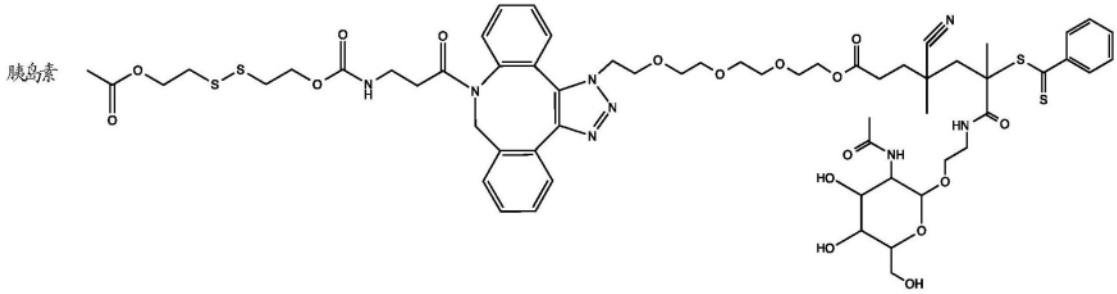
2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-ylidene) triaz-1-yn-2-ium chloride),其中X是环丁基部分(为了说明性目的,代替抗原显示),Y是式Ya,m是1,n是4且Z是N-乙酰基半乳糖胺-2-基或N-乙酰基葡糖胺-2-基:

[0602] 

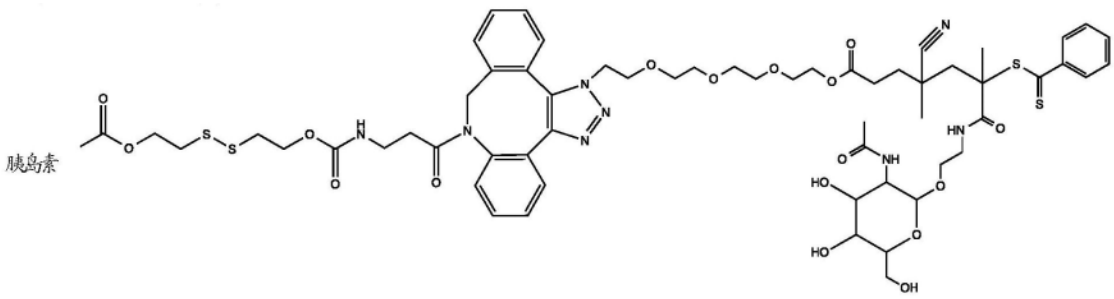
[0603] ,因此其中X为组织转谷氨酰胺酶的本发明的相应组合物可以命名为(Z)-(21-(组织转谷氨酰胺酶)-1-氧代-1-((2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-4,7,10,13-四氧杂-16,17-二硫代二十一烷-21-亚基)三氮-1-炔-2-阳离子氯化物。其中的X'是组织转谷氨酰胺酶,m是2,n是4,且Z'为N-乙酰基半乳糖胺-2-基或N-乙酰基葡糖胺-2-基的本发明的相应组合物可以命名为(3Z)-((组织转谷氨酰胺酶)-1,3-二基双(-1-氧代-1-(2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-4,7,10,13-四氧-16,17-二硫代二十一烷-21-基-21-亚基))双(三氮-1-炔-2-阳离子)氯化物((3Z)-((tissue transgultaminase)-1,3-diylbis(1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) tetra hydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-yl-21-ylidene))bis(triaz-1-yn-2-ium)chloride)。

[0604] 为简化处理,式1的组合物可以使用备选的命名系统来命名,通过参照X并对应于式1a至1p之一(如在反应方案中显示),之后引用变量m、n、p和/或q的整数、R^8、R^9并标识半乳糖苷化部分和缀合它的位置。在一些实施方案中,其中的W是共聚物的化合物通过后面有"撇"的"Y基团"的字母(例如F1c')指定,并且包括共聚单体的数目和鉴定。在此系统下,其中的X是卵清蛋白,m是2,n是4且Z是N-乙酰基半乳糖胺-2-基的式1a的组合物可以命名为"F1a-OVA-m_2-n_4-2NAcGAL"。其中的X是卵清蛋白,m是2,n是4且Z是N-乙酰基葡糖胺-2-基的式1a的相应的组合物可以命名为"F1a-OVA-m_2-n_4-2NAcGLU"。

[0605] 相似地,式1的以下化合物:

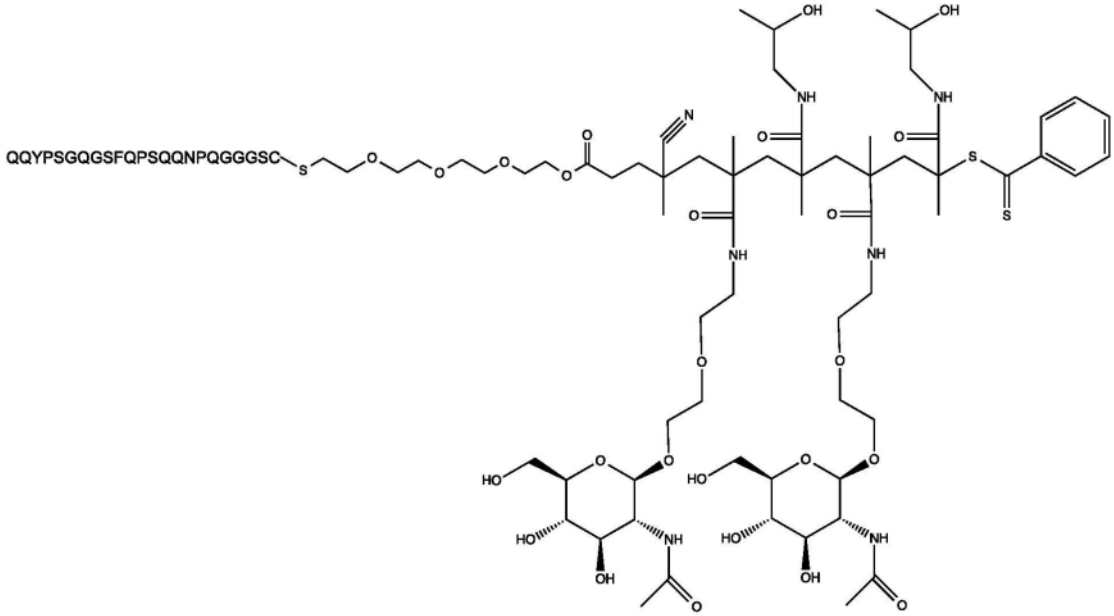
[0606] 

[0607] 可以命名为"2-((2-(((3-(3-(22-((3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16-氰基-16,18-二甲基-13,19-二氧代-18-((苯基碳硫基)硫代)-3,6,9,12-四氧-20-氮杂二十二烷基)-3,9-二氢-8H-二苯并-[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]吖辛因-8-基)-3-氧代丙基)氨基甲酰基)氧基)乙基)二硫烷基)乙基胰岛素羧化物。异构体:

[0608] 

[0609] 可以命名为“2-((2-(((3-(1-(22-(3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16-氰基-16,18-二甲基-13,19-二氧代-18-((苯基碳硫基)硫代)-3,6,9,12-四氧-20-氮杂二十二烷基)-1,9-二氢-8H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]吖辛因-8-基)-3-氧代丙基)氨基甲酰基)-氧基)乙基)二硫烷基)乙基胰岛素羧化物”(加入粗体字突出显示以方便鉴定正式名称之间的差异)。采用适用于本发明的命名系统,这两种异构体可以命名为“F1n-胰岛素m_1-n_1-p_1-q_4-CMP-EtAcN-1NAcGAL”(或““F1n-胰岛素-m_1-n_1-p_1-q_4-CMP-EtAcN-1NAcGLU”,因为对糖环未显示立体化学),其中CMP指示R^8是1-氰基-1-甲基-丙基,EtAcN指示R^9是乙基乙酰氨基,并且1NAcGAL指示“Z”是C1处缀合的N-乙酰基半乳糖胺。指定Z前缺少缩写EtAcN指示R^9为直接键。

[0610] 式1的以下组合物例示了其中的W是共聚物的化合物:

[0611] 

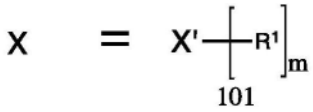
[0612] 并且可以命名为2-(2-(2-(2-(QQYPSGQGSFQPSQQNPQGGGSC-硫烷基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙基6,10-二((2-(2-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙氧基)乙基)氨基甲酰基)-4-氰基-13-((2-羟基丙基)氨基)-8-((2-羟基丙基)氨基甲酰基)-4,6,8,10,12-戊甲基-13-氧代-12-((苯基碳硫基)硫代)三癸酸。采用适合于本发明的命名系统,化合物可以命名为“F1c’-DQ8-相关α麦醇溶蛋白-m_1-n_4-p_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_2$-HPMA$_2$)”。

[0613] 本发明的组合物的制备

[0614] 可以例如通过调整Zhu,L.,等,Bioconjugate Chem.2010,21,2119-2127中描述的方法来制备式1的组合物。下文还参考反应方案1至14描述了式1的一些组合物的合成。其它

的合成方法对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0615] 式101(下面)是X的备选的表示

[0616] 

[0617] 其中R^1是位于X的三维结构上的游离的表面氨基(-NH_2)或硫醇(-SH)部分,从而对于与连接基的缀合是可接近的,并且X'表示除了鉴定的游离氨基基团以外的X的剩余部分[(在反应方案中使用X"来表示排除游离硫醇基团的X的剩余部分]。根据X的特征,将有至少一个(N-末端胺),并可以是多个R^1基团(主要来自赖氨酸残基或未参与二硫键键合的半胱氨酸残基),如由m表示,其是从约1至100,更通常是1或约4至20个,且最通常是1至约10个的整数。

[0618] 在反应方案中使用的变量如以上文定义,并且另外包括以下项,其应当理解为就特定的反应方案或步骤而言,在缺少另外任何特定指示下,具有下列含义。

[0619] ●R^2是OH或保护基团;

[0620] ●R^3为OH、NH_2、NHAc、保护基或NH保护基团;

[0621] ●R^4是OH或保护基团;

[0622] ●R^5是OH或保护基团;

[0623] ●R^6是OH或保护基团;

[0624] ●Z'为在C1或C6处缀合的半乳糖或葡萄糖、在C2处缀合的半乳糖胺或葡糖胺、和在C6处缀合的N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺;

[0625] ●R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)--;和

[0626] ●R^9为直接键并且Z"是在C2处缀合的N-乙酰基半乳糖胺;或

[0627] ●R^9为乙基乙酰氨基基团或PEG化的乙基乙酰氨基基团,且Z"是在C1处缀合的半乳糖、葡萄糖、半乳糖胺、葡糖胺、N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰葡糖胺。

[0628] 合成反应参数

[0629] 术语"溶剂"、"惰性有机溶剂"或"惰性溶剂"指结合本发明描述的反应条件下为惰性的溶剂[包括例如苯、甲苯、乙腈、四氢呋喃("THF")、二甲基甲酰胺("DMF")、氯仿、亚甲基二氯(methylene chloride)(或二氯甲烷)、乙醚、甲醇、吡啶等]。除非相反规定,在本发明的反应中使用的溶剂是惰性有机溶剂。

[0630] 术语"q.s"意指加入足以实现叙述功能的量,例如,以使溶液达到期望的体积(即,100%)。

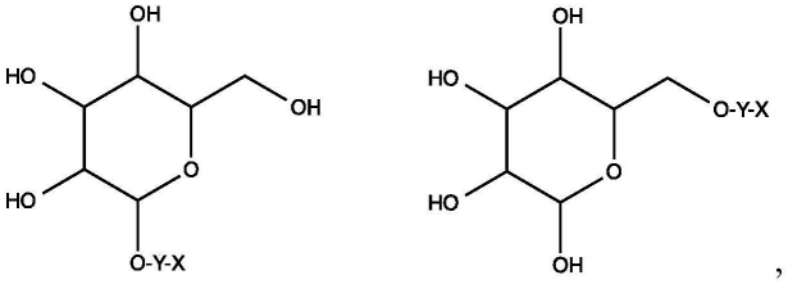
[0631] 根据需要,本发明所述的化合物和中间体的分离和纯化可以通过任何合适的分离或纯化程序进行,诸如例如过滤、萃取、结晶、柱层析、薄层层析或厚层层析、离心尺寸排阻色谱、高效液相色谱、重结晶、升华、快速蛋白液相色谱、凝胶电泳、透析或这些程序的组合。合适的分开和分离程序的具体例示可以参照下文的实施例。然而,当然也可以使用其它等同的分开和分离程序。

[0632] 除非另有规定(包括在实施例中),在标准大气压(约1个大气压)和环境(或室温)(约20℃),在约pH 7.0-8.0下进行所有反应。

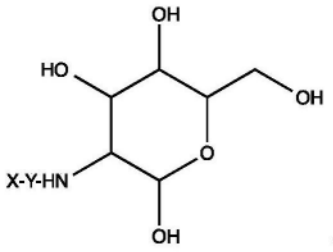
[0633] 可以通过常规手段,例如,质子和碳NMR、质谱法、尺寸排阻色谱、红外光谱法、凝胶

电泳进行反应产物的表征。

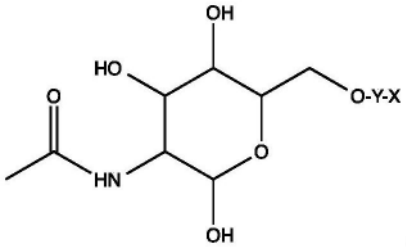
[0634] 反应方案1显示了式1的组合物的制备,其中Z可以是半乳糖、葡萄糖、半乳糖胺、葡糖胺、N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺。在这方面并且如上文所定义,在反应方案1中使用的Z'涵盖在C1和C6处缀合并且对应于根据式1的以下结构的半乳糖或葡萄糖:

[0635] 

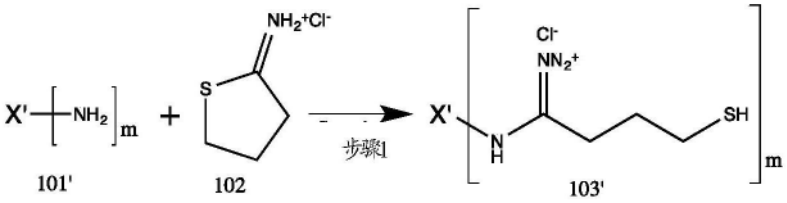
[0636] 在C2处缀合并且对应于根据式1的以下结构的半乳糖胺或葡糖胺:

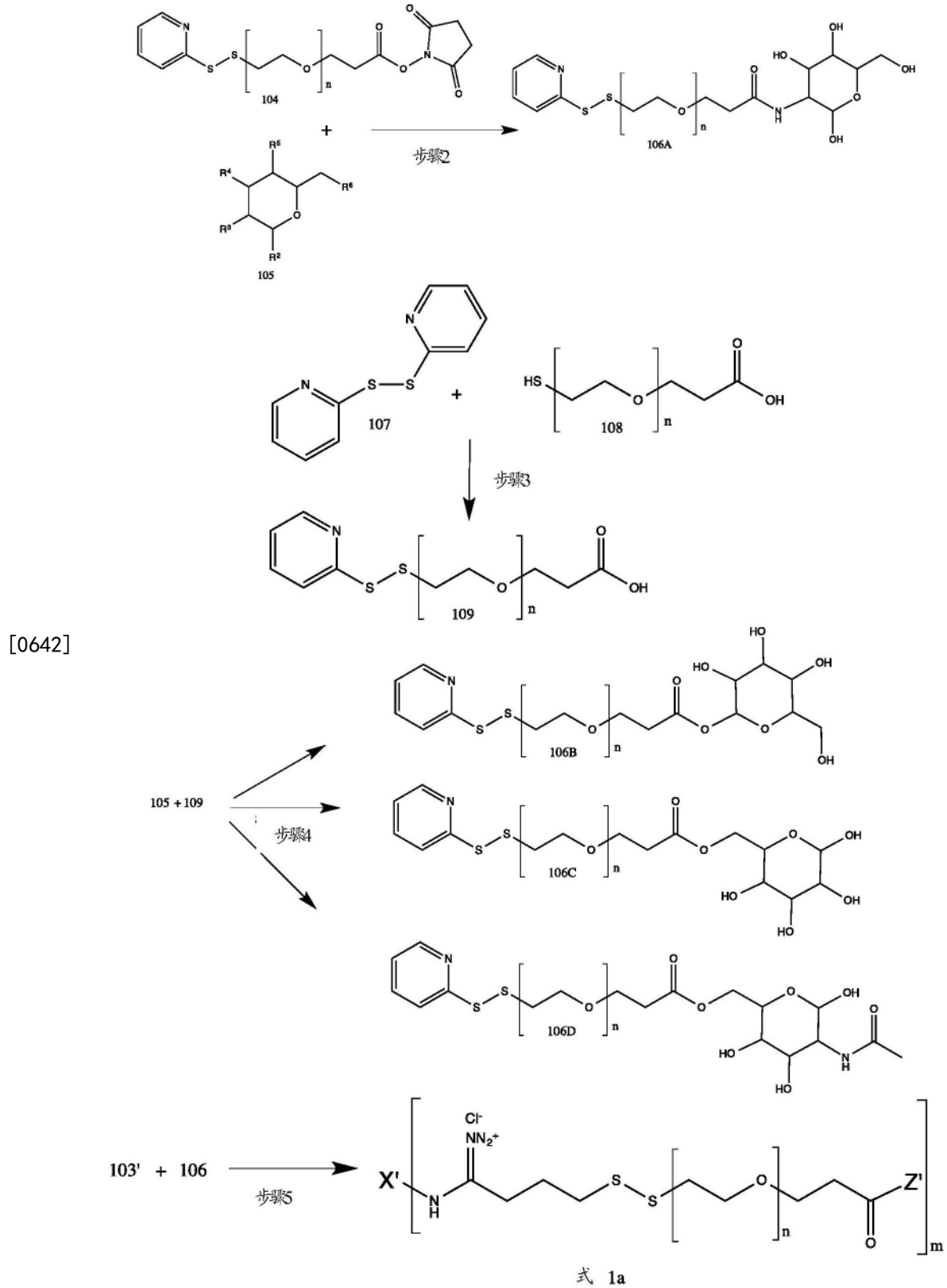
[0637] 

[0638] 和在C6处缀合并且对应于根据式1的以下结构的N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺:

[0639] 

[0640] 反应方案1

[0641] 

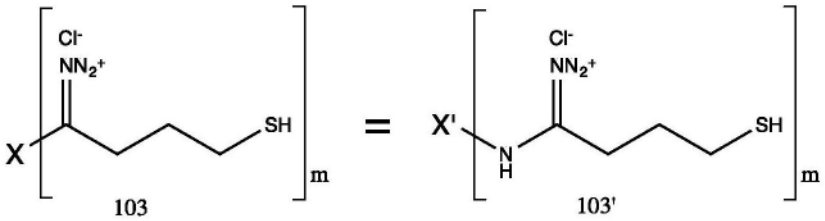


式 1a

[0642]

[0643] 如上文在反应方案1,步骤1中所示,可以如下在具有游离的表面氨基的抗原、抗体、抗体片段或配体(式101')上产生表面硫醇基团:通过在pH约8.0与Traut试剂(式102)接触约1小时以获得式103',从中除去未反应的Traut试剂,例如,通过离心尺寸排阻色谱。如下所示的两种结构显示出了反应方案1,步骤1的产物,其分别显示最初在X上发现的游离表

面氨基(即式103',其中X'表示除了鉴定的游离表面氨基以外的X的剩余部分)并且省略游离的表面氨基(即,式103)。这使如X和式101之间显示的区别平行。在随后的反应方案中紧接着是转化。

[0644] 

[0645] 在反应方案1,步骤2中,使吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(式104)与半乳糖胺或葡糖胺(式105,其中R^3是NH_2,且R^2,R^4,R^5和R^6是OH)在搅拌的情况下在约pH 8接触约1小时,以获得式106A的相应的吡啶基二硫醇聚(乙二醇)-糖,其可以在无需进一步纯化的情况下使用。

[0646] 在反应方案1,步骤3中,使4,4'-二硫代二吡啶(式107)与硫醇聚(乙二醇)丙酸(式108)接触,以获得相应的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)丙酸(式109)。

[0647] 在反应方案1,步骤4中,使式109的酸与式105的被保护的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺接触,以获得式106B、106C和106D的相应的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-糖,其可以在脱保护后使用,在所述式105中,R^2为OH,且R^3、R^4、R^5和R^6是保护基("PG"),其中R^6为OH且R^2、R^3、R^4、R^5和R^6是PG,或其中R^6是N-乙酰基且R^2、R^3、R^4和R^5是PG。

[0648] 在反应方案1,步骤5中,对步骤1的产物(式103')的搅拌溶液加入过量(对应于m的值)的步骤2或步骤4的产物(式106,即106A、106B、106C或106D)达约1小时,随后通过离心尺寸排阻色谱除去任何游离的剩余反应物,从而产生根据式1a,分别是式1aA、式1aB、式1aC和式1aD的相应的产物。

[0649] 对于采用根据式106A-D的中间体制备的产物,对应于式1a的组合物可以分别例如如下命名:

[0650] "F1aA-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-2NGAL"

[0651] "F1aB-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-1GAL"

[0652] "F1aC-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-6GAL"

[0653] "F1aD-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-6NAcGAL"

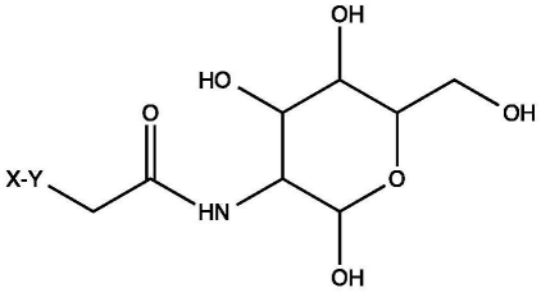
[0654] "F1aA-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-2NGLU"

[0655] "F1aB-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-1GLU"

[0656] "F1aC-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-6GLU"

[0657] "F1aD-X'-m_m-n_n"或"F1a-X'-m_m-n_n-6NAcGLU"。

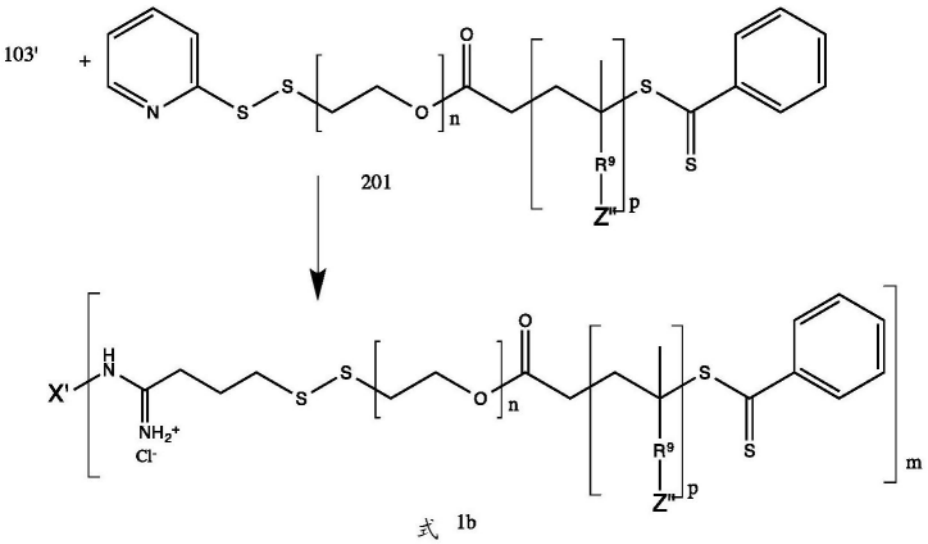
[0658] 反应方案2-14显示了化合物的制备,其中W是相同W^1基团的聚合物。对于本发明采用的命名法的目的,除非另有明确声明,Z"指在C2处缀合的N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺:

[0659] 

[0660] 或指在C1处缀合的半乳糖、葡萄糖、半乳糖胺、葡糖胺、N-乙酰基半乳糖胺或N-乙酰基葡糖胺。应当注意,根据一些实施方案,为了改善收率,在合成过程中可以保护C1缀合的组合物,例如通过用C3羟基环化胺,并且在受保护的半乳糖胺掺入到连接基的相邻部分中后脱保护。

[0661] 可以通过使半乳糖或葡萄糖甲基丙烯酸酯化来制备式201、401、501、601、701、803和1401的聚(半乳糖甲基丙烯酸酯)和聚(葡萄糖甲基丙烯酸酯)反应物,例如,使半乳糖胺或葡糖胺和甲基丙烯酸酐接触,接着在合适的溶剂中在偶氮二异丁腈(AIBN)的存在下用相应RAFT试剂进行可逆加成-断裂链转移(reversible addition-fragmentation chain transfer)(RAFT)聚合,从冷冻-解冻循环起始,然后在约60-80℃、优选70℃加热约5-8小时,优选约6小时。可以在低级链烷醇,优选甲醇中沉淀聚合物。

[0662] 反应方案2

[0663] 

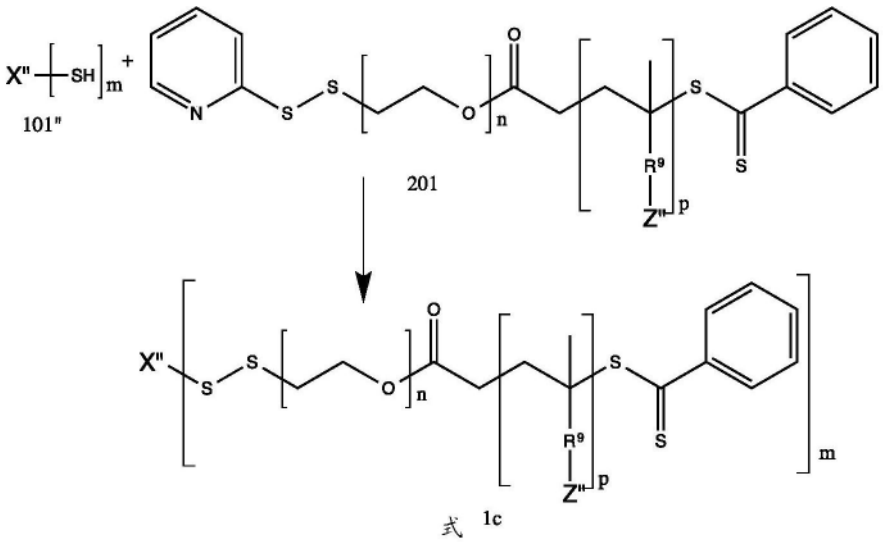
式 1b

[0664] 如反应方案2中所示,使例如如参考反应方案1,步骤1所述制备的具有游离表面硫醇基团的抗原、抗体、抗体片段或配体(式103')与过量(对应于m值)的式201的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接触约1小时,以产生根据式1b的相应的产物。

[0665] 式1b中的组合物可以如下命名:“F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL”、“F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGLU”或“F1b-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z”。例如,其中X'是尿酸酶,m是1,n是4,p是4,并且Z”是在C2处缀合的N-乙酰基半乳糖胺的式1b的组合物可以命名为“F1b-尿酸酶-m_1-n_4-p_4-2NAcGAL”或“30-(尿酸酶)-3,5,7,9-四甲基-12-氧代-1-苯基-硫代(thioxo)-3,5,7,9-四((2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基甲酰基)-13,16,19,22-四氧-2,25,26-三硫代三十烷-30-亚胺离子(iminium)”。

[0666] 反应方案3

[0667]



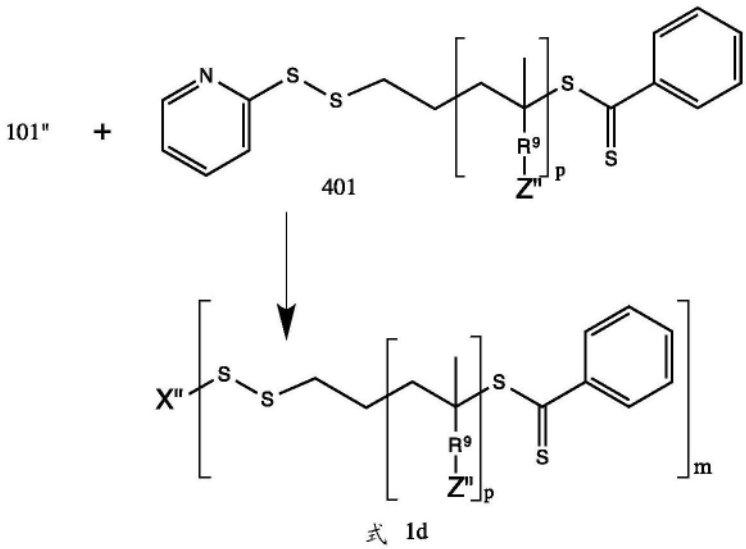
式 1c

[0668] 如反应方案3中所示,将具有天然的游离表面硫醇基团(半胱氨酸)的抗原、抗体、抗体片段或配体[式101",对应于式101并且显示其中"X",如该术语将随后使用的那样,表示出了鉴定的游离表面硫醇以外的X]与过量(对应于m值)的式201的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接触,以产生根据式1c的相应产物。

[0669] 对应于式1c的组合物可以如下命名:"F1c-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL"、"F1c-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGLU"或"F1c-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z"。

[0670] 反应方案4

[0671]

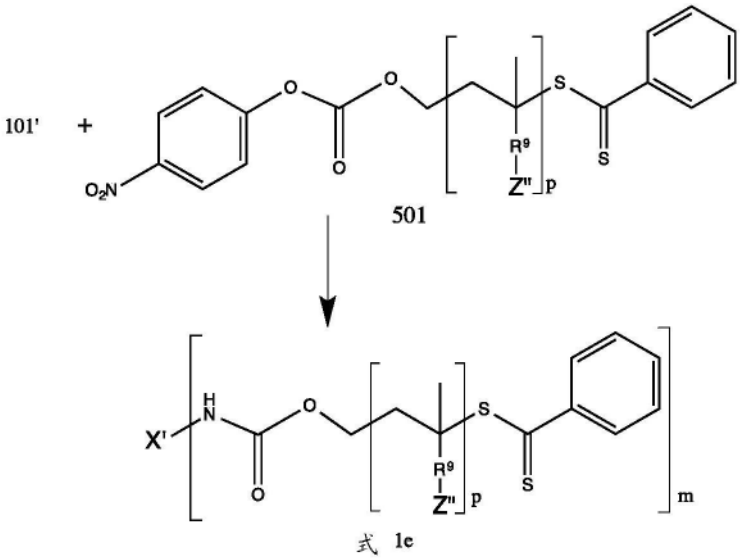


式 1d

[0672] 如反应方案4中所示,将式101"的具有天然的游离表面硫醇基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式401的吡啶基二硫醇接触,以产生根据式1d的相应产物。

[0673] 对应于式1d的组合物可以如下命名:"F1d-X'-m_m-p_p-2NAcGAL"、"F1d-X'-m_m-p_p-2NAcGLU"或"F1d-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z"。

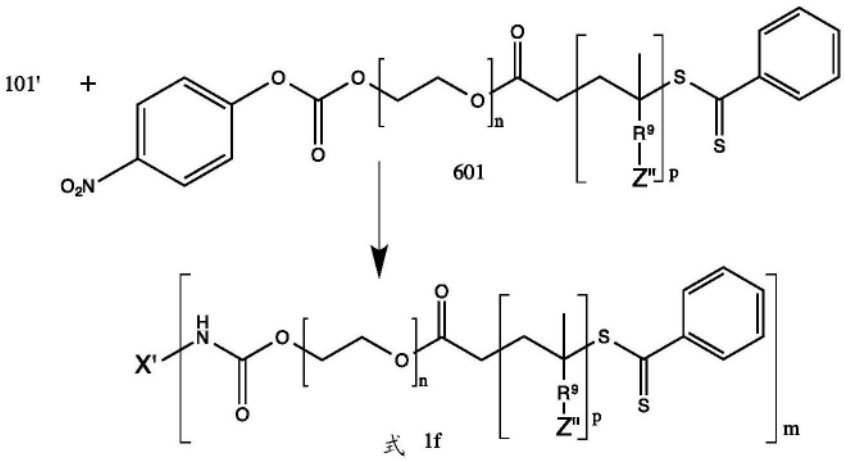
[0674] 反应方案5

[0675] 

[0676] 如反应方案5中所示,将具有式101'的天然的游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式501的n-硝基苯基碳酸酯接触,以产生根据式1e的相应产物。

[0677] 对应于式1e的组合物可以如下命名:"F1e-X'-m_m-p_p-2NAcGAL""F1e-X'-m_m-p_p-2NAcGLU"或"F1e-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z"。

[0678] 反应方案6

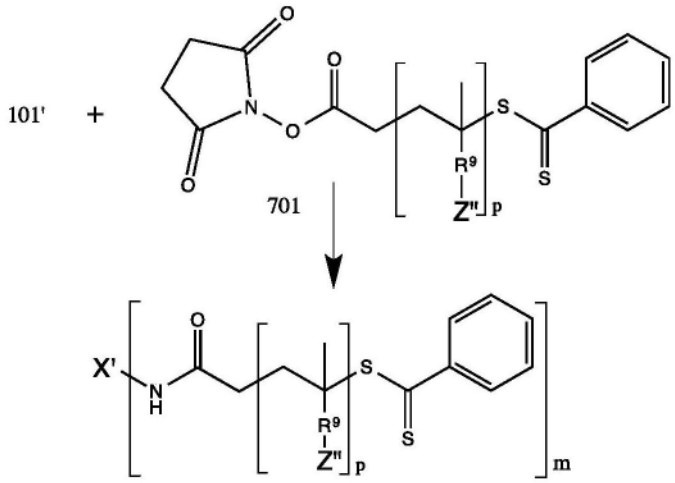
[0679] 

[0680] 如反应方案6中所示,将式101'的具有天然的游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式601的n-硝基苯基碳酸酯聚(乙二醇)酯接触,以产生根据式1f的相应产物。

[0681] 对应于式1f的组合物可以如下命名:"F1f-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL"、"F1f-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGLU"或"F1f-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z"。

[0682] 反应方案7

[0683]



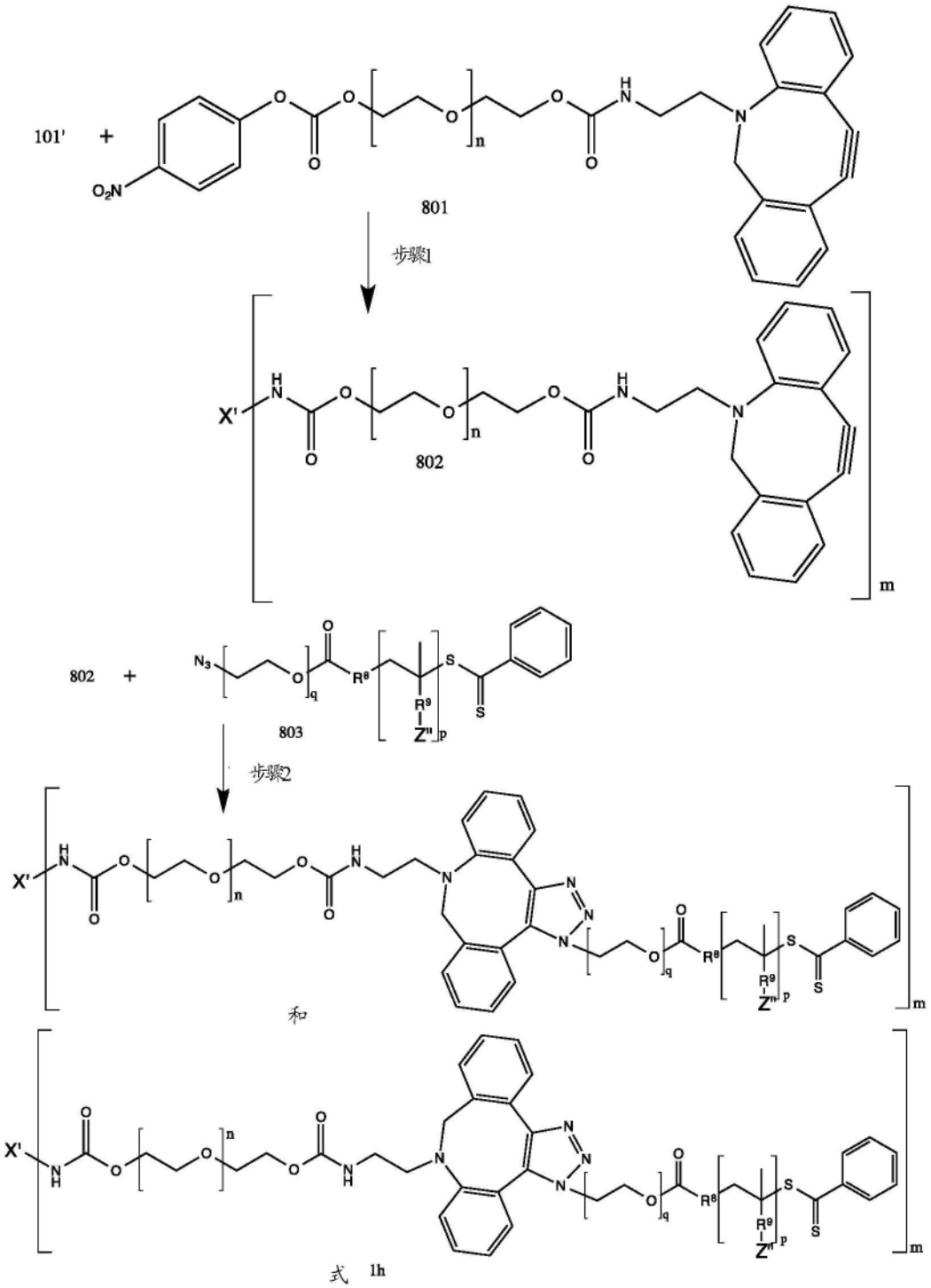
式 1g

[0684] 如反应方案7中所示,将式101'的具有天然的游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式701的NHS酯聚(乙二醇)酯接触,以产生根据式1g的相应产物。

[0685] 对应于式1g的组合物可以如下命名:“F1g-X'-m_m-p_p-2NAcGAL”、“F1g-X'-m_m-p_p-2NAcGLU”或“F1g-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z”。

[0686] 反应方案8

[0687]



[0688] 如反应方案8,步骤1中所示,将式101'的具有天然的游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式801的用于Click化学的胺反应性连接基接触,以产生根据式802的相应产物。

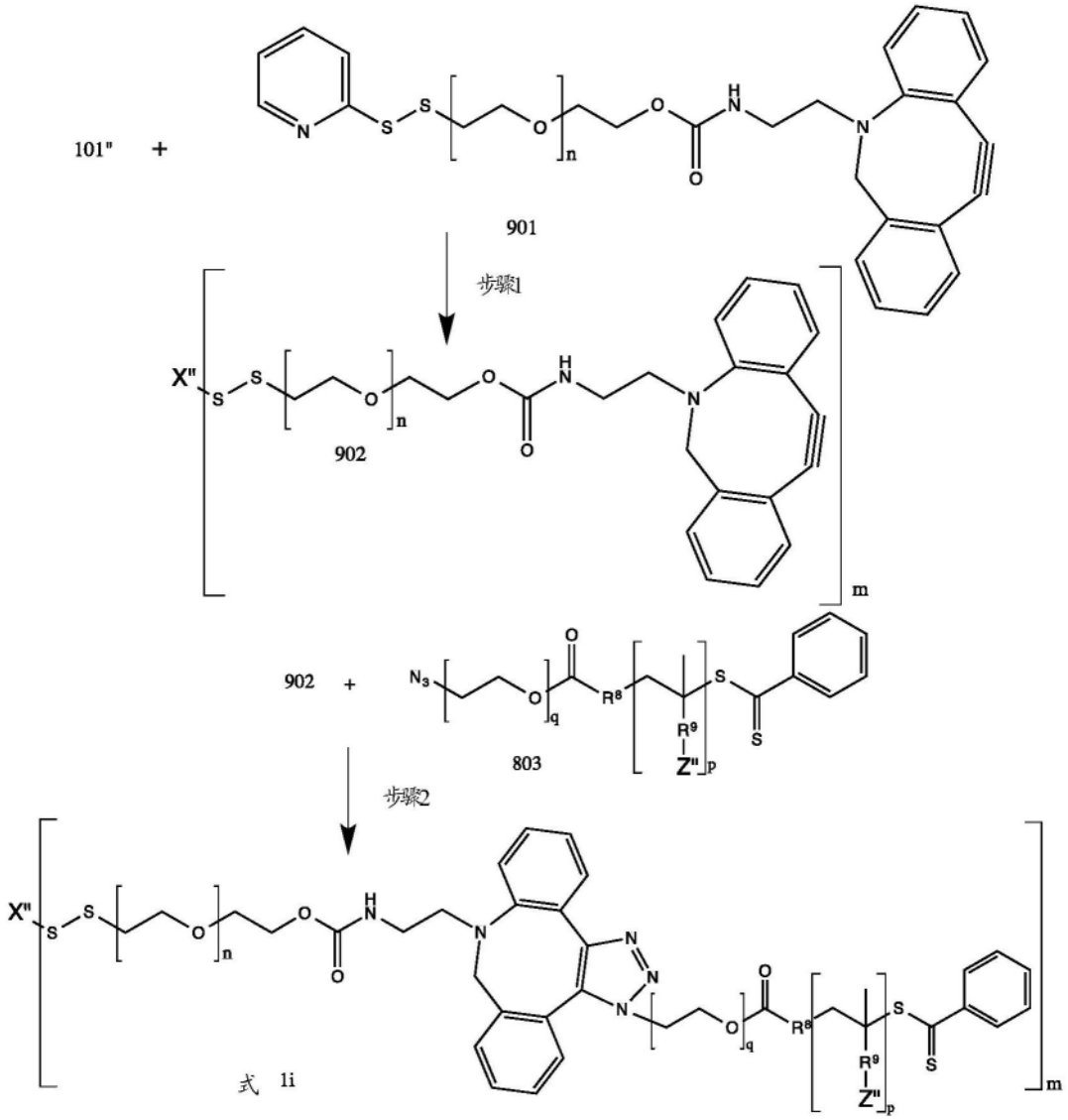
[0689] 在反应方案8,步骤2中,然后将式802的产物与当量(再次对应于m值)的式803的半乳糖(胺)聚合物接触,以产生根据式1h的相应的异构体产物。上面显示的两种异构体是由式803的叠氮化物与式802的三键的非特异性环化产生的。此类非特异性环化在其中Y选自式Yh到Yn的其它组合物的合成中发生,但不会在每种情况下显示。

[0690] 对应于式1h的组合物可以如下命名:

[0691] “F1h-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”、“F1h-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU”或“F1h-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

[0692] 反应方案9

[0693]



