

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 874 884**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/38 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)
A61K 47/54 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2015** **PCT/IB2015/001145**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015** **WO15140648**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2015** **E 15744656 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 3107563**

54 Título: **Compuestos terapéuticos dirigidos a la glucosa**

30 Prioridad:

21.02.2014 US 201461942942 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2021

73 Titular/es:

**ECOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) EPFL-TTO (50.0%)
EPFL Innovation Park J
1015 Lausanne, CH y
ANOKION SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HUBBELL, JEFFREY A.;
KONTOS, STEPHANE;
LORENTZ, KRISTEN MARIE;
WILSON, DAVID SCOTT y
GAI, SHUNING**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 874 884 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos terapéuticos dirigidos a la glucosa

5 Campo de la invención

El campo de la invención se refiere a composiciones farmacéuticamente aceptables que son útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y alergias alimentarias.

10 Antecedentes de la divulgación

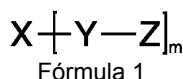
Las solicitudes US 2012/0039989, US 2012/0178139 y WO 2013/121296 describen el direccionamiento de antígenos a eritrocitos para aprovechar el papel de los eritrocitos en la presentación de antígenos para su tolerancia. A pesar de los resultados positivos generados hasta la fecha con este enfoque, la posibilidad de enfoques alternativos sigue siendo de interés.

El documento WO 2014/023709 A1 describe anticuerpos anti-ASGPR usados para administrar compuestos al hígado. Coulstock et al., PLOS ONE, 2013 y el documento WO 2011/086143 A2 describen anticuerpos anti-ASGPR fusionados con IFN- α . Meager et al. El documento WO 2012/083185 A2 se refiere a un sistema de suministro de ARNi que comprende un ligando ASGP.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un compuesto de Fórmula 1:

25



en la que:

30

m es un número entero de 1 a 100;

X comprende un antígeno alimentario seleccionado de la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, al que los pacientes desarrollan una respuesta alérgica o de hipersensibilidad, o un antígeno seleccionado de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, contra el cual un paciente desarrolla una respuesta autoinmune;

35

Y comprende una fracción enlazadora; y

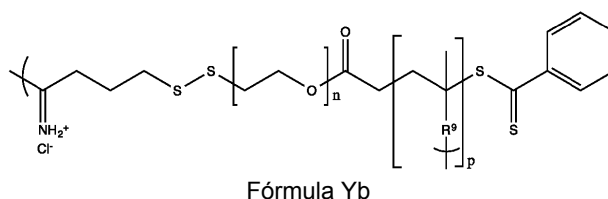
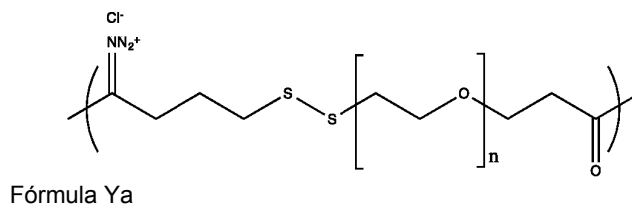
Z comprende una fracción dirigida al hígado; en la que la fracción dirigida al hígado comprende galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.

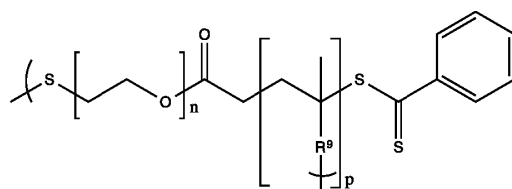
La galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina comprendida en X puede conjugarse en su C1, C2 o C6 a Y.

Y puede seleccionarse de enlazadores de N-hidroxisuccinamido, enlazadores de maleimida, enlazadores de vinilsulfona, enlazadores de piridil-di-tiol-poli(etilenglicol), enlazadores de piridil-di-tiol, enlazadores de carbonato de n-nitrofenilo, enlazadores de éster de NHS y enlazadores de éster de nitrofenoxi-poli(etilenglicol).

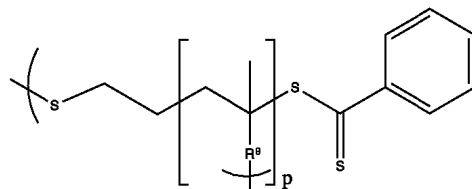
45

Y también puede comprender: una estructura representada por una de las fórmulas Ya a Yp:

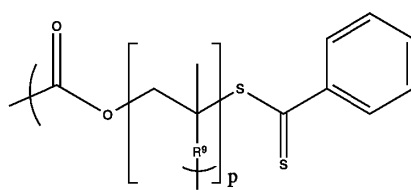




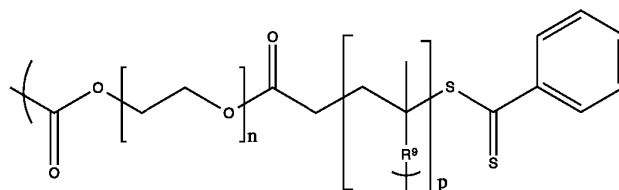
Fórmula Yc



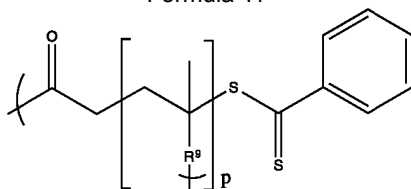
Fórmula Yd



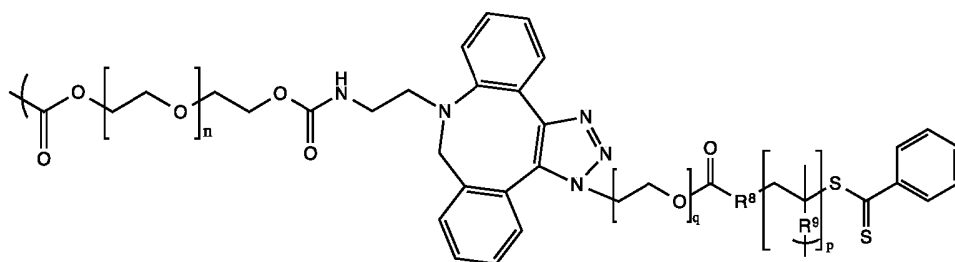
Fórmula Ye



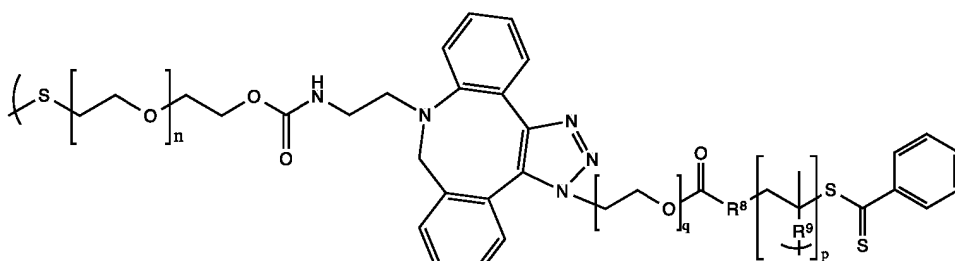
Fórmula Yf



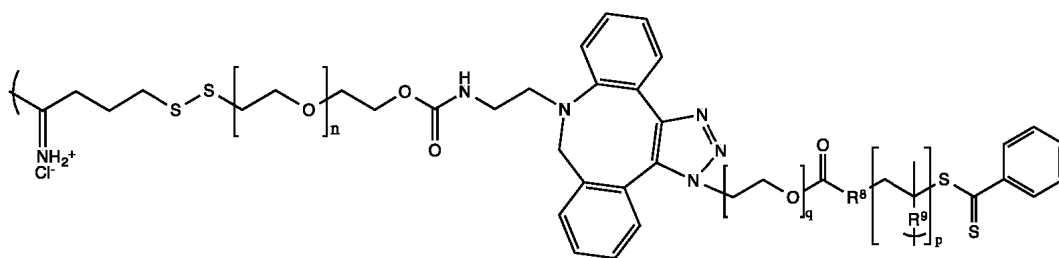
Fórmula Yg



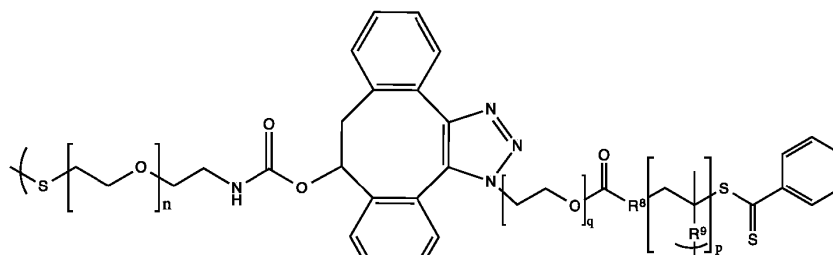
Fórmula Yh



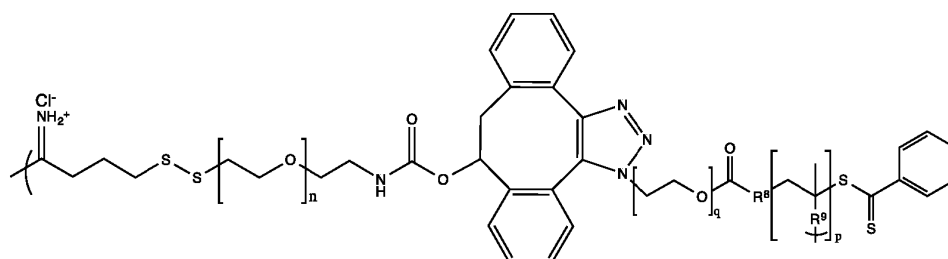
Fórmula Yi



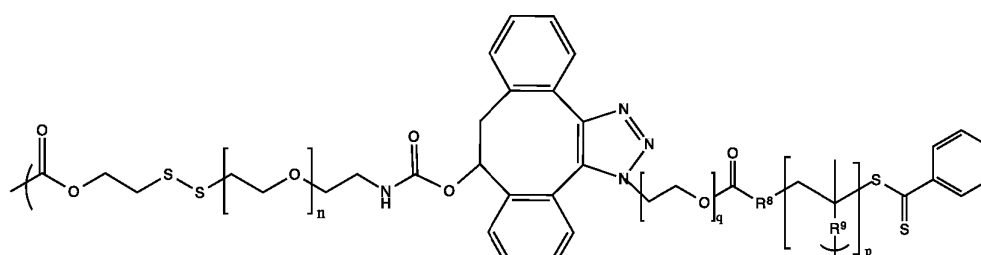
Fórmula Yj



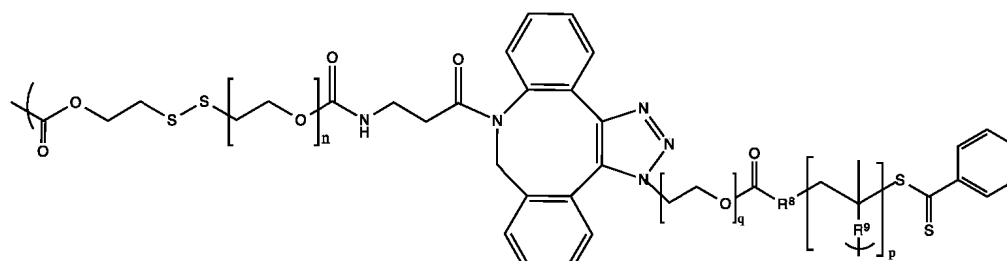
Fórmula Yk



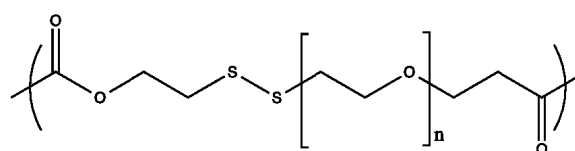
Fórmula YL



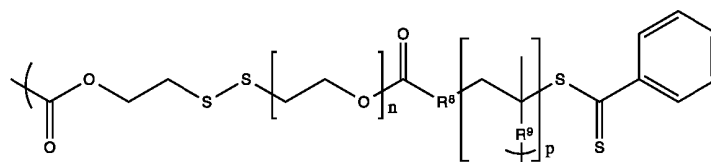
Fórmula Ym



Fórmula Yn

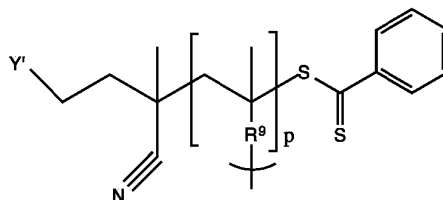


Fórmula Yo



Fórmula Yp

o tiene una porción representada por la Fórmula Y'-CMP:



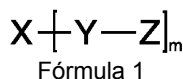
Fórmula Y'-CMP

en las que: el corchete izquierdo "(("indica el enlace entre X e Y; el paréntesis derecho o inferior y)")" indica el enlace entre Y y Z; n es un número entero de aproximadamente 1 a 100; p es un número entero de aproximadamente 2 a 150; q es un número entero de aproximadamente 1 a 44; R⁸ es -CH₂- o -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-; R⁹ es un enlace directo o -CH₂-CH₂-NH-C(O)-; y Y' representa la porción restante de Y.

En otro aspecto de lo anterior, n es aproximadamente 40 a 80, p es aproximadamente 10 a 100, q es aproximadamente 3 a 20, R⁸ es -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-; y cuando R⁹ es -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en su C1.

En otro aspecto más de lo anterior, Y comprende la Fórmula Ya, la Fórmula Yb, la Fórmula Yh, la Fórmula Yi, la Fórmula Yk, la Fórmula Ym o la Fórmula Yn, particularmente la Fórmula Ya, la Fórmula Yb, la Fórmula Ym o la Fórmula Yn.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición como se menciona en el primer aspecto de la invención o una composición que comprende un compuesto de Fórmula 1:



Fórmula 1

en la que:

m es un número entero de 1 a 100;

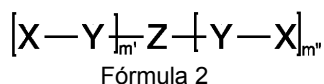
X comprende un antígeno contra el cual un paciente desarrolla una respuesta inmune;

Y comprende una fracción enlazadora; y

Z comprende una fracción dirigido al hígado; en la que la fracción dirigido al hígado comprende galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina, para uso en la tolerancia de dicho paciente con respecto alafracción del antígeno X. X puede comprender además: un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplante desarrollan una respuesta inmune no deseada; un antígeno alimentario, animal, vegetal o ambiental extraño contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada; un agente terapéutico extraño contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada; o un antígeno propio sintético contra la versión endógena de la cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada, o una porción tolerogénica de la misma.

La divulgación también se refiere a un método de tratamiento para una respuesta inmune no deseada contra un antígeno administrando a un mamífero que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de Fórmula 1 como se discutió anteriormente. En dicho método, la composición se puede administrar para la eliminación de una proteína o péptido o anticuerpo circulante que se une específicamente a la fracción del antígeno X, proteína o péptido o anticuerpo circulante que está involucrado de manera causal en el rechazo del trasplante, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, la enfermedad autoinmune, hipersensibilidad y/o alergia. La composición se puede administrar en una cantidad eficaz para reducir la concentración de los anticuerpos que están causalmente implicados en el rechazo del trasplante, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, la enfermedad autoinmune, la hipersensibilidad y/o la alergia en la sangre del paciente en al menos un 50% p/p, medido en un tiempo entre aproximadamente 12 y aproximadamente 48 horas después de la administración. La composición se puede administrar para la tolerancia de un paciente con respecto alafracción del antígeno X.

Se divulga además una composición que comprende un compuesto de Fórmula 2:



en la que: m'es cero o un número entero de aproximadamente 1 a 10, m''es cero o un número entero de aproximadamente 1 a 10, y la suma de m' + m'' es un número entero de aproximadamente 1 a 10 pero es al menos 1; cada X es un antígeno extraño o antígeno propio contra el cual un paciente desarrolla una respuesta inmune no deseada, o una porción tolerogénica del mismo; cada Y es una fracción enlazadora o un enlace directo, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido u otro ligando que se une específicamente a X; y Z es una fracción dirigida al hígado, siempre que X no sea interferón, Ribavirina, Nexavar/Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatina/bevacizumab o Herceptina/trastuzumab cuando m'+ m''es igual a 1 y Z es DOM 26h-196-61.

En el aspecto anterior de la divulgación que involucra la Fórmula 2, se describe que Z puede comprender un anticuerpo dirigido a ASGPR, un fragmento de anticuerpo dirigido a ASGPR, un péptido dirigido a ASGPR, un scFv dirigido a ASGPR u otro ligando de ASGPR. Se describe que Y puede ser un enlazador que tiene un sitio de escisión de inmunoproteasoma. Se describe que X puede comprender un grupo de antígenos relacionados contra los cuales un paciente desarrolla una respuesta inmune no deseada o un grupo de fragmentos tolerogénicos del misma. Por ejemplo, X se puede seleccionar de los grupos que comprenden:

- dos o más de insulina, proinsulina, preproinsulina, ácido glutámico descarboxilasa-65 GAD-67, glucosa-6 fosfatasa 2, proteína 2 asociada a insulinoma, proteína 2 asociada a insulinoma, ICA69, ICA12, carboxipeptidasa H, Imogen 38, GLIMA 38, Cromogranina A, HSP-60, carboxipeptidasa E, periferina, transportador 2 de glucosa, proteína asociada al hepatocarcinoma-intestino-páncreas/pancreática, S100β, proteína ácida fibrilar glial, gen de regeneración II, homeobox 1 pancreático duodenal, distrofia miotónica quinasa, proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islotes y receptores 1-5 acoplados a proteína G de SST;
- dos o más de proteína básica de mielina, glicoproteína de oligodendrocitos de mielina, proteína proteolipídica de mielina, la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17; y
- dos o más de la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27.

La divulgación también se refiere a un método de tratamiento para una respuesta inmune no deseada contra un antígeno administrando a un mamífero que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto de Fórmula 2 como se discutió anteriormente. En dicho método, la composición se puede administrar para la eliminación de una proteína o péptido o anticuerpo circulante que se une específicamente a la fracción del antígeno X, proteína o péptido o anticuerpo circulante que está involucrado de manera causal en el rechazo del trasplante, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, la enfermedad autoinmune, hipersensibilidad y/o alergia. La composición se puede administrar en una cantidad eficaz para reducir la concentración de los anticuerpos que están causalmente implicados en el rechazo del trasplante, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, la enfermedad autoinmune, la hipersensibilidad y/o la alergia en la sangre del paciente en al menos un 50% p/p, medida en un tiempo entre aproximadamente 12 y aproximadamente 48 horas después de la administración. La composición se puede administrar para la tolerancia de un paciente con respecto a la fracción del antígeno X.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una serie de gráficos que muestran la conjugación de galactosa [F1aA-PE-m₄-n₈₀ (Gal-PE)] preferiblemente se dirige OVA a las células del hígado, incluidas las siguientes: (A.) células endoteliales sinusoidales (LSEC), (B.) Células de Kupffer (KC), (C.) hepatocitos y (D.) otras células presentadoras de antígeno (APC).