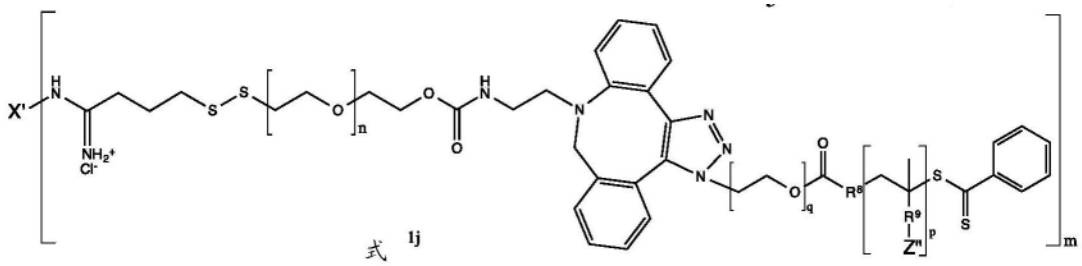
[0694] 如反应方案9,步骤1中所示,将式101”的具有天然的游离的表面硫醇基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式901的用于Click化学的硫醇反应性连接基接触,以产生根据式902”的相应产物。

[0695] 在反应方案9,步骤2中,然后将式902”的产物与当量的(再次对应于m值)式803的半乳糖(胺)聚合物接触,以产生根据式1i的相应的异构体产物。

[0696] 对应于式1i的组合物可以如下命名:

[0697] “F1i-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”“F1i-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU”或“F1i-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

[0698] 通过遵循反应方案9描述的程序,但用式103’(用Traut试剂衍生化)的化合物替换起始材料101”,获得了对应于如下显示的式1j的相应的异构体产物。

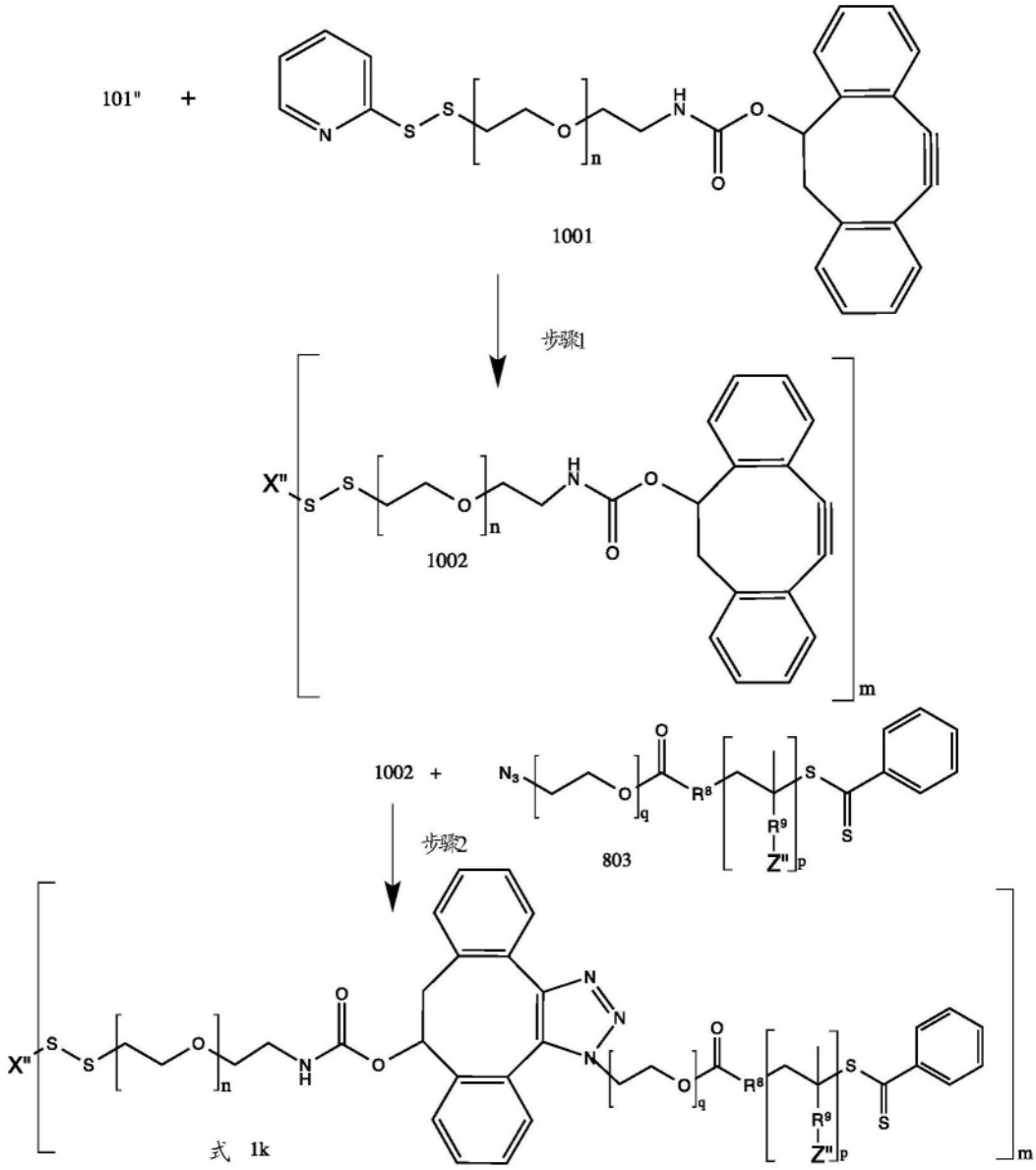
[0699] 

式 1j

[0700] 对应于式1j的组合物可以如下命名:

[0701] “F1j-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”、“F1j-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU”或“F1j-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

[0702] 反应方案10

[0703] 

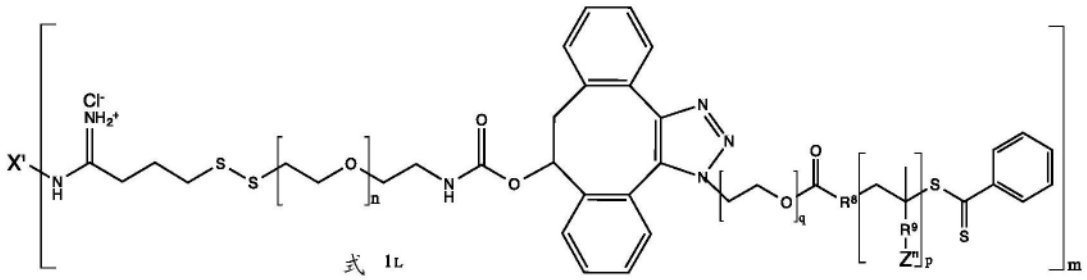
[0704] 如反应方案10,步骤1中所示,将具有式101”的天然的游离的表面硫醇基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式1001的用于Click化学的硫醇反应性连接基接触,以产生根据式1002的相应产物。

[0705] 在反应方案10,步骤2中,然后将式1002的产物与当量(再次对应于m值)式803的半

乳糖(胺)聚合物接触,以产生根据式1k的相应的异构体产物。

[0706] 对应于式1k的组合物可以如下命名:“F1k-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”、“F1k-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU”或“F1k-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

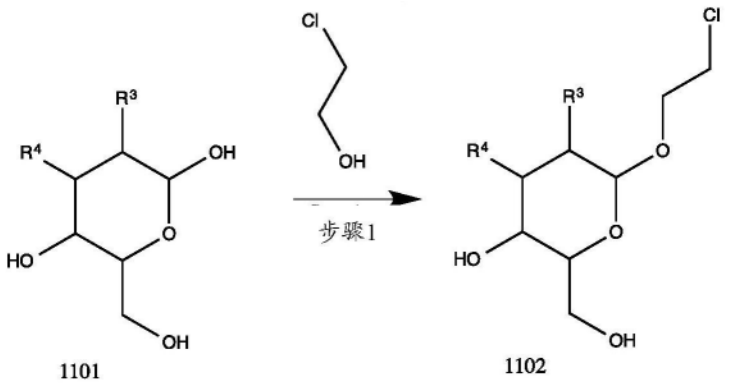
[0707] 通过遵循反应方案10描述的程序,但用式103’(用Traut试剂衍生化)的化合物替换起始材料101”,获得了对应于如下文显示的式1L的相应的异构体产物。

[0708] 

式 1L

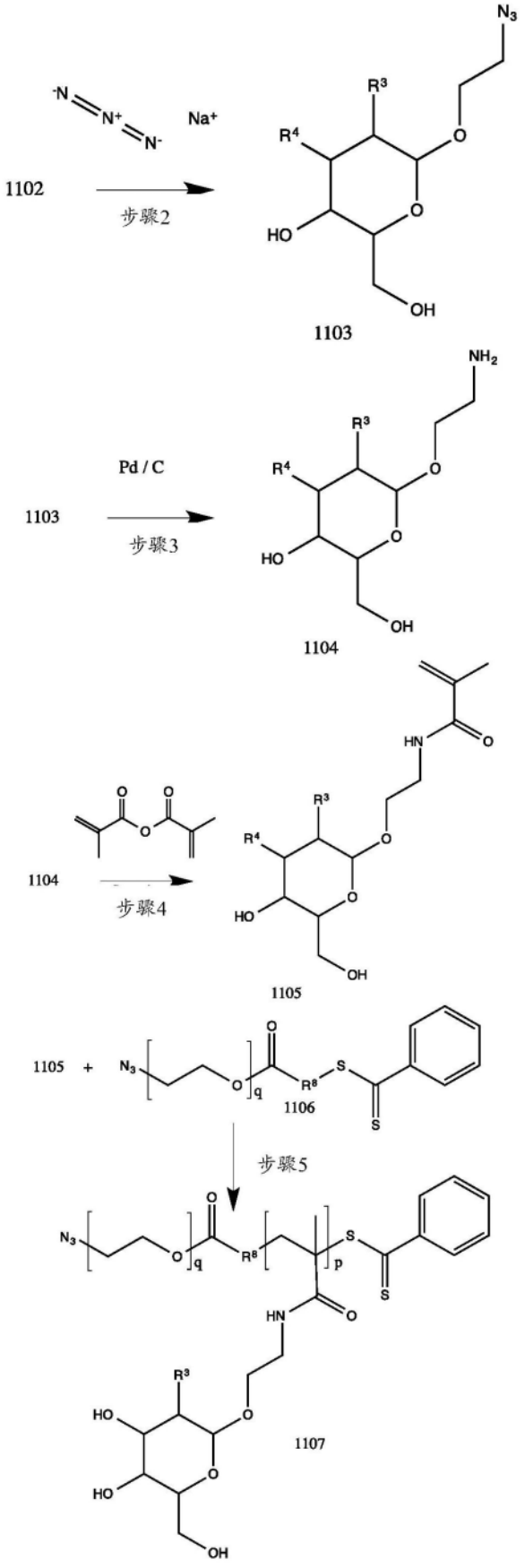
[0709] 对应于式1L的组合物可以如下命名:“$F1_L$-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”、“$F1_L$-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU”或“$F1_L$-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

[0710] 反应方案11

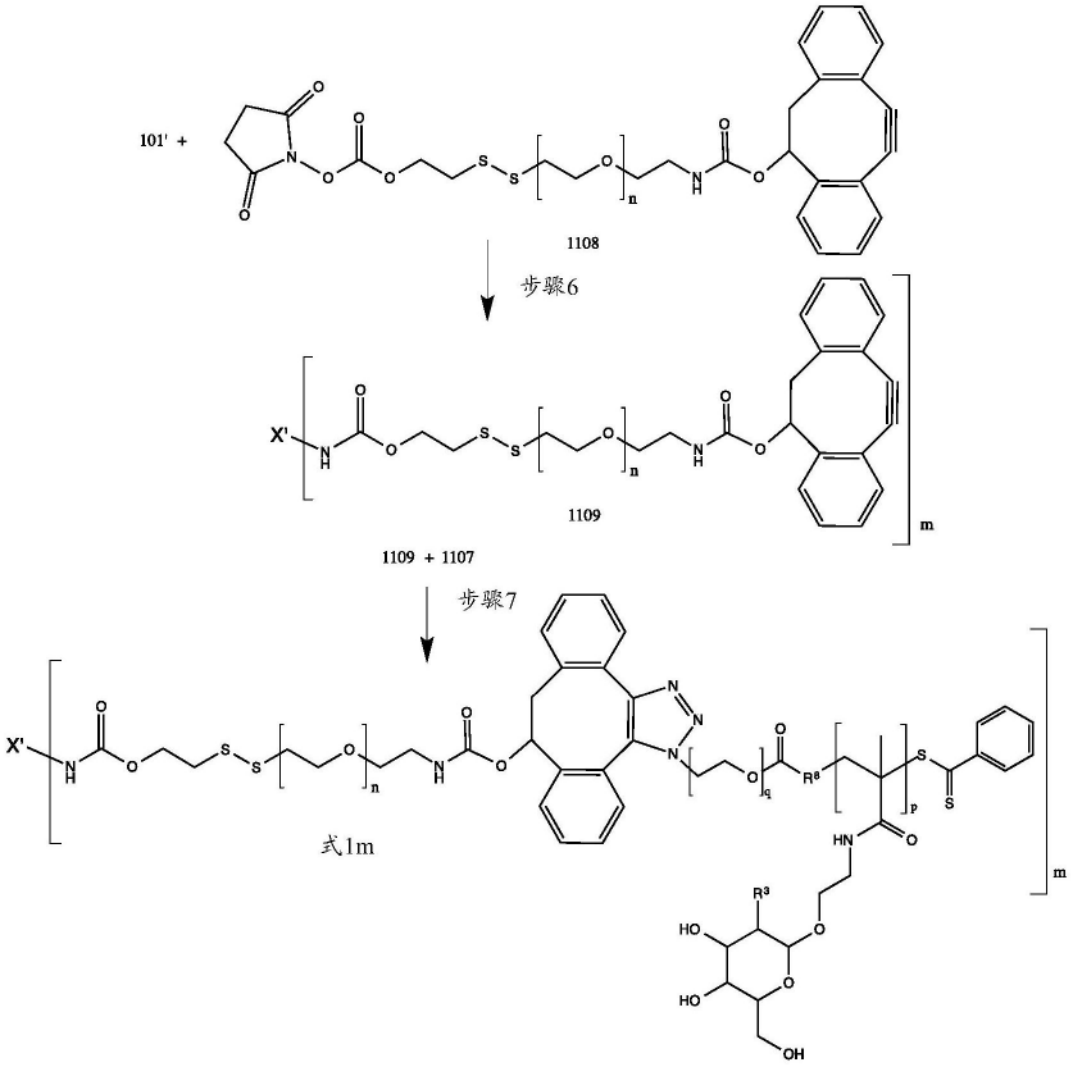
[0711] 

1101 1102

[0712]


N3
Na+
R3
R4
O
HO
OH
1102
步骤2
1103
NH2
Pd / C
1103
步骤3
1104
HN
1104
步骤4
1105
1105 +
1106
步骤5
1107

[0713]



[0714] 如反应方案11,步骤1中所示,半乳糖、受保护的半乳糖胺或N-乙酰基-D-半乳糖胺(式1101,其中分别地,R^3和R^4是OH,R^3是NH保护基(例如,与R^4一起环化),或R^3是NHAc且R^4是OH)与2-氯乙-1-醇接触,随后冷却并逐滴添加乙酰氯。将溶液温热至室温,然后加热至70℃达数小时。将乙醇加入粗产物,并且将所得的溶液在碳的存在下搅拌,然后过滤,随后除去溶剂,以产生式1102的相应的产物。

[0715] 如反应方案11,步骤2中所示,将式1102的产物加入过量的叠氮化钠,并加热至90℃达数小时,然后过滤,随后除去溶剂,以产生式1103的相应的产物。

[0716] 如反应方案11,步骤3中所示,将式1103的产物加入钯碳(palladium on carbon)和乙醇的溶液,并在氢气(3atm)下搅拌数小时,然后过滤,随后除去溶剂,以产生式1104的相应的产物。

[0717] 如反应方案11,步骤4中所示,将式1104的产物加入甲基丙烯酸酐(methacrylate anhydride)的溶液中。加入三乙胺,并且将反应搅拌2小时,然后除去溶剂并分离以产生式1105的相应的产物。

[0718] 如反应方案11,步骤5中所示,将叠氮化物修饰的uRAFT剂(式1106)与偶氮二异丁腈一起加入式1105的产物的溶液,进行4次冷冻解冻泵循环(free-pump-thaw cycle),然后在70℃搅拌。数小时后,通过加入低级链烷醇沉淀式1107的相应的聚合物产物,随后除去溶

剂。在R^3是NH保护基团(例如,与R^4一起环化)的情况下,在此点时除去保护基团。

[0719] 如反应方案11,步骤6中所示,将具有式101'的天然游离表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体添加至pH 8.0的缓冲液,并在搅拌下与过量的(对应于m值)式1108的二氧代吡咯烷接触。1小时后,除去未反应的式1108,并且在无进一步纯化的情况下使用所得的式1109的产物。

[0720] 如反应方案11,步骤7中所示,将式1107的产物加入pH 8.0的缓冲液,对所述缓冲液加入式1109的产物。搅拌2小时后,除去过量的式1107,以产生式1m的相应的异构体产物。

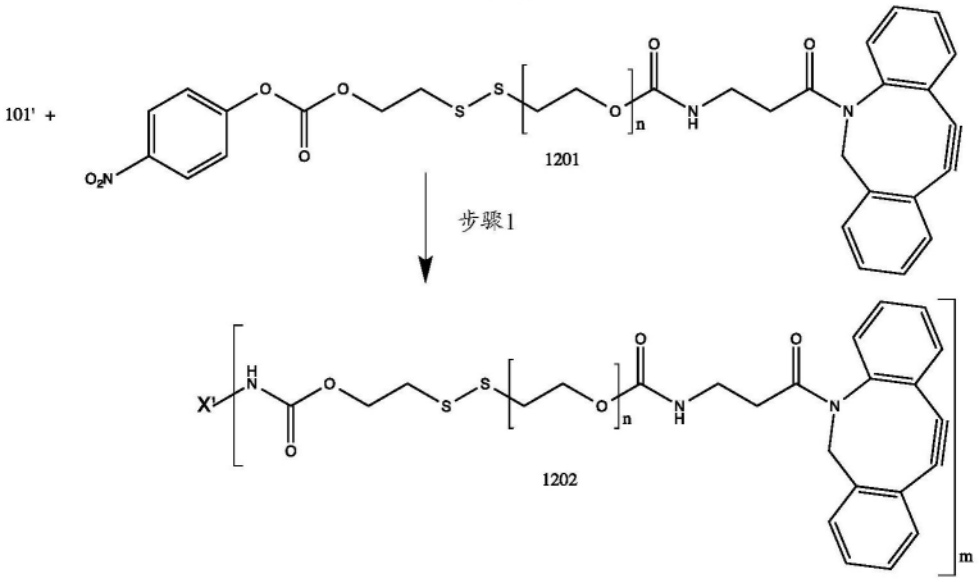
[0721] 通过用N-(2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)甲基丙烯酰胺替换步骤5中的式1105的产物并继续步骤6和7,获得式1m的相应的异构体产物,其中Z"是在C2处缀合的N-乙酰基半乳糖胺。

[0722] 对应于式1m的组合物可以如下命名:

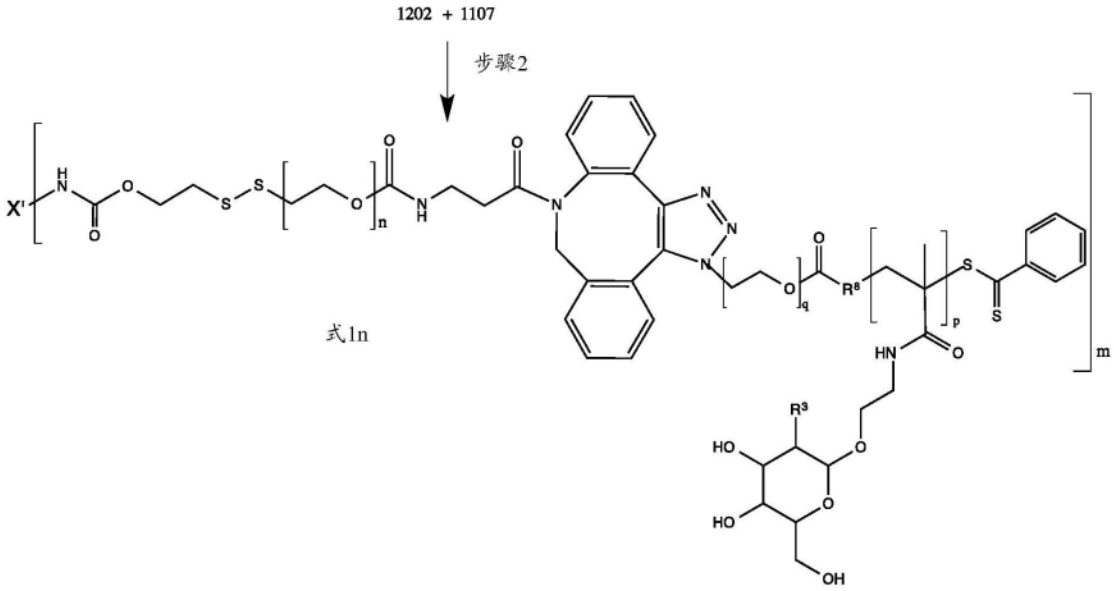
[0723] "F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z",其中Z"是1GAL、1NGAL、1NAcGAL、"F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL"或"F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU"(或相应的1GAL、1GLU、1NGAL、1NGLU、1NAcGAL或1NAcGLU化合物)。

[0724] 反应方案12

[0725]



[0726]



[0727] 由于使用有机溶剂,反应方案12的合成方法特别适合于疏水性抗原、抗体、抗体片段和配体(例如,胰岛素)。

[0728] 如反应方案12,步骤1中所示,将式101'的具有天然的游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体溶解于含有三乙胺的有机溶剂(例如,DMF)中。对此加入一定量(对应于m值)式1201的化合物,之后搅拌,并加入叔丁基甲基醚。式1202的相应的产物作为沉淀物回收。

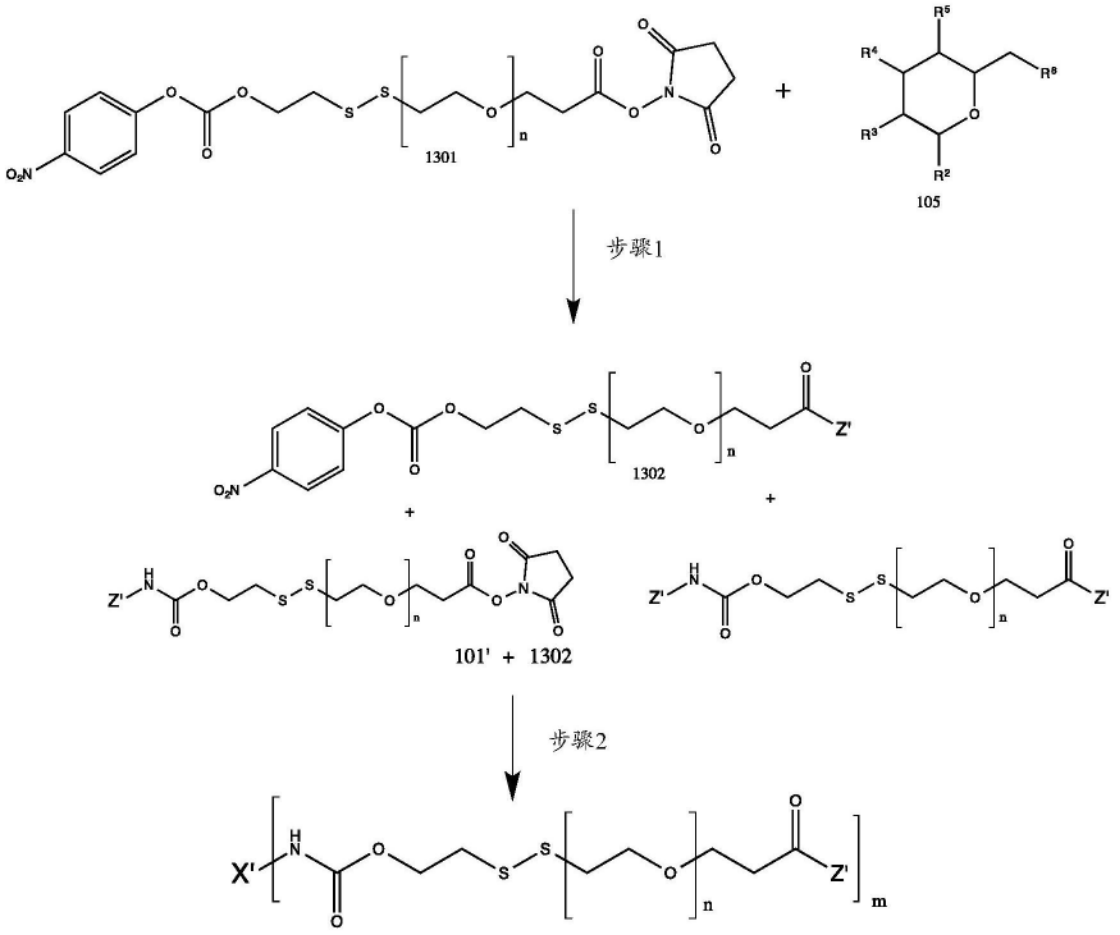
[0729] 使式1202的产物重悬在有机溶剂中,并且加入一定量的(对应于m值)式1107(例如,如参照反应方案11描述的那样获得),然后搅拌。通过加入二氯甲烷沉淀反应产物,然后过滤并除去溶剂。纯化(例如,重悬在PBS中),随后通过离心尺寸排阻色谱产生式1n的相应的异构体产物。

[0730] 可以如下命名对应于式1n的组合物:

[0731] "F1n-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z",其中Z"是1GAL、1NGAL、1NAcGAL、1GLU、1NGLU、1NAcGLU、或"F1m-X'-n_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL"或"F1m-X'-n_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGLU"。

[0732] 反应方案13

[0733]



式1o

[0734] 在反应方案13,步骤1中,使硝基苯氧基羰基-氧烷基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(式1301)与半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺(式105)接触,以获得式1302的对应产物连同其它两种所示的产物,从中分离式1302的期望的硝基苯氧基羰基二硫醇-聚(乙二醇)羧乙基半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺,之后进行后面的步骤。

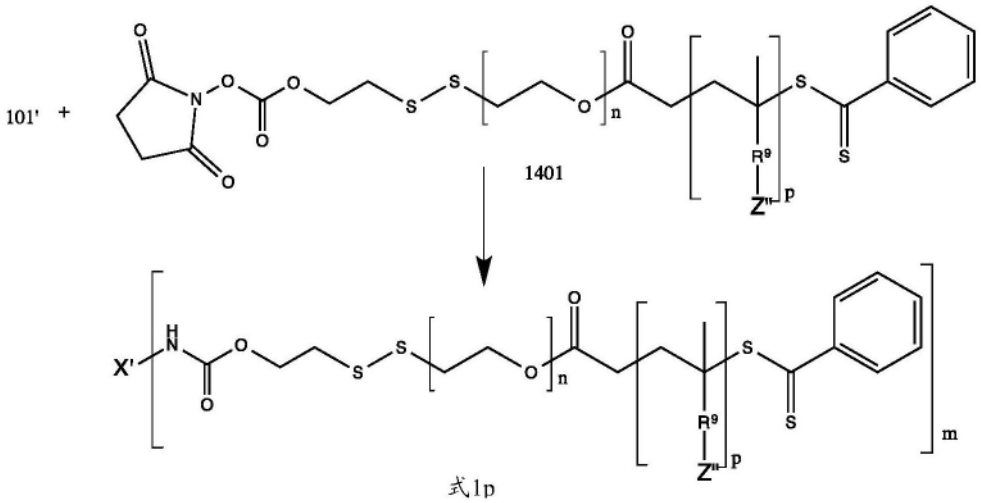
[0735] 如反应方案13,步骤2中所示,可以通过式101'的具有游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体与过量(对应于m值)的式1302的产物接触,以产生根据式1o的相应的产物。

[0736] 对应于式1o的组合物可以如下命名:

[0737] "F1o-X'-m_m-n_n-Z'"。

[0738] 反应方案14

[0739]



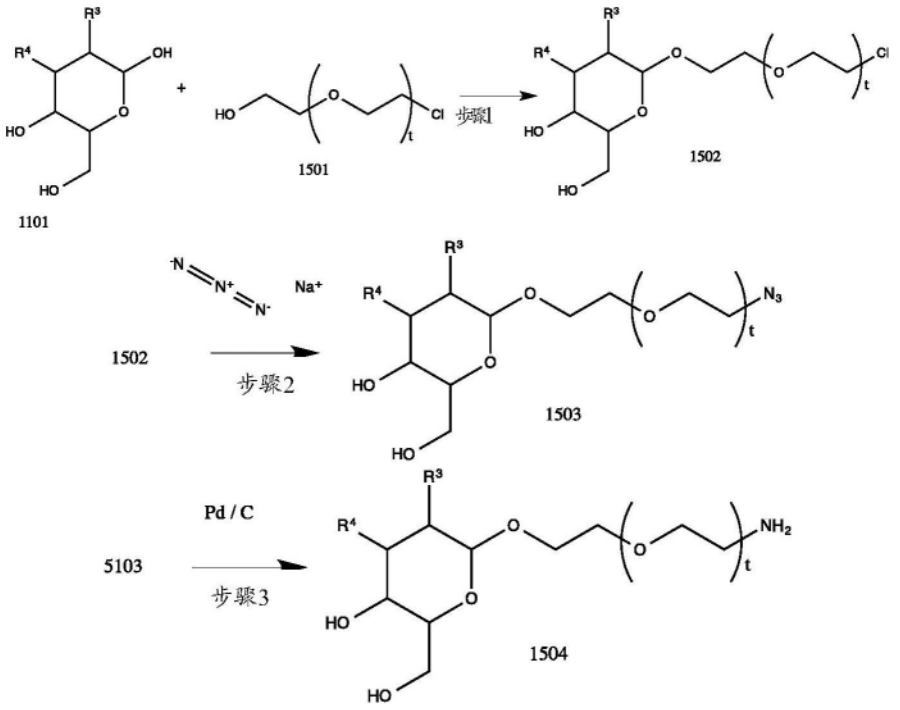
[0740] 如反应方案14中所示,使具有游离的表面氨基基团的抗原、抗体、抗体片段或配体(式101')与过量(对应于m值)的式1401的吡啶基-二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯接触,以产生根据式1p的相应的产物。

[0741] 对应于式1p的组合物可以如下命名:"F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL"、"F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGLU"或"F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z"。

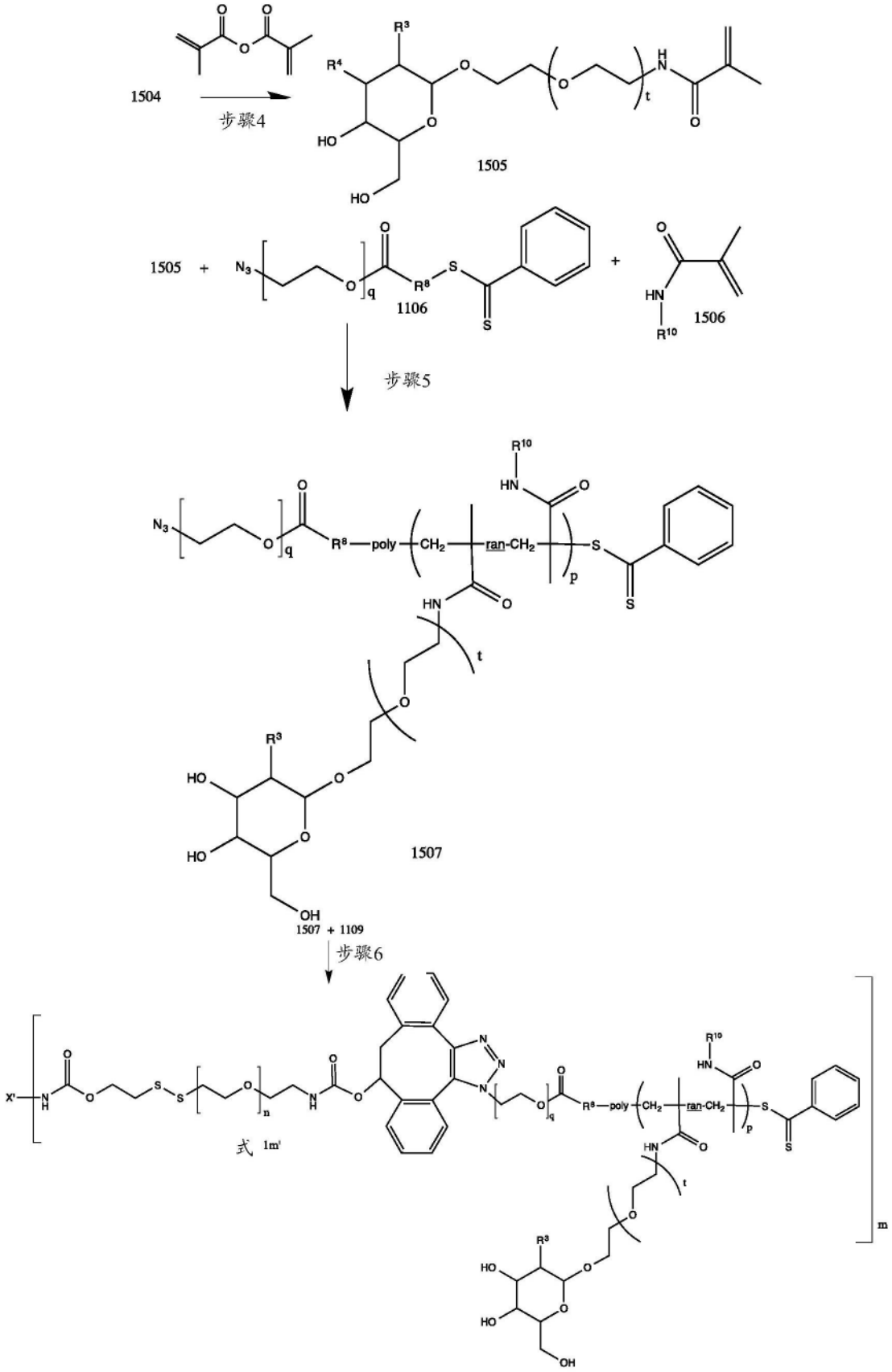
[0742] 反应方案15-18显示了化合物的制备,其中W是相同或不同W^1和W^2基团的共聚物。

[0743] 反应方案15

[0744]



[0745]



[0746] 如反应方案15,步骤1中所示,使半乳糖或葡萄糖(式1101,其中R^3和R^4是OH)、受保护的半乳糖胺或受保护的葡糖胺(式1101,其中R^3是NH保护基团,例如与R^4一起环化)或N-乙酰基-D-半乳糖胺或N-乙酰基-D-葡糖胺(式1101,其中R^3是NHAc并且R^4是OH)与式1501(其中

t是1至5)的2-(聚-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙-1-醇接触,接着冷却并且逐滴添加乙酰氯。将溶液温热至室温,然后加热至70℃达数小时。将乙醇加入粗产物,并且将所得的溶液在碳的存在下搅拌,然后过滤,随后除去溶剂,以产生式1502的相应的产物。

[0747] 如反应方案15,步骤2中所示,将式1502的产物加入过量的叠氮化钠,并加热至90℃达数小时,然后过滤,随后除去溶剂,以产生式1503的相应的产物。

[0748] 如反应方案15,步骤3中所示,将式1503的产物加入钯碳和乙醇的溶液,并在氢气(3atm)下搅拌数小时,然后过滤,随后除去溶剂,以产生式1504的相应的产物。

[0749] 如反应方案15,步骤4中所示,将式1504的产物加入甲基丙烯酸酐的溶液中。加入三乙胺,并且将反应物搅拌2小时,然后除去溶剂并分离以产生式1505的相应的产物。或者,可以使用五氟苯基甲基丙烯酸酯(或另一种丙烯酸化剂(acrylating agent))来制备式1505的相应产物。在一些实施方案中,将式1504的产物加入DMF中。加入三乙胺(例如有机碱)并将混合物冷却(例如使用冰浴至4℃)。随后,加入五氟苯基甲基丙烯酸酯(或另一种丙烯酸化剂)(例如,在不断搅拌下滴加)。一段时间(例如30分钟)后,除去冷却(例如冰浴),并使反应物在室温下搅拌一段时间(例如4小时)。在一些实施方案中,然后除去溶剂。在一些实施方案中,使用快速层析纯化产物。

[0750] 如反应方案15,步骤5中所示,将式1106的叠氮化物修饰的uRAFT剂和式1506的甲基丙烯酰胺与偶氮二异丁腈一起加入式1505的产物的溶液,进行4次冷冻解冻泵循环,然后在70℃搅拌。数小时后,通过加入低级链烷醇或丙酮沉淀式1507的相应的无规共聚物产物,随后除去溶剂。在R^3是NH保护基团(例如,与R^4一起环化)的情况下,在此点时除去保护基团。

[0751] 如反应方案15,步骤6中所示,将式1507的产物添加至pH 8.0的缓冲液,对其加入式1109的产物(例如,如参考反应方案11所述的那样制备)。在搅拌2小时后,除去过量的式1109以产生式1m'的相应异构体无规共聚物产物。

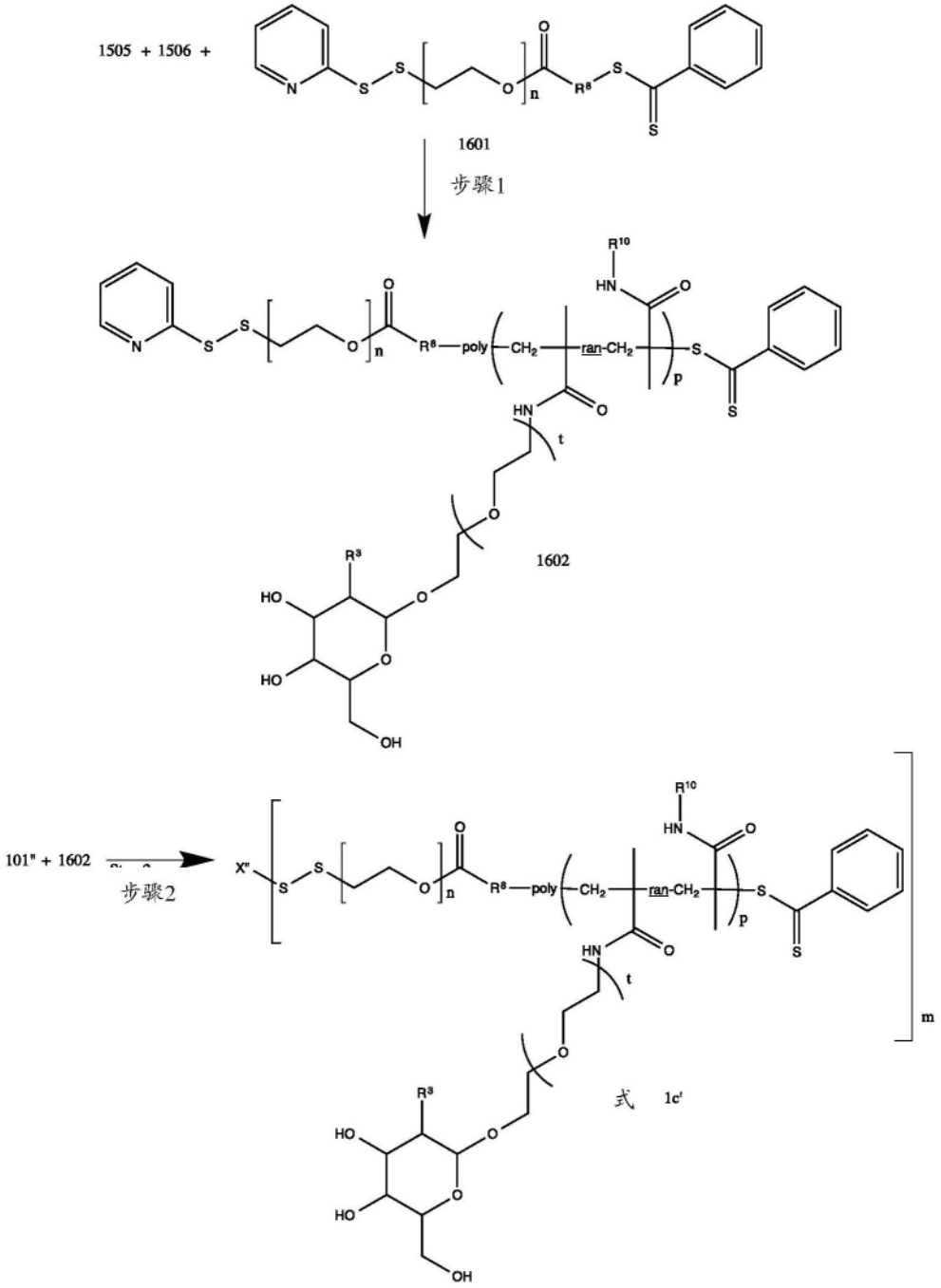
[0752] 通过添加步骤5中式1505的超过一种甲基丙烯酰胺(例如,葡萄糖和半乳糖甲基丙烯酰胺,或者两种或更多种具有不同t值的甲基丙烯酰胺)和/或式1506的两种或更多种甲基丙烯酰胺,并且继续步骤6,获得具有R^3和/或PEG("t")和/或R^{10}基团的混合物的式1m'的相应产物,即,式1的化合物,其中W是不同W^1和W^2基团的无规共聚物。

[0753] 对应于式1m'的组合物可以如下命名:

[0754] "F1m'-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-R^8-聚-($W^1{}_t$Z"$_{W1p}$-ran-$W^2{}_{W2p}$)"。

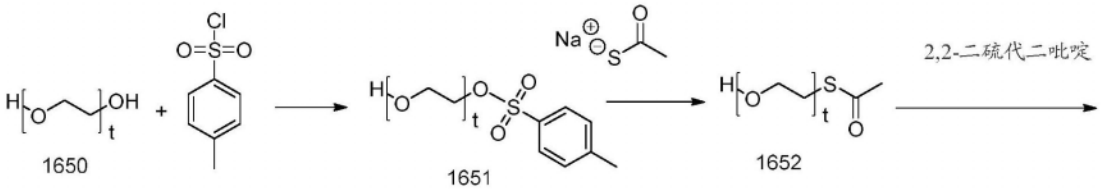
[0755] 反应方案16

[0756]

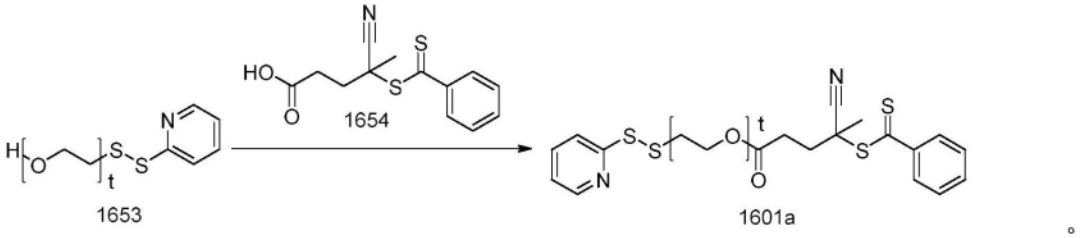


[0757] 如反应方案16,步骤1中所示,在与反应方案15,步骤5的条件相似的条件下使式1601的化合物与式1505和1506的化合物接触,以提供式1602的相应化合物。

[0758] 在一些实施方案中,进行以下合成以形成化合物1601a(1601的实施方案):



[0759]



。

[0760] 在一些实施方案中,t是约1至约10或约1至约5的整数。在一些实施方案中,将寡乙二醇(1650)与对甲苯磺酰氯(或能够用离去基团官能化1650的一些其它试剂)反应以形成寡乙二醇单对甲苯磺酸(1651)(或用离去基团官能化的一些其它寡乙二醇)。在一些实施方案中,可以使化合物1651与硫代乙酸钾反应以形成化合物1652。在一些实施方案中,使化合物1652与2,2-二硫代二吡啶反应以形成化合物1653。在一些实施方案中,将化合物1653与化合物1654偶联以形成化合物1601a。

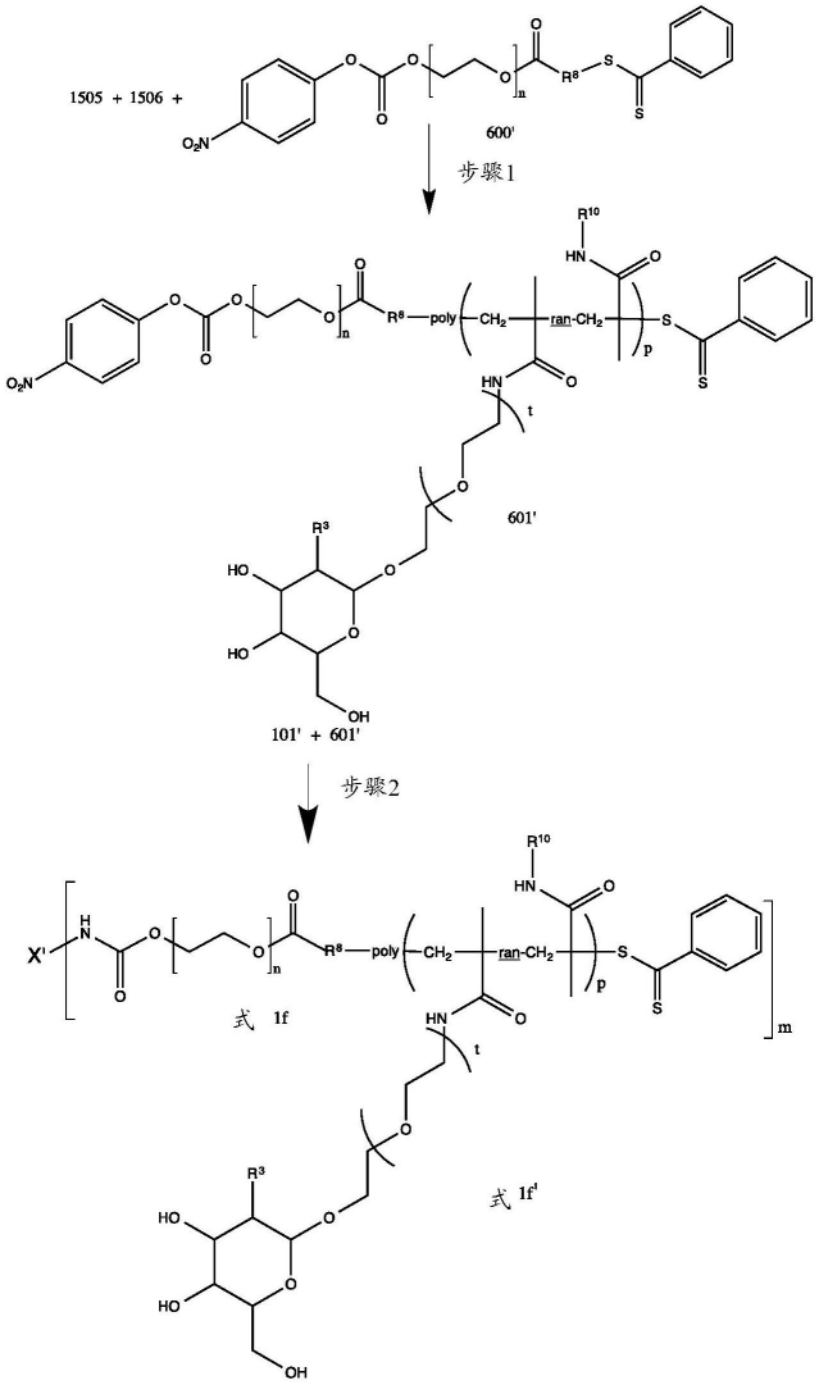
[0761] 如反应方案16,步骤2中所示,在与反应方案15,步骤6的条件相似的条件下使式1602的化合物与式101”的化合物接触,以提供式1c’的相应化合物。

[0762] 对应于式1c’的组合物可以如下命名:

[0763] “F1c’-X’-m_m-n_n-p_p-R^8-聚-($W^1{}_tZ$”-ran-W^2)”。

[0764] 反应方案17

[0765]



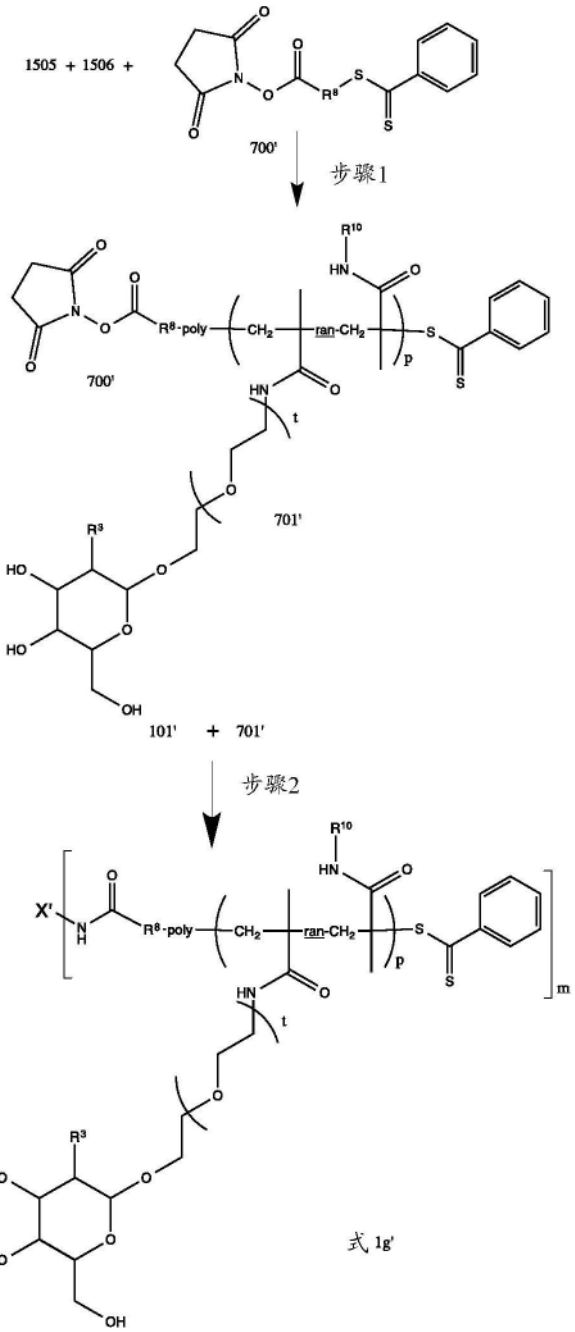
[0766] 如反应方案17,步骤1中所示,在与反应方案15,步骤5的条件相似的条件下使式600'的化合物与式1505和1506的化合物接触,以提供式601'的相应化合物。

[0767] 如反应方案17,步骤2中所示,在与反应方案15,步骤6的条件相似的条件下使式601'的化合物与式101'的化合物接触,以提供式1f'的相应化合物。

[0768] 对应于式1f'的组合物可以如下命名:

[0769] "F1f'-X'-m_m-n_n-p_p-R^8-聚-(W^1_tZ"-ran-W^2)"。

[0770] 反应方案18

[0771] 

[0772] 如反应方案18,步骤1中所示,在与反应方案15,步骤5的条件相似的条件下使式700'的化合物与式1505和1506的化合物接触,以提供式701'的相应化合物。

[0773] 如反应方案18,步骤2中所示,在与反应方案15,步骤6的条件相似的条件下使式701'的化合物与式101'的化合物接触,以提供式1g'的相应化合物。

[0774] 对应于式1g'的组合物可以如下命名:

[0775] “F1g'-X'-m_m-p_p-R^8-聚-($W^1{}_t$Z”-ran-W^2)”。

[0776] 具体的处理和最后的步骤

[0777] 使式103'的化合物与过量(对应于m值)的式106的化合物接触,以获得式1a的相应的产物。

[0778] 使式103'的化合物与过量(对应于m值)的式201的化合物接触,以获得式1b的相应的产物。

[0779] 使式802、902或1002的化合物与过量(对应于m值)的式803的化合物接触,以分别获得式1h、式1i或式1k的相应的产物。

[0780] 使式1109的化合物与过量(对应于m值)的式1107的化合物接触,以获得式1m的相应的产物,特别地其中n为约80,p为约30,q是约4,并且作为抗原函数的m是约2至10。

[0781] 使式1202的化合物与过量(对应于m值)的式1107的化合物接触,以获得式1n的相应的产物,特别地其中n为约1,p为约30,q为约4,并且作为抗原函数的m是约2至10。

[0782] 使式1507的化合物与式1109的化合物接触,以获得式1m'的相应的产物,特别地其中n是约4,p是约90,q是约4,t是约1或2,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,R^{10}是2-羟基丙基,并且作为抗原函数的m是约1至10。

[0783] 使式101"的化合物与式1602的化合物接触,以获得式1c'的相应的产物,特别地其中n是约4,p是约90,t是约1或2,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,R^{10}是2-羟基丙基,并且作为抗原函数的m是约1至10。

[0784] 使式101'的化合物与式601'的化合物接触,以获得式1f'的相应的产物,特别地其中n是约4,p是约90,t是约1或2,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,R^{10}是2-羟基丙基,并且作为抗原函数的m是约1至10。

[0785] 使式101'的化合物与式701'的化合物接触,以获得式1g'的相应的产物,特别地其中n是约4,p是约90,t是约1或2,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,R^{10}是2-羟基丙基,并且作为抗原函数的m是约1至10。

[0786] 具体组合物

[0787] 作为非限制性实例,本发明的组合物、药物制剂、制备方法和用途优选的具体基团是式1的取代基基团的以下组合和排列(分别以优选的递增顺序分成亚组):

[0788] ●X是移植接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原;患者针对其形成不期望的免疫应答的外来抗原;患者针对其形成不期望的免疫应答的治疗性蛋白质;患者针对其形成不期望的免疫应答的自身抗原,或其致耐受性部分。

[0789] ●X是选自下组的、患者针对其形成不期望的免疫应答的治疗性蛋白质:阿巴西普、阿昔单抗、阿达木单抗、腺苷脱氨酶、Ado-曲妥珠单抗-美坦新、阿加糖酶α、阿加糖酶β、阿地白介素、阿糖脑苷酶、阿葡糖苷酶α、α-1-蛋白酶抑制剂、阿那白滞素、阿尼普酶(茴香酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物)、抗纤维蛋白酶III、抗胸腺细胞球蛋白、阿替普酶、贝伐单抗、比伐卢定、A型肉毒杆菌毒素、B型肉毒毒素、C1酯酶抑制剂、卡那单抗、羧肽酶G2(谷卡匹酶和Voraxaze)、赛妥珠单抗、西妥昔单抗、胶原酶、响尾蛇科免疫Fab、达贝泊汀-α(Darbepoetin-α)、地诺单抗、地高辛免疫Fab、脱氧核糖核酸酶α、艾库组单抗、依那西普、因子VIIa、因子VIII、因子IX、因子XI、因子XIII、纤维蛋白原、非格司亭、Galsulfase、戈利木单抗、组氨瑞林乙酸酯、透明质酸酶、Idursulphase、伊米苷酶、英夫利昔单抗、胰岛素[包括"rHu胰岛素"和牛胰岛素]、干扰素-α2a、干扰素α2b、干扰素-β1a、干扰素-β1b、干扰素-γ1b、伊匹单抗、L-精氨酸酶、L-天冬酰胺酶、L-甲硫氨酸酶、乳糖酶、拉罗尼酶、来匹卢定/蛭素、美卡舍明、美卡舍明-林菲培、甲氧基奥法木单抗、那他珠单抗、奥曲肽、奥普瑞白介素、胰淀粉酶、胰脂肪酶、木瓜蛋白酶、Peg-天冬酰胺酶、Peg-多柔比星HCl、PEG红细胞生成素-β、培非司亭、Peg-干扰素-α2a、Peg-干扰素-α2b、培戈洛酶、培维索孟、苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)、蛋白C、拉布立酶(尿酸酶)、沙克罗酶、鲑鱼降钙素、沙格司亭、链激酶、替奈普酶、特立帕肽、

托珠单抗(atlizumab)、曲妥珠单抗、1型α-干扰素、乌司奴单抗和vW因子。

[0790] ○尤其其中X是阿昔单抗、阿达木单抗、阿加糖酶α、阿加糖酶β、阿地白介素、阿葡糖苷酶α、因子VIII、因子IX、英夫利昔单抗、L-天冬酰胺酶、拉罗尼酶、那他珠单抗、奥曲肽、苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)、或拉布立酶(尿酸酶)。

[0791] ■特别地,其中X是因子VIII、因子IX、尿酸酶、PAL或天冬酰胺酶。

[0792] ●X是自身抗原多肽,其选择用于治疗1型糖尿病、儿科多发性硬化、幼年型类风湿关节炎、乳糜泻、或普秃。

[0793] ○尤其其中X是自身抗原多肽,其选择用于治疗新发1型糖尿病、儿科多发性硬化症或乳糜泻。

[0794] ●X是患者针对其形成不期望的免疫应答的外来抗原:

[0795] ○来自花生,包括伴花生球蛋白(Ara h 1)

[0796] ○来自小麦,包括天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20)、脱酰胺基化的α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22)和Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23)。

[0797] ○来自猫,包括Fel d 1A(UNIPROT P30438)和猫白蛋白(UNIPROT P49064)。

[0798] ○来自狗,包括Can f 1(UNIPROT O18873)和狗白蛋白(UN IPROT P49822)。

[0799] ●X是移植接受体针对其形成不期望的免疫应答的外来移植物抗原,例如人白细胞抗原蛋白。

[0800] ●X是特异性结合循环蛋白或肽或者抗体的抗体、抗体片段或配体,所述循环蛋白或肽或者抗体产生移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、和/或变态反应。

[0801] ○尤其其中X结合内源性循环蛋白或肽或抗体。

[0802] ●Y是连接基,其选自式Ya,式Yb,式Yh,式Yi,式Yk,式Ym,式Yn,式Yo和式Yp。

[0803] ○尤其其中n为8至90±10%,p为20至100±10%,且q为3至20±3。

[0804] ●特别其中n为40至80±10%,p为30至40±10%,q是4至12±3。○尤其其中Y为式Ya,式Yb,式Ym或式Yn。

[0805] ●特别其中n为8至90±10%,p为20至100±10%和q是3至20±3。

[0806] ●更特别地,其中n是40至80±10%,p为30至40±10%,且q是4至12±3。

[0807] ●特别其中Z通过乙基乙酰氨基基团缀合至Y。

[0808] ●更特别地,其中Z在其C1处缀合至Y。

[0809] ○更特别地,其中R^8是CMP。

[0810] ●更特别地,其中R^8是CMP。

[0811] ●特别地,其中R^8是CMP。

[0812] ●Y是选自下组的连接基:式Yc、式Yf、式Yg和式Ym。

[0813] ○尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0814] ■特别其中t是1或2

[0815] ●更特别地,其中t是1。

[0816] ■特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0817] ●Z是半乳糖、半乳糖胺、N-乙酰基半乳糖胺、葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0818] ○尤其其中Z是在C1、C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0819] ■特别其中Z是在C1或C2缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0820] ●更特别地,其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基半乳糖胺。

[0821] ○尤其其中Z是在C1、C2或C6处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0822] ■特别其中Z是在C1或C2处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0823] ●更特别地,其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基葡糖胺。

[0824] 上述组和亚组中的每个分别是优选的,并且可以组合以描述本发明的进一步优选的方面,例如但不作为限制,如下:

[0825] ●X是自身抗原多肽,其选择用于治疗1型糖尿病、儿科多发性硬化症、幼年型类风湿关节炎、乳糜泻或普秃。

[0826] ○尤其其中X是自身抗原多肽,其选择用于治疗新发作1型糖尿病、儿科多发性硬化症或乳糜泻。

[0827] ■特别地,其中Y是连接基,其选自式Ya,式Yb,式Yc、式Yf、式Yg、式Yh,式Yi,式Yk,式Ym,式Yn,式Yo和式Yp。

[0828] ●尤其其中W_p是W^1聚合物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN,或者是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0829] ○特别其中t是1或2。

[0830] ■更特别地,其中t是2。

[0831] ■更特别地,其中t是1。

[0832] ○特别其中p是约90。

[0833] ■更特别地,其中W_p是无规共聚物并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0834] ●尤其其中n是8至90±10%,p是20至100±10%,并且q是3至20±3。

[0835] ○特别其中n是40至80±10%,p是30至40±10%,并且q是4至12±3。

[0836] ●尤其其中Y是式Ya、式Yb、式Ym或式Yn。

[0837] ○特别其中n是8至90±10%,p是20至100±10%,并且q是3至20±3。

[0838] ■更特别地,其中n是40至80±10%,p是30至40±10%,并且q是4至12±3。

[0839] ●甚至更特别地,其中Z经由乙基乙酰氨基基团与Y缀合。

[0840] ■更特别地,其中Z经由乙基乙酰氨基基团与Y缀合。

[0841] ○特别其中Z经由乙基乙酰氨基基团与Y缀合。

[0842] ●尤其其中Z是半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺。

[0843] ○特别其中Z是在C1、C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0844] ■更特别地,其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0845] ●甚至更特别地,其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基半乳糖胺。

[0846] ●尤其其中Z是葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0847] ○特别地,其中Z是在C1、C2或C6处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0848] ■更特别地,其中Z是在C1或C2处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0849] ●甚至更特别地,其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基葡糖胺。

[0850] ■特别其中Y是选自下组的连接基:式Yc,式Yf,式Yg和式Ym。

[0851] ●尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0852] ○特别其中t是1或2。

[0853] ■更特别地,其中t是1。

[0854] ○特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0855] ■特别其中Y是选自下组的连接基:式Yc和式Ym。

[0856] ●尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN,并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0857] ○特别其中t是1或2。

[0858] ■更特别地,其中t是1。

[0859] ○特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0860] ■特别其中Z是半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺。

[0861] ●尤其其中Z是在C1、C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0862] ○特别其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0863] ■更特别地,其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基半乳糖胺。

[0864] ■特别其中Z是葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0865] ●尤其其中Z是在C1、C2或C6处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0866] ○更特别地,其中Z是在C1或C2处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0867] ■甚至更特别地,其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基葡糖胺。

[0868] ○尤其其中Y是选自下组的连接基:式Ya,式Yb,式Yh,式Yi,式Yk,式Ym,式Yn,式Yo和式Yp。

[0869] ■特别其中Y是选自下组的连接基:式Yc,式Yf,式Yg和式Ym。

[0870] ●尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0871] ○特别其中t是1或2。

[0872] ■更特别地,其中t是1。

[0873] ○特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0874] ■特别其中Y是选自下组的连接基:式Yc和式Ym。

[0875] ●尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0876] ○特别其中t是1或2

[0877] ■更特别地,其中t是1。

[0878] ○特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0879] ■特别其中n是8至90±10%,p是20至100±10%,并且q是3至20±3。

[0880] ●更特别地,其中n是40至80±10%,p是30至40±10%,并且q是4至12±3。

[0881] ■特别其中Y是式Ya,式Yb,式Ym或式Yn。

[0882] ●更特别地,其中n是8至90±10%,p是20至100±10%并且q是3至20±3。

[0883] ○更优选其中n是40至80±10%,p是30至40±10%,并且q是4至12±3。

[0884] ●更特别地,其中Z经由乙基乙酰氨基基团与Y缀合。

[0885] ○尤其其中Z是半乳糖、半乳糖胺或N-乙酰基半乳糖胺。

[0886] ■特别其中Z是在C1、C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0887] ●更特别地,其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰基半乳糖胺。

[0888] ○更优选其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基半乳糖胺。

[0889] ●更特别地,其中Y是选自下组的连接基:式Yc,式Yf,式Yg和式Ym。

[0890] ○尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0891] ■特别其中t是1或2。

[0892] ●更特别地,其中t是1。

[0893] ■特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0894] ○尤其其中Z是葡萄糖、葡糖胺或N-乙酰基葡糖胺。

[0895] ■特别其中Z是在C1、C2或C6处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0896] ●更特别地,其中Z是在C1或C2处缀合的葡萄糖或N-乙酰基葡糖胺。

[0897] ○更优选其中Z是在C1处缀合的N-乙酰基葡糖胺。

[0898] ●更特别地,其中Y是选自下组的连接基:式Yc,式Yf,式Yg和式Ym。

[0899] ○尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0900] ■特别其中t是1或2。

[0901] ●更特别地,其中t是1。

[0902] ■特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0903] ●更特别地,其中Y是选自下组的连接基:式Yc和式Ym。

[0904] ○尤其其中W_p是无规共聚物,其中R^9是Et-PEG_t-AcN并且R^{10}是2-羟基丙基。

[0905] ■特别其中t是1或2。

[0906] ●更特别地,其中t是1。

[0907] ■特别其中p是约90并且包括约30个W^1和60个W^2共聚单体。

[0908] ●m是约1至100的整数。

[0909] ○m是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或110。

[0910] ○特别地m是约1至20。

[0911] ■m是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21或22。

[0912] ■更特别地m是约10。

[0913] ●m是9,10或11。

[0914] ●n是代表包括约1至100的混合的整数。

[0915] ○n是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或110。

[0916] ■特别地n是约8至90。

[0917] ■特别地n是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或99。

[0918] ●更特别地n是约40至80。

[0919] ●更特别地n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0920] ○n代表涵盖范围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和107-113的混合的整数。

[0921] ■特别地n代表涵盖范围7-13,6-14,15-25,26-30,42-50,46-57,60-82,85-90和82-99的混合的整数。

[0922] ●更特别地n代表涵盖范围36-44,42-50,46-57,60-82和75-85的混合的整数。

[0923] ○p是代表包括约2至150的混合的整数。

[0924] ■p是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或165。

[0925] ■特别其中n是代表包括约1至100的混合的整数。

[0926] ●特别地n是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或110。

[0927] ○更特别地,其中n是约8至90。

[0928] ○更特别地n是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或99。

[0929] ■甚至更特别地,其中n是约40至80。

[0930] ■甚至更特别地n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0931] ●更特别地p是18,19,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100或110。

[0932] ○特别其中n是代表约1至100的混合的整数。

[0933] ■特别地n是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或110。

[0934] ●更特别地,其中n是约8至90。

[0935] ●更特别地n是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或99。

[0936] ○甚至更特别地,其中n是约40至80。

[0937] ○甚至更特别地n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0938] ○更特别地p是27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,或44。

[0939] ■特别其中n是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或110。

[0940] ●更特别地,其中n是约8至90。

[0941] ●更特别地n是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或99。

[0942] ○甚至更特别地,其中n是约40至80。

[0943] ○甚至更特别地n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0944] ○q是代表包括约1至44的混合的整数。

[0945] ■q是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或48。

[0946] 效用、测试和施用

[0947] 一般效用

[0948] 本发明的组合物可用于多种应用,如本领域技术人员理解,包括移植物排斥、针对治疗剂的免疫应答、自身免疫性疾病、以及食物变态反应的治疗等用途。

[0949] 在优选的实施方案中,本发明的组合物用于调节(特别是下调)抗原特异性的不期望的免疫应答。

[0950] 在另外的实施方案中,本发明的组合物可用于结合并清除不期望的循环特异性蛋白质,包括在患者中内源产生的抗体(即,不是施用于患者的外源抗体)、肽等,其引起自身免疫和相关病理学、变态反应、炎性免疫应答和过敏反应。

[0951] 在根据本发明的一些实施方案中,使抗原靶向肝以通过抗原呈递细胞呈递,从而用于特异性下调免疫系统或用于清除不需要的循环蛋白。这与以前的肝靶向的用途不同,例如如US2013/0078216中所述,其中肝靶向分子如DOM26h-196-61的目的是递送治疗剂以治疗肝疾病,如纤维化、肝炎、肝硬化和肝癌。

[0952] 根据一些实施方案,本发明提供了治疗针对自身抗原和外来抗原的不期望的免疫应答的组合物和方法,所述外来抗原包括但不限于:移植物接受体针对其形成不期望的免疫应答(例如,移植物排斥)的外来移植物抗原、患者针对其形成不期望的免疫(例如,变应性或超敏性)应答的外来抗原、患者针对其形成不期望的免疫应答(例如,超敏性和/或降低的治疗活性)的治疗剂、患者针对其形成不期望的免疫应答(例如,自身免疫性疾病)的自身抗原。

[0953] 可以使用本发明提供的方法和组合物治疗的自身免疫性疾病状态包括但不限于:急性播散性脑脊髓炎(Acute Disseminated Encephalomyelitis(ADEM));急性间质变应性肾炎(Acute interstital allergic nephritis)(药物变态反应);急性坏死性出血性白质脑炎(Acute necrotizing hemorrhagic leukoencephalitis);阿狄森氏病(Addison's Disease);斑秃(Alopecia areata);普秃;强直性脊柱炎;青少年关节炎(Arthritis,juvenile);银屑性关节炎(Arthritis,psoriatic);类风湿性关节炎(Arthritis,rheumatoid);特应性皮炎;自身免疫性再生障碍性贫血;自身免疫性胃炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性垂体炎;自身免疫性卵巢炎;自身免疫性睾丸炎;1型自体免疫多内分泌综合征(Autoimmune polyendocrine syndrome type 1);2型自体免疫多内分泌综合征;自身免疫性甲状腺炎;贝切特氏病(Behcet's disease);闭塞性细支气管炎;大疱性类天疱疮;乳糜泻;丘-斯综合征(Churg-Strauss syndrome);慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病;瘢痕性类天疱疮;克罗恩氏病(Crohn'sdisease);柯萨奇心肌炎(Coxsackie myocarditis);杜林疱疹样皮炎(Dermatitis herpetiformis Duhring);糖尿病(1型);结节性红斑;获得性大疱性表皮松解症(Epidermolysis bullosa acquisita),巨细胞动脉炎(颞动脉炎);巨细胞心肌炎;肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome);格雷夫斯病(Graves'disease);格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome);桥本氏脑炎(Hashimoto'sencephalitis);桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis);IgG4相关硬化疾病;(IgG4-related sclerosing disease);兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome);混合性结缔组织病;Mucha-Habermann病(Mucha-Habermann disease);多发性硬化症;重症肌无力;视神经炎;视神经脊髓炎;寻常性天疱疮和变体;Pernicious angemis;垂体自身免疫性疾病;多发性肌炎;心包切开术后综合征(Postpericardiotomy syndrome);卵巢早衰;原发性胆汁性肝硬化(Primary Biliary Cirrhosis);原发性硬化性胆管炎;银屑病;风湿性心脏病;干燥综合征(Sjogren's syndrome);系统性红斑狼疮;系统性硬化症;溃疡性结肠炎;未分化结缔组织病(UCTD);葡萄膜炎;白癜风;和韦氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0954] 可以使用本发明提供的方法和组合物治疗的一组具体的自身免疫性疾病状态包括但不限于:急性坏死性出血性白质脑炎;阿狄森氏病;银屑性关节炎;类风湿性关节炎;自

身免疫性再生障碍性贫血;自身免疫性垂体炎;自身免疫性胃炎;1型自体免疫多内分泌综合征;大疱性类天疱疮;乳糜泻;柯萨奇心肌炎;杜林疱疹样皮炎;糖尿病(1型);获得性大疱性表皮松解症;巨细胞心肌炎;肺出血肾炎综合征;格雷夫斯病;桥本氏甲状腺炎;混合性结缔组织病;多发性硬化症;重症肌无力;视神经脊髓炎;Pernicious angemis;寻常性天疱疮和变体;垂体自身免疫性疾病;卵巢早衰;风湿性心脏病;系统性硬化症;干燥综合征;系统性红斑狼疮;和白癜风。

[0955] 在利用针对其形成不期望的免疫应答的抗原如食物抗原的实施方案中,可以提供治疗针对例如:花生、苹果、奶、蛋清、蛋黄、芥菜、芹菜、虾、小麦(和其它谷物)、草莓和香蕉的反应。

[0956] 本领域的技术人员将理解,可以测试患者以鉴定已经针对其形成不期望的免疫应答的外来抗原,并且可以基于所述抗原开发本发明的组合物。

[0957] 测试

[0958] 在确定本发明的组合物和方法的效用时,最初应当确定对肝中的抗原呈递细胞的结合(特别是对肝细胞和特别地ASGPR的结合)的特异性。这可以例如通过在本发明的组合物中采用标记物(如荧光标记物藻红蛋白(“PE”))来完成。将组合物施用于合适的实验受试者。将对照,例如未缀合的PE或载体(盐水)施用于其它组的受试者。允许该组合物和对照循环1至5小时的时段,在此之后,收获受试者的脾和肝并测量荧光。可以随后确定其中发现荧光的特定细胞。当以这种方式测试时,本发明的组合物与未缀合的PE或载体相比显示在肝的抗原呈递细胞中更高的浓度水平。

[0959] 可以通过与施用单独的抗原或仅施用载体相比,测量响应于施用掺入已知抗原(如卵清蛋白(“OVA”))的本发明组合物的OT-I $CD8^+$细胞(移植入宿主小鼠中)的增殖来测试免疫调节的效率。当以这种方式测试时,与单独的抗原或载体相比,本发明的组合物显示OT-I细胞增殖的增加,证明增加的$CD8^+$T细胞交叉引发(cross-priming)。为了区分扩增(expand)为功能效应表型的T细胞与扩增并删除的T细胞,可以针对耗竭的分子标签[如程序性死亡-1(PD-1),FasL等],以及作为凋亡以及因此删除的标志的膜联蛋白V结合,对增殖的OT-I$CD8^+$T细胞进行表型分析。还可以评估OT-I $CD8^+$T细胞在有佐剂的情况下对抗原攻击的响应性,以证明对抗原的功能性非响应性和因此的免疫耐受性。为此,将本发明的组合物施用到宿主小鼠中,紧接着进行抗原攻击,之后分析细胞的炎性标签。当以这种方式测试时,本发明的组合物与对照组相比表明非常低(例如,背景)的针对OVA的炎性OT-I $CD8^+$T细胞应答水平,从而证明免疫耐受性。

[0960] 可以通过与施用单独的抗原或仅载体相比,施用掺入已知抗原,如OVA的本发明的组合物,并且测量所得的抗体的水平来测试体液免疫应答。当以这种方式测试时,本发明的组合物显示非常低(例如,背景)水平抗体形成,其响应于施用的组合物和载体的施用,响应于抗原施用的抗体形成的水平显著更高。

[0961] 可以如上文参考体液免疫应答测试针对抗原的耐受化的效率,其中用本发明的组合物治疗后数周,通过仅施用抗原攻击一组受试者,随后测量针对抗原的抗体的水平。当以这种方式测试时,相比于未预处理的组,在用此类组合物预处理的组中,本发明的组合物显示低水平的抗体形成,其响应于抗原攻击。

[0962] 疾病聚焦(Disease-focused)实验模型是本领域技术人员公知的,并包括自身免

疫和耐受性的NOD(或非肥胖型糖尿病)小鼠模型和用于人炎性脱髓鞘疾病、多发性硬化的EAE(实验性自身免疫性脑脊髓炎)模型。具体地,NOD小鼠形成自发性自身免疫糖尿病(类似于人的1a型糖尿病)。用测试化合物或阴性对照处理NOD小鼠组,接着测量血糖。成功的治疗对应于治疗人糖尿病的可能性或治疗其它自身免疫性疾病的方法的机制证据。(参见例如Anderson和Bluestone,Annu.Rev.Immunol.2005;23:447-85)。

[0963] 施用

[0964] 以治疗有效剂量,例如,足以提供对先前所描述疾病状态的治疗的剂量施用本发明的组合物。可以通过用于发挥类似效用的试剂的任何可接受的施用模式施用本发明的化合物或其药学可接受盐。

[0965] 虽然对于本发明的化合物还没有优化人剂量水平,但是这些最初可以从对小鼠施用的约10μg至100μg的剂量外推。通常,单独的人剂量为约0.01至2.0mg/kg体重,优选约0.1至1.5mg/kg体重,最优选约0.3至1.0mg/kg体重。治疗可以施用一天或数天的时段,并且可以以数天、1周或数周、或1个月或数个月的间隔重复。施用可以作为单一剂量(例如作为推注),或者作为初始推注,接着在一定时间,例如1至7天连续输注完整剂量的剩余部分。施用的活性化合物的量当然将取决于以下的任一种或全部:治疗的受试者和疾病状态、病痛的严重性、施用的方式和日程表以及开处方的医生的判断。还应当理解的是,施用量将取决于抗原、抗体、抗体片段或配体的分子量以及连接基的大小。

[0966] 本发明的组合物可单独施用或与其它药学可接受赋形剂组合施用。虽然考虑所有典型的施用途径(例如,口服、局部、经皮、注射(肌肉内、静脉内、或动脉内)),但目前优选的是提供适合于注射的液体剂型。制剂通常将包含常规药物载体或赋形剂和本发明的组合物或其药学可接受盐。此外,这些组合物可包括其它的医学剂、药剂、载体等,包括但不限于对应于在本发明的组合物中使用的抗原(X)的治疗性蛋白质,肽,抗体或抗体样分子,和可以充当免疫调节剂、更具体地可以对B细胞具有抑制效果的其它活性剂,包括抗叶酸剂、免疫抑制剂、细胞抑制剂(cyostatics)、有丝分裂抑制剂和抗代谢物、或它们的组合。

[0967] 一般来说,根据预期的施用模式,药学可接受组合物将含有按重量计约0.1%至95%,优选约0.5%至50%的本发明的组合物,剩余部分是合适的药物赋形剂、载体等。可以制备含有0.005%至95%范围内的活性成分且由无毒性载体补足余量的剂型或组合物。

[0968] 例如,可以通过将本发明的活性成分(例如,冻干粉末)和任选的药物佐剂在载体,诸如例如水(注射用水)、盐水、水性右旋糖、甘油、二醇、乙醇等(排除半乳糖)中溶解、分散等,由此形成溶液或悬浮液,来制备药学上可施用的液体组合物。如果需要的话,待施用的药物组合物也可以含有少量的无毒辅助物质,如润湿剂、乳化剂、稳定剂、增溶剂、pH缓冲剂等,例如乙酸钠、柠檬酸钠、环糊精衍生物、脱水山梨醇单月桂酸酯(sorbitan monolaurate)、三乙醇胺乙酸酯和油酸三乙醇胺等、渗透剂(osmolyte)、氨基酸、糖和碳水化合物、蛋白质和聚合物、盐、表面活性剂、螯合剂、和抗氧化剂、防腐剂,和特定的配体。对于本领域技术人员而言,制备此类剂型的实际方法是已知的或是显而易见的;例如参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Pharmaceutical Press,第22版,2012。在任何情况下,待施用的组合物或制剂含有的活性化合物量为有效治疗所治疗的受试者的症状的量。

实施例

[0969] 以下实施例用来更充分地描述使用上述公开的方式,以及列出考虑用于实施本发明的各个方面的最佳模式。应当理解,这些实施例绝不用来限制本发明的真实范围,而是为了说明性的目的而呈现。本发明引用的所有参照文献通过引用完整并入。

[0970] 实施例1

[0971] F1aA-OVA-m_4-n_{80}(或F1a-OVA-m_4-n_{80}-2NGAL)

[0972] 1A.式103',其中X'是OVA,且m是4

[0973] 在无内毒素的管中,将OVA(5.0mg,0.00012mmol)加入100μl含5mM EDTA的pH 8.0PBS并搅拌。独立地,将1mg的Traut试剂溶解于100μl pH 7.0PBS中,并将如此获得的16μl(0.00119mmol)Traut试剂溶液在持续搅拌的情况下加入OVA的搅拌溶液。1小时后,使用离心尺寸排阻柱除去过量的Traut试剂,以提供式103'的相应产物。

[0974] 1B.式106A,其中n是80

[0975] 在无内毒素的管中,在搅拌的情况下将半乳糖胺(10.0mg,0.04638mmol)溶解于100μl含5mM EDTA的pH8.0 PBS中。将溶解于100μl pH7.0 PBS中的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(式104,其中n为80)(16.23mg,0.00464mmol)加入半乳糖胺的搅拌溶液。1小时后,所得吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-N-乙酰基半乳糖胺(式106A)准备好在无进一步纯化的情况下使用。

[0976] 1C.式1aA,其中X'是OVA,m为4,n为80(和Z'为C2半乳糖胺)

[0977] 将在实施例1A中制备的式103'的纯化的OVA-Traut缀合物直接加入在实施例1B中制备的式106A的搅拌产物。1小时后,通过将反应混合物通过离心尺寸排阻柱纯化获得的式1a的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。(参照图5)。

[0978] 1D.式103'的其它化合物

[0979] 通过遵循实施例1A中所述的程序并用以下替换OVA:

[0980] ●阿昔单抗,

[0981] ●阿达木单抗,

[0982] ●阿加糖酶α,

[0983] ●阿加糖酶β,

[0984] ●阿地白介素,

[0985] ●阿葡糖苷酶α,

[0986] ●因子VIII,

[0987] ●因子IX,

[0988] ●L-天冬酰胺酶,

[0989] ●拉罗尼酶

[0990] ●奥曲肽,

[0991] ●苯丙氨酸氨裂解酶,

[0992] ●拉布立酶,

[0993] ●胰岛素(SEQ ID NO:1),

[0994] ●GAD-65(SEQ ID NO:2),

[0995] ●IGRP(SEQ ID NO:3)

[0996] ●MBP(SEQ ID NO:4),

[0997] ●MOG(SEQ ID NO:5),

[0998] ●PLP(SEQ ID NO:6),

[0999] ●MBP13-32(SEQ ID NO:7),

[1000] ●MBP83-99(SEQ ID NO:8),

[1001] ●MBP111-129(SEQ ID NO:9),

[1002] ●MBP146-170(SEQ ID NO:10),

[1003] ●MOG1-20(SEQ ID NO:11),

[1004] ●MOG35-55(SEQ ID NO:12),

[1005] ●PLP139-154(SEQ ID NO:13),

[1006] ●MART1(SEQ ID NO:14),

[1007] ●酪氨酸酶(SEQ ID NO:15),

[1008] ●PMEL(SEQ ID NO:16),

[1009] ●水通道蛋白-4(SEQ ID NO:17),

[1010] ●S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18),

[1011] ●IRBP(SEQ ID NO:19),

[1012] ●伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6),

[1013] ●天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20),

[1014] ●脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),

[1015] ●α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22),

[1016] ●Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23),

[1017] ●Fel d 1A(UNIPROT P30438),

[1018] ●猫白蛋白(UNIPROT P49064),

[1019] ●Can f 1(UNIPROT O18873),

[1020] ●狗白蛋白(UNIPROT P49822),和

[1021] ●RhCE(UNIPROT P18577),获得式103’的以下的相应化合物,其中:

[1022] ●X是阿昔单抗并且m是10,

[1023] ●X是阿达木单抗并且m是11,

[1024] ●X是阿加糖酶α并且m是14,

[1025] ●X是阿加糖酶β并且m是14,

[1026] ●X是阿地白介素并且m是6,

[1027] ●X是阿葡糖苷酶α,m是13,

[1028] ●X为因子VIII并且m是100,

[1029] ●X是因子IX并且m是18,

[1030] ●X是L-天冬酰胺酶并且m是5,

[1031] ●X是拉罗尼酶并且m是7,

[1032] ●X是奥曲肽并且m是1,

[1033] ●X是苯丙氨酸氨裂解酶并且m是12,

[1034] ●X是拉布立酶并且m是12

[1035] ●X是胰岛素(SEQ ID NO:1)并且m是2,

[1036] ●X是GAD-65(SEQ ID NO:2)并且m是8,

[1037] ●X是IGRP(SEQ ID NO:3)并且m是7,

[1038] ●X是MBP(SEQ ID NO:4)并且m是6,

[1039] ●X是MOG(SEQ ID NO:5)并且m是5,

[1040] ●X是PLP(SEQ ID NO:6)并且m是8,

[1041] ●X是MBP13-32(SEQ ID NO:7)并且m是1,

[1042] ●X是MBP83-99(SEQ ID NO:8)并且m是1,

[1043] ●X是MBP111-129(SEQ ID NO:9)并且m是1,

[1044] ●X是MBP146-170(SEQ ID NO:10)并且m是2,

[1045] ●X是MOG1-20(SEQ ID NO:11)并且m是1,

[1046] ●X是MOG35-55(SEQ ID NO:12)并且m是2,

[1047] ●X是PLP139-154(SEQ ID NO:13)并且m是3,

[1048] ●X是MART1(SEQ ID NO:14)并且m是4,

[1049] ●X是酪氨酸酶(SEQ ID NO:15)并且m是8,

[1050] ●X是PMEL(SEQ ID NO:16)并且m是5,

[1051] ●X是水通道蛋白-4(SEQ ID NO:17)并且m是4,

[1052] ●X是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18)并且m是12,

[1053] ●X是IRBP(SEQ ID NO:19)并且m是21,

[1054] ●X是伴花生球蛋白并且m是21,

[1055] ●X是天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20)并且m是1,

[1056] ●X是脱酰氨的α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21)并且m是1,

[1057] ●X是α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22)并且m是1,

[1058] ●X是Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23)并且m是1,

[1059] ●X是Fel d 1并且m是4,

[1060] ●X是猫白蛋白并且m是16,

[1061] ●X是Can f 1并且m是6,

[1062] ●X是狗白蛋白,且m是23,

[1063] ●X是RhCE并且m是10。

[1064] 1E.式1aA的其它化合物

[1065] 通过遵循实施例1C中描述的程序并替换式103’的化合物,例如如实施例1D中获得,获得式1aA的下列相应化合物:

[1066] ●F1aA-阿昔单抗-m_{10}-n_{80},

[1067] ●F1aA-阿达木单抗-m_{11}-n_{80},

[1068] ●F1aA-阿加糖酶α-m_{14}-n_{80},

[1069] ●F1aA-阿加糖酶β-m_{14}-n_{80},

[1070] ●F1aA-阿地白介素-m_{6}-n_{80},

[1071] ●F1aA-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{80},

[1072] ●F1aA-因子VIII-m_{100}-n_{80},

[1073] ●F1aA-因子IX-m_{18}-n_{80},

[1074] ●F1aA-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{80},

[1075] ●F1aA-拉罗尼酶-m_7-n_{80},

[1076] ●F1aA-奥曲肽-m_1-n_{80},

[1077] ●F1aA-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{80},

[1078] ●F1aA-拉布立酶-m_{12}-n_{80},

[1079] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{80},

[1080] ●F1aA-GAD-65-m_8-n_{80},

[1081] ●F1aA-IGRP-m_7-n_{80},

[1082] ●F1aA-MBP-m_6-n_{80},

[1083] ●F1aA-MOG-m_5-n_{80},

[1084] ●F1aA-PLP-m_8-n_{80},

[1085] ●F1aA-MBP13-32-m_1-n_{80},

[1086] ●F1aA-MBP83-99-m_1-n_{80},

[1087] ●F1aA-MBP111-129-m_1-n_{80},

[1088] ●F1aA-MBP146-170-m_2-n_{80},

[1089] ●F1aA-MOG1-20-m_1-n_{80},

[1090] ●F1aA-MOG35-55-m_2-n_{80},

[1091] ●F1aA-PLP139-154-m_3-n_{80},

[1092] ●F1aA-MART1-m_4-n_{80},

[1093] ●F1aA-酪氨酸酶-m_8-n_{80},

[1094] ●F1aA-PMEL-m_5-n_{80},

[1095] ●F1aA-水通道蛋白4-m_4-n_{80},

[1096] ●F1aA-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{80},

[1097] ●F1aA-IRBP-m_{21}-n_{80},

[1098] ●F1aA-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{80},

[1099] ●F1aA-天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{80},

[1100] ●F1aA-脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{80},

[1101] ●F1aA-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{80},

[1102] ●F1aA-Ω-麦醇溶蛋白-m_1-n_{80},

[1103] ●F1aA-Fel d 1-m_4-n_{80},

[1104] ●F1aA-猫白蛋白-m_{16}-n_{80},

[1105] ●F1aA-Can f 1-m_6-n_{80},

[1106] ●F1aA-狗白蛋白-m_{23}-n_{80},和

[1107] ●F1aA-RhCE-m_{10}-n_{80}。

[1108] 1F.式106A的其它化合物

[1109] 通过遵循实施例1B中描述的程序并将吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(式104,其中n是80)替换为以下项:

[1110] ●式104,其中n是12,

[1111] ●式104,其中n是33,

[1112] ●式104,其中n是40,

[1113] ●式104,其中n是43,

[1114] ●式104,其中n是50,

[1115] ●式104,其中n是60,

[1116] ●式104,其中n是75,和

[1117] ●式104,其中n是80,

[1118] 获得式106A的以下的相应化合物,其中:

[1119] ●n是12,

[1120] ●n是33,

[1121] ●n是40,

[1122] ●n是43,

[1123] ●n是50,

[1124] ●n是60,

[1125] ●n是75,和

[1126] ●n是84,

[1127] 1G.式1aA的其它化合物

[1128] 遵循实施例1E中所述的程序并将式106A的化合物替换为实施例1F中获得的化合物,获得式1aA的相应化合物,其中n是12,33,40,43,50,60,75,和84,如:

[1129] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{12},

[1130] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{33},

[1131] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{40},

[1132] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{43},

[1133] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{50},

[1134] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{60},

[1135] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{75},和

[1136] ●F1aA-胰岛素-m_2-n_{84}。

[1137] 1H.式1aA的其它化合物

[1138] 类似地,通过在遵循实施例1A-G中所述的程序并且以化合物葡糖胺替换半乳糖胺,获得式1aA的相应化合物,其中Z'是C2葡糖胺。

[1139] 实施例2

[1140] F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL

[1141] 2A.式103',其中X'是卵清蛋白,且m是1

[1142] 在无内毒素的管中,将OVA(6.5mg,0.000155mmol)加入200μl含5mM EDTA的pH 8.0PBS并搅拌。独立地,将1mg的Traut试剂溶解于100μl pH 7.0的PBS中,并将由此获得的43μl(0.00310mmol)Traut试剂溶液在持续搅拌下加入OVA的搅拌的溶液。1小时后,使用离心尺寸排阻柱除去未反应的Traut试剂,以提供式103'的产物。

[1143] 2B.式1b,其中X'是卵清蛋白,m是1,n是4,p是34,R^9是直接键,并且Z"是2NAcGAL

[1144] 在微离心管中,将聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-(吡啶基二硫化物)(式201)

(20.0mg,0.0020mmol)溶解于50μl含有5mM EDTA的pH8.0 PBS中。向其中加入来自实施例2A的经纯化的OVA-Traut产物,随后搅拌1小时。将反应混合物通过离心尺寸排阻柱纯化获得的式1b的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。(参照图5)。

[1145] 2C.式1b的其它化合物

[1146] 通过遵循实施例2B中描述的程序并替换式103'的化合物,例如如实施例1D中获得,获得式1b的以下相应化合物:

[1147] ●F1b-阿昔单抗-m_{10}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1148] ●F1b-阿达木单抗-m_{11}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1149] ●F1b-阿加糖酶α-m_{14}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1150] ●F1b-阿加糖酶β-m_{14}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1151] ●F1b-阿地白介素-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1152] ●F1b-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1153] ●F1b-因子VIII-m_{100}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1154] ●F1b-因子IX-m_{18}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1155] ●F1b-L-天冬酰胺酶-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1156] ●F1b-拉罗尼酶-m_7-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1157] ●F1b-奥曲肽-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1158] ●F1b-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1159] ●F1b-拉布立酶-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1160] ●F1b-胰岛素-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1161] ●F1b-GAD-65-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1162] ●F1b-IGRP-m_7-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1163] ●F1b-MBP-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1164] ●F1b-MOG-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1165] ●F1b-PLP-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1166] ●F1b-MBP13-32-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1167] ●F1b-MBP83-99-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1168] ●F1b-MBP111-129-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1169] ●F1b-MBP146-170-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1170] ●F1b-MOG1-20-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1171] ●F1b-MOG35-55-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1172] ●F1b-PLP139-154-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1173] ●F1b-MART1-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1174] ●F1b-酪氨酸酶-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1175] ●F1b-PMEL-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1176] ●F1b-水通道蛋白4-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1177] ●F1b-S-抑制蛋白-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1178] ●F1b-IRBP-m_{21}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1179] ●F1b-伴花生球蛋白-m_{21}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1180] ●F1b-天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1181] ●F1b-脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1182] ●F1b-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1183] ●F1b-Ω-麦醇溶蛋白-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1184] ●F1b-Fel d 1-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1185] ●F1b-猫白蛋白-m_{16}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1186] ●F1b-Can f 1-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[1187] ●F1b-狗白蛋白-m_{23}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,和

[1188] ●F1b-RhCE-m_{10}-n_4-p_{34}-2NAcGAL。

[1189] 1D.式1b的其它化合物

[1190] 类似地,通过遵循实施例2B-C中所述的程序并且替换化合物聚(葡糖胺甲基丙烯酸酯)-(吡啶基二硫化物)或聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-(吡啶基二硫化物),获得式1b的相应化合物,其中Z”是2-NAcGLU。

[1191] 实施例3

[1192] F1f-OVA-m_1-n_4-p_{33}-2NAcGAL

[1193] 3A.式1f,其中X’是卵清蛋白,m是1,n是4,p是33,R^9是直接键,并且Z”是2NAcGAL

[1194] 在无内毒素的管中,将OVA(4.0mg,0.0000952381mmol)加入0.1ml pH 7.4PBS并搅拌。独立地,将式601的聚(N-乙酰基半乳糖胺)-对-硝基碳酸苯酯(poly-(n-Acetylgalactosamine)-p-nitrophenyol carbonate)(其中n是4,p是33)(33.0mg,0.002380952mmol)加入100μl的pH7.5 PBS中,并且涡旋振荡直至溶解。将两种溶液组合,并且将混合物剧烈搅拌1小时。然后收集混合物并以pH 7.4PBS透析3天(30kDa分子量截留),以提供式1f的产物。

[1195] 3B.式1f,其中X’是卵清蛋白,并且m是1,n是4,p是33,R^9是直接键,并且Z”是2NAcGLU

[1196] 类似地,通过遵循实施例3A的程序并且以聚(n-乙酰基葡糖胺)-对-硝基碳酸苯酯替换聚(n-乙酰基半乳糖胺)-对-硝基碳酸苯酯,获得式1f的相应化合物,其中Z”是2NAcGLU。

[1197] 实施例4

[1198] F1g-PVA-m_1-p_{90}-2NAcGAL

[1199] 4A.式1g,其中X’是卵清蛋白,并且m是1,p是90,R^9是直接键,并且Z”是2NAcGAL3A

[1200] 在无内毒素的管中,将OVA(5.0mg,0.000119048mmol)加入0.2ml pH 7.4PBS并搅拌。向搅拌的溶液加入溶解于0.4ml pH 7.4PBS中的75mg(0.00297619mmol)聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS(式701)。允许混合物搅拌2小时。然后收集该混合物并对pH 7.4PBS透析3天(30kDa分子量截留),以提供式1g的产物。

[1201] 4B.式1g,其中X’是卵清蛋白,并且m是1,p是90,R^9是直接键,并且Z”是2NAcGLU

[1202] 类似地,通过遵循实施例4A的程序并且以聚(葡糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS替换聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS,获得式1g的相应化合物,其中Z”是2NAcGLU。

[1203] 实施例5

[1204] F1h-OVA-m_2-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL

[1205] 5A.式802',其中X'是卵清蛋白,m是2,并且n是45

[1206] 在无内毒素的管中,将OVA(3.0mg,0.0000714286mmol)加入150μl含有5mM EDTA的pH 8.0PBS并搅拌。将溶解于DMF的二苯并环辛炔-PEG-(对硝基苯基碳酸酯)(式801)(5.265mg,0.002142857mmol)加入OVA溶液,并搅拌1小时。使用离心尺寸排阻柱去除过量的二苯并环辛炔-PEG-(对硝基苯基碳酸酯),以提供式802'的产物。

[1207] 5B.式1h,其中X'是卵清蛋白,m是2,n是45,p是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键并且Z"是2NAcGAL

[1208] 将聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3(式803,其中p是55,q是4,且Z"是N-乙酰基半乳糖胺)(33mg,0.002142857mmol)溶解于100μl的pH 7.4PBS中,并且在搅拌的情况下加入实施例5A的产物。1小时后,通过离心尺寸排阻色谱纯化所得的式1h产物。

[1209] 5C.式1h,其中X'是卵清蛋白,m是2,n是45,p是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键,并且Z"是2NAcGLU

[1210] 类似地,通过遵循实施例5B的程序并且以聚(葡糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS替换聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS,获得式1h的相应化合物,其中Z"是2NAcGLU。

[1211] 实施例6

[1212] F1j-OVA-m_{10}-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL

[1213] 6A.式103',其中X'是卵清蛋白,且m是10

[1214] 在无内毒素的管中,将OVA(5.0mg,0.00019mmol)加入150μl含有5mM EDTA的pH 8.0PBS并搅拌。独立地,将1mg Taut试剂溶解于100μl pH7.0 PBS中,并将由此获得的16μl(0.00119mmol)Traut试剂溶液在持续搅拌的情况下加入OVA的搅拌的溶液。1小时后,使用离心尺寸排阻柱除去未反应的Traut试剂,以提供式103'的产物。

[1215] 6B.式902",其中X'是卵清蛋白,m为10且n是45

[1216] 将二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物)(式901,其中n为45)(6.0mg,0.00238mmol)溶解于DMF中,并且将所得溶液加入实施例6A获得的OVA溶液,并搅拌1小时。使用离心尺寸排阻色谱除去过量的二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物),以提供式902"的产物。

[1217] 6C.式1j,其中X'是卵清蛋白,m是10,n是45,p是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键并且Z"是2NAcGAL。

[1218] 聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3(式803,其中p是55,q是4和Z"是N-乙酰基半乳糖胺)(36mg,0.00238mmol)溶解于150μl的pH 7.4PBS中,并在搅拌的情况下加入实施例6B的产物。1小时后,通过离心尺寸排阻色谱纯化获得式1j的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。

[1219] 6D.式1j,其中X'是卵清蛋白,m是10,n是45,p是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键,并且Z"是2NAcGLU

[1220] 类似地,通过遵循实施例6C的程序并且以聚(葡糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS替换聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS,获得式1j的相应化合物,其中Z"是2NAcGLU。

[1221] 实施例7

[1222] F1L-OVA-m_2-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL

[1223] 7A.式1002,其中X'是卵清蛋白,m是2,并且n是80

[1224] 将二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物)(式1001,其中n为80)(9.0mg,0.00238mmol)溶解于DMF中,并且将所得溶液加入经纯化的式103'的OVA溶液(其中X'是卵清蛋白,且m是2)中,例如如实施例6A中所述制备,并搅拌1小时。使用离心尺寸排阻色谱除去过量的二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物),以提供式1002的产物。

[1225] 7B.式1L,其中X'是卵清蛋白,m是2,n是80,p是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键并且Z"是2NAcGAL

[1226] 将聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3(式803,其中p是55,q是4和Z"是N-乙酰基半乳糖胺)(36mg,0.00238mmol)溶解于150μl的pH 7.4PBS中,并在搅拌的情况下加入实施例7A的产物。1小时后,通过离心尺寸排阻色谱纯化获得的式1L的产物(除去过量的聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3)。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。

[1227] 7C.式1L,其中X'是卵清蛋白,m是2,n是80,p是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键并且Z"是2NAcGLU

[1228] 类似地,通过遵循实施例7B的程序并且以聚(葡糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS替换聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS,获得式1jL的相应化合物,其中Z"是2NAcGLU。

[1229] 实施例8

[1230] 聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)聚合物的制备

[1231] 8A.半乳糖胺甲基丙烯酸酯

[1232] 对搅拌的半乳糖胺盐酸盐(2.15g,10.0mmol)加入0.5M甲醇钠(22ml,11.0mmol)。30分钟后,加入甲基丙烯酸酐(14.694克,11.0mmol),并继续搅拌4小时。通过旋转蒸发(rotovap)将所获得的半乳糖胺甲基丙烯酸酯装载到硅胶上并使用DCM:甲醇(85:15)经由柱层析纯化。

[1233] 8B.式201,其中n是4,并且p为30

[1234] 将半乳糖甲基丙烯酸酯(600mg,2.43mmol),2-(2-(2-(2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)2-(苯基碳硫基)硫代)乙酸乙酯(44.8mg,0.081mmol)和AIBN(3.174089069mg,0.016mmol)加入Schlenk烧瓶中的1.5ml DMF中。将反应混合物进行4个冷冻-解冻循环,然后在70℃搅拌6小时。于12ml甲醇中沉淀式201的期望的聚合物产物,并在减压下除去过量的溶剂。

[1235] 8C.式201,其中n是4并且p是30

[1236] 类似地,通过遵循实施例8B的程序并且以葡萄糖甲基丙烯酸酯替换半乳糖甲基丙烯酸酯,获得相应的聚(葡糖胺甲基丙烯酸酯)聚合物。

[1237] 实施例9

[1238] F1aA-PE-m_3-n_{80}的制备

[1239] 9A.式103',其中X'是藻红蛋白

[1240] 在无内毒素的管中,将藻红蛋白("PE")(购自Pierce)(200μl,0.000004mmol)加入50μl含有5mM EDTA的pH 8.0PBS并搅拌。独立地,将1mg Traut试剂溶解于100μl pH7.0 PBS中,并将由此获得的2μl(0.00013mmol)的Traut试剂溶液加入PE的搅拌的溶液并继续搅拌。1小时后,使用离心尺寸排阻柱除去过量的Traut试剂,以提供式103'的产物。

[1241] 9B.式106A,其中n是80

[1242] 在无内毒素的管中,在搅拌的情况下将半乳糖胺(7.0mg,0.03246mmol)溶解于100

μl的含有5mM EDTA的pH8.0 PBS中。将溶解于50μl pH7.0 PBS中的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(式104,其中n为80)(16.23mg,0.00464mmol)加入半乳糖胺的搅拌溶液。1小时后,所得的式106A的产物准备好在无进一步纯化的情况下使用。

[1243] 9C.式1a,其中X'是藻红蛋白,m为3,n为80并且Z'是半乳糖胺

[1244] 将实施例9A中制备的经纯化的PE-Traut缀合物直接加入在实施例9B制备的式106A的搅拌产物。1小时后,通过将反应混合物通过离心尺寸排阻柱纯化获得的式1a的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。

[1245] 9D.式1a,其中X'是藻红蛋白,m为3,n为80并且Z'是葡糖胺

[1246] 类似地,通过遵循实施例9B和C的程序并且以葡糖胺替换半乳糖胺,获得式1a的相应化合物,其中Z"是葡糖胺。

[1247] 实施例10

[1248] 肝分布

[1249] 10A.例如,如实施例9所述制备F1aA-PE-m_3-n_{80}。制备无菌盐水中的30μg/100μl溶液用于注射。

[1250] 将F1aA-PE-m_3-n_{80}溶液(30μg)经由尾静脉注射施用于三组C57 black 6小鼠中的一组(每组3只)。其它两组小鼠接收等体积的在100μl盐水中的藻红蛋白或盐水载体。施用后三小时,收集这些动物的肝和脾,并且通过流式细胞术确定这些器官中的细胞荧光水平作为细胞PE含量的指示。

[1251] 如图1A-1D所示,与接收PE溶液的动物相比,来自用F1aA-PE-m_3-n_{80}处理的小鼠的肝中的窦内皮细胞(LSEC)(1A)、肝细胞(1C)、库普弗细胞(KC)(1B)、和其它抗原呈递细胞(APC)(1D)表现出荧光的至少三倍的增加。在从三组收获的脾细胞中没有找到荧光的可检测差异。这些结果证实,F1aA-PE-m_3-n_{80}对于结合肝中的抗原呈递细胞具有足够的特异性。

[1252] 10B.通过遵循实施例10A中描述的程序并且用以下化合物替换F1aA-PE-m_3-n_{80}: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和F1n-PE-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH(例如如参照实施例9所述通过分别替换实施例2B、3、4、5B、6B、7B、15G、15L、16B和16F中的X制备),证实化合物F1aA-PE-m_3-n_{80}与化合物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和F1n-PE-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH对于结合肝中的抗原呈递细胞具有足够的特异性。

[1253] 10C.通过遵循实施例10A和10B中描述的程序并且以相应的葡糖基化化合物替换半乳糖苷化化合物,证实了葡糖基化化合物对于结合肝中的抗原呈递细胞具有足够的特异性。

[1254] 实施例11

[1255] 抗原特异性OT1 $CD8^+$T细胞的增殖

[1256] 11A.将例如如实施例1中所述合成的F1aA-OVA-m_4-n_{80}制备为10μg/100μl盐水溶液

用于注射。在第0天,将106个OT-1T细胞荧光标记并经由尾静脉注射过继转移到3组CD 45.2小鼠(每组5只)中。次日(即第1天),经尾静脉注射将10μg F1aA-OVA-m_4-n_{80}、OVA或盐水分别施用于3组小鼠中的每组。在第6天,将动物处死并通过荧光激活细胞分选测定脾增殖OT-I细胞的%。

[1257] 来自本研究的结果(参照图2)显示,在用F1aA-OVA-m_4-n_{80}(图2中的"Gal-OVA")处理的小鼠中增殖的OTI T细胞的百分比显著大于用OVA或盐水(图2中的"未处理")处理的小鼠脾中增殖的OTI细胞的百分比。OTI细胞增殖的增加表明相对于其它疗法,用F1aA-OVA-m_4-n_{80}处理的动物中增加的CD8+T细胞的交叉引发。与来自实施例12的结果一致,这些结果指示F1aA-OVA-m_4-n_{80}能够将抗原靶向肝,从而增加肝中抗原呈递细胞对OVA特异性OTI T细胞的OVA呈递。

[1258] 11B.为了区分扩增成功能性效应表型的T细胞与扩增并删除的T细胞,可以通过作为凋亡并因此删除的标志的膜联蛋白V的结合,以及耗竭标记物程序性死亡-1(PD-1),来分析增殖的OTI $CD8^+$T细胞的磷脂酰丝氨酸暴露。如图3A-3B中所示,F1aA-OVA-m_4-n_{80}(图3A-3B中的"Gal-OVA")比可溶性OVA诱导高得多数目的膜联蛋白-V^+和PD-1^+增殖OTI $CD8^+$T细胞。这些数据证明了根据本发明中公开的一些实施方案,将针对其诱导的耐受性的抗原与如本发明中公开的连接基和肝靶向部分偶联导致了能够成为免疫功能性的T细胞的出乎意料增强的生成。

[1259] 11C.通过遵循以下实施例11A和11B中所述的程序,并且用例如如实施例3A,4A,5B,6C,7B和19G中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8,显示来自实施例3A,4A,5B,6C,7B和19G的化合物比可溶性OVA诱导高得多数目的膜联蛋白-V^+和PD-1^+增殖OTI $CD8^+$T细胞。

[1260] 11D.通过遵循实施例11A和11B中所述的程序,并且分别用例如如实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F中所述获得的式1和2的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8以及用对应于X(或X' 或X")的抗原替换OVA,显示来自实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F的化合物比可溶性抗原X诱导高得多数目的膜联蛋白-V^+和PD-1^+增殖OTI $CD8^+$T细胞。

[1261] 11E.通过遵循实施例11A-D中所述的程序并且以相应的葡糖基化化合物替换半乳糖苷化化合物,证实了葡糖基化化合物比可溶性抗原X诱导高得多数目的膜联蛋白-V^+和PD-1^+增殖OTI $CD8^+$T细胞。

[1262] 实施例12

[1263] F1aA-OVA-m_4-n_8不诱导OVA特异性抗体应答

[1264] 12A.为了评估对F1aA-OVA-m_4-n_8的体液免疫应答,我们通过每周静脉内注射F1aA-OVA-m_4-n_8或OVA来处理小鼠,然后测量血液中OVA-特异性抗体的水平。在实验的第0天、第7天和14天,对小鼠施用含有以下之一的100μl盐水的静脉内注射:1)6μg OVA;2.)6μg F1aA-OVA-m_4-n_8;3.)30μg OVA;4.)30μg F1aA-OVA-m_4-n_8,或5.)仅盐水。每组含有5只小鼠。第19天,将小鼠通过颊穿刺放血,并通过ELISA测定在每只小鼠的血液中OVA特异性抗体的效价。这项研究的结果显示了,虽然用6μg和30μg OVA处理小鼠增加了OVA特异性抗体效价,但用6μg和30μg F1aA-OVA-m_4-n_8(图4中的"Gal-OVA")处理的小鼠具有类似于用盐水处理的小鼠(即经载体处理的动物)的血液效价(图4)。例如,用6μg和30μg OVA处理的小鼠分别具有3.5和2.5的平均抗体效价;然而,用6μg和30μg OVA处理的小鼠分别具有0.75和0.25的平均抗

体效价。因此,这些数据证明了将期望的免疫所针对的抗原与根据本发明公开的一些实施方案的连接基和肝靶向部分的偶联导致显著较少的抗原特异性抗体生成。因此,这些数据证明了对通过本发明中公开的组合物对肝递送的抗原的免疫应答是降低的。

[1265] 12B.通过遵循实施例12A中所述的程序并且用例如如实施例3A,4A,5B,6C,7B和15G中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8,显示用来自实施例3A,4A,5B,6C,7B和15G的化合物处理的小鼠具有与用盐水处理的小鼠类似的OVA特异性抗体效价。

[1266] 12C.通过遵循实施例12B中所述的程序并且分别用如例如实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8以及用对应于X(或X'或X")的抗原替换OVA,显示用来自实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F的化合物处理的小鼠具有与用盐水处理的小鼠类似的抗原X特异性抗体效价。

[1267] 12D.通过遵循实施例12A-C中所述的程序并且以相应的葡糖基化化合物替换半乳糖苷化化合物,证实了葡糖基化化合物具有与用盐水处理的小鼠类似的抗原X特异性抗体效价。

[1268] 实施例13

[1269] F1aA-OVA-m_4-n_8消减OVA特异性抗体

[1270] 13A.用20μg溶解于100μl盐水的F1aA-OVA-m_4-n_8静脉内注射处理具有不同的OVA抗体血液效价的小鼠(每只小鼠具有0至4.5的效价)。在第0、5、7、12和14天对小鼠静脉内注射F1aA-OVA-m_4-n_8(将F1aA-OVA-m_4-n_8注射标记为"Gal-OVA"并在图5的x轴上显示为绿色箭头)。为了确定F1aA-OVA-m_4-n_8消减血清OVA特异性抗体的能力,在第-1天将小鼠放血以建立初始抗体效价,然后在第2、6、9、13和16天每次注射F1aA-OVA-m_4-n_8后进行随后的放血。通过ELISA测定每只小鼠的抗体效价。来自本研究的结果显示了F1aA-OVA-m_4-n_8能够消减小鼠中的血清抗体水平。例如,第一次F1aA-OVA-m_4-n_8注射后一天(即,第2天),具有阳性OVA抗体效价的小鼠经历血清抗体水平的5至100倍的降低(图5)。这些结果显示了尽管在19天实验的过程内,一些小鼠的抗体效价确实增加,但是效价水平从未达到第-1天时测定的初始抗体效价,并且随后的F1aA-OVA-m_4-n_8给药有效减少抗体效价的这些瞬时增加。这些结果证明了F1aA-OVA-m_4-n_8具有结合血清OVA特异性抗体的特异性和消减OVA特异性血清抗体所需要的动力学。

[1271] 13B.通过遵循实施例13A中所述的程序并且用如例如实施例3A、4A、5B、6C、7B和15G中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8,显示来自实施例3A、4A、5B、6C、7B和15G的化合物具有结合血清OVA特异性抗体的特异性和消减OVA特异性血清抗体所需要的动力学。

[1272] 13C.通过遵循实施例13A中所述的程序并且分别用如例如实施例1E、1G、2C、10D、15I、15L、16B、16D和16F中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8以及用对应于X(或X'或X")的抗原替换OVA,显示来自实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F的化合物具有结合血清X特异性抗体的特异性和消减抗原X特异性血清抗体所需要的动力学。

[1273] 13D.通过遵循实施例13A-C中所述的程序并且以相应的葡糖基化化合物替换半乳糖苷化化合物,证实了葡糖基化化合物具有结合血清抗原X特异性抗体的特异性和消减抗原X特异性血清抗体所需要的动力学。

[1274] 实施例14

[1275] OT-1攻击-与-耐受性模型(challenge-to-tolerance model)

[1276] 14A.使用建立的OTI攻击-与-耐受性模型(Liu,Iyoda,等,2002),表明F1aA-OVA-m_4-n_8(mGal-OVA)和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}(pGal-OVA)防止对疫苗介导的抗原攻击的后续免疫应答的能力-即便是对于牵涉非常强的细菌衍生的佐剂(即脂多糖)的攻击。为了耐受化,在OTI $CD8^+$($CD45.2^+$)T细胞对$CD45.1^+$小鼠(n=每组5只小鼠)的过继转移后1天和6天静脉内施用100μl盐水中233nmol的F1aA-OVA-m_4-n_8、F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}、或可溶性OVA。再过9天以允许转移的T细胞的潜在删除后,然后通过皮内注射用以脂多糖(LPS)(50ng)作为佐剂的OVA(10μg)攻击接受体小鼠。表征攻击后4天的引流淋巴结以确定是否实际发生删除。

[1277] 14B.与在LPS的抗原攻击前用未修饰的OVA处理的小鼠相比,F1aA-OVA-m_4-n_8和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}的静脉内施用导致引流淋巴结中OTI $CD8^+$T细胞群体的极度减少,证明了删除耐受性。例如,图6A-6F显示了来自用F1aA-OVA-m_4-n_8(mGal-OVA)和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}(pGal-OVA)处理的小鼠的引流淋巴结与经OVA处理的小鼠相比含有少超过9倍的OTI $CD8^+$T细胞,并且比未接受抗原的静脉内注射的攻击对照小鼠少超过43倍;脾细胞中的应答是相似的。这些结果证明了F1aA-OVA-m_4-n_8和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}减轻了在伴有佐剂的OVA攻击后的OVA特异性免疫应答,因此证实了本发明中公开的组合物适合于诱导免疫耐受性。关于表征,图7显示了F1aA-OVA-m_4-n_{80}和F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}的表征。

[1278] 14C.通过遵循实施例14A和B中所述的程序,并且用例如如实施例3A、4A、5B、6C、7B和15G中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34},显示了来自实施例3A、4A、5B、6C、7B和15G的化合物减轻在伴有佐剂的OVA攻击后的OVA特异性免疫应答。

[1279] 14D.通过遵循实施例14A和B中所述的程序,并且分别用例如如实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F中所述获得的式1的化合物替换F1aA-OVA-m_4-n_8和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}以及用对应于X(或X'或X")的抗原替换OVA,显示了来自实施例1E、1G、2C、15I、15L、16B、16D和16F的化合物减轻在伴有佐剂的抗原X攻击后的抗原X特异性免疫应答。

[1280] 14E.通过遵循实施例14A-D中所述的程序,并且用相应的葡糖基化化合物替换半乳糖苷化化合物,证实了葡糖基化化合物减轻在伴有佐剂的抗原X攻击后的抗原X特异性免疫应答。

[1281] 实施例15

[1282] F1m-OVA-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc

[1283] 15A.式1102,其中R^3是NHAc,且R^4是OH

[1284] 在室温下将N-乙酰基-D-半乳糖胺(式1101,其中R^3是NHAC,且R^4是OH)(5g,22.6mmol)加入氯乙醇的搅拌溶液(200ml)。将溶液冷却至4℃,并且将乙酰氯逐滴加入溶液。将溶液升温至室温,然后加热至70℃。4小时后,在减压下除去未反应的氯乙醇。将100ml乙醇加入粗产物,并且将所得的溶液在碳的存在下搅拌2小时。将溶液过滤,并在减压下除去溶剂。在无进一步纯化的情况下使用相应的式1102的产物N-(2-(2-氯乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺。

[1285] 15B.式1103,其中R^3是NHAc,且R^4是OH

[1286] 在实施例15A中制备的N-(2-(2-氯乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺(2g,7.4mmol)加入DMF(100ml)和叠氮化钠(4g,61.5mmol)的搅拌溶液。将溶液加热到90℃达12小时,然后过滤。在减压下除去残留的溶剂,并通过快速层析(在二氯

甲烷中的10％MeOH)纯化粗产物,以给出相应的式1103的产物N-(2-(2-叠氮基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺。

[1287] 15C.式1104,其中R^3是NHAc,且R^4是OH

[1288] 在实施例15B中制备的N-(2-(2-叠氮基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺(2g,6.9mmol)加入钯碳和乙醇的溶液(50ml)。在氢气(3atm)下搅拌溶液4小时。过滤所得的溶液并在减压下除去残留的溶剂,以提供相应的式1104的产物N-(2-(2-氨基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺,其在无进一步纯化的情况下使用。

[1289] 15D.式1105,其中R^3是NHAc,且R^4是OH

[1290] 将实施例15C中制备的N-(2-(2-氨基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺(1.0g,3.78mmol)加入在DMF(50ml)中的甲基丙烯酸酐(0.583g,3.78mmol)的溶液。然后将三乙胺加入该溶液,并且在室温下搅拌反应2小时。2小时后,在减压下除去过量的溶剂,并且通过快速层析分离相应的式1105的产物N-(2-((3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙基)甲基丙烯酰胺。

[1291] 15E.式1107,其中p是30,q是4,R^3是NHAC,R^4为OH且R^8是CMP

[1292] 将式1106(其中q为4)的经叠氮化物修饰的uRAFT剂(28mg)加入在DMF中的实施例15D中制备的N-(2-((3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙基)甲基丙烯酰胺(579mg,1.74mmol)和偶氮二异丁腈(2.2mg,0.0116mmol)。将反应混合物进行4次冷冻解冻泵循环,然后在70℃搅拌。12小时后,通过加入甲醇从反应混合物沉淀式1107的聚合物产物,其中p是30且q是4。从固体弃去溶剂并收集固体,并且通过减压除去残留的溶剂。

[1293] 15F.式1109,其中X'是OVA,m是2,且n是80

[1294] 将卵清蛋白(5mg,0.00012mmol)加入100μl磷酸钠缓冲液(pH 8.0)并搅拌。对此溶液加入5mg式1108的化合物,其中n是80。1小时后,通过离心尺寸排阻色谱从溶液中除去式1108的未反应的化合物。所得的含有式1109的相应产物的缓冲溶液在无进一步纯化的情况下用于接下来的反应。

[1295] 15G.式1m,其中X'是OVA,m是2,n是80,p是30,q是4,R^3是NHAC,且R^8是CMP

[1296] 将实施例15F中制备的溶液加入100μl的磷酸钠缓冲液(pH 8.0),其含有10mg在实施例15E中制备的式1107的产物。让反应物搅拌2小时,然后经由离心尺寸排阻色谱除去过量的式1107,以提供过溶液中的式1m的相应的异构体产物,其在无进一步纯化的情况下用于生物研究。标题化合物的名称中R^3取代基显示为2NHAc。

[1297] 15H.式1109的其它化合物

[1298] 通过遵循实施例15F中所述的方案并且用以下各项替换OVA:

[1299] ●阿昔单抗,

[1300] ●阿达木单抗,

[1301] ●阿加糖酶α,

[1302] ●阿加糖酶β,

[1303] ●阿地白介素,

[1304] ●阿葡糖苷酶α,

[1305] ●因子VIII,

[1306] ●因子IX,

[1307] ●L-天冬酰胺酶,

[1308] ●拉罗尼酶,

[1309] ●奥曲肽,

[1310] ●苯丙氨酸氨裂解酶,

[1311] ●拉布立酶,

[1312] ●胰岛素(SEQ ID NO:1),

[1313] ●GAD-65(SEQ ID NO:2),

[1314] ●IGRP(SEQ ID NO:3)

[1315] ●MBP(SEQ ID NO:4),

[1316] ●MOG(SEQ ID NO:5),

[1317] ●PLP(SEQ ID NO:6),

[1318] ●MBP13-32(SEQ ID NO:7),

[1319] ●MBP83-99(SEQ ID NO:8),

[1320] ●MBP111-129(SEQ ID NO:9),

[1321] ●MBP146-170(SEQ ID NO:10),

[1322] ●MOG1-20(SEQ ID NO:11),

[1323] ●MOG35-55(SEQ ID NO:12),

[1324] ●PLP139-154(SEQ ID NO:13),

[1325] ●MART1(SEQ ID NO:14),

[1326] ●酪氨酸酶(SEQ ID NO:15),

[1327] ●PMEL(SEQ ID NO:16),

[1328] ●水通道蛋白-4(SEQ ID NO:17),

[1329] ●S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18),

[1330] ●IRBP(SEQ ID NO:19),

[1331] ●伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6),

[1332] ●天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20),

[1333] ●脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),

[1334] ●α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22),

[1335] ●Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23),

[1336] ●Fel d 1A(UNIPROT P30438),

[1337] ●猫白蛋白(UNIPROT P49064),

[1338] ●Can f 1(UNIPROT 018873),

[1339] ●狗白蛋白(UNIPROT P49822),和

[1340] ●RhCE(UNIPROT P18577),

[1341] 获得式1109(其中n是80)的以下相应的化合物:

[1342] ●X是阿昔单抗,并且m是10,

[1343] ●X是阿达木单抗,并且m是11,

[1344] ●X是阿加糖酶α,并且m是14,

[1345] ●X是阿加糖酶β,并且m是14,

[1346] ●X是阿地白介素,并且m是6,

[1347] ●X是阿葡糖苷酶α,并且m是13,

[1348] ●X是因子VIII,并且m是100,

[1349] ●X是因子IX,并且m是18,

[1350] ●X是L-天冬酰胺酶,并且m是5,

[1351] ●X是拉罗尼酶,并且m是7,

[1352] ●X是奥曲肽,并且m是1,

[1353] ●X是苯丙氨酸氨裂解酶,并且m是12,

[1354] ●X是拉布立酶,并且m是12,

[1355] ●X是胰岛素(SEQ ID NO:1),并且m是2,

[1356] ●X是GAD-65(SEQ ID NO:2),并且m是8,

[1357] ●X是IGRP(SEQ ID NO:3),并且m是7,

[1358] ●X是MBP(SEQ ID NO:4),并且m是6,

[1359] ●X是MOG(SEQ ID NO:5),并且m是5,

[1360] ●X是PLP(SEQ ID NO:6),并且m是8,

[1361] ●X是MBP13-32(SEQ ID NO:7),并且m是1,

[1362] ●X是MBP83-99(SEQ ID NO:8),并且m是1,

[1363] ●X是MBP111-129(SEQ ID NO:9),并且m是1,

[1364] ●X是MBP146-170(SEQ ID NO:10),并且m是2,

[1365] ●X是MOG1-20(SEQ ID NO:11),并且m是1,

[1366] ●X是MOG35-55(SEQ ID NO:12),并且m是2,

[1367] ●X是PLP139-154(SEQ ID NO:13),并且m是3,

[1368] ●X是MART1(SEQ ID NO:14),并且m是4,

[1369] ●X是酪氨酸酶(SEQ ID NO:15),并且m是8,

[1370] ●X是PMEL(SEQ ID NO:16),并且m是5,

[1371] ●X是水通道蛋白4(SEQ ID NO:17),并且m是4,

[1372] ●X是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18),并且m是12,

[1373] ●X是IRBP(SEQ ID NO:19),并且m是21,

[1374] ●X是伴花生球蛋白,并且m是21,

[1375] ●X是天然的α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20),并且m是1,

[1376] ●X是脱酰氨基的α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),并且m是1,

[1377] ●X是α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22),并且m是1,

[1378] ●X是Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23),并且m是1,

[1379] ●X是Fel d 1,并且m是4,

[1380] ●X是猫白蛋白,并且m是16,

[1381] ●X是Can f 1,并且m是6,

[1382] ●X是狗白蛋白,并且m是23,和

[1383] ●X是RhCE,并且m是10。

[1384] 15I.式1m的其它化合物

[1385] 通过遵循实施例15G中所述的程序,并且替换式1109的化合物,例如如实施例15H中获得,获得式1m的以下相应化合物:

[1386] ●F1m-阿昔单抗-m_{10}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1387] ●F1m-阿达木单抗-m_{11}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1388] ●F1m-阿加糖酶α-m_{14}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1389] ●F1m-阿加糖酶β-m_{14}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1390] ●F1m-阿地白介素-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1391] ●F1m-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1392] ●F1m-因子VIII-m_{100}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1393] ●F1m-因子IX-m_{18}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1394] ●F1m-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1395] ●F1m-拉罗尼酶-m_7-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1396] ●F1m-奥曲肽-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1397] ●F1m-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1398] ●F1m-拉布立酶-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1399] ●F1m-胰岛素-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1400] ●F1m-GAD-65-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1401] ●F1m-IGRP-m_7-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1402] ●F1m-MBP-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1403] ●F1m-MOG-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1404] ●F1m-PLP-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1405] ●F1m-MBP13-32-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1406] ●F1m-MBP83-99-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1407] ●F1m-MBP111-129-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1408] ●F1m-MBP146-170-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1409] ●F1m-MOG1-20-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1410] ●F1m-MOG35-55-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1411] ●F1m-PLP139-154-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1412] ●F1m-MART1-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1413] ●F1m-酪氨酸酶-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1414] ●F1m-PMEL-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1415] ●F1m-水通道蛋白-4-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1416] ●F1m-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1417] ●F1m-IRBP-m_{21}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1418] ●F1m-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1419] ●F1m-天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1420] ●F1m-脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1421] ●F1m-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1422] ●F1m-Ω麦醇溶蛋白-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1423] ●F1m-Fel d 1-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1424] ●F1m-猫白蛋白-m_{16}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1425] ●F1m-Can f 1-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1426] ●F1m-狗白蛋白-m_{23}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,和

[1427] ●F1m-RhCE-m_{10}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc。

[1428] 15J.式1107,其中p是30,q是8,R^3是OH,R^4为OH且R^8是CMP

[1429] 通过遵循实施例15A中所述的程序,并且用半乳糖替换N-乙酰基-D-半乳糖胺,并且遵循实施例15E中所述的程序(除了使用式1106(其中q是8)的经叠氮化物修饰的uRAFT剂),获得式1107的化合物,其中p是30,q是8,R^3是OH,R^4为OH且R^8是CMP。

[1430] 15K.式1109,其中n是62,并且其中X'和m如在实施例19H中

[1431] 通过遵循实施例15F中所述的程序,用如实施例15H中所描述的化合物替换OVA并利用式1108的化合物(其中n是62),获得式1109的相应化合物,其中n是62。

[1432] 15L.式1m的其它化合物

[1433] 通过遵循实施例15G中描述的程序并且用实施例15J中获得的化合物替换式1107的化合物并且用实施例15K中获得的化合物替换式1109的化合物,获得式1m的以下相应化合物:

[1434] ●F1m-阿昔单抗-m_{10}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1435] ●F1m-阿达木单抗-m_{11}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1436] ●F1m-阿加糖酶α-m_{14}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1437] ●F1m-阿加糖酶β-m_{14}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1438] ●F1m-阿地白介素-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1439] ●F1m-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1440] ●F1m-因子VIII-m_{100}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1441] ●F1m-因子IX-m_{18}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1442] ●F1m-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1443] ●F1m-拉罗尼酶-m_7-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1444] ●F1m-奥曲肽-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1445] ●F1m-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1446] ●F1m-拉布立酶-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1447] ●F1m-胰岛素-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1448] ●F1m-GAD-65-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1449] ●F1m-IGRP-m_7-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1450] ●F1m-MBP-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1451] ●F1m-MOG-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1452] ●F1m-PLP-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1453] ●F1m-MBP13-32-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1454] ●F1m-MBP83-99-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1455] ●F1m-MBP111-129-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1456] ●F1m-MBP146-170-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1457] ●F1m-MOG1-20-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1458] ●F1m-MOG35-55-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1459] ●F1m-PLP139-154-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1460] ●F1m-MART1-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1461] ●F1m-酪氨酸酶-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1462] ●F1m-PMEL-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1463] ●F1m-水通道蛋白-4-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1464] ●F1m-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1465] ●F1m-IRBP-m_{21}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1466] ●F1m-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1467] ●F1m-天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1468] ●F1m-脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1469] ●F1m-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1470] ●F1m-Ω-麦醇溶蛋白-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1471] ●F1m-Fel d 1-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1472] ●F1m-猫白蛋白-m_{16}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1473] ●F1m-Can f 1-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1474] ●F1m-狗白蛋白-m_{23}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,和

[1475] ●F1m-RhCE-m_{10}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH。

[1476] 15M.式1m的其它化合物

[1477] 通过遵循实施例15A-L中所述的程序并且分别用葡糖胺或葡萄糖替换半乳糖胺或半乳糖,获得式1m的相应的葡糖基化化合物。

[1478] 实施例16

[1479] F1n-胰岛素-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc

[1480] 16A.式1202,其中X’是胰岛素,m是2且n是1

[1481] 将重组人胰岛素(5mg)加入100μl含有10μl三乙胺的DMF并搅拌直至胰岛素溶解。向该溶液加入10mg(0.0161mmol)式1201的连接基前体,其中n是1,并且搅拌反应物。1小时后,加入1.3ml叔丁基甲基醚以分离式1202的相应的产物,其作为沉淀物回收。在减压下除去残留的DMF和叔丁基甲基醚。通过液相色谱、质谱法和聚丙烯酰胺凝胶电泳的表征证实了产物的身份。式1202的经修饰的胰岛素产物在无进一步纯化的情况下使用。

[1482] 16B.式1n,其中X’是胰岛素,m是2,n是1,p是30,q是4且R^8是CMP

[1483] 将实施例16A中获得的式1202的产物重悬于100μl DMF中。加入在实施例15E中获得的式1107的聚合物产物(10mg),并且搅拌反应物1小时。1小时后,通过加入二氯甲烷(1.3ml)沉淀反应产物。过滤产物并在减压下除去残留的溶剂。然后在500μl PBS中重悬浮粗产物,并通过离心尺寸排阻色谱除去低分子量组分以提供式1n的相应的异构体产物。通过液相色谱、质谱法和聚丙烯酰胺凝胶电泳的表征证实了产物的身份。式1202的经修饰的胰岛素产物在无进一步纯化的情况下使用。