La Figura 2 es un gráfico que muestra la proliferación de células T CD8+ OTI en ratones tratados con F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA), OVA o solución salina (es decir, sin tratamiento previo).

La Figura 3 es una serie de gráficos que muestran el porcentaje de células T CD8+ OT-I que presentan marcadores de superficie (A.) PD-1+ y (B.) Anexina-V+ en generaciones de células T proliferantes tratadas con solución salina, OVA o F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (GAL-OVA).

La Figura 4 es un gráfico que muestra que la conjugación de galactosa [F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA)] disminuye la inmunogenicidad de OVA según se determina mediante títulos de anticuerpos específicos de OVA (mostrados en títulos de Ab log⁻¹).

La Figura 5 muestra que F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (Gal-OVA) es capaz de reducir los anticuerpos específicos de OVA del suero.

La Figura 6 muestra que F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄ (pGal-OVA) y N'-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C'(Dom-OVA) son capaces de mitigar la respuesta inmune específica de OVA en el drenaje de los ganglios linfáticos después de la exposición intradérmica con OVA y el LPS adyuvante.

La Figura 7 muestra la caracterización de F1aA-OVA-m₄-n₈₀ y F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄. (A.) Trazaspor HPCL de exclusión por tamaño de F1aA-OVA-m₄-n₈₀ (magenta), F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄ (azul) y OVA no conjugado (negro). El

desplazamiento hacia la izquierda representa un aumento en el peso molecular. (B.) Gel de poliacrilamida que demuestra un peso molecular aumentado después de la conjugación de OVA: (1.) OVA no conjugado, (2.) F1aA-OVA-m₄-n₈₀ y (3.) F1b-OVA-m₁-n₄₄-p₃₄.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la cantidad normalizada de N-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA), N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (DOM-OVA) o N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C (OVA-DOM) en la circulación de ratones después de la inyección como un bolo iv.

La Figura 9 es una serie de gráficos que muestran el título de anticuerpos IgG anti-OVA en la circulación de ratones individuales después del tratamiento con solución salina, DOM y OVA, DOM-OVA u OVA-DOM. La producción de IgG anti-OVA fue inducida por inyecciones iv de OVA solamente (a) u OVA y CpG-B (b). Los tiempos de tratamiento se indican mediante líneas discontinuas verticales. El título se calcula como log₁₀ de la dilución máxima de plasma con IgG anti-OVA detectable.

Descripción detallada

Los dos receptores de asialoglicoproteína conocidos ("ASGPR") se expresan en hepatocitos y células endoteliales sinusoidales hepáticas (o "LSEC"). Se pueden encontrar otros receptores de galactosa/galactosamina/N-acetilgalactosamina en diversas formas en múltiples tipos de células [por ejemplo, células dendríticas, hepatocitos, LSEC y células de Kupffer]. Las células dendríticas se consideran "células presentadoras de antígenos profesionales" porque su función principal es presentar antígenos al sistema inmunológico para generar respuestas inmunitarias. Se sabe que algunas células del hígado pueden presentar antígenos, pero es más conocido que el hígado participa en la tolerogénesis. Se entiende que el hígado es un órgano tolerogénico. Por ejemplo, se informan incidencias más bajas de rechazo en los casos de trasplantes de órganos múltiples cuando el hígado es uno de los órganos trasplantados. Los LSEC son mucho más nuevos en la literatura; en consecuencia, su papel en la tolerogénesis y/o la moderación de las respuestas inmunitarias inflamatorias aún no se reconoce ni se comprende bien. Sin embargo, cada vez está más claro que también pueden desempeñar un papel importante en la inducción de tolerancia específica de antígeno.

Una de las características distintivas de la superficie de los eritrocitos es su glicosilación, es decir, la presencia de un número significativo de proteínas glicosiladas. De hecho, las glicoforinas (por ejemplo, glicoforina A) se han empleado como dianas para la unión de eritrocitos. Las glicoforinas son proteínas con muchas cadenas de azúcar unidas covalentemente, cuyo extremo terminal es el ácido siálico. A medida que un eritrocito envejece y madura para su eliminación, el ácido siálico terminal de sus glicoforinas tiende a perderse, dejando la N-acetilgalactosamina en el extremo libre. La N-acetilgalactosamina es un ligando recibido selectivamente por el ASGPR asociado con las células hepáticas, que conduce a la unión de sustancias que contienen N-acetilgalactosamina por las células hepáticas y su posterior absorción y procesamiento en el hígado.

Hasta ahora, los expertos en la técnica han entendido que debe evitarse la glicosilación de un agente terapéutico de una manera que dé como resultado el direccionamiento hepático debido a la eliminación en una primera pasada por el hígado dando como resultado una semivida de circulación deficiente del agente terapéutico. Del mismo modo, algunos anticuerpos monoclonales necesitan ser glicosilados específicamente en ASN297 para una unión óptima a sus receptores Fc. Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que la galactosilación se puede usar de una manera que induzca la tolerogénesis.

Se divulgan ciertas composiciones terapéuticas que están dirigidas para la administración (y para la captación) del hígado, particularmente hepatocitos, LSEC, células de Kupffer y/o células estrelladas, más particularmente hepatocitos y/o LSEC, e incluso más particularmente para unirse específicamente a ASGPR. El direccionamiento al hígado facilita dos mecanismos de tratamiento: tolerancia y eliminación. La tolerancia aprovecha el papel del hígado en la eliminación de células apoptóticas y el procesamiento de sus proteínas para que el sistema inmunológico las reconozca como "propias", así como el papel del hígado en el muestreo de proteínas periféricas para la tolerancia inmunitaria. La eliminación aprovecha el papel del hígado en la purificación de la sangre al eliminar y descomponer rápidamente toxinas, polipéptidos y similares. El direccionamiento de estas composiciones al hígado se logra mediante una fracción galactosilante (por ejemplo, galactosa, galactosamina y N-acetilgalactosamina, particularmente conjugada en C1, C2 o C6), mediante otra fracción dirigida al hígado (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento o un scFv del mismo), o por desialilación de un polipéptido para el que se desea dicho direccionamiento al hígado. La galactosilación u otra fracción dirigida al hígado puede conjugarse químicamente o fusionarse de manera recombinante con un antígeno, mientras que la desialilación expone una fracción similar a galactosa en un polipéptido antigénico. El antígeno puede ser endógeno (un antígeno propio) o exógeno (un antígeno extraño), que incluye, entre otros: un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplante desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, rechazo de trasplante), un antígeno extraño de alimento, animal, planta o ambiental al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, alérgica o hipersensibilidad), un agente terapéutico al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, hipersensibilidad y/o actividad terapéutica reducida), un antígeno propio al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, enfermedad autoinmune), o una porción tolerogénica (por ejemplo, un fragmento o un epitopo) del mismo; estas composiciones son útiles para inducir la tolerancia al antígeno. Alternativamente, la galactosilación u otra fracción dirigida al hígado se puede conjugar con un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que se une específicamente a una proteína o péptido o anticuerpo

circulante, cuya proteína o péptido o anticuerpo circulante está involucrado causalmente en el rechazo del trasplante, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, enfermedad autoinmune y/o alergia (como se discutió anteriormente); estas composiciones son útiles para eliminar la proteína, péptido o anticuerpo circulantes. Por consiguiente, las composiciones de la presente divulgación pueden usarse para tratar una respuesta inmune no deseada, por ejemplo, rechazo de trasplante, una respuesta inmune contra un agente terapéutico, una enfermedad autoinmune y/o una alergia. También se divulgan composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la divulgación mezclada con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se describen además métodos para el tratamiento de una respuesta inmune no deseada, tal como el rechazo de un trasplante, la respuesta contra un agente terapéutico, una enfermedad autoinmune o una alergia.

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, se pretende que las siguientes palabras y frases tengan los significados que se exponen a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

Las formas singulares "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con un valor numérico pretende abarcar valores numéricos dentro de un intervalo que típicamente tiene un límite inferior, es decir, es, por ejemplo, un 5-10% más pequeño que el valor numérico indicado y tiene un límite superior que es, por ejemplo, un 5-10% más grande que el valor numérico indicado.

Un "antígeno" es cualquier sustancia que sirve como diana para los receptores de una respuesta inmune adaptativa, tal como el receptor de células T, el receptor de células B o un anticuerpo. Un antígeno puede originarse dentro del cuerpo ("propio", "auto" o "endógeno"). Un antígeno puede originarse desde fuera del cuerpo ("no propio", "extraño" o "exógeno"), habiendo entrado, por ejemplo, por inhalación, ingestión, inyección o trasplante. Los antígenos extraños incluyen, pero no se limitan a, antígenos alimentarios, antígenos animales, antígenos vegetales, antígenos ambientales, agentes terapéuticos, así como antígenos presentes en un trasplante de aloinjerto.