[1484] 16C.式1202的其它化合物

[1485] 通过遵循实施例16A中描述的程序并将胰岛素替换为以下项：

[1486] ●阿昔单抗，

[1487] ●阿达木单抗，

[1488] ●阿加糖酶α，

[1489] ●阿加糖酶β，

[1490] ●阿地白介素，

[1491] ●阿葡糖苷酶α，

[1492] ●因子VIII，

[1493] ●因子IX，

[1494] ●L-天冬酰胺酶，

[1495] ●拉罗尼酶，

[1496] ●奥曲肽，

[1497] ●苯丙氨酸氨裂解酶，

[1498] ●拉布立酶，

[1499] ●GAD-65(SEQ ID NO:2)，

[1500] ●IGRP(SEQ ID NO:3)

[1501] ●MBP(SEQ ID NO:4)，

[1502] ●MOG(SEQ ID NO:5)，

[1503] ●PLP(SEQ ID NO:6)，

[1504] ●MBP13-32(SEQ ID NO:7)，

[1505] ●MBP83-99(SEQ ID NO:8)，

[1506] ●MBP111-129(SEQ ID NO:9)，

[1507] ●MBP146-170(SEQ ID NO:10)，

[1508] ●MOG1-20(SEQ ID NO:11)，

[1509] ●MOG35-55(SEQ ID NO:12)，

[1510] ●PLP139-154(SEQ ID NO:13)，

[1511] ●MART1(SEQ ID NO:14)，

[1512] ●酪氨酸酶(SEQ ID NO:15)，

[1513] ●PMEL(SEQ ID NO:16)，

[1514] ●水通道蛋白-4(SEQ ID NO:17)，

[1515] ●S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18)，

[1516] ●IRBP(SEQ ID NO:19)，

[1517] ●伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6)，

[1518] ●天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20)，

[1519] ●脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21)，

[1520] ●α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22)，

[1521] ●Ω麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23)，

[1522] ●Fel d 1A(UNIPROT P30438)，

[1523] ●猫白蛋白(UNIPROT P49064),

[1524] ●Can f 1(UNIPROT O18873),

[1525] ●狗白蛋白(UNIPROT P49822),和

[1526] ●RhCE(UNIPROT P18577),

[1527] 获得式1202(其中n是1)的以下相应化合物:

[1528] ●X是阿昔单抗,并且m是10,

[1529] ●X是阿达木单抗,并且m是11,

[1530] ●X是阿加糖酶α,并且m是14,

[1531] ●X是阿加糖酶β,并且m是14,

[1532] ●X是阿地白介素,并且m是6,

[1533] ●X是阿葡糖苷酶α,并且m是13,

[1534] ●X是因子VIII,并且m是100,

[1535] ●X是因子IX,并且m是18,

[1536] ●X是L-天冬酰胺酶,并且m是5,

[1537] ●X是拉罗尼酶,并且m是7,

[1538] ●X是奥曲肽,并且m是1,

[1539] ●X是苯丙氨酸氨裂解酶,并且m是12,

[1540] ●X是拉布立酶,并且m是12,

[1541] ●X是GAD-65(SEQ ID NO:2),并且m是8,

[1542] ●X是IGRP(SEQ ID NO:3),并且m是7,

[1543] ●X是MBP(SEQ ID NO:4),并且m是6,

[1544] ●X是MOG(SEQ ID NO:5),并且m是5,

[1545] ●X是PLP(SEQ ID NO:6),并且m是8,

[1546] ●X是MBP13-32(SEQ ID NO:7),并且m是1,

[1547] ●X是MBP83-99(SEQ ID NO:8),并且m是1,

[1548] ●X是MBP111-129(SEQ ID NO:9),并且m是1,

[1549] ●X是MBP146-170(SEQ ID NO:10),并且m是2,

[1550] ●X是MOG1-20(SEQ ID NO:11),并且m是1,

[1551] ●X是MOG35-55(SEQ ID NO:12),并且m是2,

[1552] ●X是PLP139-154(SEQ ID NO:13),并且m是3,

[1553] ●X是MART1(SEQ ID NO:14),并且m是4,

[1554] ●X是酪氨酸酶(SEQ ID NO:15),并且m是8,

[1555] ●X是PMEL(SEQ ID NO:20),并且m是5,

[1556] ●X是水通道蛋白-4(SEQ ID NO:21),并且m是4,

[1557] ●X是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22),并且m是12,

[1558] ●X是IRBP(SEQ ID NO:19),并且m是21,

[1559] ●X是伴花生球蛋白,并且m是21,

[1560] ●X是天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20),并且m是1,

[1561] ●X是脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),并且m是1,

[1562] ●X是α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22),并且m是1,

[1563] ●X是Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27),并且m是1,

[1564] ●X是Fel d 1,并且m是4,

[1565] ●X是猫白蛋白,并且m是16,

[1566] ●X是Can f 1,并且m是6,

[1567] ●X是狗白蛋白,并且m是23,和

[1568] ●X是RhCE,并且m是10。

[1569] 16D.式1n的其它化合物

[1570] 通过遵循在实施例16B中描述的程序,并且替换例如如实施例16C中获得的式1202的化合物,获得式1m的以下相应化合物:

[1571] ●F1n-阿昔单抗-m_{10}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1572] ●F1n-阿达木单抗-m_{11}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1573] ●F1n-阿加糖酶α-m_{14}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1574] ●F1n-阿加糖酶β-m_{14}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1575] ●F1n-阿地白介素-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1576] ●F1n-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1577] ●F1n-因子VIII-m_{100}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1578] ●F1n-因子IX-m_{18}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1579] ●F1n-L-天冬酰胺酶-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1580] ●F1n-拉罗尼酶-m_7-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1581] ●F1n-奥曲肽-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1582] ●F1n-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1583] ●F1n-拉布立酶-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1584] ●F1n-GAD-65-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1585] ●F1n-IGRP-m_7-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1586] ●F1n-MBP-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1587] ●F1n-MOG-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1588] ●F1n-PLP-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1589] ●F1n-MBP13-32-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1590] ●F1n-MBP83-99-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1591] ●F1n-MBP111-129-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1592] ●F1n-MBP146-170-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1593] ●F1n-MOG1-20-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1594] ●F1n-MOG35-55-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1595] ●F1n-PLP139-154-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1596] ●F1n-MART1-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1597] ●F1n-酪氨酸酶-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1598] ●F1n-PMEL-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1599] ●F1n-水通道蛋白-4-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1600] ●F1n-S-抑制蛋白-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1601] ●F1n-IRBP-m_{21}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1602] ●F1n-伴花生球蛋白-m_{21}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1603] ●F1n-天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1604] ●F1n-脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1605] ●F1n-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1606] ●F1n-Ω-麦醇溶蛋白-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1607] ●F1n-Fel d 1-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1608] ●F1n-猫白蛋白-m_{16}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1609] ●F1n-Can f 1-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1610] ●F1n-狗白蛋白-m_{23}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,和

[1611] ●F1n-RhCE-m_{10}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc。

[1612] 16E.式1202,其中n是33,并且其中X’和m是如在实施例20C中所述

[1613] 通过遵循实施例16F中描述的程序,并且用如实施例16C中描述的化合物替换胰岛素并使用式1201的化合物(其中n是33),获得式1202的相应化合物,其中n是33。

[1614] 16F.式1n的其它化合物

[1615] 通过遵循实施例16B中描述的程序,并且用在实施例15J中获得的化合物替换式1107的化合物并且用在实施例16E中获得的化合物替换式1202的化合物,获得式1n的以下相应化合物:

[1616] ●F1n-阿昔单抗-m_{10}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1617] ●F1n-阿达木单抗-m_{11}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1618] ●F1n-阿加糖酶α-m_{14}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1619] ●F1n-阿加糖酶β-m_{14}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1620] ●F1n-阿地白介素-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1621] ●F1n-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1622] ●F1n-因子VIII-m_{100}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1623] ●F1n-因子IX-m_{18}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1624] ●F1n-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1625] ●F1n-拉罗尼酶-m_7-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1626] ●F1n-奥曲肽-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1627] ●F1n-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1628] ●F1n-拉布立酶-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1629] ●F1n-GAD-65-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1630] ●F1n-IGRP-m_7-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1631] ●F1n-MBP-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1632] ●F1n-MOG-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1633] ●F1n-PLP-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1634] ●F1n-MBP13-32-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1635] ●F1n-MBP83-99-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1636] ●F1n-MBP111-129-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1637] ●F1n-MBP146-170-m_2-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1638] ●F1n-MOG1-20-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1639] ●F1n-MOG35-55-m_2-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1640] ●F1n-PLP139-154-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1641] ●F1n-MART1-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1642] ●F1n-酪氨酸酶-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1643] ●F1n-PMEL-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1644] ●F1n-水通道蛋白-4-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1645] ●F1n-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1646] ●F1n-IRBP-m_{21}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1647] ●F1n-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1648] ●F1n-天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1649] ●F1n-脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1650] ●F1n-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1651] ●F1n-Ω-麦醇溶蛋白-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1652] ●F1n-Fel d 1-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1653] ●F1n-猫白蛋白-m_{16}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1654] ●F1n-Can f 1-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1655] ●F1n-狗白蛋白-m_{23}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,和

[1656] ●F1n-RhCE-m_{10}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH。

[1657] 16G.式1n的其它化合物

[1658] 通过遵循实施例16A-F中所述的程序并且用葡糖基化部分替换半乳糖苷化部分，获得式1n的相应的葡糖基化化合物。

[1659] 实施例17

[1660] 式1507,其中p是90,t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH

[1661] 17A.式1502,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH

[1662] 在室温下将N-乙酰基-D-葡糖胺(式1101,其中R^3是NHAc并且R^4是OH)(5.0g,22.6mmol)加入2-(2-氯乙氧基)乙-1-醇(50ml)的搅拌溶液。将溶液冷却到4℃,并且将乙酰氯逐滴加入溶液。将溶液升到室温,并且加热到70℃。4小时后,将反应混合物加入200ml乙酸乙酯。收集形成的沉淀物,加入100ml乙醇,并且在存在碳的情况下搅拌2小时。将溶液过滤,并且在减压下除去溶剂。式1502的相应产物N-乙酰基-D-葡糖胺-2-(氯乙氧基)乙醇在无进一步纯化的情况下使用。

[1663] 17B.式1503,其中t是1,R^3是NHAc,并且R^4是OH

[1664] 将N-乙酰基-D-葡糖胺-2-(氯乙氧基)乙醇(2.0g,6.11mmol)加入DMF(100ml)和叠氮化钠(4.0g,61.5mmol)的搅拌溶液。在90℃加热溶液12小时,然后过滤。在加压下除去残留的溶剂,并且通过快速层析(二氯甲烷中的10％MeOH)纯化粗产物以给出式1503的相应产物N-乙酰基-D-葡糖胺-2-(叠氮基乙氧基)乙醇。

[1665] 17C.式1504,其中t是1,R^3是NHAc,并且R^4是OH

[1666] 将N-乙酰基-D-葡糖胺-2-(叠氮基乙氧基)乙醇(2.0g,5.9mmol)加入钯碳和乙醇(50ml)的溶液。在氢气(3atm)下搅拌溶液4小时。将所得的溶液过滤,并且在加压下除去残留的溶剂以提供式1504的相应产物N-乙酰基-D-葡糖胺-2-(氨基乙氧基)乙醇。

[1667] 17D.式1505,其中t是1,R^3是NHAc,并且R^4是OH

[1668] 将N-乙酰基-D-葡糖胺-2-(氨基乙氧基)乙醇(1.0g,3.25mmol)加入DMF(50ml)中的甲基丙烯酸酐(0.583g,3.78mmol)溶液。然后,将三乙胺加入溶液,并且在室温搅拌反应物2小时。在2小时后,在减压下除去过量的溶剂,并且通过快速层析分离式1505的相应产物((2S,3S,4S,5R,6S)-4,5-二羟基-6-(羟基甲基)-2-(2-(2-甲基丙烯酰胺基乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基甲酸。

[1669] 17E.式1507,其中p是90,q是4,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1670] 给25ml Schlenk烧瓶填充式1505的化合物、实施例17D的产物(272mg,0.72mmol)、N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺("HPMA",以从制造商接收的那样使用)(211mg,1.47mmol)、式1106的经叠氮化物修饰的uRAFT剂(其中q是4并且R^8是CMP)(10.41mg,0.0217mmol)、偶氮二(异丁腈)(0.98mg,0.005mmol)、和1.2ml二甲基甲酰胺。将反应混合物进行四个冷冻-泵送-解冻脱气循环,然后在70℃搅拌20小时。通过在丙酮中沉淀反应混合物回收式1507的相应的无规聚合产物。在减压下除去过量的丙酮以提供无规聚合产物,其在无进一步纯化的情况下使用。

[1671] 17F.式1507,其中p是90,q是4,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基,使用N-乙酰基-D-半乳糖胺

[1672] 通过遵循实施例17A到17E的程序并且以N-乙酰基-D-半乳糖胺替换实施例17A的程序中的N-乙酰基-D-葡糖胺,获得式1507的相应的半乳糖苷化合物

[1673] 17G.式1507的化合物,其中t不是1

[1674] 通过遵循实施例17A到17E的程序并且以下替换2-(2-氯乙氧基)乙-1-醇:

[1675] ●2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙-1-醇,提供式1507的相应化合物,其中t是2,

[1676] ●2-(2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇,提供式1507的相应化合物,其中t是3,

[1677] ●2-(2-(2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇,提供式1507的相应化合物,其中t是4,

[1678] ●2-(2-(2-(2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇,提供式1507的相应化合物,其中t是5,并且

[1679] ●2-(2-(2-(2-(2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇,提供式1507的相应化合物,其中t是6。

[1680] 17H.具有多个W^1基团的式1507的化合物,其中t变化

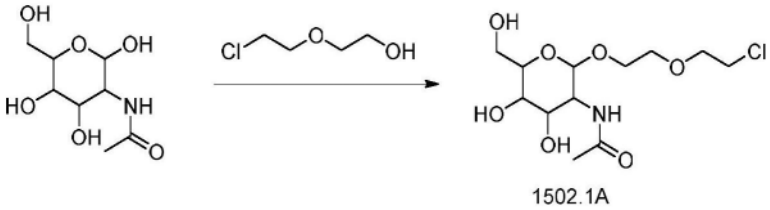
[1681] 通过遵循实施例17E的程序并且将式1505(其中t是1)的化合物替换为各0.36mmol式1505(其中t是2和4)(例如,通过遵循实施例17A到17D的程序如实施例17F中所述的那样制备),获得式1507的相应无规共聚物,具有在t是2的情况下约15个W^1基团,在t是4的情况下15个W^1基团,以及60个W^2基团。

[1682] 17I.具有葡糖基和半乳糖基部分的混合物的式1507的化合物

[1683] 通过遵循实施例17E的程序并且将式1505的化合物替换为各0.36mmol葡糖基和半乳糖基式1505(例如,通过遵循实施例17A到17D的程序如实施例17D和实施例17F中所述制备),获得式1507的相应的无规共聚物,具有约15个葡糖基W^1基团、15个半乳糖基W^1基团和60个W^2基团。

[1684] 实施例17.1

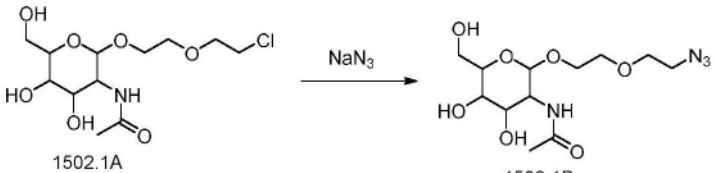
[1685] 式1507,其中t是1,R^3是NHAc,并且R^4是OH

[1686] 

1502.1A

[1687] 17.1A.式1502,其中t是1,R^3是NHAc,并且R^4是OH;2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)-α-NAc-半乳糖胺(1502.1A)。

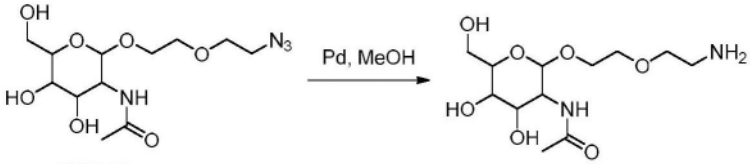
[1688] 将乙酰氯(4.35mL,61.05mmol)逐滴加入2-(2'-氯乙氧基)乙醇(40mL)中NHAc保护的D-半乳糖胺(10.0g)的冰冷溶液。在4℃将混合物搅拌15分钟,然后转移到70℃的油浴。在冷却冷凝器下将反应保持混合达4小时。该时间后,将暗褐色的溶液冷却并且倒入400mL乙酸乙酯和二氯甲烷(3:1,v/v)溶液中,以除去过量的未反应的氯乙醇。将混合物置于冷冻器中30分钟,然后倒出暗褐色的粘性沉淀物。将沉淀物溶解于无水乙醇中,并且添加活性炭。将悬浮液混合1.5小时,然后经由硅藻土过滤,并且用乙醇清洗。在最后的步骤中,在真空中蒸发乙醇以提供12.8g产物(1502.1A)(95.24%收率)。

[1689] 

1502.1A 1503.1B

[1690] 17.1B.式1503,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH;2-(2-(2-叠氮基乙氧基)乙氧基)-α-NAc-半乳糖胺(1503.1B)。

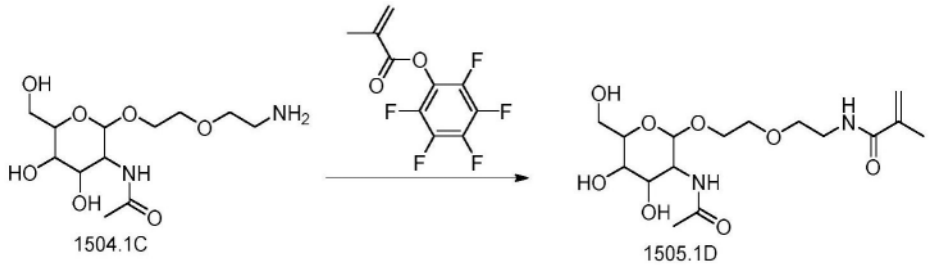
[1691] 将化合物(1502.1A)(5.0g)溶解于20mL N,N-二甲基甲酰胺。对该溶液添加叠氮化钠(26628-22-8)(5.0g)。将悬浮液置于油浴中,并且在80℃搅拌过夜。过夜后,经由硅藻土过滤反应混合物。然后,在高压下蒸发溶剂以提供油性褐色物质。经由快速层析纯化终产物(82.2%收率)。

[1692] 

1503.1B 1504.1C

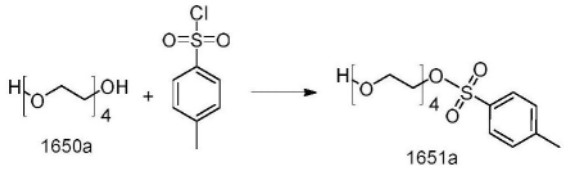
[1693] 17.1C.式1504,其中t是1,R^3是NHAc,并且R^4是OH;2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)-α-NAc-半乳糖胺(1504.1C)。

[1694] 在Shlenk烧瓶中以初始压力2巴氢气氢化20mL乙醇中(1503.1B)(5.5g)和10%钯碳(约500mg)的悬浮液。通过TLC控制还原过程。在3小时后,完成还原,并且经由硅藻土过滤悬浮液(78%收率)。

[1695] 

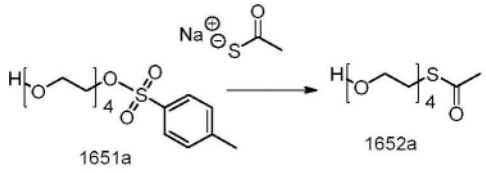
[1696] 17.1D.式1505,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH;α-NAc-半乳糖胺-胺-甲基丙烯酸酯(1505.1D)

[1697] 在10mL N,N-二甲基甲酰胺中溶解化合物(1504.1C)(4.5g)。对该溶液添加三乙胺(3mL),并且将混合物冷却到4℃。随后,在恒定搅拌的情况下逐滴添加甲基丙烯酸五氟苯酯(13642-97-2)(4.38mL)。在30分钟后,除去冰浴,并且允许反应物在室温再搅拌4小时。接着,蒸发溶剂,并且在硅胶上吸附残留物。使用快速层析(二氯甲烷:甲醇95:5,v/v)纯化粗材料提供3.8g NAc-半乳糖胺单体(α-NAc-半乳糖胺-胺-甲基丙烯酸酯(1505.1D))(64.73%收率)。

[1698] 

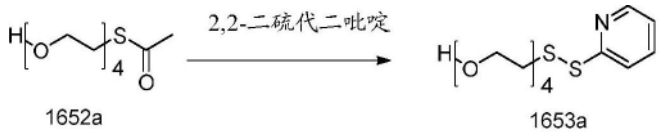
[1699] 三缩四乙二醇单对甲苯磺酸盐(1651a).

[1700] 将三缩四乙二醇(1650a)(112-60-7)(2.5g)和吡啶(1.0g)加入50mL二氯甲烷,并且在0℃搅拌20分钟。对该溶液缓慢添加15mL二氯甲烷中的对甲苯磺酰氯(98-59-9)(2.37)。然后,在0℃将反应混合物搅拌2h,接着在室温搅拌4h。在该时间后,蒸发溶剂,并且经由快速层析(乙酸乙酯:己烷6:4,v/v)纯化粗产物以提供1651a(44%收率)。

[1701] 

[1702] S-[2-[2-[2-(2-羟基乙氧基)乙氧基]乙氧基]乙基]酯(1652a)

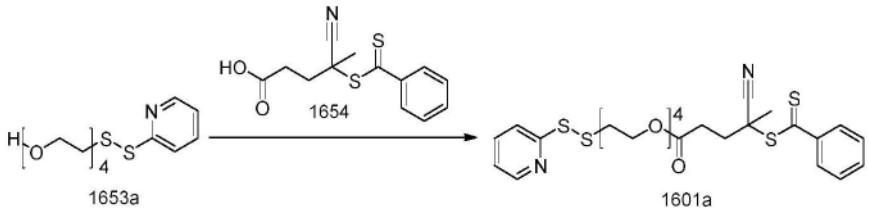
[1703] 对650mL DMF中的硫代乙酸钾(10387-40-3)(10.1g,88mmol)悬浮液添加100mL DMF中(1651a)(15.4g)的溶液。在室温将混合物搅拌1h,然后在90C搅拌4h。过滤后,减压蒸发溶剂。在乙酸乙酯(150mL)中溶解残留物,并且用水(2×50mL)和卤水(2×50mL)清洗。用乙酸乙酯(2×50mL)再提取水性清洗溶液,并且用硫酸镁干燥组合的有机层,并且在减压下蒸发以给出黄色油状产物1652a(45%收率)。

[1704] 

[1705] 2-(2-(2-(2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)乙-1-醇(1653a)

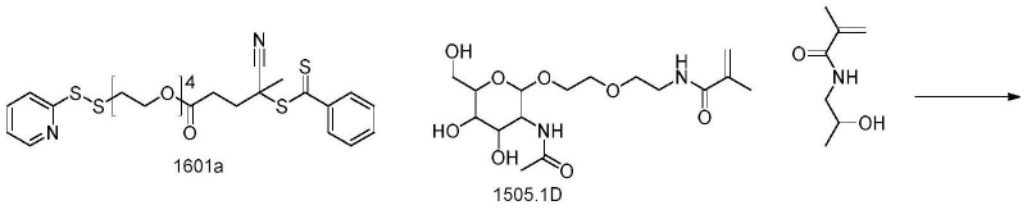
[1706] 在氩气气氛下将甲醇钠(1.40ml甲醇中0.5M)逐滴加入无水甲醇(3mL)中(1652a)(70.9mg)和2,2-二硫代二吡啶(2127-03-9)(77.4mg,0.351mmol)的搅拌溶液。在2h后,将反

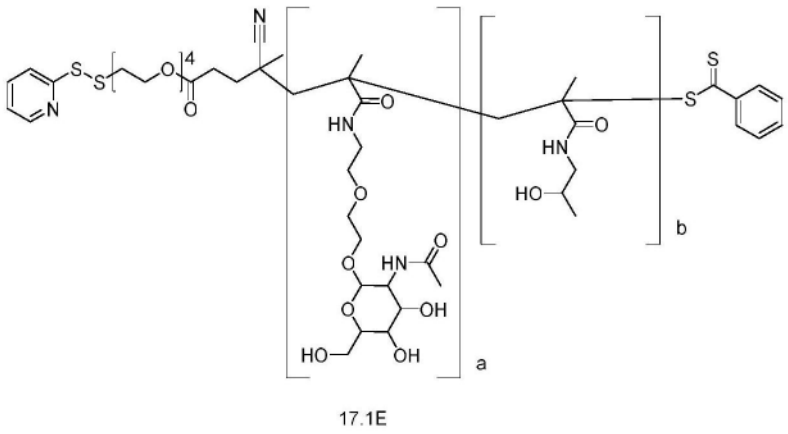
应物与二氧化硅一起浓缩至粉末,并且通过用二氧化硅的快速层析(1:1已烷:EtOAc)纯化粗产物以提供1653a,为澄清浅黄色液体(26.3mg,44%收率)。

[1707] 

[1708] uRAFT剂(1601a)

[1709] 将化合物1653a(1g)逐滴加入DCM(15ml)中4-氰基-4-(硫代苯甲酰基硫代)戊酸(1.1g)(201611-92-9),N,N'-二环已基碳二亚胺(538-75-0)(0.5g)和4-二甲基氨基吡啶(DMAP)(1122-58-3)(0.1g)的搅拌溶液。在0C将反应物搅拌2h,然后允许温热到室温。在3h后,经由硅藻土过滤反应物,并且经由减压除去溶剂。从快速层析回收终产物(1601a)(67%收率)。



[1710] 

17.1E

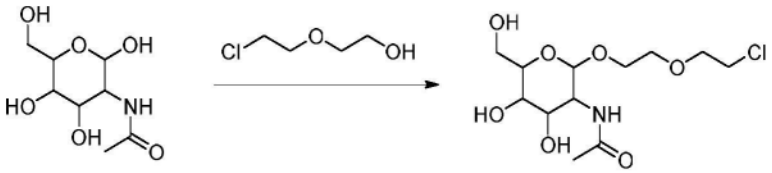
[1711] pGal(17.1E)

[1712] 使用α-NAc-半乳糖胺-胺-甲基丙烯酸酯(例如1505.1D)单体进行以下条件以提供17.1E。在一些实施方案中,可以取而代之使用α-NAc-葡糖胺-胺-甲基丙烯酸酯单体(例如1505.2D)以提供基于葡糖胺的单体。在一些实施方案中,a是约0至约150、约1至约100、约1至约50、约1至约10、或约1至约5的整数。在一些实施方案中,b是约0至约150、约1至约100、约1至约50、约1至约10、或约1至约5的整数。

[1713] 将化合物1601a、1505.1D、偶氮二异丁腈(78-67-1)、和N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺(21442-01-3)加入DMF(1ml)。将反应混合物进行4次冷冻-泵送-解冻脱气循环,之后在70C搅拌20h。经由沉淀从丙酮回收聚合产物。减压除去过量的溶剂(55%收率)。

[1714] 实施例17.2

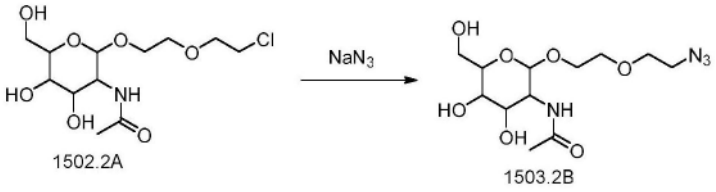
[1715] 式1507,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH

[1716] 

1502.2A

[1717] 17.2A.式1502,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH;2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)-α-NAc-葡糖胺(1502.2A)。

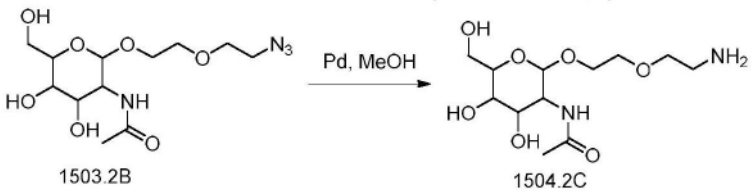
[1718] 将乙酰氯(75-36-5)(4.35mL,61.05mmol)逐滴加入2-(2'-氯乙氧基)乙醇(628-89-7)(40mL)中的D-葡糖胺(7512-17-6)(10.0g)的冰冷溶液。在4℃将混合物搅拌15分钟,然后转移到70℃的油浴。在冷却冷凝器下将反应物保持混合达4小时。该时间后,将暗褐色的溶液冷却并且倒入400mL乙酸乙酯和二氯甲烷(3:1,v/v)溶液中,以除去过量的未反应的氯乙醇。将混合物置于冷冻器中30分钟,然后倒出暗褐色的粘性沉淀物。将沉淀物溶解于无水乙醇中,并且添加活性炭。将悬浮液混合1.5小时,然后经由硅藻土过滤,并且用乙醇清洗。在最后的步骤中,在真空中蒸发乙醇以提供1502.2A(76%收率)。

[1719] 

1502.2A 1503.2B

[1720] 17.2B.式1503,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH;2-(2-(2-氯乙氧基)乙氧基)-α-NAc-葡糖胺(1503.2B)。

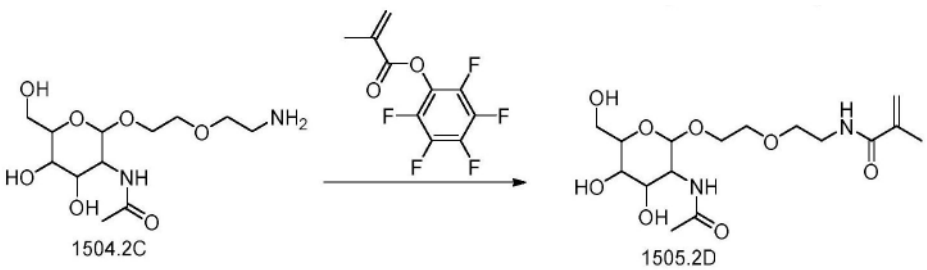
[1721] 将化合物(1502.2A)(5.0g)溶解于20mL N,N-二甲基甲酰胺。对该溶液添加叠氮化钠(26628-22-8)。将悬浮液置于油浴中,并且在80℃搅拌过夜。过夜后,经由硅藻土过滤反应混合物。然后,在高压下蒸发溶剂以提供油性褐色物质。经由快速层析纯化终产物1503.2B(75.4%收率)。

[1722] 

1503.2B 1504.2C

[1723] 17.2C.式1504,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH;2-(2-(2-氨基乙氧基)乙氧基)-α-NAc-葡糖胺(1504.2C)。

[1724] 在Shlenk烧瓶中以初始压力2巴氢气氢化20mL乙醇中(1503.2B)(5.5g)和10%钯碳(约500mg)的悬浮液。通过TLC控制还原过程。在3小时后,完成反应,并且经由硅藻土过滤悬浮液以提供1504.2C(65%收率)。

[1725] 

1504.2C 1505.2D

[1726] 17.2D.式1505,其中t是1,R^3是NHAc并且R^4是OH;α-NAc-葡糖胺-胺-甲基丙烯酸酯(1505.2D)。

[1727] 在10mL N,N-二甲基甲酰胺中溶解化合物1504.2C(4.5g)。对该溶液添加三乙胺(3mL),并且将混合物冷却到4℃。随后,在恒定搅拌的情况下逐滴添加甲基丙烯酸五氟苯酯(13642-97-2)(4.38mL)。在30分钟后,除去冰浴,并且允许反应物在室温再搅拌4小时。接着,蒸发溶剂,并且在硅胶上吸附残留物。使用快速层析(二氯甲烷:甲醇95:5,v/v)纯化粗材料提供3.8g NAc-葡糖胺单体1505.2D(74%收率)。

[1728] 实施例18

[1729] 式1m',其中X'是OVA,m是1-3,n是79,p是90($30W^1+60W^2$),q是4,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1730] 18A.式1109,其中X'是OVA,m是1-3,并且n是79

[1731] 将pH 7.6PBS中的式101'(其中X'是OVA)(10mg无内毒素卵清蛋白)溶液加入无内毒素的管中的式1108(其中n是79)(10mg)。允许反应混合物在室温下搅拌。在1小时后,经由离心尺寸排阻色谱除去任何未缀合的式1108以提供式1109的相应产物,其在无进一步纯化的情况下使用。

[1732] 18B.式1m',其中X'是OVA,m是1-3,n是79,p是90,q是4,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1733] 然后,将实施例18A中获得的式1109溶液加入无内毒素的管中的如实施例17E中获得的式1507(20mg),并且在室温下搅拌以提供式1m'的相应产物("F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$")),其经由使用Superdex 200制备级柱的快速蛋白质液体色谱(FPLC)从反应混合物中纯化并且在无进一步纯化的情况下使用。

[1734] 18C.式1m',其中X'是OVA,m是1-3,n是79,p是90,q是4,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基,使用N-乙酰基-D-半乳糖胺

[1735] 通过遵循实施例18B的程序并且替换如实施例17F中获得的式1507的半乳糖苷化合物,获得式1m'("F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$")的相应的半乳糖苷化合物。

[1736] 18D.式1m'的其它化合物,其中X'是OVA,m是1-3,n是79,p是90,q是4,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1737] 通过遵循实施例18A、18B和18C中所述的程序并且将OVA替换为以下项:

[1738] ●阿昔单抗,

[1739] ●阿达木单抗,

[1740] ●阿加糖酶α,

[1741] ●阿加糖酶β,

[1742] ●阿地白介素,

[1743] ●阿葡糖苷酶α,

[1744] ●因子VIII,

[1745] ●因子IX,

[1746] ●L-天冬酰胺酶,

[1747] ●拉罗尼酶,

[1748] ●奥曲肽,

[1749] ●苯丙氨酸氨裂解酶,

[1750] ●拉布立酶,

[1751] ●GAD-65(SEQ ID NO:2),

[1752] ●IGRP(SEQ ID NO:3)

[1753] ●MBP(SEQ ID NO:4),

[1754] ●MOG(SEQ ID NO:5),

[1755] ●PLP(SEQ ID NO:6),

[1756] ●MBP13-32(SEQ ID NO:7),

[1757] ●MBP83-99(SEQ ID NO:8),

[1758] ●MBP111-129(SEQ ID NO:9),

[1759] ●MBP146-170(SEQ ID NO:10),

[1760] ●MOG1-20(SEQ ID NO:11),

[1761] ●MOG35-55(SEQ ID NO:12),

[1762] ●PLP139-154(SEQ ID NO:13),

[1763] ●MART1(SEQ ID NO:14),

[1764] ●酪氨酸酶(SEQ ID NO:15),

[1765] ●PMEL(SEQ ID NO:16),

[1766] ●水通道蛋白-4(SEQ ID NO:17),

[1767] ●S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18),

[1768] ●IRBP(SEQ ID NO:19),

[1769] ●伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6),

[1770] ●天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20),

[1771] ●脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),

[1772] ●α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22),

[1773] ●Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23),

[1774] ●Fel d 1A(UNIPROT P30438),

[1775] ●猫白蛋白(UNIPROT P49064),

[1776] ●Can f 1(UNIPROT O18873),

[1777] ●狗白蛋白(UNIPROT P49822),和

[1778] ●RhCE(UNIPROT P18577),

[1779] 获得式1m'的以下相应的葡糖基和半乳糖苷化合物:

[1780] ●X是阿昔单抗,并且m是10,

[1781] ●X是阿达木单抗,并且m是11,

[1782] ●X是阿加糖酶α,并且m是14,

[1783] ●X是阿加糖酶β,并且m是14,

[1784] ●X是阿地白介素,并且m是6,

[1785] ●X是阿葡糖苷酶α,并且m是13,

[1786] ●X是因子VIII,并且m是100,

[1787] ●X是因子IX,并且m是18,

[1788] ●X是L-天冬酰胺酶,并且m是5,

[1789] ●X是拉罗尼酶,并且m是7,

[1790] ●X是奥曲肽,并且m是1,

[1791] ●X是苯丙氨酸氨裂解酶,并且m是12,

[1792] ●X'是拉布立酶,并且m是12,

[1793] ●X'是GAD-65(SEQ ID NO:2),并且m是8,

[1794] ●X'是IGRP(SEQ ID NO:3),并且m是7,

[1795] ●X'是MBP(SEQ ID NO:4),并且m是6,

[1796] ●X'是MOG(SEQ ID NO:5),并且m是5,

[1797] ●X'是PLP(SEQ ID NO:6),并且m是8,

[1798] ●X'是MBP13-32(SEQ ID NO:7),并且m是1,

[1799] ●X'是MBP83-99(SEQ ID NO:8),并且m是1,

[1800] ●X'是MBP111-129(SEQ ID NO:9),并且m是1,

[1801] ●X'是MBP146-170(SEQ ID NO:10),并且m是2,

[1802] ●X'是MOG1-20(SEQ ID NO:11),并且m是1,

[1803] ●X'是MOG35-55(SEQ ID NO:12),并且m是2,

[1804] ●X'是PLP139-154(SEQ ID NO:13),并且m是3,

[1805] ●X'是MART1(SEQ ID NO:14),并且m是4,

[1806] ●X'是酪氨酸酶(SEQ ID NO:15),并且m是8,

[1807] ●X'是PMEL(SEQ ID NO:16),并且m是5,

[1808] ●X'是水通道蛋白-4(SEQ ID NO:17),并且m是4,

[1809] ●X'是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:18),并且m是12,

[1810] ●X'是IRBP(SEQ ID NO:19),并且m是21,

[1811] ●X'是伴花生球蛋白,并且m是21,

[1812] ●X'是天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:20),并且m是1,

[1813] ●X'是脱酰氨基α-麦醇溶蛋白“33聚体”(SEQ ID NO:21),并且m是1,

[1814] ●X'是α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:22),并且m是1,

[1815] ●X'是Ω-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:23),并且m是1,

[1816] ●X'是Fel d 1,并且m是4,

[1817] ●X'是猫白蛋白,并且m是16,

[1818] ●X'是Can f 1,并且m是6,

[1819] ●X'是狗白蛋白,并且m是23,并且

[1820] ●X'是RhCE,并且m是10。

[1821] 18E.式1h'、1i'、1j'、1k'、1L'和1n'的化合物

[1822] 通过遵循实施例18B、18C和18D中所述的程序并且将式1109替换为以下项:

[1823] ●式802,提供式1h'的相应无规共聚物,

[1824] ●式902,提供式1i'的相应无规共聚物,

[1825] ●用式103'的化合物制备的式902,提供式1j'的相应的无规共聚物,

[1826] ●式1002,提供式1k'的相应无规共聚物,

[1827] ●用式103'的化合物制备的式1002,提供式1L'的相应的无规共聚物,和

[1828] ●式1202,提供式1n'的相应无规共聚物。

[1829] 18F.式1h'、1i'、1j'、1k'、1L'、1m'和1n'的其它化合物

[1830] 通过遵循实施例18B、18C、18D和18E中所述的程序,并且用如实施例17G、17H和17I中所述制备的化合物替换式1507,获得式1h'、1i'、1j'、1k'、1L'、1m'和1n'的相应化合物,其中t不为1,该化合物具有多个t基团,并且具有葡糖基和半乳糖基部分的混合物。

[1831] 实施例19

[1832] 式1c',其中X"是胰岛素-B,m是1,n是4,p是90(30W^1+60W^2),t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1833] 19A.式1602,其中n是4,p是90,t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1834] 向25ml Schlenk烧瓶加入((2S,3S,4S,5R,6S)-4,5-二羟基-6-(羟基甲基)-2-(2-(2-甲基丙烯酰胺基乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基甲酸(272mg,0.72mmol)(式1505,例如,如实施例17D中所述制备的)、HPMA(211mg,1.47mmol)(式1506)、式1601的二硫代-吡啶基官能化uRAFT剂(其中n是4并且R^8是CMP)(12.5mg,0.0217mmol)、偶氮二(异丁腈)(0.98mg,0.005mmol)、和1.2ml二甲基甲酰胺。将反应混合物进行四次冷冻-泵送-解冻脱气循环,然后在70℃搅拌20小时。通过在丙酮中沉淀反应混合物回收式1602(具有约30个W^1基团和约60个W^2基团)的相应的无规聚合产物。减压除去过量的丙酮以提供无规聚合产物,其在无进一步纯化的情况下使用。

[1835] 19B.式1c',其中X"是胰岛素-B,m是1,n是4,p是90(30W^1+60W^2),t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1836] 将实施例19A中获得的式1602溶液(20mg)悬浮于200μl二甲基甲酰胺中,并且加入含有胰岛素-B(1mg)的无内毒素的管,并且在室温搅拌3小时以提供式1c'("F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$")的相应产物。然后,在丙酮中沉淀反应混合物,并且经由使用Superdex 200制备级柱的快速蛋白质液相色谱(FPLC)从反应混合物纯化,并且在无进一步纯化的情况下使用。

[1837] 19C.式1c',其中X"是胰岛素-B,m是1,n是4,p是90(30W^1+60W^2),t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基,使用N-乙酰基-D-半乳糖胺

[1838] 通过遵循实施例19A和19B的程序并且以((2S,3S,4S,5S,6S)-4,5-二羟基-6-(羟基甲基)-2-(2-(2-甲基丙烯酰胺基乙氧基)乙氧基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基甲酸替换式1505,获得式1c'("F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$")的相应半乳糖苷化合物。

[1839] 19D.式1c',其中X"是P31,m是1,n是4,p是90(30W^1+60W^2),t是1,R^3是NHAc,R^4是OH,R^8是CMP,并且R^{10}是2-羟基丙基

[1840] 通过遵循实施例19B和19C的程序并且以20mg P31替换胰岛素-B,获得式1c'的相应葡糖基和半乳糖苷化合物,其中X"是P31。

[1841] 19E.式1f'和1g'的化合物

[1842] 通过遵循实施例19A和19B的程序并且用式600'或700'的uRAFT剂替换式1601的

uRAFT剂,获得式601'或701'的相应化合物,继而使该化合物与式101'的化合物接触以分别提供式1f'或式1g'的相应化合物。

[1843] 实施例20

[1844] OT-1攻击-与-耐受模型

[1845] 20A.如上文在实施例14中讨论,F1aA-OVA-m_4-n_8和F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}在有佐剂的OVA攻击后减轻OVA特异性免疫应答。

[1846] 20B.将总共3x10^5个经CFSE标记的OTI CD8+T细胞和3x10^5个经CFSE标记的OTIICD4+T细胞注射到CD45.1+接受体小鼠中。在过继转移后1天和6天,对小鼠静脉内施用含有OVA、F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Gal-HPMA)"]、F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Glu-HPMA)"]的盐水溶液、或仅盐水。用含有游离或缀合形式的OVA的制剂处理的每只小鼠接受20μg OVA的摩尔当量。在过继转移后15天,用皮内注射到每只的后腿垫中的25μL盐水中的5μg OVA和25ng超纯大肠杆菌LPS(InvivoGen)(Hock法;总剂量10μg OVA和50ng LPS)攻击小鼠。在攻击后4天处死小鼠,并且分离脾和引流淋巴结细胞以再刺激。对于胞内细胞因子的流式细胞术分析,在存在1mg/mL OVA或1μg/mL SIINFEKL肽(Genscript)的情况下再刺激细胞达3h。添加布雷菲德菌素-A(5μg/mL;Sigma),并且将再刺激再继续3h,之后染色并进行流式细胞术分析。