Una "molécula de unión a antígeno" como se usa en este documento se refiere a moléculas, en particular a proteínas tales como moléculas de inmunoglobulina, que contienen regiones variables de anticuerpos que proporcionan una unión específica a un epítipo. La región variable del anticuerpo puede estar presente, por ejemplo, en un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo y un derivado recombinante de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El término "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "porción de unión"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a una secuencia diana. Los fragmentos de unión a antígeno que contienen regiones variables de anticuerpos incluyen (sin limitación) regiones "Fv", "Fab" y "F(ab')₂", "anticuerpos de dominio único (sdAb)", "nanocuerpos", fragmentos "Fv de cadena sencilla (scFv)", "scFv en tándem" (V_HA-V_LA-V_HB-V_LB), "diacuerpos", "triacuerpos" o "tricuerpos", "diacuerpos de cadena sencilla (scDb)" y "enlazadores de células T biespecíficos (BiTE)".

Una "modificación química" se refiere a un cambio en la estructura química natural de uno o más aminoácidos de un polipéptido. Dichas modificaciones se pueden realizar en una cadena lateral o un terminal, por ejemplo, cambiando el terminal amino o el terminal carboxilo. En algunas realizaciones, las modificaciones son útiles para crear grupos químicos que pueden usarse convenientemente para unir los polipéptidos a otros materiales o para unir un agente terapéutico.

El término "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", es inclusivo o ilimitado y no excluye elementos o etapas de métodos adicionales no citados. La frase "consistente en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado. La frase "que consiste esencialmente en" limita el alcance del tema descrito a los materiales o etapas especificadas y aquellos que no afectan materialmente sus características básicas y novedosas.

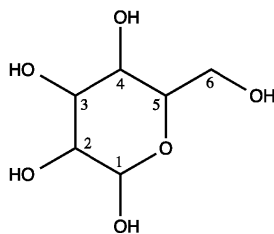
Generalmente, se pueden realizar "cambios conservadores" en una secuencia de aminoácidos sin alterar la actividad. Estos cambios se denominan "sustituciones conservadoras" o mutaciones; es decir, un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica particular puede sustituirse por otro aminoácido. Los sustitutos de una secuencia de aminoácidos se pueden seleccionar de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que tales sustituciones afecten sustancialmente al peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida o punto isoeléctrico. Las sustituciones

conservadoras también incluyen la sustitución de isómeros ópticos de las secuencias por otros isómeros ópticos, específicamente D aminoácidos por L aminoácidos para uno o más residuos de una secuencia. Además, todos los aminoácidos de una secuencia pueden sufrir una sustitución de isómero D por L. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Lys por Arg y viceversa para mantener una carga positiva; Glu por Asp y viceversa para mantener una carga negativa; Ser por Thr de modo que se mantenga un -OH libre; y Gln por Asn para mantener un -NH₂ libre. Otro tipo más de sustitución conservadora constituye el caso en el que se introducen aminoácidos con reactividades químicas deseadas para impartir sitios reactivos para reacciones de conjugación química, si surge la necesidad de derivatización química. Dichos aminoácidos incluyen, entre otros, Cys (para insertar un grupo sulfhidrilo), Lys (para insertar una amina primaria), Asp y Glu (para insertar un grupo de ácido carboxílico) o aminoácidos no canónicos especializados que contienen cetona, azida, cadenas laterales de alquino, alqueno y tetrazina. Las sustituciones o adiciones conservadoras de aminoácidos que portan -NH₂ o -SH libres pueden ser particularmente ventajosas para la conjugación química con los enlazadores y fracciones de galactosilación de Fórmula 1. Además, en algunos casos se pueden realizar mutaciones, eliminaciones e inserciones puntuales de las secuencias polipeptídicas o secuencias de ácido nucleico correspondientes sin pérdida de función del polipéptido o fragmento de ácido nucleico. Las sustituciones pueden incluir, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos. Una variante utilizable en la presente invención puede exhibir un número total de hasta 200 (hasta 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 o 200) cambios en la secuencia de aminoácidos (es decir, intercambios, inserciones, eliminaciones, truncamientos del terminal N y/o truncamientos del terminal C). Los residuos de aminoácidos descritos en el presente documento emplean ya sea el designador de aminoácidos de una sola letra o la abreviatura de tres letras de acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos estándar, J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559. Todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en este documento mediante fórmulas con orientación izquierda y derecha en la dirección convencional del terminal amino al terminal carboxilo.

Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de una composición de la divulgación que es suficiente para efectuar el tratamiento, como se define a continuación, cuando se administra a un mamífero que necesita dicho tratamiento. Esta cantidad variará dependiendo del sujeto y la condición de la enfermedad que se esté tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición de la enfermedad, la composición particular de la divulgación elegida, el régimen de dosificación a seguir, el momento de la administración, la forma de administración y similares, todo lo cual puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica.

Un "epítipo", también conocido como determinante antigénico, es el segmento de una macromolécula, por ejemplo una proteína, que es reconocida por el sistema inmunológico adaptativo, tal como los anticuerpos, las células B o las células T. Un epítipo es la parte o segmento de una macromolécula capaz de unirse a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En este contexto, el término "unión" se refiere en particular a una unión específica. En el contexto de la presente invención se prefiere que el término "epítipo" se refiera al segmento de proteína o poliproteína que es reconocido por el sistema inmunológico.

El término galactosa es bien conocido en la técnica y se refiere a un azúcar monosacárido que existe tanto en forma de cadena abierta como en forma cíclica, que tiene isómeros D y L. En la forma cíclica hay dos anómeros, a saber, alfa y beta. En la forma alfa, el grupo alcohol C1 está en la posición axial, mientras que en la forma beta, el grupo alcohol C1 está en la posición ecuatorial. En particular, "galactosa" se refiere a la piranosa cíclica de seis miembros, más en particular al isómero D e incluso más particularmente a la forma alfa-D (α -D-galactopiranos). La estructura y numeración de la galactosa se ilustra a continuación.



El término "fracción galactosilante" se refiere a un tipo particular de fracción dirigida al hígado. Las fracciones de galactosilación incluyen, pero no se limitan a, un residuo de galactosa, galactosamina y/o N-acetilgalactosamina.

El término "fracción dirigida al hígado" se refiere a fracciones que tienen la capacidad de dirigir, por ejemplo, un polipéptido, al hígado. El hígado comprende diferentes tipos de células, que incluyen pero no se limitan a hepatocitos, células epiteliales sinusoidales, células de Kupffer, células estrelladas y/o células dendríticas. Normalmente, una fracción dirigida al hígado dirige un polipéptido a una o más de estas células. En la superficie de las respectivas células hepáticas, están presentes receptores que reconocen y se unen específicamente a la fracción que se dirige al hígado. El direccionamiento al hígado se puede lograr mediante la conjugación química de un antígeno o ligando a una fracción de galactosilación, desialilación de un antígeno o ligando para exponer

fracciones de galactosilo subyacentes, fusión recombinante o conjugación química de un antígeno o ligando a una fracción de unión a ASGPR, o unión específica de un anticuerpo endógeno a un antígeno o ligando, en la que el antígeno o ligando está: desialilado para exponer fracciones galactosilo subyacentes, conjugadas a una fracción galactosilante, o fusionado recombinantemente o conjugado químicamente a una fracción de unión a ASGPR. Las proteínas desialiladas de origen natural no están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación.

Se pretende que los "valores numéricos" y los "intervalos" proporcionados para los diversos sustituyentes abarquen todos los números enteros dentro del intervalo mencionado. Por ejemplo, cuando se define n como un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 1 a 100, particularmente de aproximadamente 8 a 90 y más particularmente de aproximadamente 40 a 80 grupos de etilenglicol, en la que la mezcla típicamente abarca el número entero especificado como $n \pm$ aproximadamente 10% (o para números enteros más pequeños de 1 a aproximadamente 25, ± 3), debe entenderse que n puede ser un número entero de aproximadamente 1 a 100 (por ejemplo, 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 o 110) y que la mezcla divulgada abarca intervalos tales como 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 y 107-113 grupos etilenglicol. Se debe entender que los términos combinados "aproximadamente" y " $\pm 10\%$ " o " ± 3 " divulgan y proporcionan soporte específico para intervalos equivalentes dondequiera que se utilicen.

El término "opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que ocurre dicho evento o circunstancia y casos en los que no ocurre.

Un péptido que se une específicamente a una diana particular se denomina "ligando" para esa diana.

Un "polipéptido" es un término que se refiere a una cadena de residuos de aminoácidos, independientemente de la modificación postraducciona (por ejemplo, fosforilación o glicosilación) y/o complejación con polipéptidos adicionales, y/o síntesis en complejos de múltiples subunidades con ácidos nucleicos y/o carbohidratos u otras moléculas. Por lo tanto, los proteoglicanos también se denominan en el presente documento polipéptidos. Un polipéptido largo (que tiene más de 50 aminoácidos) se denomina "proteína". Un polipéptido corto (que tiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos) se denomina "péptido". Dependiendo del tamaño, la composición de aminoácidos y la estructura tridimensional, ciertos polipéptidos pueden nombrarse "molécula de unión a antígeno", "anticuerpo", "fragmento de anticuerpo" o "ligando". Los polipéptidos se pueden producir mediante varios métodos, muchos de los cuales son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden obtener mediante extracción (por ejemplo, de células aisladas), mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o mediante síntesis química. Los polipéptidos se pueden producir, por ejemplo, mediante tecnología recombinante y vectores de expresión que codifican el polipéptido introducido en las células huésped (por ejemplo, mediante transformación o transfección) para la expresión del polipéptido codificado.

Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar a las composiciones ingredientes activos complementarios.

El término "purificado" como se usa en este documento con referencia a un polipéptido se refiere a un polipéptido que ha sido sintetizado químicamente y por lo tanto no está sustancialmente contaminado por otros polipéptidos, o ha sido separado o aislado de la mayoría de los otros componentes celulares por los que está naturalmente acompañado (por ejemplo, otras proteínas celulares, polinucleótidos o componentes celulares). Un ejemplo de un polipéptido purificado es uno que está al menos en un 70%, en peso seco, libre de proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que se asocia naturalmente. Por lo tanto, una preparación de un polipéptido purificado puede ser, por ejemplo, al menos 80%, al menos 90% o al menos 99%, en peso seco, del polipéptido. Los polipéptidos también se pueden diseñar para contener una secuencia de etiqueta (por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, una etiqueta myc, una etiqueta FLAG® u otra etiqueta de afinidad) que facilite la purificación o el marcado (por ejemplo, captura en una matriz de afinidad, visualización bajo un microscopio). Por lo tanto, una composición purificada que comprende un polipéptido se refiere a un polipéptido purificado a menos que se indique lo contrario. El término "aislado" indica que los polipéptidos o ácidos nucleicos de la divulgación no se encuentran en su entorno natural. Por lo tanto, los productos aislados de la divulgación pueden estar contenidos en un sobrenadante de cultivo, parcialmente enriquecidos, producidos a partir de fuentes heterólogas, clonados en un vector o formulados con un vehículo, etc.

El término "identidad de secuencia" se usa con respecto a las comparaciones de secuencias de polipéptidos. Esta expresión en particular se refiere a un porcentaje de identidad de secuencia, por ejemplo al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% del polipéptido de referencia respectivo o del polinucleótido de

referencia respectivo. Particularmente, el polipéptido en cuestión y el polipéptido de referencia exhiben la identidad de secuencia indicada en un tramo continuo de 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos o en toda la longitud del polipéptido de referencia.

"Unión específica", como se usa comúnmente ese término en las técnicas biológicas, se refiere a una molécula que se une a una diana con una afinidad relativamente alta en comparación con los tejidos no diana, y generalmente involucra una pluralidad de interacciones no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno y similares. Las interacciones de unión específicas caracterizan la unión anticuerpo-antígeno, la unión enzima-sustrato y ciertas interacciones proteína-receptor; mientras que dichas moléculas pueden unirse a tejidos además de sus dianas específicas de vez en cuando, en la medida en que dicha unión no diana sea intrascendente, el par de unión de alta afinidad todavía puede caer dentro de la definición de unión específica.

El término "tratamiento" o "tratar" significa cualquier tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero, que incluye:

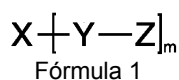
prevenir o proteger contra la enfermedad o trastorno, es decir, hacer que no se desarrollen los síntomas clínicos; inhibir la enfermedad o trastorno, es decir, detener o suprimir el desarrollo de síntomas clínicos; y/o aliviar la enfermedad o trastorno, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos.

El término "respuesta inmune no deseada" se refiere a una reacción del sistema inmune de un sujeto, que en la situación dada no es deseable. La reacción del sistema inmunológico no es deseada si dicha reacción no conduce a la prevención, reducción o curación de una enfermedad o trastorno, sino que causa, intensifica o empeora un trastorno o enfermedad. Normalmente, una reacción del sistema inmunológico provoca, potencia o empeora una enfermedad si se dirige contra un objetivo inadecuado. A modo de ejemplo, una respuesta inmune no deseada incluye, pero no se limita a, rechazo de trasplante, respuesta inmune contra un agente terapéutico, enfermedad autoinmune y alergia o hipersensibilidad.

El término "variante" debe entenderse como una proteína que difiere en comparación con la proteína de la que se deriva por uno o más cambios en su longitud, secuencia o estructura. El polipéptido del que se deriva una variante de proteína también se conoce como polipéptido o polinucleótido original. El término "variante" comprende "fragmentos" o "derivados" de la molécula original. Normalmente, los "fragmentos" son más pequeños en longitud o tamaño que la molécula original, mientras que los "derivados" exhiben una o más diferencias en su secuencia o estructura en comparación con la molécula original. También abarcan moléculas modificadas tales como, pero sin limitarse a, proteínas modificadas postraduccionalmente (por ejemplo, proteínas glicosiladas, fosforiladas, ubiquitinadas, palmitoiladas o escindidas proteolíticamente) y ácidos nucleicos modificados tales como ADN metilado. También las mezclas de diferentes moléculas tales como, pero sin limitarse a, híbridos de ARN-ADN, están englobadas por el término "variante". Las variantes de origen natural y construidas artificialmente deben entenderse que están abarcadas por el término "variante" como se usa en este documento. Además, las variantes utilizables en la presente invención también pueden derivarse de homólogos, ortólogos o parálogos de la molécula original o de una variante construida artificialmente, siempre que la variante exhiba al menos una actividad biológica de la molécula original, es decir, sea funcionalmente activa. Una variante puede caracterizarse por un cierto grado de identidad de secuencia con el polipéptido original del que se deriva. Más precisamente, una variante de proteína en el contexto de la presente divulgación puede exhibir al menos un 80% de identidad de secuencia con su polipéptido original. Preferiblemente, la identidad de secuencia de las variantes de proteínas se encuentra en un tramo continuo de 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

Composiciones y formulaciones farmacéuticas para su uso.

Un aspecto del segundo aspecto de la invención son las composiciones y formulaciones farmacéuticas para uso en la tolerancia de pacientes, representadas por la Fórmula 1:



en la que:

m es un número entero de aproximadamente 1 a 100, particularmente de aproximadamente 1 a 20, y más particularmente de 1 a aproximadamente 10;

X es una fracción de antígeno contra el cual un paciente desarrolla una respuesta inmune;

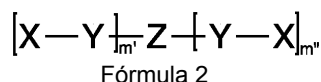
Y es una fracción enlazadora; y

Z es una fracción dirigida al hígado, en la que la fracción dirigida al hígado comprende galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.

El valor de m en la Fórmula 1 dependerá de la naturaleza de X, ya que cada antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando tienen un número y una densidad individuales de sitios (predominantemente la amina del terminal N, los residuos de lisina y los residuos de cisteína) a los que se puede unir un enlazador o una fracción galactosilante. Los antígenos que tienen un número limitado de dichos sitios pueden derivatizarse, por ejemplo, en el terminal N o C, añadiendo residuos de lisina o cisteína (opcionalmente mediante un enlazador escindible, particularmente un enlazador que tiene un sitio de escisión del inmunoproteasoma). Generalmente, se prefiere proporcionar un grado adecuado de galactosilación en las composiciones de Fórmula 1 para facilitar la captación por las células hepáticas. Las formulaciones farmacéuticas y los métodos de la divulgación pueden emplear un cóctel de composiciones de Fórmula 1, que portan respectivamente diferentes fracciones X (por ejemplo, varios epítopos asociados con una respuesta inmune no deseada particular).

Las composiciones para uso de la Fórmula 1 incluyen los subgéneros en los que X es un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplante desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, rechazo de trasplante), un antígeno de alimento, animal, vegetal o ambiental extraño contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, alérgica o hipersensibilidad), un agente terapéutico extraño contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, hipersensibilidad y/o actividad terapéutica reducida), o un antígeno propio contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, enfermedad autoinmune); en la que Y es un enlazador de fórmulas Ya a Yp; y/o en la que Z es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina, como se ilustra mediante las Fórmulas 1a a 1p como se describe a continuación con referencia a los Esquemas de reacción.

Se divulga además una composición farmacéuticamente aceptable representada por la Fórmula 2:



en la que:

m'es cero o un número entero de aproximadamente 1 a 10, m''es cero o un número entero de aproximadamente 1 a 10, y la suma de m' + m'' es un número entero de aproximadamente 1 a 10 pero es al menos 1;

X es una fracción de antígeno, particularmente un antígeno extraño o antígeno propio contra el cual un paciente desarrolla una respuesta inmune no deseada, o una porción tolerogénica (por ejemplo, un fragmento o un epítipo) de dicha fracción de antígeno;

Y es una fracción enlazadora o un enlace directo, o un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido u otro ligando que se une específicamente a X; y

Z es una fracción dirigida al hígado, en particular un anticuerpo dirigido a ASGPR, un fragmento de anticuerpo dirigido a ASGPR, un péptido dirigido a ASGPR, un scFv dirigido a ASGPR u otro ligando de ASGPR,

que incluye opcionalmente dicha composición secuencias de aminoácidos para facilitar el aislamiento y purificación [por ejemplo, una "etiqueta His" o "6xHis" que tiene la secuencia: HHHHHH (SEQ ID NO: 1) y enlazadores adicionales [por ejemplo, "Gly₃Ser" que tiene la secuencia: GGGS (SEQ ID NO: 2)]. En las composiciones de Fórmula 2 en las que m' + m'' es mayor que uno, las fracciones X pueden ser iguales o diferentes, y las fracciones Y pueden ser iguales o diferentes. El valor de m' + m'' será menor (por ejemplo, 3 o menos) cuando X es una proteína completa, o más grande (hasta aproximadamente 10) cuando X es un péptido. El enlazador o enlazadores "Y" pueden comprender ventajosamente un sitio de escisión, particularmente un sitio de escisión del inmunoproteasoma.

Se divulgan composiciones de Fórmula 2 que incluyen los subgéneros en los que X es un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplante desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, rechazo de trasplante), un antígeno de alimento, animal, vegetal o ambiental extraño contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, alérgica o hipersensibilidad), un agente terapéutico extraño contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, hipersensibilidad y/o actividad terapéutica reducida), o un antígeno propio contra el cual los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, enfermedad autoinmune).

Alternativamente, en las composiciones de Fórmula 1 y/o Fórmula 2, X puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que se une específicamente a una proteína o péptido o anticuerpo circulante, cuya proteína o péptido o anticuerpo circulante está implicado causalmente en el rechazo del trasplante, respuesta inmune frente a un agente terapéutico, enfermedad autoinmune, hipersensibilidad y/o alergia.

Las composiciones de Fórmula 2 se pueden preparar como proteínas de fusión y pueden incluir varios componentes útiles en su preparación y purificación, tal como una secuencia señal o guía que dirige el polipéptido expresado a una vía de transporte específica y posteriormente se escinde del polipéptido; por lo tanto, la secuencia señal puede ser parte de la proteína expresada y el ADN que la codifica, pero no parte de la composición final. Un ejemplo de una secuencia señal de mamífero utilizada en sistemas de expresión es la secuencia de la cadena de Ig, que dirige la secreción de proteínas: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (SEQ ID NO: 3). De manera similar, un ejemplo de

una secuencia señal bacteriana común usada en sistemas de expresión es la secuencia señal pelB, que dirige la proteína expresada al periplasma bacteriano: MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA (SEQ ID NO: 4).

Antígenos

El antígeno empleado como X en la composición para uso de la Fórmula 1 puede ser una proteína o un péptido, por ejemplo, el antígeno puede ser un agente terapéutico completo o parcial, una proteína de trasplante de longitud completa o un péptido de la misma, un antígeno propio o péptido de longitud completa del mismo, un alérgeno o péptido de longitud completa del mismo y/o un ácido nucleico, o un mimético de un antígeno mencionado anteriormente.

Los antígenos empleados en la práctica del segundo aspecto de la presente invención pueden ser uno o más de los siguientes:

- Agentes terapéuticos que son proteínas, péptidos, anticuerpos y moléculas similares a anticuerpos, incluidos fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Estos incluyen proteínas, anticuerpos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y estructuras de unión que no son anticuerpos, tales como fibronectinas, DARPs, knotinas y similares humanos, no humanos (tal como de ratón) y no naturales (es decir modificados).
- Antígenos de trasplante de aloinjertos humanos contra los cuales los receptores de trasplantes desarrollan una respuesta inmunitaria no deseada.
- Antígenos propios que provocan una respuesta autoinmune no deseada. Los expertos en la técnica apreciarán que aunque los antígenos propios son de origen endógeno en un paciente con enfermedad autoinmune, los polipéptidos empleados en las composiciones divulgadas se sintetizan típicamente de forma exógena (en lugar de purificarse y concentrarse a partir de una fuente de origen).
- Antígenos extraños, tales como antígenos alimentarios, de animales, vegetales y ambientales, contra los cuales un paciente experimenta una respuesta inmune no deseada. Los expertos en la técnica apreciarán que, si bien una proteína terapéutica también puede considerarse un antígeno extraño debido a su origen exógeno, por motivos de claridad en la descripción de la presente divulgación, tales agentes terapéuticos se describen como un grupo separado. De manera similar, un antígeno vegetal o animal puede ingerirse y considerarse un antígeno alimentario, y un antígeno ambiental puede originarse a partir de una planta. Sin embargo, todos son antígenos extraños. En aras de la simplicidad, no se intentará describir la distinción y definir todos esos grupos potencialmente superpuestos, ya que los expertos en la técnica pueden apreciar los antígenos que pueden emplearse en las composiciones de la divulgación, particularmente a la luz de la descripción detallada y los ejemplos.

El antígeno puede ser una proteína completa, una porción de una proteína completa, un péptido o similar, y puede derivatizarse (como se discutió anteriormente) para unirse a un enlazador y/o fracción galactosilante, puede ser una variante y/o puede contener sustituciones conservadoras, particularmente manteniendo la identidad de secuencia, y/o puede desialilarse.

En las realizaciones del segundo aspecto de la invención en las que el antígeno es una proteína terapéutica, péptido, anticuerpo o molécula similar a un anticuerpo, los antígenos específicos pueden seleccionarse de: Abatacept, Abciximab, Adalimumab, Adenosina desaminasa, Ado-trastuzumab emtansina, Agalsidasa alfa, Agalsidasa beta, Aldeslukina, Alglucerasa, Alglucosidasa alfa, inhibidor de α -1-proteinasa, Anakinra, Anistreplasa (complejo activador del plasminógeno estreptoquinasa anisóilado), Antitrombina III, Antitímocitos globulina, Ateplasa, Bevacizumab, Bivalirudina, toxina botulínica tipo A, toxina botulínica tipo B, inhibidor de C1-esterasa, Canakinumab, Carboxipeptidasa G2 (Glucarpidasa y Voraxaza), Certolizumab pegol, Cetuximab, Colagenasa, Fab inmune a Crotalidae, Darbepoyetina α , Denosumab, Fab inmune a digoxina, Dornasa alfa, Eculizumab, Etanercept, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XIII, Fibrinógeno, Filgrastim, Galsulfasa, Golimumab, Acetato de histrelin, Hialuronidasa, Idursulfasa, Imiglucerasa, Infliximab, insulina [incluida la insulina humana recombinante ("insulina rHu") y la insulina bovina], interferón α 2a, interferón α 2b, interferón β 1a, interferón β 1b, interferón γ 1b, ipilimumab, L-arginasa, L-asparaginasa, L-metionasa, lactasa, laronidasa, lepirudina/hirudina, mecasermina, rinfabato de mecasermina, metoxi natalizumab, octreótido, ofatumumab, oprelvekina, amilasa pancreática, lipasa pancreática, papaína, peg-asparaginasa, peg-doxorrubicina HCl, Peg-epoetina β , Peg-filgrastim, Peg-Interferón α 2a, Peg-Interferón α 2b, Pegloticasa, Pegvisomant, Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), Proteína C, Rasburicasa (uricasa), Sacrosidasa, Calcitonina de salmón, Sargramostim, Estreptoquinasa, Tenecteplasa, Teriparatida, Tocilizumab (atlizumab), Trastuzumab, Interferón alfa tipo 1, Ustekinumab, factor vW. La proteína terapéutica se puede obtener de fuentes naturales (por ejemplo, concentrada y purificada) o sintetizada, por ejemplo, de forma recombinante, e incluye agentes terapéuticos de anticuerpos que son típicamente IgG monoclonales o fragmentos o fusiones.

Las moléculas terapéuticas de proteínas, péptidos, anticuerpos o similares a anticuerpos particulares incluyen Abciximab, Adalimumab, Agalsidasa alfa, Agalsidasa beta, Aldeslukina, Alglucosidasa alfa, Factor VIII, Factor IX, Infliximab, Insulina (incluida la insulina rHu), L-asparaginasa, Laronidasa, Natalizumab, Octreotida, Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) o Rasburicasa (uricasa) y en general anticuerpos monoclonales IgG en sus diferentes formatos.

Otro grupo particular incluye los agentes hemostáticos (Factor VIII y IX), Insulina (incluida la Insulina rHu) y los compuestos terapéuticos no humanos uricasa, PAL y asparaginasa.

La respuesta inmune no deseada en hematología y trasplante incluye anemia aplásica autoinmune, rechazo de trasplante (generalmente) y enfermedad de injerto contra huésped (rechazo de trasplante de médula ósea). En las realizaciones en las que el antígeno es un antígeno de trasplante de aloinjerto humano, se pueden seleccionar secuencias específicas de: subunidades de las diversas proteínas de haplotipo del MHC de clase I y del MHC de clase II (por ejemplo, diferencias de donante/receptor identificadas en la compatibilidad cruzada de tejidos), y polimorfismos de un solo aminoácido en antígenos de grupos sanguíneos menores, incluidos RhCE, Kell, Kidd, Duffy y Ss. Dichas composiciones se pueden preparar individualmente para un par de donante/receptor dado.