[1847] 如图8A-8B中所示,OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)的施用导致OT-I细胞(在总CD8+T细胞群体中)和OT-II细胞(在总CD4+T细胞群体中)百分比的显著降低。图8A显示了与仅接受OVA(例如未缀合)的重复施用的小鼠相比,OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)施用显著降低OT-I细胞。当与仅接受OVA和LPS攻击(如接受盐水注射)的小鼠相比时降低甚至更大。值得注意地,用OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)处理造成降低将OT-I细胞水平降低到与未处理的小鼠没有显著差异的水平。类似地,如图8B中所示,与接受未缀合的OVA或单独的攻击的小鼠相比,OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)施用导致OT-II细胞的显著减少。这些数据指示专门设计为在遇到作为抗原的OVA时起反应的细胞的生成减少,指示对OVA的免疫应答降低。

[1848] 另外,OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)的施用导致小鼠的淋巴结和脾中抗原特异性调节T细胞的显著增加。如图9A中所示,用这些缀合物中的任一种的处理诱导淋巴结中CD25+/FoxP3+细胞的显著增加。同样地,图9B显示了CD25+/FoxP3+OT-II细胞的显著增加(相对于未处理、攻击(仅盐水)、和经OVA处理的动物)。这些数据指示调节T细胞的生成上调,这继而指示免疫系统就其对OVA的响应而言受到负调节(例如不太响应,或者更为耐受)。

[1849] 图10中显示的数据进一步证明了在递送具有肝靶向部分的所述抗原复合物后对抗原的耐受性的增加。在此实验中,测量表达干扰素γ(IFNγ)的细胞的百分比。在抗原特异性免疫形成后CD4和CD8 T细胞生成IFNγ。如图10中所示,仅接受盐水预攻击的小鼠具有总OTI细胞的约60%表达IFNγ。比较而言,经OVA处理的小鼠具有约40% IFNγ表达细胞。几乎与未处理的小鼠相同,经OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)处理的小鼠的OTI细胞具有小于20% IFNγ阳性细胞。IFNγ的此种显著降低指示驱动抗原特异性免疫的机制的降低。共同地且鉴于本发明的另外的公开,这些数据证明了将抗原靶向到肝可以降低对所述抗原的

抗原特异性免疫应答。特别地,用葡萄糖或半乳糖的靶向导致造成抗原特异性免疫的细胞群体的显著转变,该转变证明了对特定抗原的耐受性。

[1850] 20C.通过遵循实施例20A或20B中所述的程序并且将测试OVA组合物替换为式1的其它组合物,接着用未缀合的抗原X攻击,经处理的动物表明对特定抗原X的耐受性。

[1851] 实施例21

[1852] OTI/OTII攻击与耐受模型

[1853] 使用实施例20的模型,另外用OTII细胞(其是来自$CD45.2^+$小鼠的$CD4^+$T细胞,类似于$CD8^+$T细胞OTI细胞),证明了F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Gal-HPMA)"]和F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$["OVA-p(Glu-HPMA)"]诱导T调节应答并且防止对疫苗介导的抗原攻击的后续应答的能力,此外使用了不同给药方案。在第0天将3x 10^5个经CFSE标记的OTI和3x 10^5个经CFSE标记的OTII细胞过继转移到$CD45.1^+$小鼠(n=8只小鼠每组)。在第1、4和7天,施用致耐受性剂量或对照剂量。在一个方案中,第1天以2.5μg的剂量,在第4天以2.5μg的剂量,以及在第7天以16μg的剂量提供OVA。在另一个方案中,在第1天以7μg的剂量,在第4天以7μg的剂量,以及在第7天以7μg的剂量提供OVA,以实现相同的总剂量。同样地,在第1天以2.5μg,在第4天以2.5μg,以及在第7天以16μg或在第1天以7μg,在第4天以7μg,以及在第7天以7μg的相同给药在其它组中各自施用pGal-OVA和pGlu-OVA,所有剂量基于OVA当量剂量。在最后一组中,在同一天施用盐水。在第14天,然后通过皮内注射用以脂多糖(50ng)为佐剂的OVA(10μg)攻击接受体小鼠。在第19天完成引流淋巴结的表征,以允许确定是否实际发生了删除并且是否从过继转移的细胞诱导了调节T细胞。

[1854] 在CD4+T细胞区室中诱导了明显的耐受性,如图11A-11B中所示。就总细胞频率而言,OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)两者的这两种给药方案导致攻击后OTII细胞的等同的低水平,统计学上低于OVA处理(*和#指示$p<0.05$,**和##指示$p<0.01$),如图11A中所示。当通过流式细胞术对剩余的细胞分析转录因子FoxP3和受体CD25的存在时,与仅用OVA处理相比,FoxP3+CD25+细胞数目(T调节细胞的标记物)统计学显著升高,如图11B中所示。这里,对于OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)处理,与7μg/7μg/7μg给药方案相比,T调节细胞的数目在2.5μg/2.5μg/16μg给药方案的情况下显著更高。

[1855] 在CD8+T细胞区室中也诱导了明显的耐受性,如图12A-12B中所示。就总细胞频率而言,OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)两者的这两种给药方案都导致攻击后OTI细胞的等同的低水平,统计学上低于OVA处理(*和#指示$p<0.05$,**和##指示$p<0.01$),如图12A中所示。当通过流式细胞术对剩余的细胞分析在OVA抗原的再暴露后的IFN-γ表达时,对于OVA-p(Gal-HPMA)和OVA-p(Glu-HPMA)处理,与7μg/7μg/7μg给药方案相比,表达此炎性细胞因子的细胞的频率在接受2.5μg/2.5μg/16μg给药方案的组中降低,如图12B中所示。

[1856] 实施例22

[1857] BDC2.5研究

[1858] 22A.转基因NOD-BDC2.5小鼠的CD4+T细胞表达致糖尿病性BDC-2.5特异性调节T细胞受体(TCR)。BDC2.5 T细胞特异性靶向胰岛β-细胞自身抗原嗜铬粒蛋白-A。从转基因NOD-BDC2.5小鼠的脾分离T细胞,并且在补充有10%(vol/vol)FBS、0.05mMβ-巯基乙醇、1%嘌呤霉素/链霉素、和0.5μM P31肽(一种刺激表达BDC2.5 T细胞受体的T细胞的胰岛β-细胞自身

抗原嗜铬粒蛋白-A的模拟表位)的DMEM中培养4天。用P31刺激后,用基础DMEM清洗细胞,并且通过流式细胞术分析纯度,并且将5×10^6个T细胞静脉内注射到血糖正常的NOD/ShiLtJ小鼠中。在过继转移后8h和3天,对小鼠静脉内施用盐水、10μg F1c'-P31-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$、10μg F1c'-P31-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$或等摩尔剂量的P31肽。在第4天开始,通过使用AccuCheck Aviva血糖测计仪(Roche)测量非空腹血糖水平来检测糖尿病发作。认为小鼠在血糖读数≥300mg/dL时具有糖尿病。在两个高血糖读数后,对小鼠实施安乐死。在图13的时间过程中显示了源自此实验的数据。如显示,接受盐水的小鼠在过继转移的4-8天内形成糖尿病性血糖水平。类似地,接受P31(未缀合)的小鼠在转移后约7-10天内形成糖尿病性血糖水平。形成鲜明的对比,接受F1c'-P31-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$或F1c'-P31-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$的小鼠维持相对稳定的血糖值(<200mg/dl)达超过40天。

[1859] 22B.通过遵循实施例21A中所述的程序并且将测试组合物替换为式1的其它组合物,其中X是胰岛素-B或胰岛素原、前胰岛素原、谷氨酸脱羧酶-65(GAD-65或谷氨酸脱羧酶2)、GAD-67、葡萄糖-6磷酸酶2(IGRP或胰岛特异性葡萄糖6磷酸酶催化亚基相关蛋白)、胰岛素瘤相关蛋白2(IA-2)、和胰岛素瘤相关蛋白2β(IA-2β)、ICA69、ICA12(SOX-13)、羧肽酶H、Imogen 38,GLIMA 38、嗜铬粒蛋白-A、HSP-60、羧肽酶E、外周蛋白、葡萄糖转运蛋白2,肝癌-肠-胰腺/胰腺相关蛋白、S100β、胶质细胞原纤维酸性蛋白、再生基因II、胰腺十二指肠同源框1、营养不良性肌强直激酶、胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白和SST G蛋白偶联受体1-5,诸如F1aA-胰岛素-m_2-n_{80}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{12}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{33}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{40}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{43}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{50}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{60}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{75}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{84}、F1b-胰岛素-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL、F1m-胰岛素-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc、F1m-胰岛素-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH、F1n-胰岛素-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc、F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$或F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$,与接受盐水的动物相比,经处理的NOD小鼠中的血糖值保持稳定。

[1860] 实施例23

[1861] NOD小鼠

[1862] 23A.非肥胖糖尿病(NOD)小鼠,诸如NOD/ShiLt小鼠容易自发发作自身免疫性糖尿病,其是对各种胰腺自身抗原的自身免疫应答的结果。糖尿病由于胰腺炎而在NOD小鼠中形成,所述胰腺炎以各种白细胞对胰岛的浸润为特征。随着糖尿病发展,存在对胰岛的白细胞性浸润,接着胰岛素生成显著下降,并且血糖水平相应增加。

[1863] 为了评估对糖尿病的治疗效力,通过使用AccuCheck Aviva血糖测计仪(Roche)测量非空腹血糖水平来每周监测本发明中提供的组合物和治疗方法,其在NOD/ShiLt小鼠分组中的5周龄糖尿病发作时开始。在6周龄开始,将小鼠分成对照和测试组(对于每组,n=15),并且分别用盐水、10μg F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$,或10μgF1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$(10μg)的每周静脉内注射处理。继续注射达连续10周。随时间测量无糖尿病动物的百分比。在两个连续血糖读数≥300mg/dL或一个血糖读数≥450mg/dL时认为小鼠具有糖尿病。对认

为具有糖尿病的小鼠实施安乐死。

[1864] 图14显示了如上文描述为如随时间测量的无糖尿病动物的百分比的数据。用F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$处理的小鼠显示为实心正方形。用F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$处理的小鼠显示为实心三角形。用盐水处理的小鼠显示为实心菱形。根据从早在11周龄随时间从经盐水处理的动物收集的数据可理解,存在自发性糖尿病。流行性随时间增加(通过图中的向下趋势显示),其中60%的测试动物到第20周形成糖尿病。如图14中所示,用F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$或F1c'-胰岛素-B-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$处理NOD小鼠与接受盐水的动物相比降低了NOD小鼠中糖尿病发作的发生率。数据证明了,施用与如本发明中公开的连接基和肝靶向部分偶联的胰岛素可以通过降低对生成的各种胰腺自身抗原的自身免疫应答成功降低I型糖尿病形成。

[1865] 23B.通过遵循实施例22A中所述的程序并且将测试组合物替换为式1的其它组合物,其中X是胰岛素-B或胰岛素原、前胰岛素原、谷氨酸脱羧酶-65(GAD-65或谷氨酸脱羧酶2)、GAD-67、葡萄糖-6磷酸酶2(IGRP或胰岛特异性葡萄糖6磷酸酶催化亚基相关蛋白)、胰岛素瘤相关蛋白2(IA-2)、和胰岛素瘤相关蛋白2β(IA-2β)、ICA69、ICA12(SOX-13)、羧肽酶H、Imogen 38,GLIMA 38、嗜铬粒蛋白-A、HSP-60、羧肽酶E、外周蛋白、葡萄糖转运蛋白2、肝癌-肠-胰腺/胰腺相关蛋白、S100β、胶质细胞原纤维酸性蛋白、再生基因II、胰腺十二指肠同源框1、营养不良性肌强直激酶、胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白和SST G蛋白偶联受体1-5,诸如F1aA-胰岛素-m_2-n_{80}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{12}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{33}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{40}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{43}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{50}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{60}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{75}、F1aA-胰岛素-m_2-n_{84}、F1b-胰岛素-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL、F1m-胰岛素-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc、F1m-胰岛素-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH、F1n-胰岛素-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc、F1c'-P31-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$或F1c'-P31-m_1-n_4-p_{90}-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$,与接受盐水的动物相比,经处理的NOD小鼠中的糖尿病发作发生率降低。

[1866] 实施例24

[1867] 生物分布

[1868] 为了检查抗原糖聚合物缀合物的生物分布,我们用经荧光标记的OVA或与p(Gal-HPMA)、p(Glu-HPMA)、p(Galβ-HPMA)、或p(Gluβ-HPMA)缀合的经荧光标记的OVA处理BALB/c小鼠。将与p(Gal-HPMA)和p(Glu-HPMA)主链附接的糖部分在C1位置附接到α-构象的聚合物,而将与p(Galβ-HPMA)和p(Gluβ-HPMA)主链附接的糖在C1位置附接到β-构象的聚合物。用Dy750标记OVA。以140μl经由尾静脉注射给予所有处理。基于荧光单位用等量的荧光缀合物处理每只动物。在3小时后,对动物实施安乐死,并且用盐水灌注每只动物的肝,然后收获肝和脾,并且经由具有合适的滤器组的IVIS Spectrum系统成像。

[1869] 图15显示了来自用OVA或OVA糖聚合物缀合物处理的动物的肝(A)和脾(B)的荧光信号的代表性图像。制剂如下:1.OVA,2.F1m'-OVA750-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGALβ$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Galβ-HPMA)"],3.F1m'-OVA750-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Gal-HPMA)"],4.F1m'-OVA750-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-

q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLUβ$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Gluβ-HPMA)"],5.F1m'-OVA750-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Glu-HPMA)"]。来自如上文所述处理的动物的肝的图像显示了与摄取未缀合的抗原相比,糖聚合物缀合物显著增强了其缀合的抗原对肝(或脾)的递送。与来自用与p(Gal-HPMA)、p(Glu-HPMA)、p(Galβ-HPMA)或p(Gluβ-HPMA)缀合的OVA处理的动物的肝相比,来自用未缀合的OVA处理的动物的肝具有更少的荧光信号。另外,从如上文所述处理的动物拍摄的脾图像显示了将抗原与糖聚合物缀合降低了抗原对脾的递送。与来自与p(Gal-HPMA)、p(Glu-HPMA)、p(Galβ-HPMA)、或p(Gluβ-HPMA)缀合的OVA处理的动物的脾相比,来自用未缀合的OVA处理的动物的脾具有显著更多的荧光信号。这些数据是显著的,因为它们证明了期望耐受的抗原对肝和/或脾的靶向的增强,如通过本发明中呈现的实验数据所证明的,这导致对抗原的降低的免疫应答(即诱导耐受性)。根据本发明中公开的一些实施方案,此诱导的耐受性可以治疗、降低、预防或以其它方式改善不期望的免疫应答,其在其它情况下已经与对抗原的暴露有关。

[1870] 实施例25

[1871] 7天OTI/OTII表型分析

[1872] 为了比较各种糖聚合物-抗原缀合物诱导抗原特异性T细胞增殖以及上调T细胞无反应性和删除的各种标记物的表达和呈递的能力,用OVA或与p(Gal-HPMA)、p(Glu-HPMA)、p(Galβ-HPMA)、或p(Gluβ-HPMA)(具有如下的制剂:F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGAL$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Gal-HPMA)"];F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLU$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Glu-HPMA)"];F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGALβ$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Galβ-HPMA)"];F1m'-OVA-m_{1-3}-n_{79}-p_{90}-q_4-CMP-聚-(EtPEG$_1$AcN-1NAcGLUβ$_{30}$-ran-HPMA$_{60}$)["OVA-p(Gluβ-HPMA)"]缀合的OVA的静脉内注射处理已经接受400,000个经羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CSFE)标记的OTI细胞输注的小鼠。用游离或缀合形式的OVA处理的动物在实验的第1天和第3天接受10μgOVA。图16A中显示了实验细节的时间线。在7天后,将小鼠处死,并且收获动物的脾细胞,并且经由流式细胞术分析T细胞无反应性、删除、和记忆特征的表型标记物。

[1873] 图16B显示了与未缀合的OVA处理的动物中看到的OTI增殖量相比,用OVA-糖聚合物缀合物诱导了更多的OTIT细胞增殖。如上文讨论,这些数据进一步支持,根据本发明中公开的一些实施方案,本发明中公开的糖靶向部分导致增加的抗原特异性T细胞增殖,这是诱导对抗原的耐受性的关键步骤。令人感兴趣地,用含有β-连接的糖的OVA-糖聚合物缀合物处理的动物与用含有经由α-连接与聚合物连接的相同糖部分的糖聚合物处理的动物相比诱导显著更多的增殖(例如p(Galβ-HPMA)相比于p(Gal-HPMA))。出乎意料地,总体组合物的一个元件的该构象变化导致就T细胞增殖而言增强的效力,申请人认为(不与理论结合)这源自组合物的组分与其相应的生理靶标的协同相互作用。另外,与从来自用OVA处理的动物采集的细胞相比,从用所有OVA-糖聚合物缀合物(除了OVA-p(Gal-HPMA)以外)处理的动物采集的OTI细胞群体显示显著更多的凋亡标记物膜联蛋白V+表面表达(参见图16C)。与上文讨论的数据一致,这指示较大百分比的抗原特异性T细胞得以靶向或者处于凋亡级联中。如图16D中所示,从用含有β-连接的糖的OVA-糖聚合物缀合物处理的动物采集的OTI细胞与用含有经由α-连接与聚合物连接的相同糖部分的糖聚合物处理的动物以及用游离OVA处理的动物相比,显示了T细胞耗竭标记物PD-1的表达增加。为了维持长期耐受性,处理必须降低

长效抗原特异性记忆T细胞的数目。图16E和16F显示了OVA-p(Galβ-HPMA)和OVA-p(Gluβ-HPMA)两者诱导了表达记忆T细胞标记物的OTI细胞的显著降低。OVA-p(Galβ-HPMA)和OVA-p(Gluβ-HPMA)两者与用游离的OVA处理的动物相比诱导记忆T细胞数目降低5倍。这些数据进一步指示如本发明中公开的组合物可以导致对抗原(本发明中选择的OVA,因为其在本领域中公认为"黄金标准"抗原)的耐受性,并且在一些实施方案中,可以出乎意料地增强耐受性的诱导(如至少部分通过抗原特异性T细胞增殖、抗原特异性T细胞上增加的膜联蛋白V表达、抗原特异性T细胞上增加的耗竭标记物表达、和记忆T细胞的表达降低表示)。

[1874] 实施例26

[1875] 偶联有葡萄糖的抗原-BDC2.5研究

[1876] 进行本研究以测试p(Glu)-抗原缀合物抑制形成由CD4 T细胞驱动的自身免疫的能力。使用抗原特异性T细胞诱导自身免疫性糖尿病的小鼠模型。通过将活化的BDC2.5 T细胞(其携带糖尿病自身抗原嗜铬粒蛋白A的T细胞受体)转移到免疫受损小鼠中来诱导自身免疫性糖尿病。然后,用称作p31的自身抗原肽模拟表位,或者用p31-p(Glu)缀合物处理接受体小鼠。

[1877] 方案:在补充有10% FBS、0.05mMβ-巯基乙醇、1%嘌呤霉素/链霉素、和0.5μM p31肽的DMEM中将来自雌性BDC2.5转基因小鼠的新鲜分离的脾细胞刺激4d。在刺激后,用DMEM清洗细胞,重悬于DMEM中,并且静脉内注射到血糖正常的NOD/Scid小鼠中。在过继转移后8h,对小鼠静脉内施用盐水(未处理)、2μg p31、或2μg作为p31-pGlu缀合物的p31(在本实验中使用β构象的葡萄糖,但在一些实施方案中,可以使用α构象)。初始处理后3天,再次用盐水、2μg p31、或2μg作为p31-pGlu缀合物的p31处理小鼠。在第1天开始,使用Accucheck Aviva血糖测计仪测量每只小鼠的非空腹血糖水平。在收到超过450mg/dL的单次血糖测量值,或超过350mg/dL的连续两次血糖读数时,认为小鼠具有糖尿病。所有组具有7只小鼠。

[1878] 结果:如图17中所示,未处理的小鼠在脾细胞转移的5天内开始发展出糖尿病(如通过高血糖症测量)。在约7天内,所有未处理的小鼠发展出高血糖症。那些用对照组合物(p31;实心圆圈)处理的小鼠在未处理小鼠后不久开始发展出高血糖症。到转移后8天,所有经p31处理的小鼠已经形成了高血糖症。形成鲜明对比,施用p31-p(Glu)缀合物(实心三角形)导致小鼠与未处理的动物和那些仅用p31肽处理的小鼠相比将正常血糖水平维持显著更长的时间。在转移后15天时,100%p31-pGlu小鼠仍然具有正常的血糖水平。

[1879] 这些结果证明了p31-p(Glu)缀合物防止小鼠中形成高血糖症。因此,根据本发明中公开的一些实施方案,几种缀合物能够有效用于防止形成糖尿病。在另外的实施方案中,p(Glu)缀合物能够有效用于降低先前存在的糖尿病的发展,并且在另外的实施方案中,能够有效用于逆转先前存在的糖尿病。在另外的实施方案中,可以使用胰岛β细胞自身抗原嗜铬粒蛋白-A的其它模拟表位。此外,根据本发明中公开的一些实施方案,可以使用作为全长蛋白质的嗜铬粒蛋白-A或其片段作为致耐受性组合物的抗原性部分。另外,可以使用与糖尿病有关的本发明中公开的其它抗原。在一些实施方案中,包括但不限于胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、GAD-65、GAD-67、IGRP、IA-2、IA-2β、其片段或其模拟表位。本发明中公开了糖尿病相关抗原。此外,在一些实施方案中,可以使用与其它自身免疫性疾病相关的抗原,如本发明中公开。在另外的实施方案中,可以使用外来抗原、移植物抗原或其它类型/分类,如本发明采用嗜铬粒蛋白A,并且使用此模型作为如本发明中公开的组合物用于诱导耐受

性的能力的非限制性实例。

[1880] 实施例27

[1881] 耐受性记忆

[1882] 进行以下实验以证明如本发明中公开的致耐受性组合物可以建立耐受性记忆。为了测定通过施用如本发明中公开的致耐受性组合物(本发明使用p(Glu)抗原缀合物作为非限制性实例)诱导的调节T细胞(Treg)是否能够在初次施用疗法后建立长期耐受性,用OTII T细胞的输注预处理小鼠,接着施用p(Glu)-OVA缀合物。然后,在3周后用OVA特异性T细胞的输注和抗原攻击来攻击这些小鼠。为了证明任何耐受性诱导效果是Treg的结果,对用p(Glu)-OVA处理的小鼠注射抗CD25抗体,其显示为消减Treg。

[1883] 方案:在第0天,C57BL/6小鼠接受450,0000TII细胞的静脉内输注,然后在第1和4天用盐水或1.5μg作为游离OVA或p(Glu)-OVA缀合物的OVA处理(本发明中使用OVA作为期望耐受的抗原的非限制性实例;在本实验中使用β构象的葡萄糖,但在一些实施方案中,可以使用α构象)。在第7天,小鼠接受盐水、或15μg作为游离OVA或p(Glu)-OVA缀合物的OVA的最终处理。在第15天,用300μg抗CD25抗体的腹膜内注射处理半数用p(Glu)-OVA处理的动物,所述抗CD25抗体已经显示消减调节T细胞(Treg)。在第29天,小鼠接受750,000个OTII T细胞和750,000个OTI T细胞的输注。次日,在4个足垫的每个中用5μg OVA和50ng超纯LPS攻击动物。抗原攻击后5天,将小鼠处死,并且通过流式细胞术评估引流淋巴结中OTI和OTII T细胞的数目。(组n=5:攻击(即载体处理的动物)、OVA、p(Glu)-OVA、p(Glu)-OVA+αCD25)。图18中示意性显示了本方案。

[1884] 结果:图19A-19B中显示了本实验的结果。图19A显示了抗原攻击后剩余的OTI T细胞(作为总$CD8^+$细胞的百分比)。图19B显示了抗原攻击后剩余的OTII T细胞(作为总$CD4^+$细胞的百分比)。那些接受LPS攻击和缺乏致耐受性组合物的OVA的小鼠显示引流淋巴结中显著升高的OTI和OTII细胞。那些接受pGlu-OVA的小鼠显示OTI和OTII细胞两者的显著减少。通过施用抗CD25抗体消除了由pGlu-OVA诱导的耐受性证明了Treg在pGlu-OVA诱导的耐受性中的作用。总之,这些数据指示本发明中公开的致耐受性组合物能够经由诱导调节T细胞诱导长效耐受性。在一些实施方案中,这是有利的,因为长效耐受性降低(或在一些实施方案中消除)对本发明中公开的组合物的持续施用的需要。也就是说,在一些实施方案中,任选进行重复施用。

[1885] 实施例28

[1886] 耐受性的记忆(内源性)

[1887] 进行以下实验以证明如本发明中公开的致耐受性组合物可以从内源T细胞建立耐受性记忆。与实施例27类似地进行本实验,但是小鼠没有接受供体OTII T细胞的初始输注。

[1888] 为了测定来自内源T细胞群体的Treg可以由p(Glu)-抗原缀合物诱导并且表现出长期耐受性,用p(Glu)-OVA缀合物处理小鼠。3周后用OVA特异性T细胞的输注和抗原攻击来攻击它们。为了研究证明的耐受性诱导效应是否是内源Treg的结果,用p(Glu)-OVA处理小鼠,然后用抗CD25抗体处理。

[1889] 方案:在第0天和第3天,BL6/C57小鼠接受盐水或1.5μg作为游离OVA或p(Glu)-OVA缀合物的OVA的静脉内输注(本实验中使用β构象的葡萄糖,但在一些实施方案中,可以使用α构象)。在第6天,小鼠接受盐水或15μg作为游离OVA或p(Glu)-OVA缀合物的OVA的最终处

理。在第14天,用300μg抗CD25抗体的腹膜内注射处理半数用p(Glu)-OVA处理的动物。在第28天,小鼠接受750,000个OTII和750,000个OTI T细胞的输注。次日,在4个足垫的每个中用5μg OVA和50ng超纯LPS攻击动物。抗原攻击后5天,将小鼠处死,并且通过流式细胞术评估引流淋巴结中OTI和OTII T细胞的数目。(组n=5:攻击(即载体处理的动物)、OVA、p(Glu)-OVA、p(Glu)-OVA+αCD25)。图20中示意性显示了本方案。

[1890] 结果:图21A-21B中显示了本实验的结果。图21A显示了抗原攻击后剩余的OTI T细胞(作为总$CD8^+$细胞的百分比)。图21B显示了抗原攻击后剩余的OTII T细胞(作为总$CD4^+$细胞的百分比)。那些接受LPS攻击和缺乏致耐受性组合物的OVA的小鼠显示引流淋巴结中显著升高的OTI和OTII细胞。比较而言,那些接受pGlu-OVA的小鼠显示OTI和OTII细胞两者的显著减少。通过施用抗CD25抗体消除由pGlu-OVA诱导的耐受性证明了源自内源T细胞群体的Treg在通过pGlu-抗原组合物的耐受性诱导中发挥重大作用。总之,这些数据指示本发明中公开的致耐受性组合物能够经由诱导内源调节T细胞而诱导长效耐受性。在一些实施方案中,这是有利的,因为长效耐受性降低(或在一些实施方案中消除)对本发明中公开的组合物的持续施用的需要。也就是说,在一些实施方案中,任选进行重复施用。此外,这些数据指示给接受体的T细胞补充外源T细胞对于诱导耐受性是不必要的。确切地,T细胞的内源池足够提供适当数目的调节T细胞以导致长期耐受性。

[1891] 实施例29

[1892] 致耐受性组合物的预防性施用降低后续抗体生成

[1893] 如本发明中公开,在一些实施方案中,致耐受性组合物可用于诱导、治疗、预防或以其他方式改善针对感兴趣抗原的免疫应答。因此,在一些实施方案中,通过在接受组合物施用前受试者的当前状态确定致耐受性组合物的最终用途(例如预防vs.治疗)。进行本实验以证明可以使用本发明中公开的致耐受性组合物经由致耐受性组合物的预防性施用降低针对特定抗原的抗体生成的程度。

[1894] 方案:图22中显示了实验设计。对于预处理,存在有两组,那些接受15μg包含p-Glu-天冬酰胺酶的致耐受性组合物(高剂量)和那些接受2.5μgp-Glu-天冬酰胺酶(低剂量)(在本实验中使用β构象的葡萄糖,但在一些实施方案中,可以使用α构象)。这些预处理步骤在图22中显示为步骤“A”。注意,在本实验中使用天冬酰胺酶作为期望耐受的抗原的非限制性实例。如上文讨论,根据实施方案,也可以使用许多其它抗原、其片段或其模拟表位。在预处理后,或者在开始野生型天冬酰胺酶(WT-Asn)和混合组的实验方案时,对动物施用15μg天冬酰胺酶或12.5μg天冬酰胺酶以及2.5μg pGlu-天冬酰胺酶的组合。这些施用在图22中显示为步骤“B”。对于所有实验组,步骤“C”代表收集10μL血液样品。

[1895] 结果:图23中显示了本实验的结果。显示抗天冬酰胺酶抗体滴度在约2天时开始增加并且稳定增加到3-4的相对值是仅施用天冬酰胺酶的结果。比较而言,用高剂量或低剂量天冬酰胺酶的预处理显著降低了抗天冬酰胺酶抗体的生成,并且经由59天测试方案一致地将抗体滴度保持于相对较低的数值。负对照组(抗原未处理)显示无抗原特异性抗体形成。

[1896] 这些数据证明了在处理或降低对感兴趣的抗原的预先存在的免疫应答外,在一些实施方案中,本发明中公开的致耐受性组合物也可以在预防初始免疫应答中使用。如本实验中所示,与作为预处理施用的感兴趣抗原偶联的高剂量和低剂量的糖靶向治疗剂均改善了针对感兴趣的抗原的抗体的生成。在一些实施方案中,此类方法在对患者施用内源治疗

剂时特别有效。在一些此类实施方案中,根据治疗剂,致耐受性组合物不需要包含整个治疗剂作为感兴趣的抗原(尽管在一些实施方案中,包括了整个治疗剂),而是可以包含治疗剂的片段、治疗剂的特定表位、或治疗剂的抗原性区域的模拟表位。在一些实施方案中,治疗剂是蛋白质药物。另外,在一些实施方案中,致耐受性组合物的较长和/或较频繁的预处理施用可以用来甚至进一步降低针对感兴趣的抗原的抗体的生成。然而,在一些实施方案中,单次预处理步骤可以是足够的。

[1897] 实施例30

[1898] 致耐受性组合物改善多发性硬化

[1899] 如上文讨论,可以经由如本发明中公开的致耐受性组合物的生成和使用治疗多种与免疫应答、包括自身免疫应答有关的疾病。作为在自身免疫背景中此类用途的非限制性实例,本实验设计为测定致耐受性组合物在治疗多发性硬化(MS)中的效力。

[1900] 在多发性硬化的小鼠模型(实验性自身免疫性脑脊髓炎,EAE)中测试MS相关致耐受性组合物。用于模型中疫苗接种的自身抗原是源自髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(MOG)的肽,氨基酸编号35-55(MOG35-55;SEQ ID NO:24)。用于模型中的治疗的自身抗原是略长的肽序列(MOG30-60;SEQ ID NO:25),其含有上文定义的疫苗接种肽。使用较长的治疗性序列确保由抗原呈递细胞的加工,因此降低可溶性肽在缺乏由抗原呈递细胞的摄取的情况下结合细胞表面主要组织相容性复合物的趋势。

[1901] 方案:图24A中显示了实验方案,图24B中显示了治疗性致耐受性组合物。通过用MOG35-55/CFA使供体B6.SJL小鼠免疫来诱导EAE。11天后,收获其脾细胞,并且在培养物中用MOG35-55肽、抗IFNγ抗体和IL-12再刺激3天。将所得的致脑炎细胞注射到接受体组的小鼠中,其然后发展出MS症状。组的规模是各10只小鼠,其中半数在疾病的峰值(第11天)处死,并且半数在实验结束(第20天)处死。每周3次测量体重,并且每日以盲测方式评分疾病状态。在0、3、和6天以0.8μg或4.0μg剂量给予对照肽(MOG30-60)、糖靶向肽(pGlu-MOG30-60;(在本实验中使用α构象的葡萄糖,但在一些实施方案中,可以使用β构象)或载体(盐水)。在整个研究期间每天给予阳性效力处理对照(FTY720)。FTY720(芬戈莫德(fingolimod))是在用于MS的II期临床试验中视为有效的首创(first-in-class)鞘氨醇1-磷酸(S1P)受体调节物。

[1902] 图25A显示了与对照动物相比致耐受性组合物延迟疾病发作的能力的评估。可见,在第11天(对照组的疾病症状的峰值),施用0.8μg pGlu-MOG_{30-60}(实心三角形)导致EAE疾病得分的显著降低(与单独的MOG肽相比)。图25B显示了与MS有关的重量减轻降低相关的数据。与EAE疾病得分相似,pGlu-MOG_{30-60}显示在实验的第11天时显著降低的重量减轻(图25B;与单独的MOG相比)。比较而言,仅肽组和对照组在实验中的相同时间点时表现出约25%体重的减轻。

[1903] 图26A对应于用较高的4μg剂量pGlu-MOG_{30-60}评估疾病发作延迟。出乎意料地,疾病发作的延迟得到显著改善(相对于单独的MOG和FTY720是显著的),处理组(实心三角形)中的小鼠直至进入实验的第14天无一表现出非零EAE疾病得分。比较而言,到第6天,其它实验组的每个均显示MS的体征,如由增加的EAE疾病得分证明。再次类似于EAE疾病得分,较高的4μg剂量pGlu-MOG_{30-60}导致重量减轻的显著降低。在第11天,pGlu-MOG_{30-60}组(闭合三角形)的重量减轻基本为0,而所有其它组已经减轻了体重(FTY720组中约2.5克和仅MOG和对照组

中约5克,参见图26B)。因此,较高的4μg剂量pGlu-MOG_{30-60}产生显著(相对于单独的MOG和FTY720)改善的重量保持,其在基本上持续了整个实验。

[1904] 如上文讨论,本具体实验是根据本发明中公开的一些实施方案的致耐受性组合物可以如何用于降低受试者针对感兴趣的抗原产生的免疫应答的非限制性实例,这里该抗原为与自身免疫性疾病多发性硬化有关的抗原。如先前提及,也可以根据本发明使用其它抗原、自身抗原、治疗性蛋白质、任何前述物质的片段或特定表位、或任何前述物质的模拟表位成功诱导免疫耐受性。

[1905] 实施例31

[1906] pGal和pGluB缀合物的生物分布

[1907] 进行本实验以测定由如本发明中公开的pGal和pGlu缀合物靶向的肝细胞类型。

[1908] 方案:经由尾静脉注射100μg用荧光染料Dy-649荧光标记的OVA(OVA649)、100μg与pGluβ偶联的OVA(OVA649-pGluβ)、或100μg与pGalβ偶联的OVA(OVA649-pGluβ)处理小鼠。在3h后,处死这些小鼠,并且收获肝,加工成单细胞悬浮液,并且经由密度梯度离心分离。然后,经由流式细胞术对各种肝细胞类型分析其蛋白质含量(例如测量OVA649)。

[1909] 结果:结果显示了OVA649-pGalβ和OVA649-pGluβ缀合物两者与OVA649相比更有效靶向肝窦内皮细胞(LSEC)(图27A)。与从用OVA649处理的动物采集的LSEC相比,从用OVA649-pGalβ处理的动物采集的LSEC具有均值荧光强度(MFI)的两倍增加,并且从用OVA649-pGluβ处理的动物采集的LSEC具有MFI的2.5倍增加。

[1910] OVA649-pGluβ缀合物也有效靶向库普弗细胞。在用OVA649-pGluβ处理的动物中摄取OVA649-pGluβ的库普弗细胞的百分比显著大于摄取OVA649的库普弗细胞的百分比(图27B)。因此,在一些实施方案中,在可以期望靶向库普弗细胞时使用β构象的pGlu。也就是说,在一些实施方案中也可以任选使用pGal缀合物。

[1911] 除库普弗细胞以外,CD11c+细胞也有效摄取OVA649-pGluβ。摄取OVA649-pGluβ的CD11c+细胞的百分比显著大于由OVA649靶向的CD11c+的百分比(图27C)。因此,在一些实施方案中,在可以期望靶向CD11C+时使用β构象的pGlu。也就是说,在一些实施方案中也可以任选使用pGal缀合物。

[1912] 有趣的是,OVA649-pGluβ和OVA649-pGalβ缀合物两者与OVA649相比更有效靶向肝细胞。参见图27D。然而,摄取OVA649-pGalβ的肝细胞的百分比大于由OVA649-pGluβ靶向的肝细胞的百分比。因此,在一些实施方案中,在可以期望靶向肝细胞时使用β构象的pGal。也就是说,在一些实施方案中也可以任选使用pGlu缀合物。

[1913] 有趣的是,对游离OVA和OVA-糖聚合物缀合物靶向星形细胞的能力的分析显示了相反的结果。图27E显示了OVA比任一种OVA-糖聚合物缀合物更有效靶向星形细胞。

[1914] 在一些实施方案中,pGlu和pGal缀合物的组合可以是期望的,并且两类组合物协同相互作用以靶向肝(和肝中的各种细胞类型)。此外,在一些实施方案中,也可以使用α和β构型的缀合物的混合物。如与本发明中公开的其它实验一样,使用OVA作为期望耐受的抗原的非限制性实例。基于本发明中提供的公开,也可以将本发明中公开的其它抗原、其片段及其模拟表位与糖靶向部分缀合,并且诱导对其的耐受性。根据本发明中公开的一些实施方案,该诱导的耐受性可以治疗、降低、预防、或以其它方式改善不期望的免疫应答,所述不期望的免疫应答在其它情况下将与对抗原的暴露有关。

[1915] 尽管本发明已经参考其具体实施方案描述,但是本领域技术人员应当理解,可以做出各种改变并且可以替换等同方案而不脱离本发明的真实精神和范围。另外,可以进行许多修改以使特定情况、材料、物质组成、工艺、一个或多个工艺步骤适应本发明的目的、精神和范围。所有这些修改意图在所附权利要求书的范围内。所引用的所有出版物、专利、专利申请、因特网站点和登录号/数据库序列(包括多核苷酸和多肽序列二者)出于所有目的通过引用整体并入本发明,其程度如同每个单独的出版物、专利、专利申请、因特网站点或登录号/数据库序列具体且单独指示为通过引用并入一样。

[1916] 可以设想,可以进行上文公开的实施方案的具体特征和方面的各种组合或子组合,并且仍然落入本发明中的一项或多项内。此外,本发明结合实施方案公开的任何具体特征、方面、方法、性质、特性、质量、属性、元素等可以用于在此阐述的所有其它实施方案中。因此,应当理解的是,所公开的实施方案的各种特征和方面可以彼此组合或替代以形成所公开的发明的不同模式。因此,意图本发明中公开的本发明的范围不应限于上文描述的具体公开的实施方案。此外,虽然本发明易于进行各种修改和替代形式,但其具体实例已经在附图中示出并且在本发明中详细描述。然而,应当理解,本发明不限于所公开的具体形式或方法,而是相反,本发明覆盖落入描述的各个实施方案和所附权利要求书的精神和范围内的所有修改、等同方案和替代。本发明公开的任何方法不需要以所列举的顺序进行。本发明中公开的方法包括从业者采取的一些动作;然而,它们也可以包含任何第三方对这些行为的指示,无论是明示还是暗示。例如,动作诸如“施用糖靶向致耐受性组合物”包括“指示施用糖靶向致耐受性组合物”。此外,在根据马库什组描述本发明的特征或方面的情况下,本领域技术人员将认识到本发明也由此根据马库什组的任何个别成员或成员亚组进行描述。

[1917] 本发明中公开的范围也涵盖任何和所有重复、亚范围、及其组合。语言诸如“直至”、“至少”、“大于”、“小于”、“之间”等包括所述的数目。前面有术语诸如“约”或“大约”的数字包括所述的数字。例如,“约10纳米”包括“10纳米”。