En las realizaciones del segundo aspecto de la invención, en las que el antígeno es un antígeno propio, los antígenos específicos (y la enfermedad autoinmune con la que están asociados) se pueden seleccionar de:

- En la diabetes mellitus tipo 1, se han identificado varios antígenos principales: insulina, proinsulina, preproinsulina, ácido glutámico descarboxilasa-65 (GAD-65 o glutamato descarboxilasa 2), GAD-67, glucosa 6 fosfatasa 2 (IGRP o proteína relacionada con la subunidad catalítica glucosa-6- fosfatasa específica de islotes) proteína 2 asociada a insulinoma (IA-2) y proteína 2β asociada a insulinoma (IA-2β); otros antígenos incluyen ICA69, ICA12 (SOX-13), carboxipeptidasa H, Imogen 38, GLIMA 38, Cromogranina-A, HSP-60, carboxipeptidasa E, periferina, transportador 2 de glucosa, proteína asociada a hepatocarcinoma-intestino-páncreas/pancreática, S100β, proteína ácida fibrilar glial, gen II de regeneración, homeobox 1 duodenal pancreático, distrofia miotónica quinasa, proteína relacionada con la subunidad catalítica de glucosa-6-fosfatasa específica de islote y receptores 1-5 acoplados a la proteína G de SST. Cabe señalar que la insulina es un ejemplo de un antígeno que se puede caracterizar tanto como un antígeno propio como un antígeno proteico terapéutico. Por ejemplo, la insulina rHu y la insulina bovina son antígenos proteicos terapéuticos (que son objeto de un ataque inmunológico no deseado), mientras que la insulina humana endógena es un antígeno propio (que es objeto de un ataque inmunitario no deseado). Debido a que la insulina humana endógena no está disponible para ser empleada en una composición farmacéutica, se emplea una forma recombinante en las composiciones de la divulgación.

- La insulina humana, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P01308):

```
MALWMRLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALY LVCGERGFFY
TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPL ALEGLSLQKRG IVEQCCTSIC
SLYQLENYCN (SEQ ID NO:5).
```

- GAD-65, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT Q05329):

```
MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGI GNKLCALLYG
DAEKPAESGG SQPPRAARK AACACDQKPC SCSKVDVNYA FLHATDLLPA
CDGERPTLAF LQDVMNILLQ YVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA
DQPQNLEEIL MHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTA
NTNMFYIEIA PVFVLLLEYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFS PGGAISNMYA
MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEH SHFSLKKGAA ALGIGTDSVI
LIKCDERGMK IPSDLERRIL EAKQKGFVPF LVSATAGTTV YGAFDPLLAV
ADICKKYKIW MHVDAAWGGG LLMSRKHKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV
PLQCSALLVR EEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSYDTG DKALQCGRHV
DVFKLWLMWR AKGTTGFEAH VDKCLEAEY LYNIKNREG YEMVFDGKPK
HTNVCFWYIP PSLRTLEDNE ERMSRLSKVA PVIKARMMMEY GTTMVSYQPL
GDKVNFRRMV ISNPAATHQD IDFLIEEIER LGQDL (SEQ ID NO:6).
```

- IGRP, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT QN9QR9):

MDFLHRNGVLIQHLQKDYRAYYTFLNFMNSVGDPRNIFFIYFPLCFQFNQTVGTMKI
 WWAVIGDWLNLIFKWILFGHRPYWWWQETQIYPNHSSPCLEQFPPTCETGPGSPSG
 HAMGASCWVYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHRLTWSFLWSVFWLIQISVCISRVFI
 ATHFPHQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGIQTASLGTYLKTNLFLFLFAVGFYLLRLVNI
 DLLWSVPIAKKWCANPDWIHIDTTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLSCRGGNN
 YTLSFRLLCALTSLTLQLYHFLQIPTHEEHLFYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLM
 KQSGKKSQ (SEQ ID NO:7).

- En las enfermedades autoinmunes de la tiroides, incluidas la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Graves, los principales antígenos incluyen tiroglobulina (TG), peroxidasa tiroidea (TPO) y receptor de tirotrópina (TSHR); otros antígenos incluyen el simportador de yodo de sodio (NIS) y la megalina. En la oftalmopatía y dermatopatía asociadas a la tiroides, además de los antígeno propios tiroideos, incluido el TSHR, un antígeno es el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina. En el hipoparatiroidismo, un antígeno principal es el receptor sensible al calcio.
- En la enfermedad de Addison, los antígenos principales incluyen 21-hidroxilasa, 17D-hidroxilasa y enzima de escisión de la cadena lateral P450 (P450_{scc}); otros antígenos incluyen el receptor de ACTH, P450_{c21} y P450_{c17}.
- En la insuficiencia ovárica prematura, los principales antígenos incluyen el receptor de FSH y la α -enolasa.
- En la hipofisitis autoinmune, o enfermedad autoinmune hipofisaria, los antígenos principales incluyen el factor proteico específico de la glándula pituitaria (PGSF) 1a y 2; otro antígeno es la yodotironina desyodasa tipo 2.
- En la esclerosis múltiple, los antígenos principales incluyen proteína básica de mielina ("MBP"), glicoproteína de oligodendrocitos de mielina ("MOG") y proteína proteolipídica de mielina ("PLP").

◦ MBP, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P02686):

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNN
 GTSSQDQDAVTDKRTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDR
 PSEDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRH
 RDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVV
 HFFKNIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFK
 GVDAQGTLSKIFKLGGDRDSRSGSPMARR (SEQ ID NO:8).

◦ MOG, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT Q16653):

MASLSRPSLPSCLCFLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPICALVGDEVELPCRISPG
 KNATGMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDGDQAPQYRGRTELLKDAIGEGKVTLR
 IRNVRFSDEGGFTCFRRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWWSPGLVLLAVLPVLLQIT
 VGLIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNW
 LHRRLAGQFLEELRNPF (SEQ ID NO:9).

◦ PLP, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P60201):

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQD
 YEYLINVIHAFQYVIYGTASFFFLYGALLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKLSAT
 VTGGQKGRGSRGQHQAHSRLRVCHCLGKWLGHDPKFGVITYALTVMWLLVFACSA
 VPVYIYFNTWTTCSIAFPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCNLLSIC
 KTAEFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTFK (SEQ ID
 NO:10).

◦ Los péptidos/epítomos útiles en las composiciones de la divulgación para tratar la esclerosis múltiple incluyen algunas o todas las siguientes secuencias, individualmente en una composición de Fórmula 1, juntas en un cóctel de composiciones de Fórmula 1, o fusionadas en una o más composiciones de Fórmula 2:

- MBP13-32: KYLATASMDHARHGFLPRH (SEQ ID NO: 11);
- MBP83-99: ENPWHFFKNIVTPRTP (SEQ ID NO: 12);

- MBP111-129: LSRFSWGAEGQRPGFGYGG (SEQ ID NO: 13);
- MBP146-170: AQGTLSKIFKLGGDRSRSGSPMARR (SEQ ID NO: 14);
- MOG1-20: GQFRVIGPRHPIRALVGDEV (SEQ ID NO: 15);
- MOG35-55: MEVGWYRPPFSRWHLRYRNGK (SEQ ID NO: 16); y
- PLP139-154: HCLGKWLGHDPKDFVGI (SEQ ID NO: 17).

En la artritis reumatoide, los principales antígenos incluyen colágeno II, proteína de unión a inmunoglobulina, la región cristizable en fragmentos de inmunoglobulina G, ADN de doble cadena y las formas naturales y citulinadas de proteínas implicadas en la patología de la artritis reumatoide, que incluyen fibrina/fibrinógeno, vimentina, colágeno I y II, y alfa-enolasa.

- En la gastritis autoinmune, un antígeno principal es H⁺,K⁺-ATPasa.
- En la anemia perniciosa, un antígeno principal es el factor intrínseco.
- En la enfermedad celíaca, los principales antígenos son la transglutaminasa tisular y las formas naturales y desamidadas del gluten o proteínas similares al gluten, tales como la alfa, gamma y omega-gliadina, glutenina, hordeína, secalina y avenina. Los expertos en la técnica apreciarán, por ejemplo, que mientras que el antígeno principal de la enfermedad celíaca es la alfa gliadina, la alfa gliadina se vuelve más inmunogénica en el cuerpo mediante la desamidación por la glutaminasa tisular que convierte las glutaminas de la alfa gliadina en ácido glutámico. Por lo tanto, mientras que la alfa gliadina es originalmente un antígeno alimentario extraño, una vez que se ha modificado en el cuerpo para volverse más inmunogénico, se puede caracterizar como un antígeno propio.
- En el vitiligo, un antígeno principal es la tirosinasa y las proteínas 1 y 2 relacionadas con la tirosinasa.

◦ MART1, antígeno de melanoma reconocido por las células T1, Melan-A, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT Q16655):

```
MPREDAHFYGYPKKGHGHSYTTAEAAAGIGILTIVLGVLLIGCWYCRNRNGYRAL
MDKSLHVGTCALTRRCPEQEGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSEAEQS
PPPYSP (SEQ ID NO:18).
```

◦ La tirosinasa, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P14679):

```
MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGS
CQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFW
GPNCETERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPGTYGQMKNGSTPM
FNDINIYDLFVWMHYVSM DALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQ
KLTGDENFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNP NLLSPASFFSSWQIVCSRL
EEYN SHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPLRPSSADVEFCLSLTQYESGSMKD
AANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLHHA
FVDSIFEQWLRRHRPLQEVYPEANAPIGHNRESYMPFIPLYRNGDFFISSKDLGYD
YSYLQDSDPDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRK
QLPEEKQPLLMEKEDYHSLYQSHL (SEQ ID NO:19).
```

◦ La proteína de melanocitos PMEL, gp100, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P40967):

```
MDLVLRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRLRTKAWNRLYPEWTEA
QRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPQSQKVLDPGQVIWVNNTIING
SQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYVQVLGG
PVSGLSIGTGRAMLGHTMEVTYHRRGSRSYPLAHSSSAFTITDQVPFVSVSQSL
RALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPGSLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHT
TYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVP GTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVG
TTPGQAPTAEPSTTSVQVPTTEVISTAPVQMPPTAESTGMTPEKVPVSEVMGTTLA
```

EMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWWETTARELPIPEPEGPDASSIMST
 ESITGSLGPLLDGTATLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGE
 GDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQRQCQVLPSPACQLVLHQILKGGG
 GTYCLNVLADTNLAVVSTQLIMPQGQEAGLGQVPLIVGILLVLMVVLASLIYRRRL
 MKQDFSVPQLPHSSSHWLRRLPRIFCSCPIGENSPLLGGQV (SEQ ID NO:20).