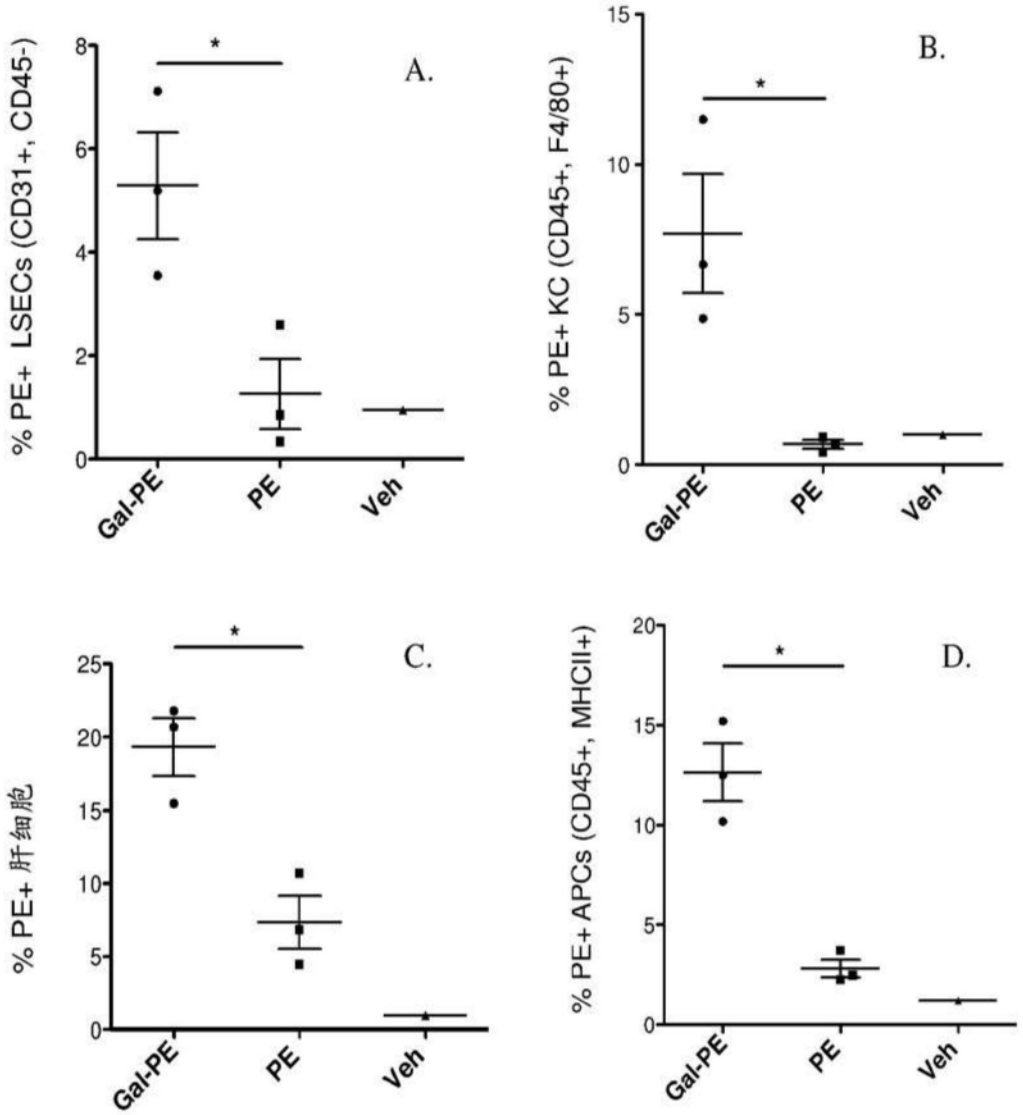

A.
% PE+ LSECs (CD31+, CD45-)
Gal-PE
PE
Veh
B.
% PE+ KC (CD45+, F4/80+)
C.
% PE+ 肝细胞
D.
% PE+ APCs (CD45+, MHCII+)

图1A-1D

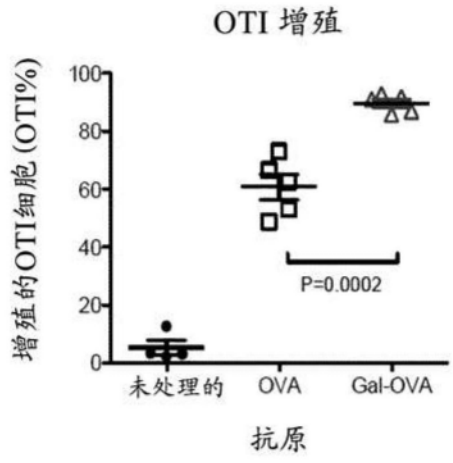

OTI 增殖
增殖的OTI细胞 (OTI%)
P=0.0002
未处理的
OVA
Gal-OVA
抗原

图2

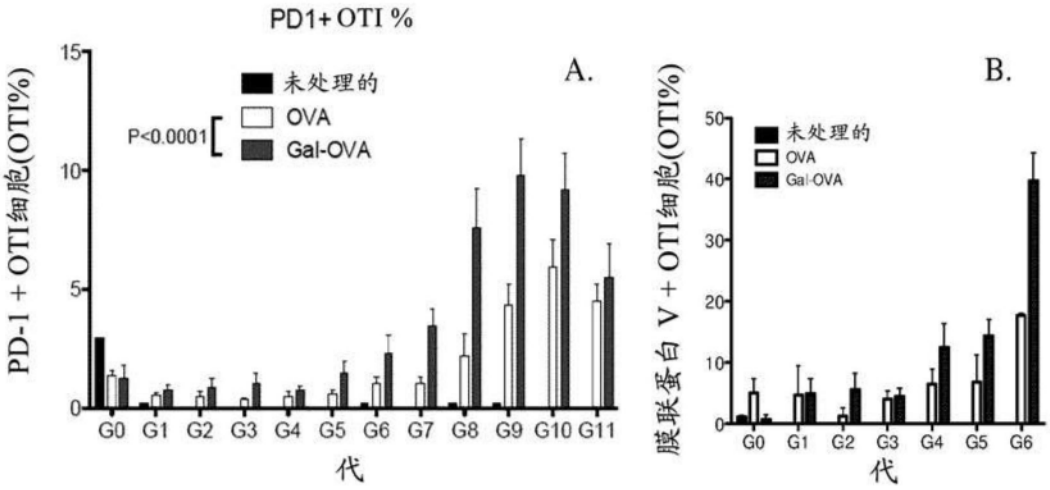

PD1+ OTI %
A.
未处理的
OVA
Gal-OVA
P<0.0001
PD-1 + OTI细胞(OTI%)
G0 G1 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11
代
B.
膜联蛋白 V + OTI细胞(OTI%)
G0 G1 G2 G3 G4 G5 G6
代

图3A-3B

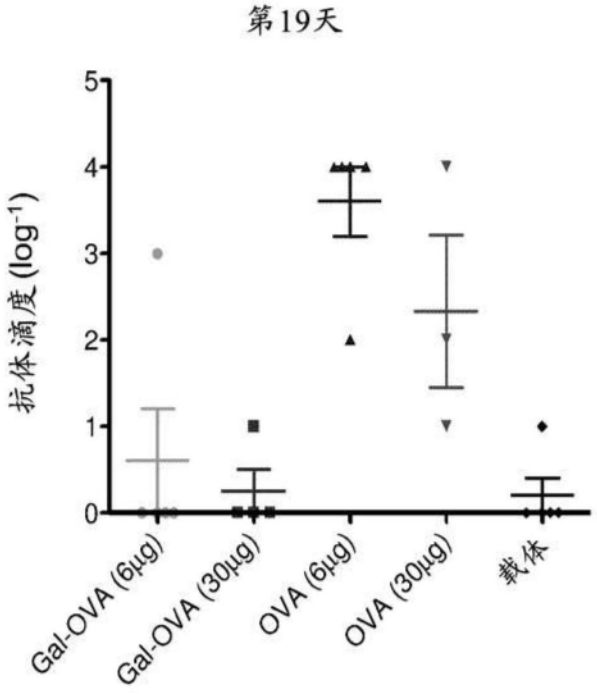

第19天
抗体滴度 (log-1)
Gal-OVA (6μg)
Gal-OVA (30μg)
OVA (6μg)
OVA (30μg)
载体

图4

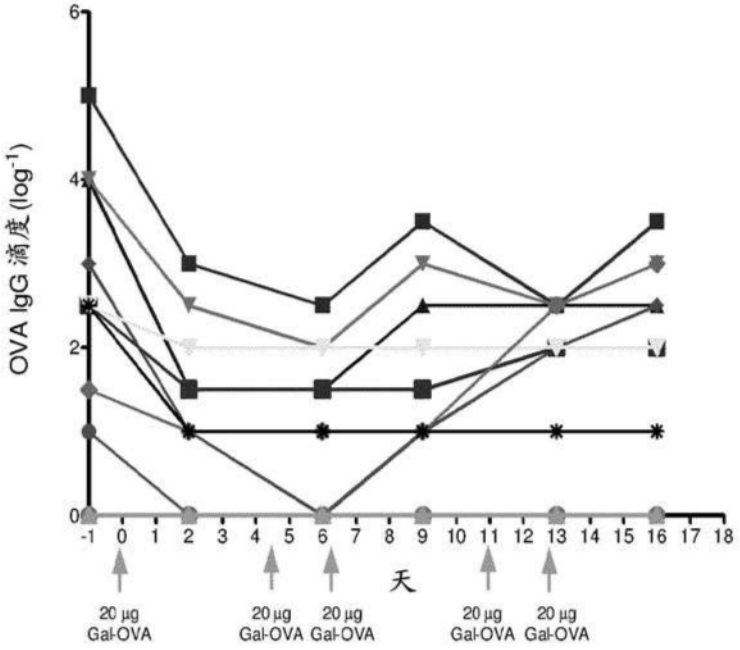

OVA IgG 滴度 (log-1)
6
4
2
0
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
天
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA

图5

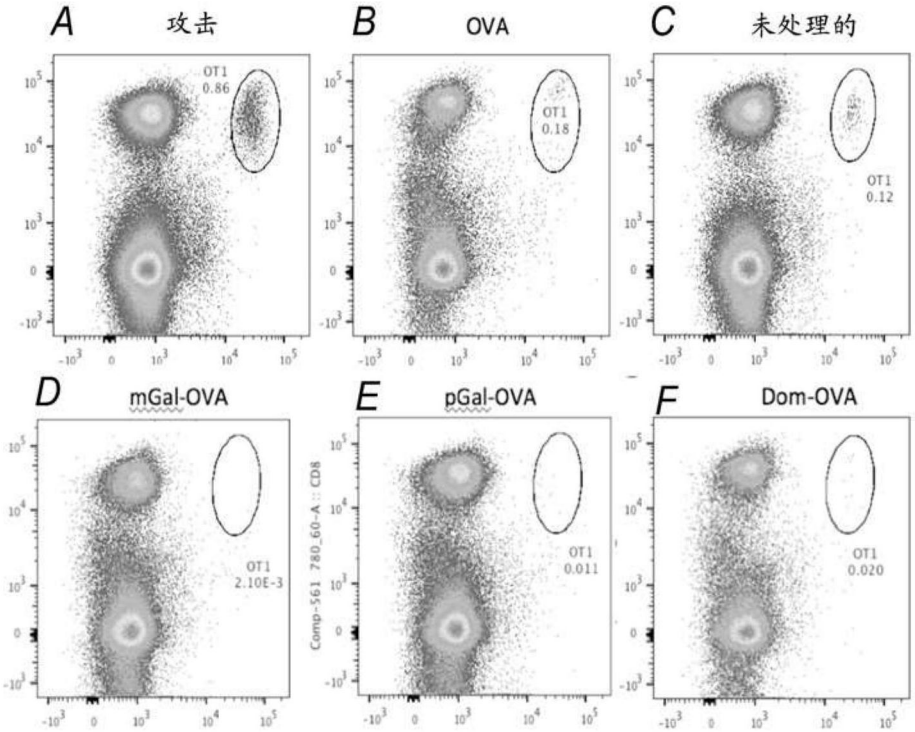
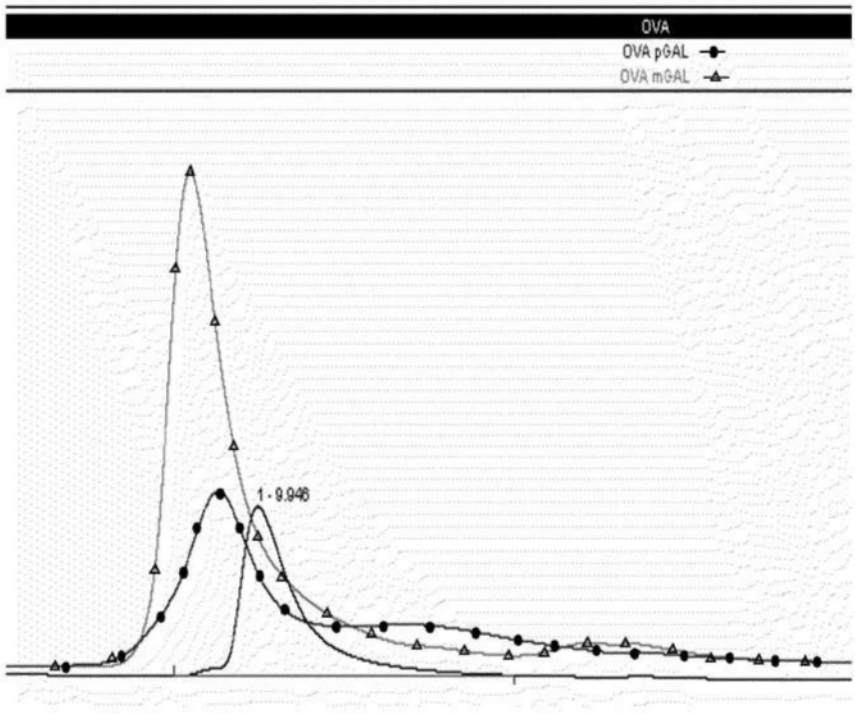
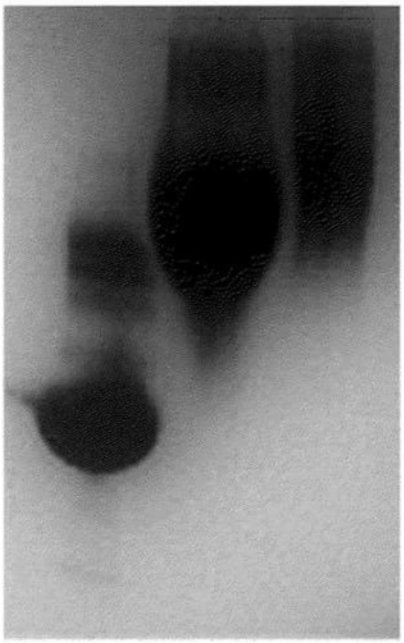

A 攻击
OT1 0.86
B OVA
OT1 0.18
C 未处理的
OT1 0.12
D mGal-OVA
OT1 2.10E-3
E pGal-OVA
OT1 0.011
F Dom-OVA
OT1 0.020
Comp-561 780_60-A :: CD8

图6A-6F



A



B

图7A-7B

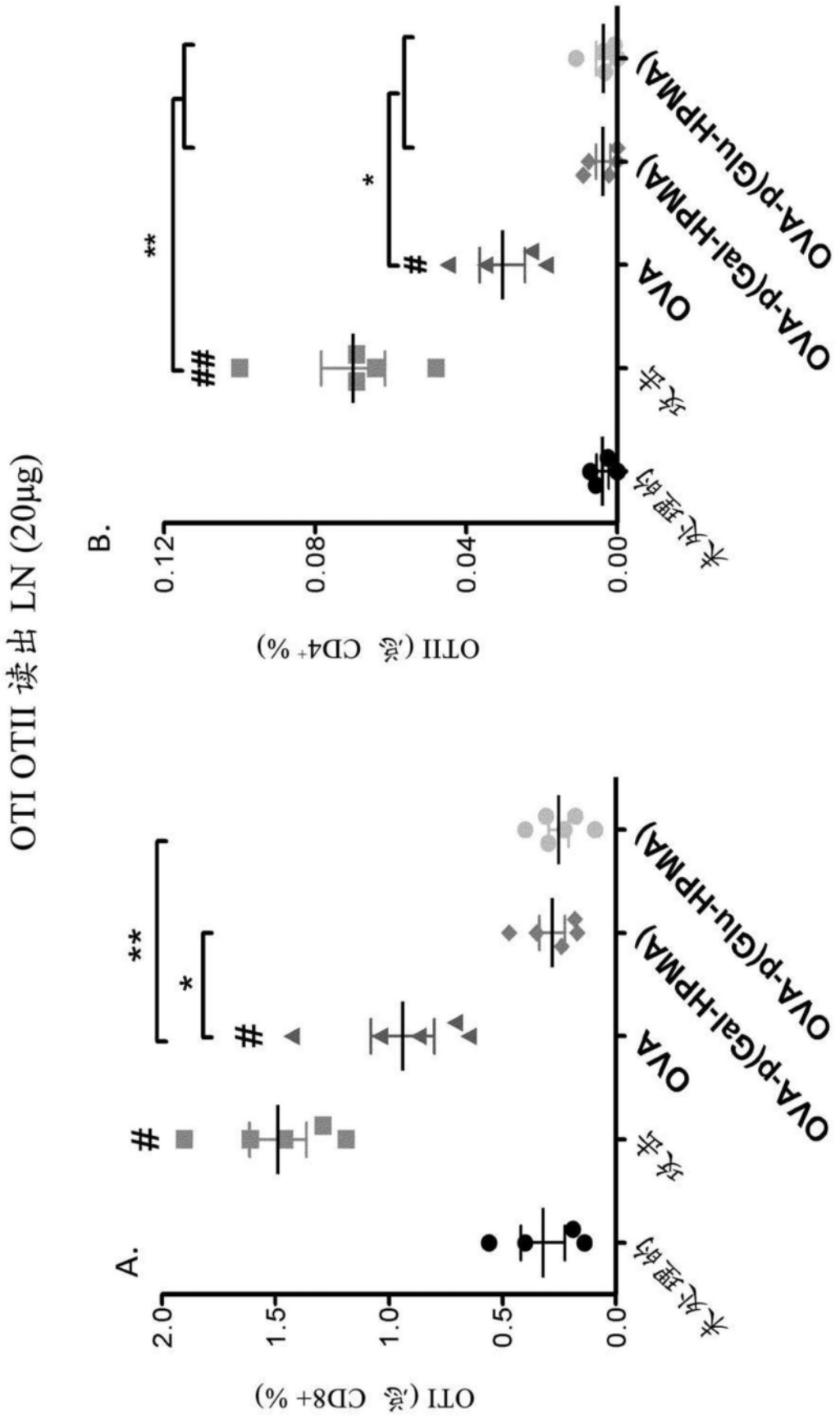

OTI OTII 读出 LN (20μg)
A.
OTI (总 CD8+ %)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
未处理的
环杰
OVA
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
B.
OTII (总 CD4+ %)
0.12
0.08
0.04
0.00

图8A-8B

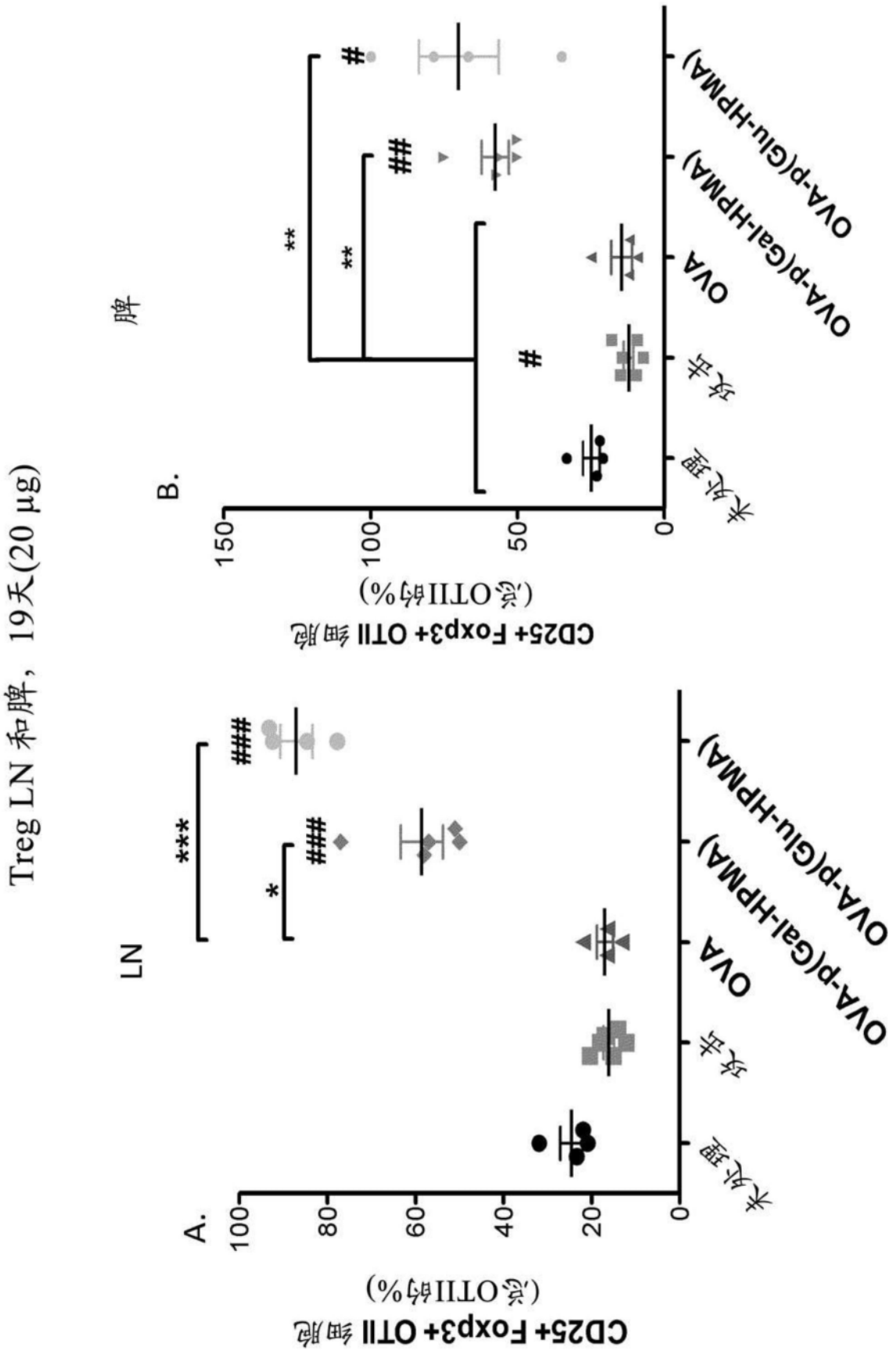

Treg LN 和脾，19天(20 μg)
A.
LN
CD25+ Foxp3+ OTII 细胞
(总OTII的%)
100
80
60
40
20
0
未处理
佐剂
OVA
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
*
***
####
B.
脾
CD25+ Foxp3+ OTII 细胞
(总OTII的%)
150
100
50
0
未处理
佐剂
OVA
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
**
**
#
##
#

图9A-B

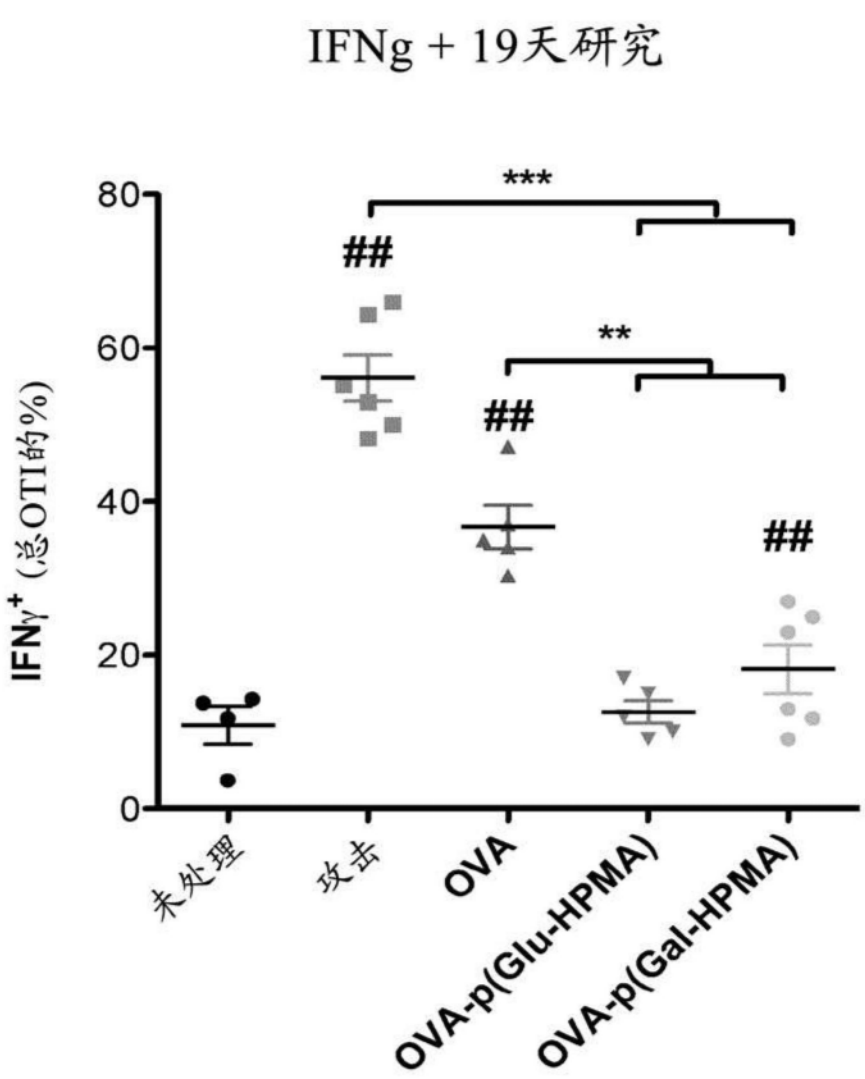

IFNg + 19天研究
IFNγ+ (总OTI的%)
80
60
40
20
0
***
**
##
##
##
未处理
攻击
OVA
OVA-p(Glu-HPMA)
OVA-p(Gal-HPMA)

图10

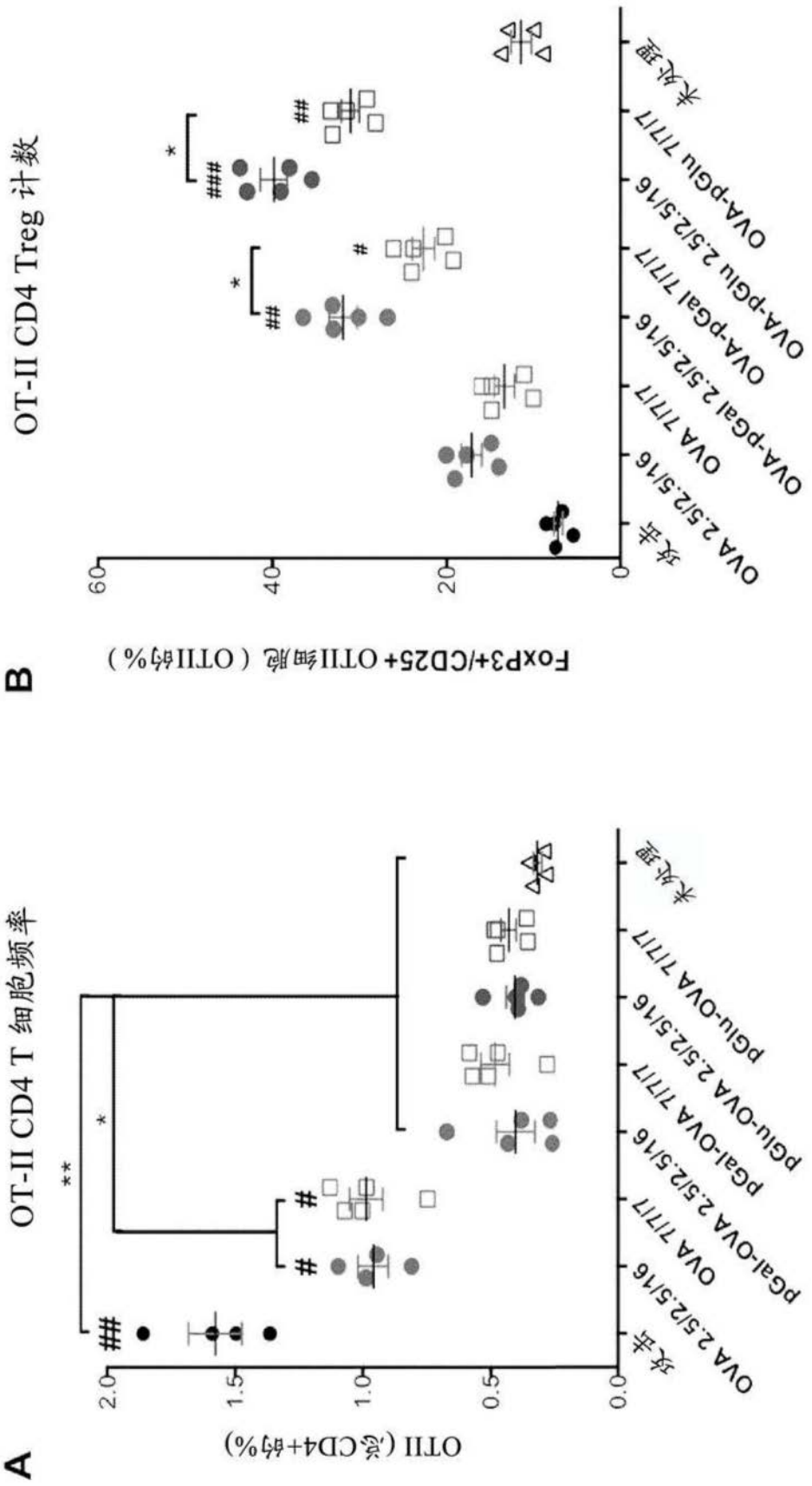

A
OT-II CD4 T 细胞频率
OTII (总CD4+的%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
##
#
#
空白
OVA 2.5/2.5/16
OVA 7/7/7
pGal-OVA 2.5/2.5/16
pGal-OVA 7/7/7
pGlu-OVA 2.5/2.5/16
pGlu-OVA 7/7/7
未处理
B
OT-II CD4 Treg 计数
FoxP3+/CD25+ OTII细胞（OTII的%）
60
40
20
0
*
*
##
#
##
###
空白
OVA 2.5/2.5/16
OVA 7/7/7
OVA-pGal 2.5/2.5/16
OVA-pGal 7/7/7
OVA-pGlu 2.5/2.5/16
OVA-pGlu 7/7/7
未处理

图11A-11B

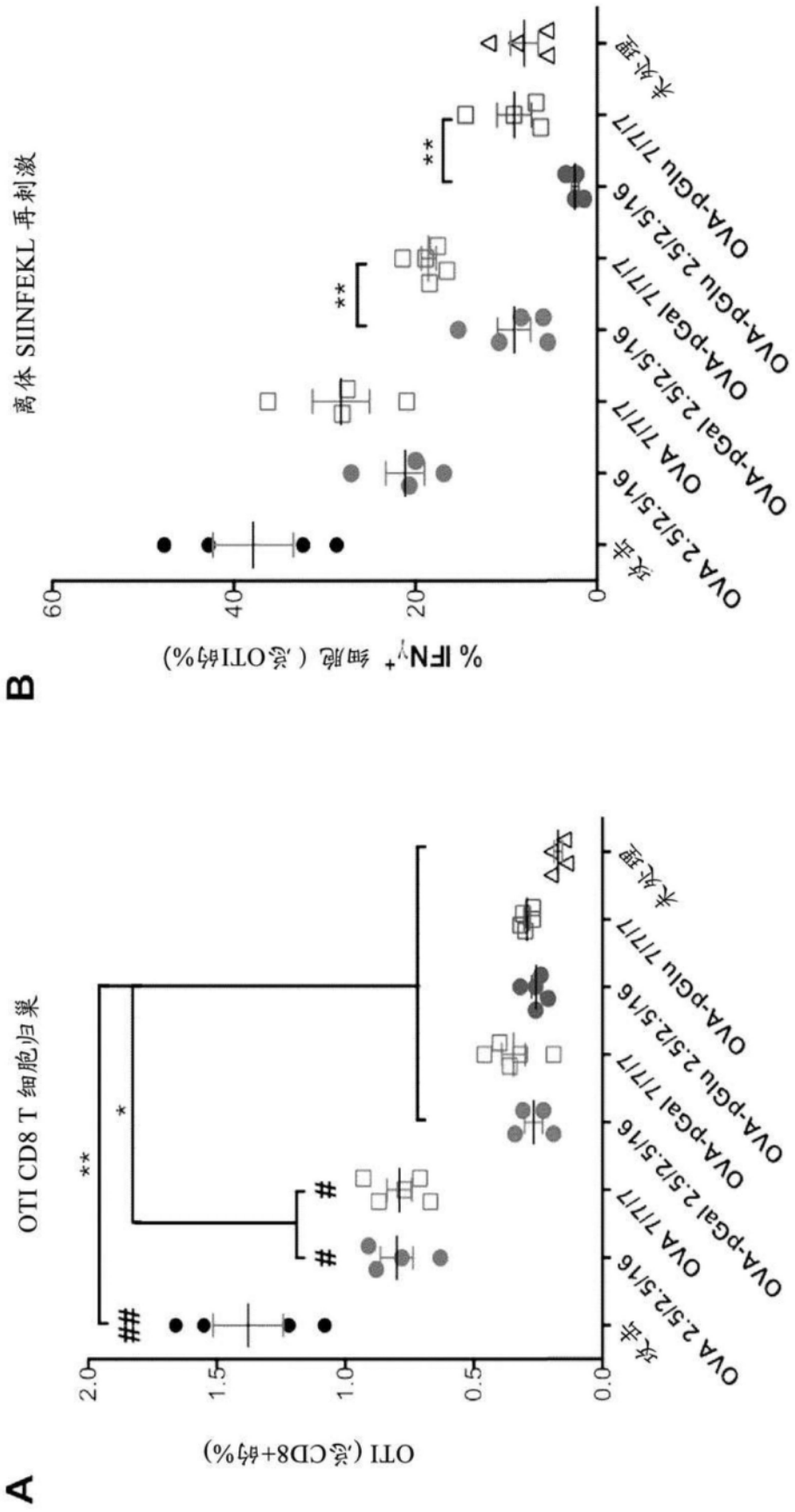

A
OTI CD8 T 细胞归巢
OTI (总CD8+的%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
#
##
无处理
OVA-pGlu 7/7/7
OVA-pGal 2.5/2.5/16
OVA 7/7/7
OVA 2.5/2.5/16
无处理
B
离体 SIINFEKL 再刺激
% IFNγ+ 细胞（总OTI的%）
60
40
20
0
**
**
无处理
OVA-pGlu 7/7/7
OVA-pGal 2.5/2.5/16
OVA 7/7/7
OVA 2.5/2.5/16

图12A-12B

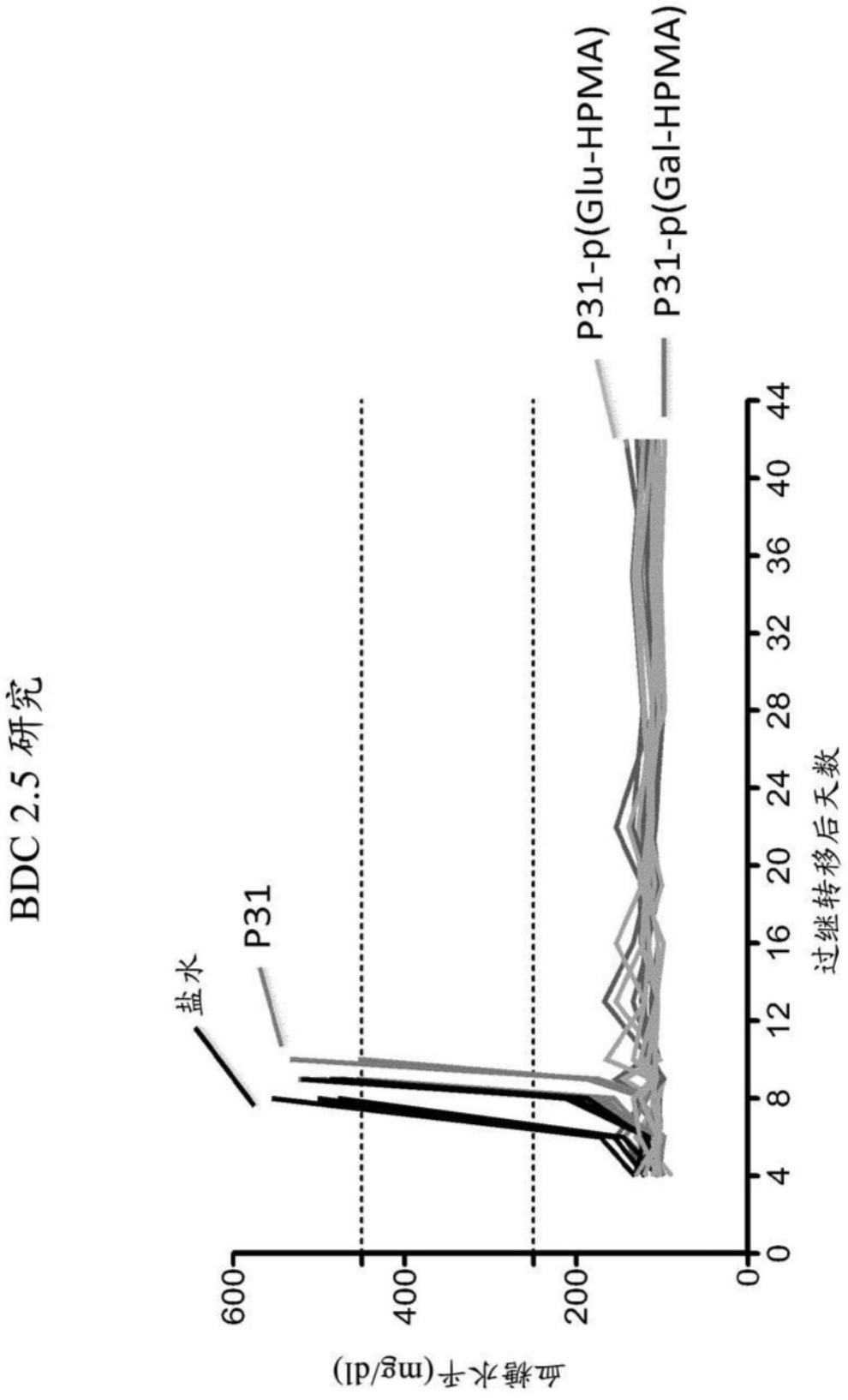

BDC 2.5 研究
盐水
P31
P31-p(Glu-HPMA)
P31-p(Gal-HPMA)
600
400
200
0
血糖水平(mg/dl)
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
过继转移后天数

图13

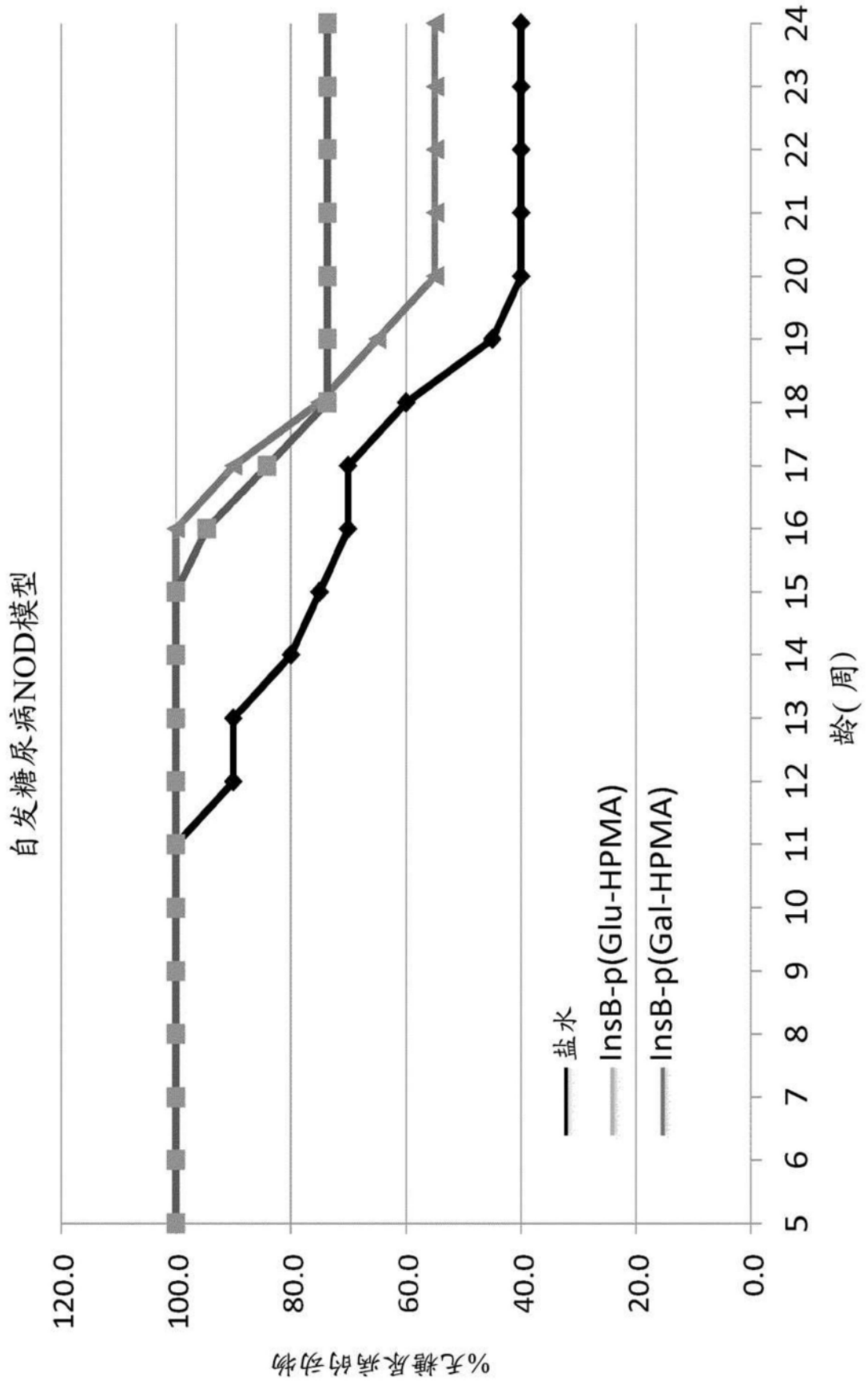

自发糖尿病NOD模型
%无糖尿病的动物
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
龄(周)
盐水
InsB-p(Glu-HPMA)
InsB-p(Gal-HPMA)

图14

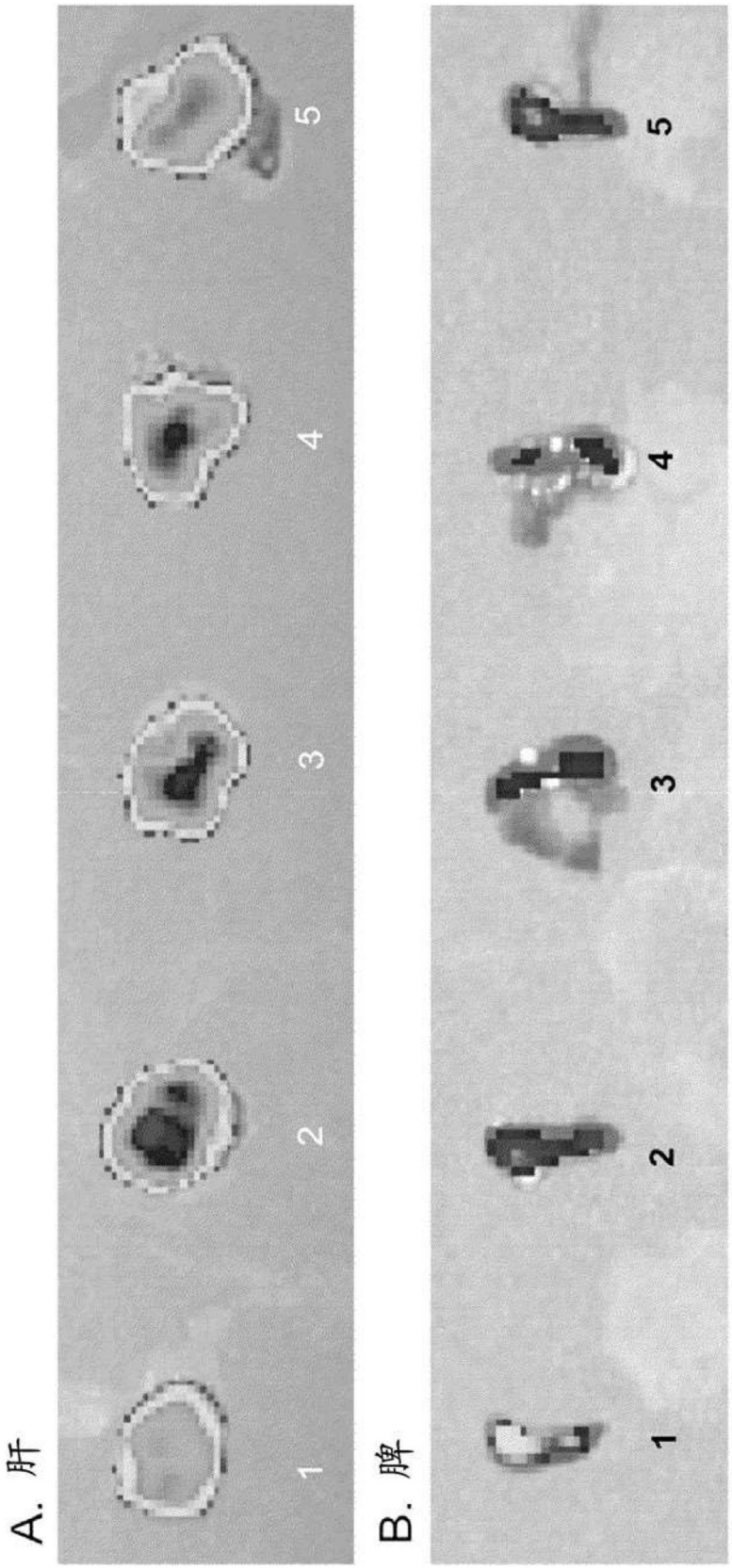


图15A-15B

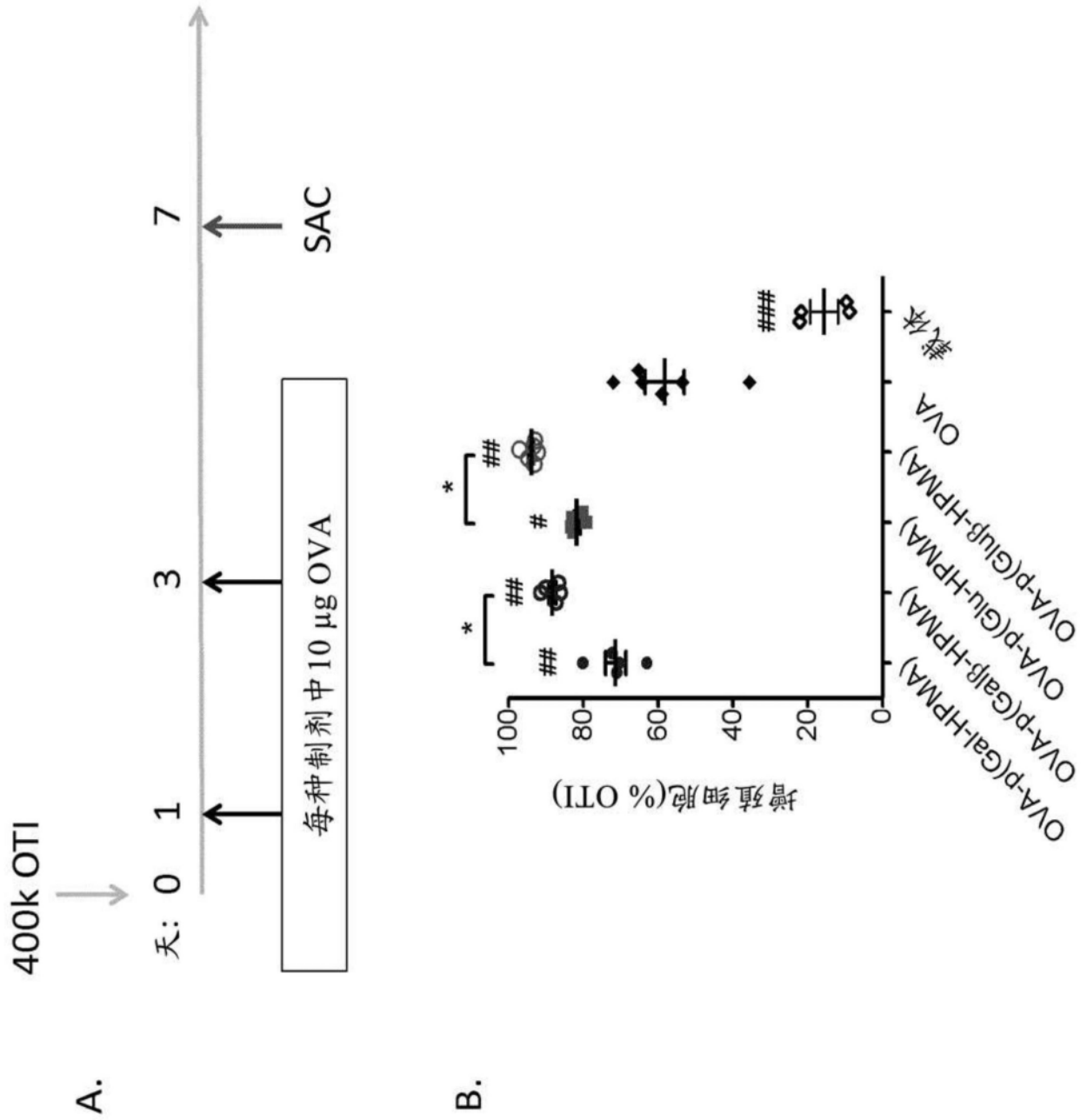

A.
400k OTI
天: 0 1 3 7
每种制剂中10 μg OVA
SAC
B.
增殖细胞(% OTI)
100
80
60
40
20
0
*
*
##
##
#
###
载体
OVA
OVA-p(Glup-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
OVA-p(Galp-HPMA)
OVA-p(Gal-HPMA)

图16A-16B

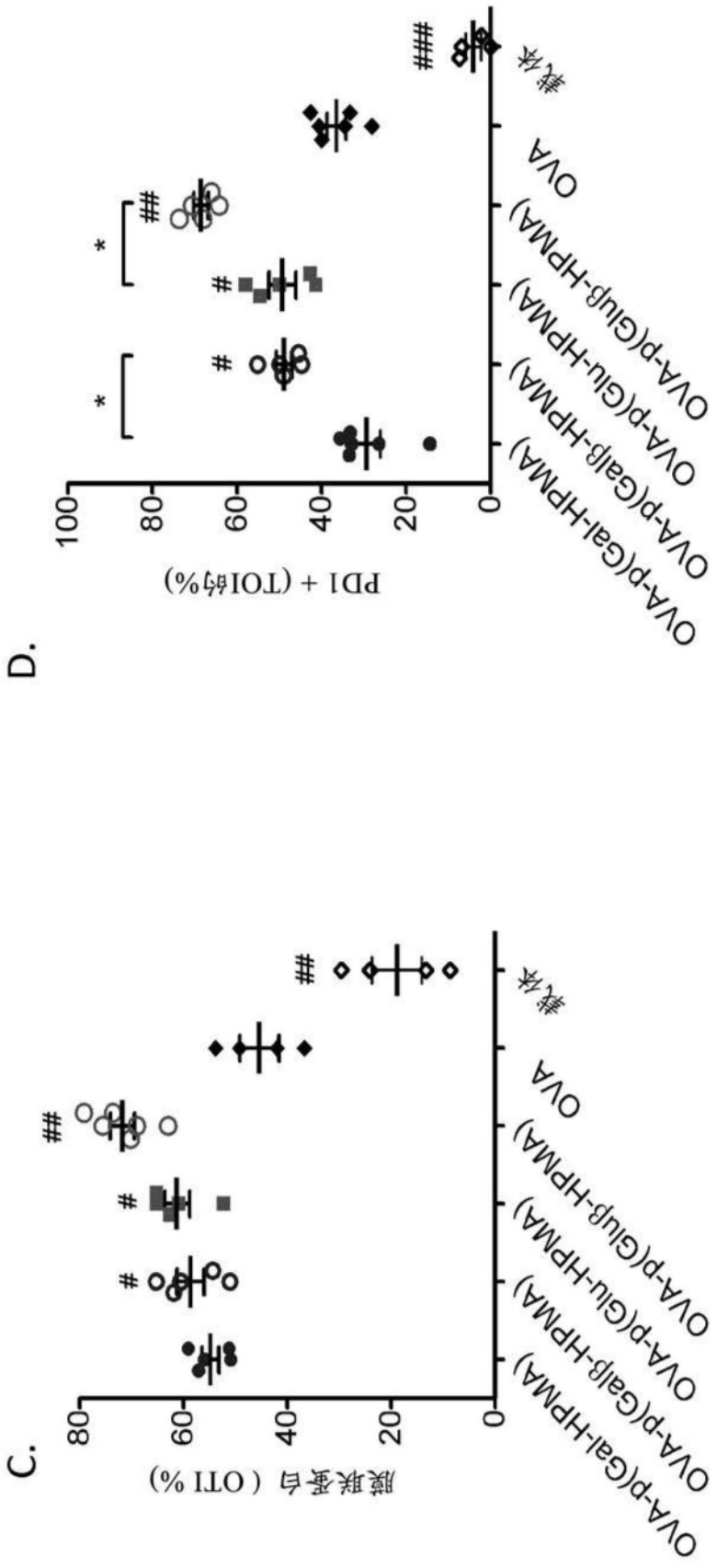
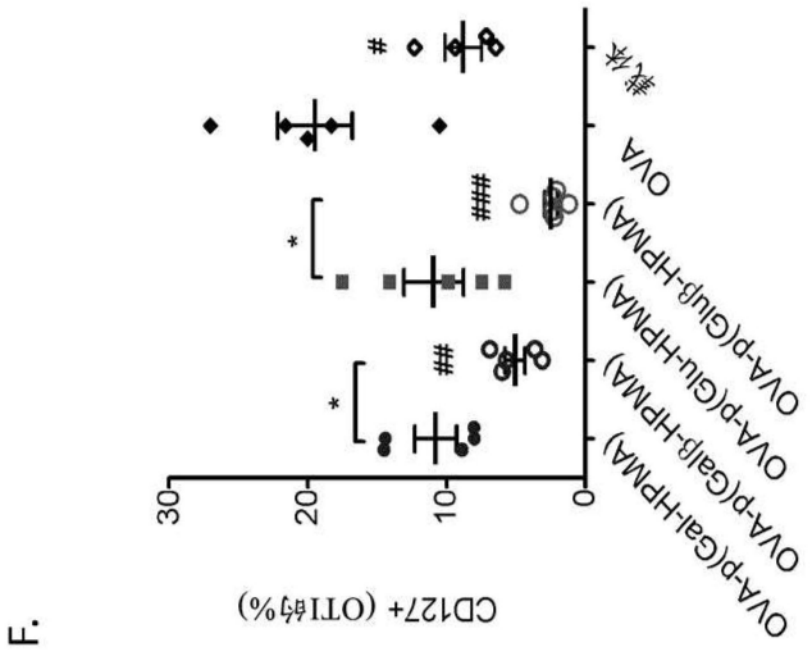

C.
膜联蛋白（OTI %）
0
20
40
60
80
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Galβ-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
OVA-p(Gluβ-HPMA)
OVA
载体
D.
PD1 +（TOI的%）
0
20
40
60
80
100
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Galβ-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
OVA-p(Gluβ-HPMA)
OVA
载体

图16C-16D


F.
CD127+ (OTI的%)
30
20
10
0
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Galβ-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
OVA-p(Gluβ-HPMA)
OVA
载体
*
*
#
#
#

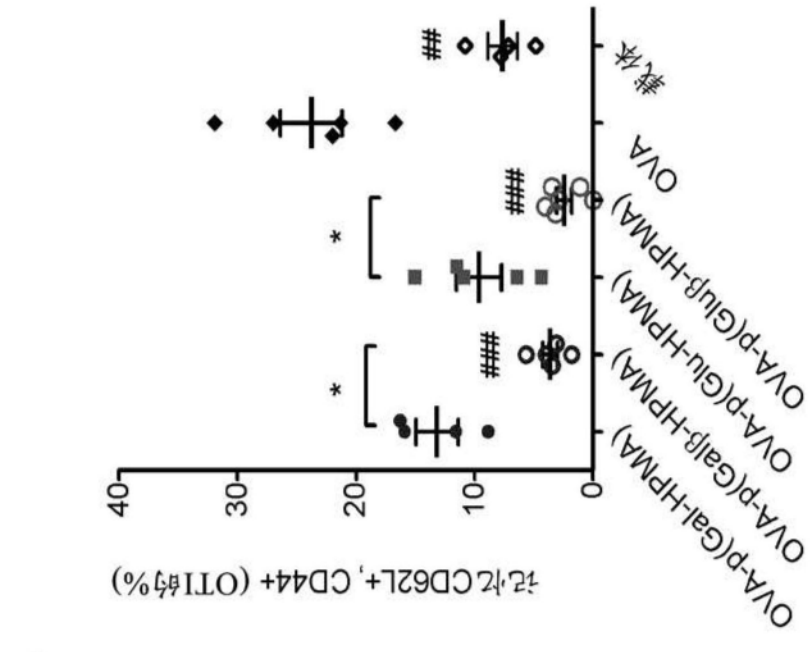

E.
CD62L+, CD44+ (OTI的%)
40
30
20
10
0
OVA-p(Gal-HPMA)
OVA-p(Galβ-HPMA)
OVA-p(Glu-HPMA)
OVA-p(Gluβ-HPMA)
OVA
载体
*
*
#
#
#

图16E-16F

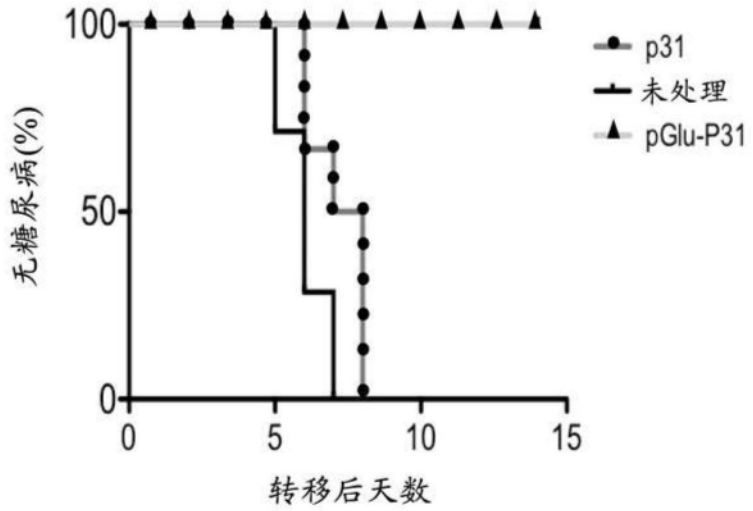
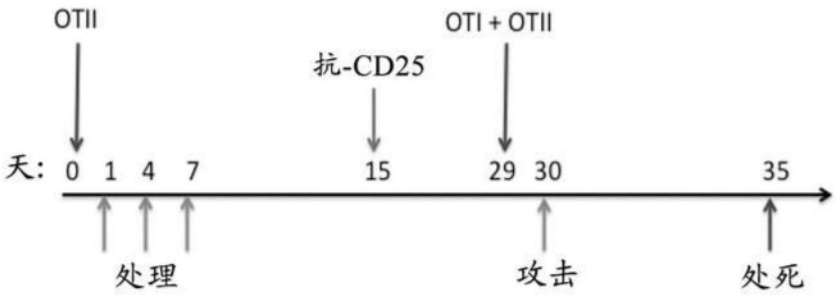


图17



处理:

1. pGlu-OVA
2. OVA
3. pGlu-OVA + 抗-CD25
4. 载体

图18

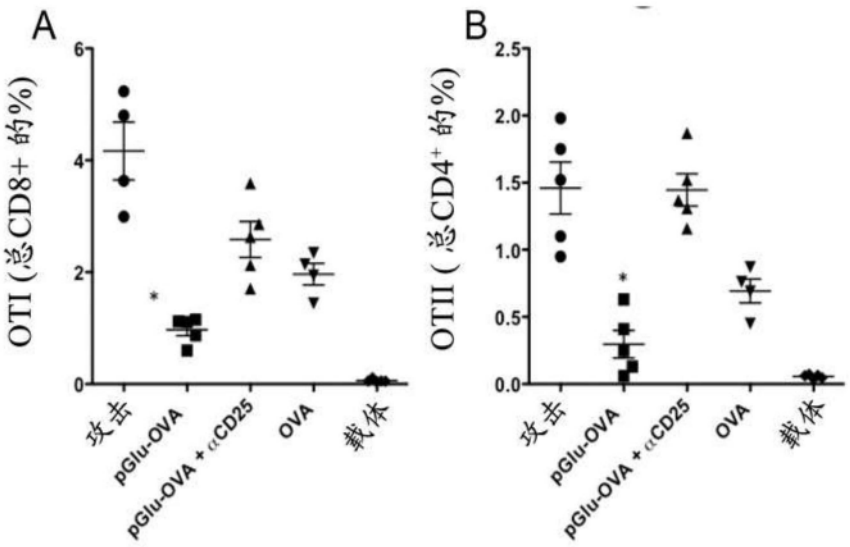
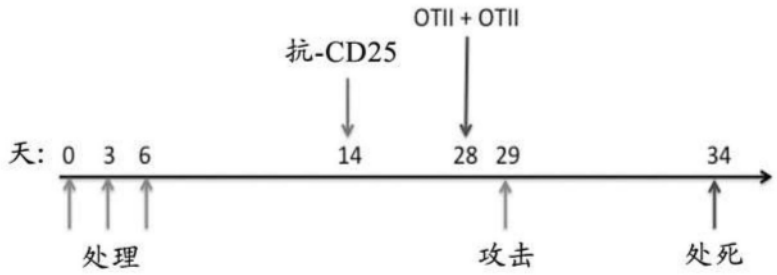


图19A-19B



处理:
1. pGlu-OVA
2. OVA
3. pGlu-OVA + 抗 CD25
4. 载体

图20

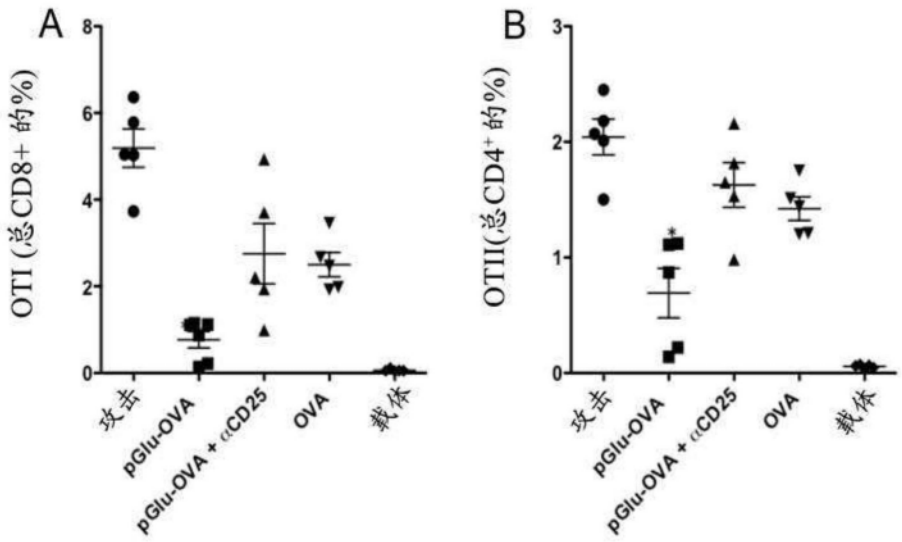
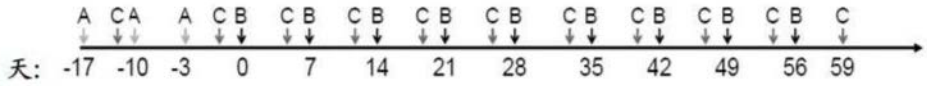


图21A-21B

A ↓ 15 μg 高剂量或2.5 μg 低剂量 pGlu-天冬酰胺酶(pGlu-ASNase)

C ↓ 血液收集

预防处理组:



仅WT-ASNase处理:

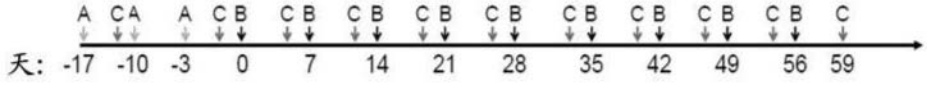


图22

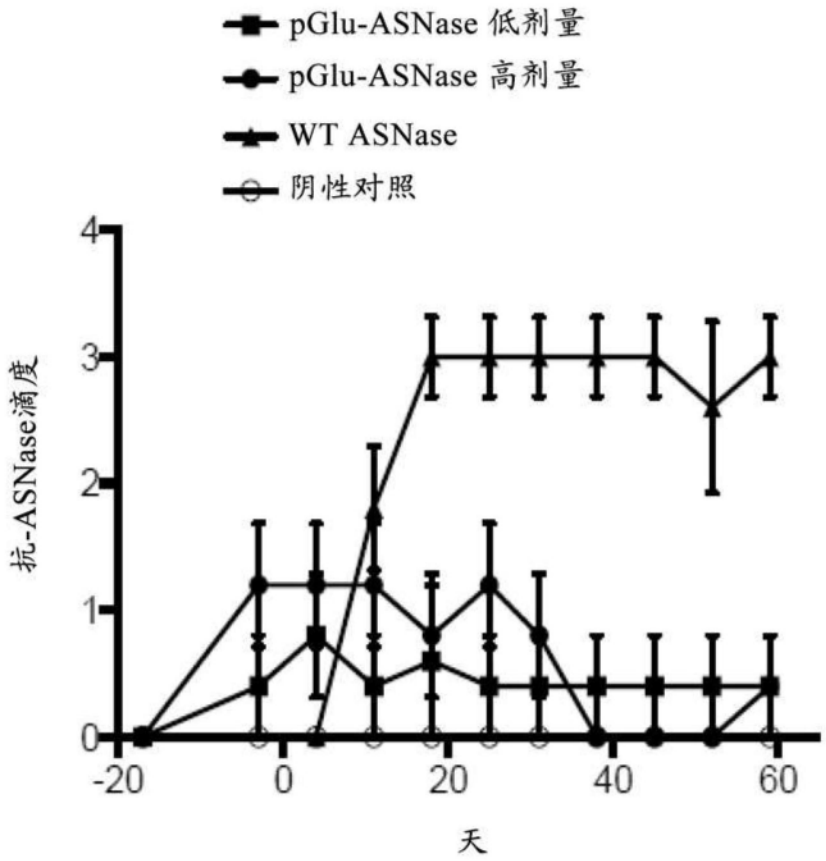
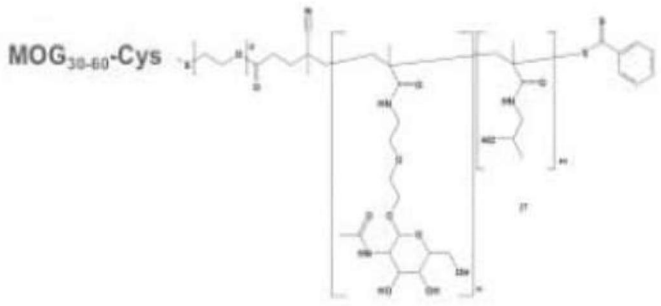

pGlu-ASNase 低剂量
pGlu-ASNase 高剂量
WT ASNase
阴性对照
抗-ASNase滴度
4
3
2
1
0
-20
0
20
40
60
天

图23


A
用MOG35-55/CFA
接种疫苗
将细胞与抗原
一起培养：4d
过继转移致
脑炎性T细胞
检测EAE麻痹、体重、T细胞应答
35-55: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK
组: n= 10 每组
盐水(载体对照)
FTY720 (效力对照)
0.8 μg MOG30-60
0.8 μg pGlu-MOG30-60
4.0 μg MOG30-60
4.0 μg pGlu-MOG30-60

图24A

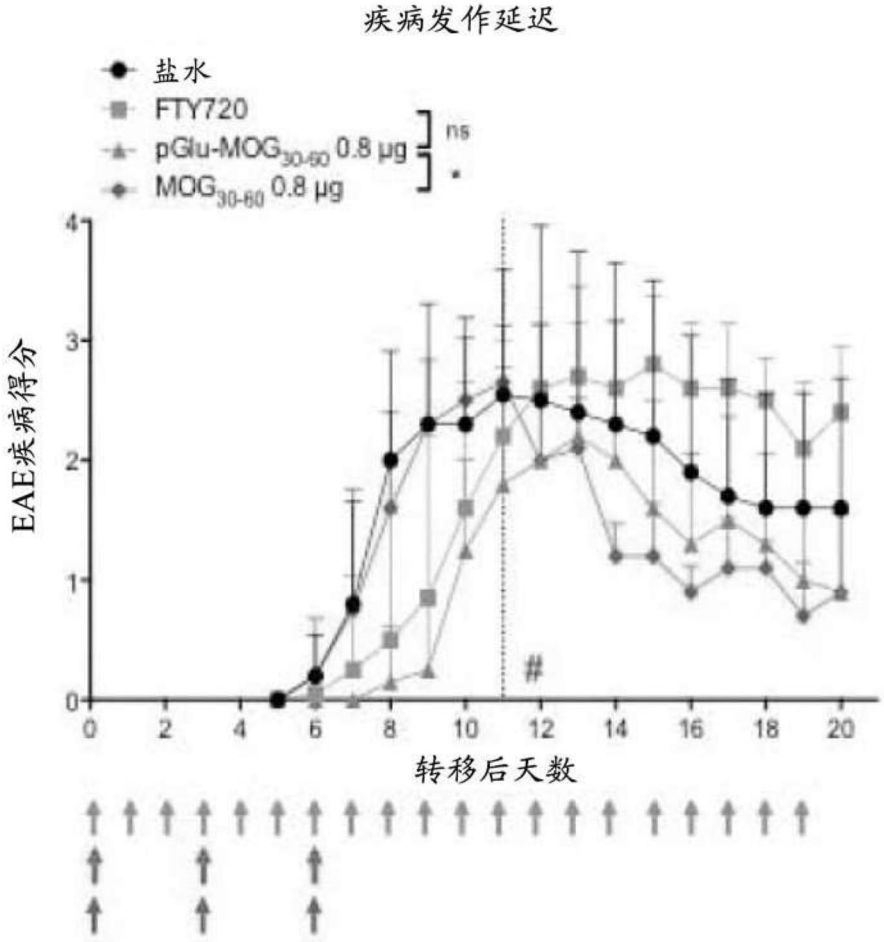
B



30-60: KNATGMEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAE

图24B

A



第11天(疾病峰值-对照):
10只中5只实施安乐死并且分析
追踪10只中5只到研究结束

图25A

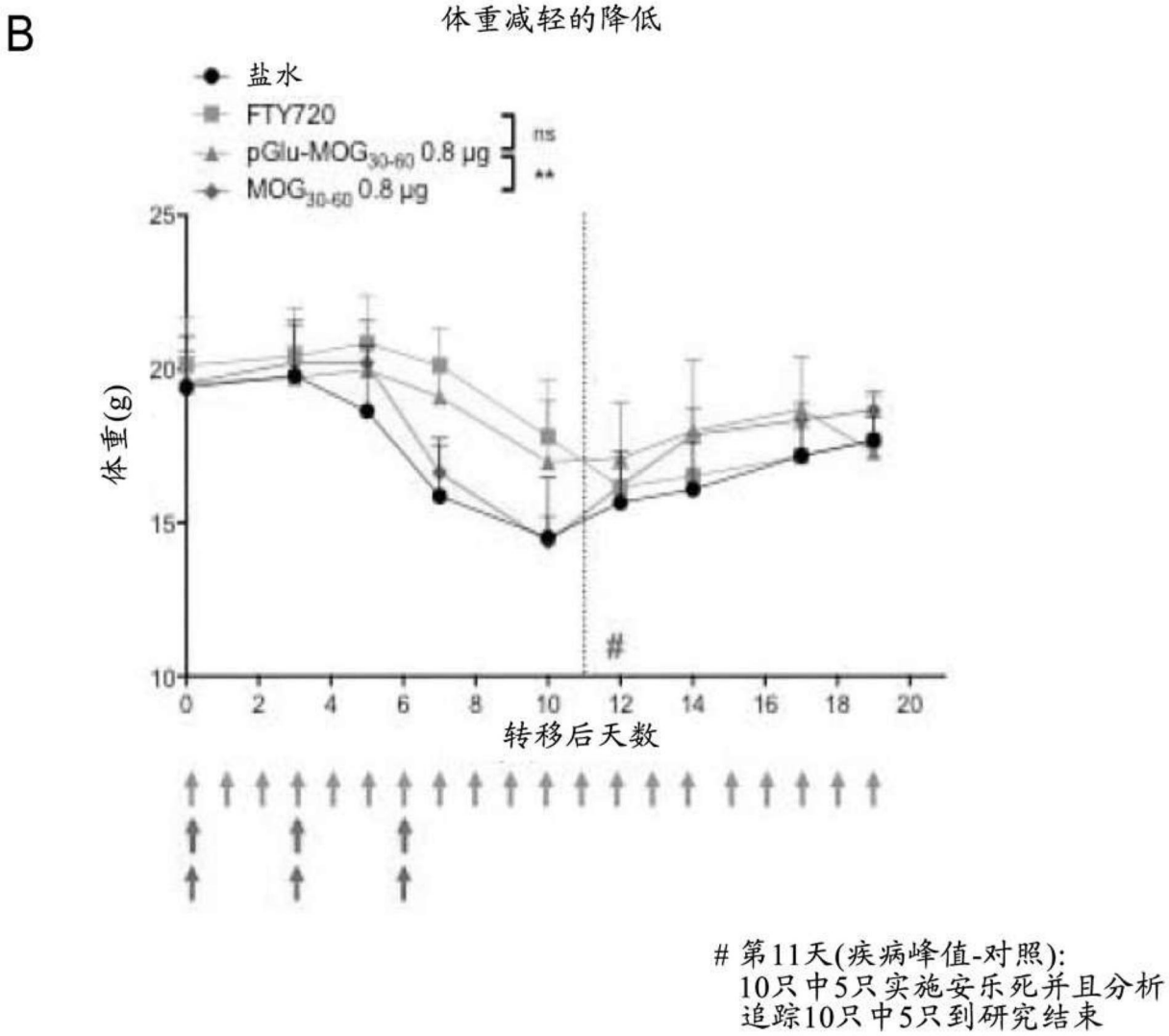

B
体重减轻的降低
盐水
FTY720
pGlu-MOG30-60 0.8 μg
MOG30-60 0.8 μg
ns
**
体重(g)
25
20
15
10
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
#
转移后天数
第11天(疾病峰值-对照):
10只中5只实施安乐死并且分析
追踪10只中5只到研究结束

图25B

A

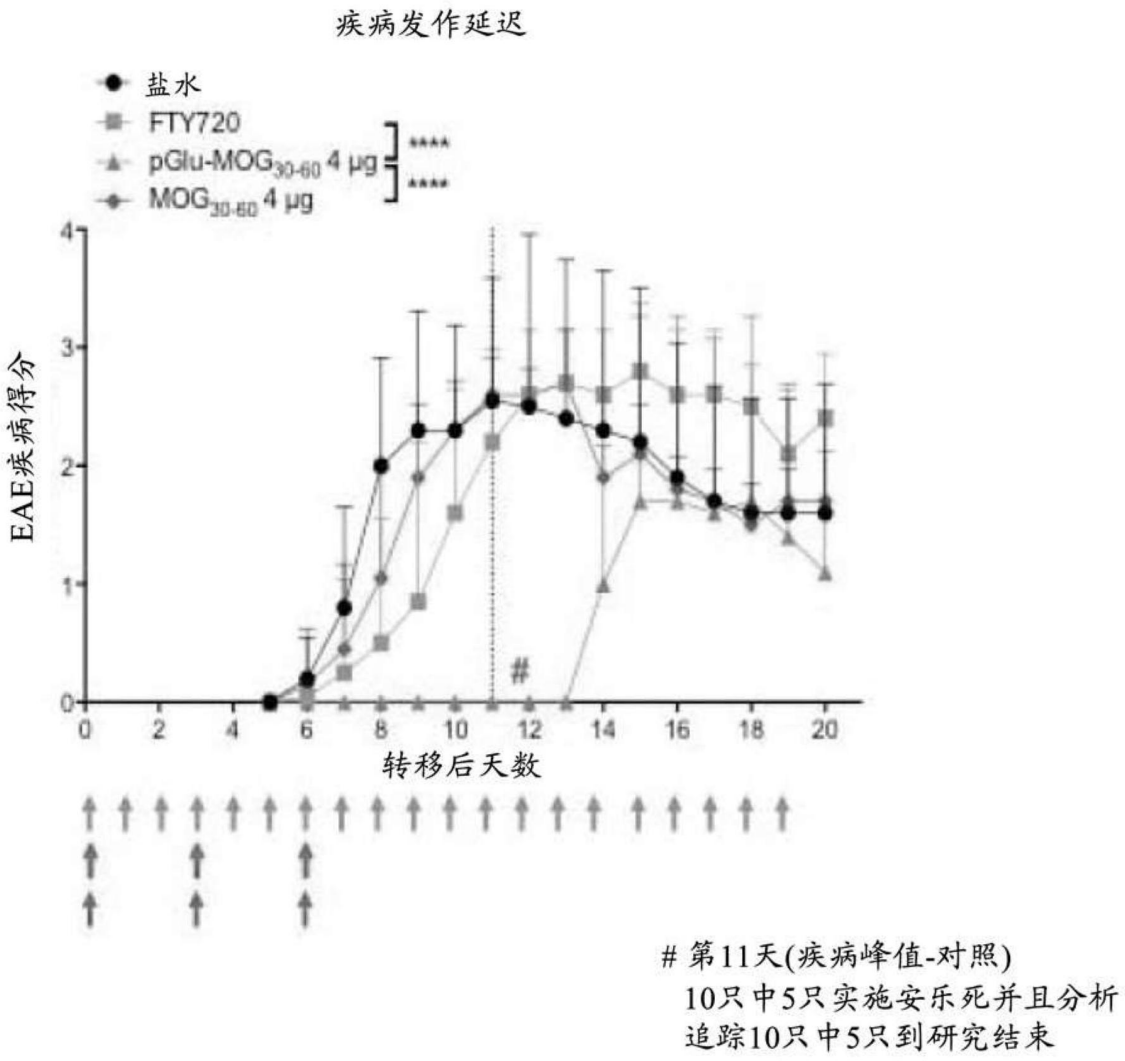

疾病发作延迟
盐水
FTY720
pGlu-MOG30-60 4 μg
MOG30-60 4 μg
****
****
EAE疾病得分
转移后天数
#
0
1
2
3
4
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
第11天(疾病峰值-对照)
10只中5只实施安乐死并且分析
追踪10只中5只到研究结束

图26A

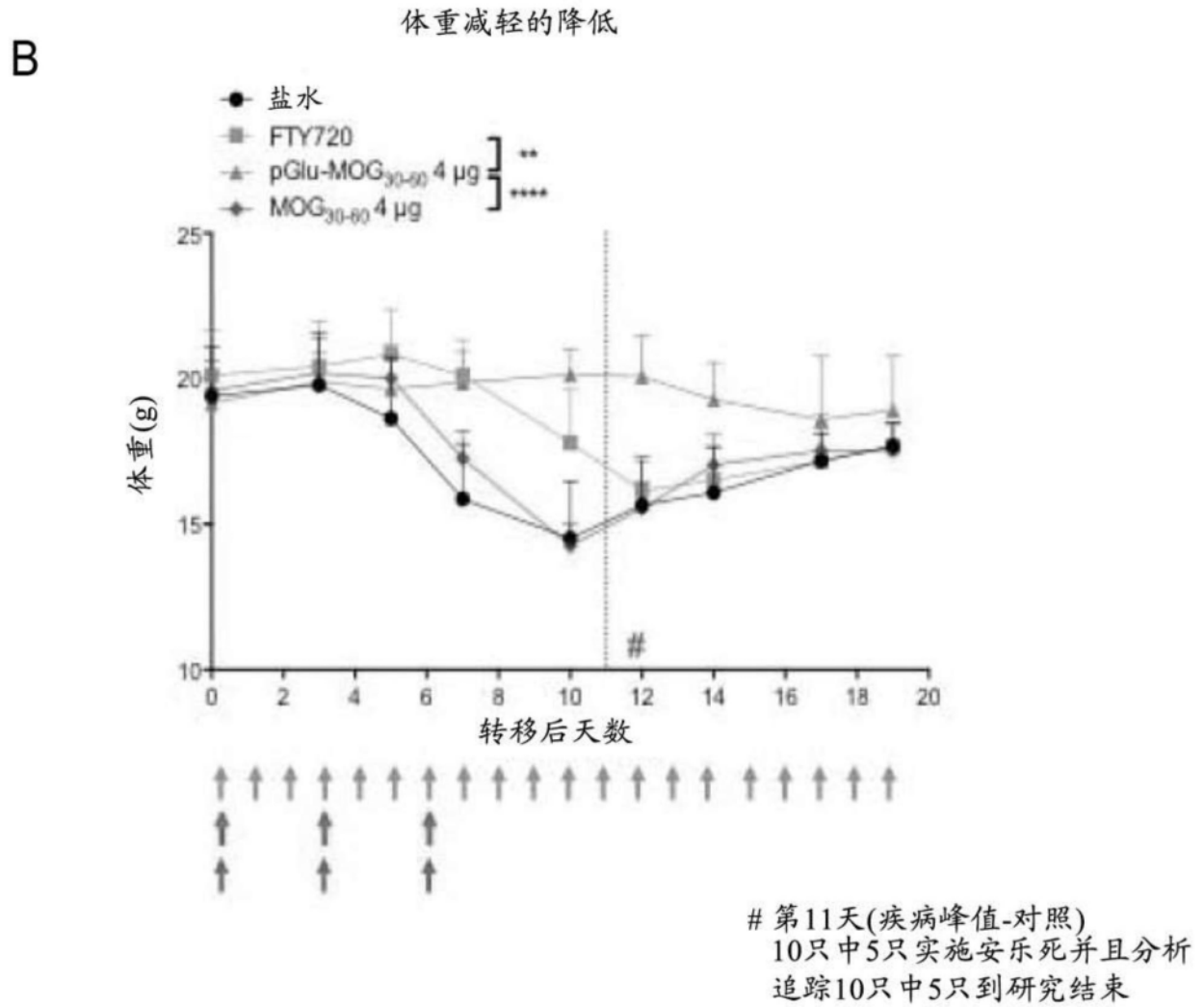

B
体重减轻的降低
盐水
FTY720
pGlu-MOG30-60 4 μg
MOG30-60 4 μg
**
****
体重(g)
转移后天数
#
第11天(疾病峰值-对照)
10只中5只实施安乐死并且分析
追踪10只中5只到研究结束

图26B

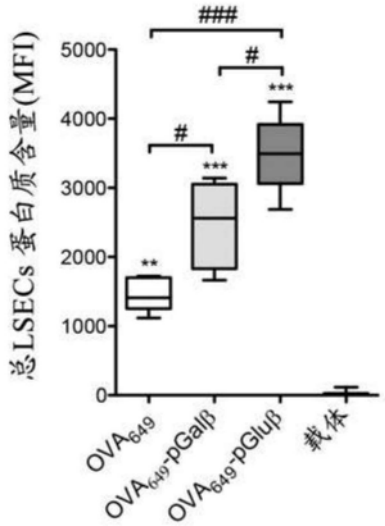

总LSECs 蛋白质含量(MFI)
###
#
#
***
***
**
OVA649
OVA649-pGalβ
OVA649-pGluβ
载体

图27A

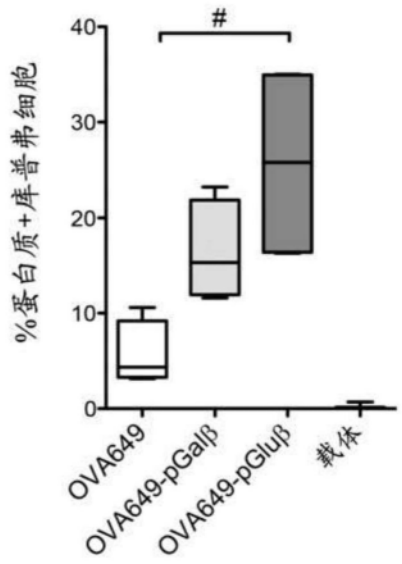

#
40
30
20
10
0
%蛋白质+库普弗细胞
OVA649
OVA649-pGalβ
OVA649-pGluβ
载体

图27B

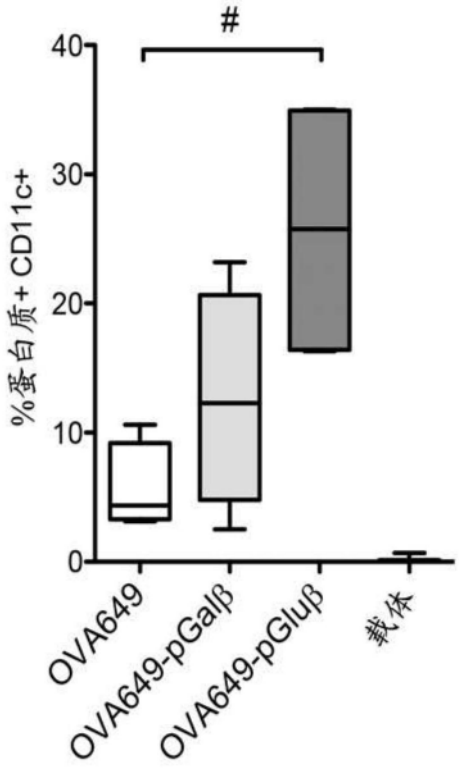

#
40
30
20
10
0
%蛋白质+ CD11c+
OVA649
OVA649-pGalβ
OVA649-pGluβ
载体

图27C

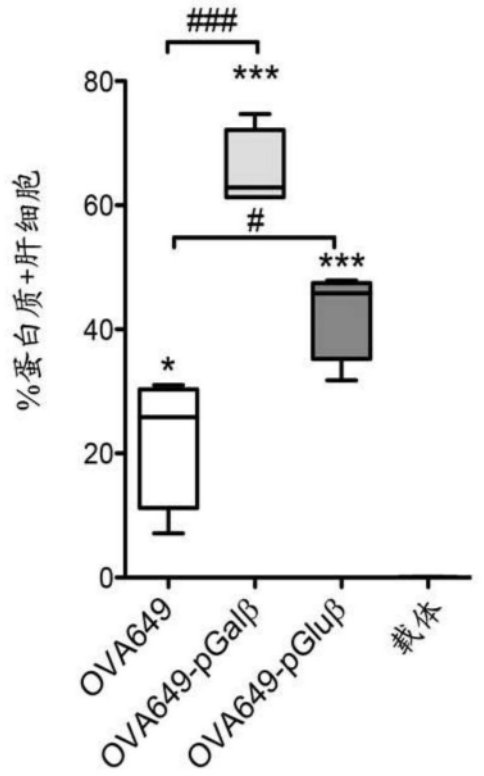

###
***
#
***
*
%蛋白质+肝细胞
80
60
40
20
0
OVA649
OVA649-pGalβ
OVA649-pGluβ
载体

图27D

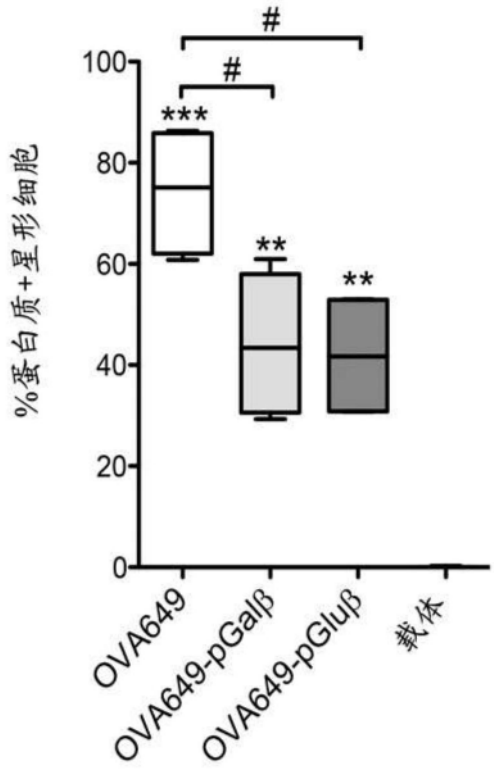

#
#
***
**
**
%蛋白质+星形细胞
100
80
60
40
20
0
OVA649
OVA649-pGalβ
OVA649-pGluβ
载体

图27E