- En la miastenia grave, un antígeno principal es el receptor de acetilcolina.
 - En el pénfigo vulgar y variantes, los principales antígenos son desmogleína 3, 1 y 4; otros antígenos incluyen pemfagina, desmocollinas, plakoglobina, perlaquina, desmoplaquina y receptor de acetilcolina.
 - En el penfigoide ampolloso, los principales antígenos incluyen BP180 y BP230; otros antígenos incluyen plectina y laminina 5.
 - En la dermatitis herpetiforme de Duhring, los principales antígenos incluyen endomisio y transglutaminasa tisular.
 - En la epidermólisis ampollosa adquirida, un antígeno principal es el colágeno VII.
 - En la esclerosis sistémica, los antígenos principales incluyen la metaloproteína de matriz 1 y 3, la proteína 47 de choque térmico de chaperona molecular específica del colágeno, la fibrilina-1 y el receptor de PDGF; otros antígenos incluyen Scl-70, U1 RNP, Th/To, Ku, Jo1, NAG-2, proteínas centrómeras, topoisomerasa I, proteínas nucleolares, ARN polimerasa I, II y III, PM-Slc, fibrilarina y B23.
 - En la enfermedad mixta del tejido conectivo, un antígeno principal es U1snRNP.
 - En el síndrome de Sjogren, los principales antígenos son los antígenos nucleares SS-A y SS-B; otros antígenos incluyen fodrina, poli(ADP-ribosa)polimerasa y topoisomerasa, receptores muscarínicos y el receptor IIIb de Fc-gamma.
 - En el lupus eritematoso sistémico, los principales antígenos incluyen proteínas nucleares que incluyen el "antígeno de Smith", SS-A, la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1), nucleosomas, proteínas histona y ADN de doble cadena (contra el cual se producen autoanticuerpos elaborados en el proceso de la enfermedad).
 - En el síndrome de Goodpasture, los antígenos principales incluyen proteínas de la membrana basal glomerular, incluido el colágeno IV.
 - En la cardiopatía reumática, un antígeno principal es la miosina cardíaca.
 - En el síndrome poliendocrino autoinmune tipo 1, los antígenos incluyen L-aminoácido descarboxilasa aromática, histidina descarboxilasa, cisteína ácido sulfínico descarboxilasa, triptófano hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, fenilalanina hidroxilasa, citocromos hepáticos P450A2 y 2A6, SOX-9 y SOX-10, proteína receptora sensible al calcio, y los interferones tipo 1, interferón alfa, beta y omega.
 - En la neuromielitis óptica, un antígeno principal es AQP4.
- La acuaporina-4, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P55087):

MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGST
 INWGGTEKPLPVDMLISLCFGLSIATMVQCFCGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKS
 VFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNLTAGHGILLVELIITFQLVFTIF
 ASCDSKRTDVTGSIAI AIGESVAIGHI FAINYTGASMNPARSEFGPAVIMGNWFNHWI

YWWGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTGKSYMEVEDNRSQVE
 TDDLILKPGVVHVIDVDVRGEEKKGKDQSGEVLSSV (SEQ ID NO:21).

- En la uveítis, los antígenos principales incluyen el antígeno S de la retina o "arrestina S" y la proteína de unión a retinoide interfotorreceptora (IRBP) o la proteína 3 de unión a retinol.
- S-arrestina, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P10523):

MAASGKTSKS EPNHVIFKKI SRDKSVTIYL GNRDYIDHVS QVQPV DGVVL
 VDPDLVKGKK VYVTLTCAFR YGQEDIDVIG LTFRRDLYFS RVQVYPPVGA
 ASTPTKLQES LLKKLGSNTY PFLTTFPDYL PCSVMLQPAP QDSGKSCGVD
 FEVKAFATDS TDAEEDKIPK KSSVRLIRK VQHAPLEMGP QPRAEAAWQF
 FMSDKPLHLA VSLNKEIYFH GEPIPVTVTV TNNTEKTVKK IKAFVEQVAN
 VVLYSSDYV KPVAMEEAE KVPNSTLTK TLTLPLLAN NRERRGIALD
 GKIKHEDTNL ASSTIIEGI DRTVLGILVS YQIKVKLTVS GFLGELTSSE
 VATEVPFRLM HPQPEDPAKE SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAEEGKRDK
 NDVDE (SEQ ID NO:22).

◦ IRBP, incluida una forma obtenida exógenamente útil en las composiciones de la divulgación, tiene la siguiente secuencia (UNIPROT P10745):

5

MMREWLLMSVLLCGLAGPHTLFQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAQQAI
 KSHEILSISDPQTLASVLTAGVQSSNDPRLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLEEELLA
 WLQRGLRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAHVWGNLMGTSALVLDL
 RHCTGGQVSGIPYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDV
 VVLTSSQTRGVAEDIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLRKL RIGESDFFFTVPVSR
 LGPLGGGSQTWEGSGVLPVGTAEQALEKALAILT RLSALPGVVHCLQEVLDYY
 TLVDRVPTLLQHLASMDFTVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRLLVRAIGPTETPSW
 PAPDAAEDSPGVAPELPEDEAIRQALVDSVFQSVLPGNVGYLRFD SFADASVLG
 VLAPYVLRQVWEPLQDTEHLIMDLRHNPGGPSSAVPLLLSYFQGPEAGPVHLFTTY
 DRRTNITQEHSFHELMELGPRYSTQRGVYLLTSHRTATAAEFAFLMQSLGWATLVG
 EITAGNLLHTRTVPLDTPESGLALTVPVLT FIDNHGEAWLGGGVDPDAIVLAEALD
 KAQEVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGAYRTAVDLE
 SLASQLTADLQEVSGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEV
 LPGQLGYLRFDAMAELETVAVG PQLVRLVWQQLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIP
 LCSYFFAEPRQHLYSVFDRATSKVTEVWTL PQVAGQRYGSHKDLYILMSHTSGSA
 AEFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSSPLYASMPTQMAMSATTGKA
 WDLAGVEPDITVPMSEALSIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAKMAT
 KLSGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLSGDPHLKAAHIPENAKDRIPGIVPMQIPS
 PEVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFD MFGDGELLTQVSRLLVEHIWKKIMHTDAMIID
 MRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKK
 SMVILTSSVTAGTAEFTYIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTA
 RSVGASDGSSWEGVGVTPHVVPAAEEALARAKEMLQHNQLRVKRSPGLQDHL
 (SEQ ID NO:23).

En las realizaciones del segundo aspecto de la invención en las que el antígeno es un antígeno extraño contra el cual se puede desarrollar una respuesta inmune, tal como antígenos alimentarios, los antígenos específicos pueden ser:

10

- de cacahuete: conaraquina (Ara h 1), alérgeno II (Ara h 2), aglutinina de arachis, conglutina (Ara h 6);
- conaraquina, por ejemplo, tiene la secuencia identificada como UNIPROT Q6PSU6
- de manzana: homólogo de proteína de resistencia a alérgenos principales/enfermedades (Mal d 2) de 31 kDa, precursor de proteína de transferencia de lípidos (Mal d 3), alérgeno principal Mal d 1.03D (Mal d 1);
- de leche: α -lactoalbúmina (ALA), lactotransferrina; de kiwi: actinidina (Act c 1, Act d 1), fitocistatina, proteína similar a la taumatina (Act d 2), kiwelina (Act d 5);
- de claras de huevo: ovomucoide, ovoalbúmina, ovotransferrina y lisozima;
- de yemas de huevo: livetina, apovitilina y vosvetina;
- de mostaza: albúmina 2S (Sin a 1), globulina 11S (Sin a 2), proteína de transferencia de lípidos (Sin a 3), profilina (Sin a 4);
- de apio: profilina (Api g 4), glicoproteína de alto peso molecular (Api g 5);

15

20

- de camarones: alérgeno Pen a 1 (Pen a 1), alérgeno Pen m 2 (Pen m 2), isoforma rápida de tropomiosina;
- de trigo y/u otros cereales: glutenina de alto peso molecular, glutenina de bajo peso molecular, alfa, gamma y omega-gliadina, hordeína, secalina y/o avenina;
- Los péptidos/epítomos útiles en las composiciones de la divulgación para el tratamiento de la enfermedad celiaca incluyen algunas o todas las siguientes secuencias, individualmente en una composición de Fórmula 1, juntos en un cóctel de composiciones de Fórmula 1, o fusionadas en una o más composiciones de Fórmula 2:

• Alfa-gliadina nativa de "33 mer" relevante para DQ-2:
LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 24)

• Alfa-gliadina desamidada de "33 mer" relevante para DQ-2:
LQLQPFPPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF (SEQ ID NO: 25)

• alfa-gliadina relevante para DQ-8:
QQYPSGQGSFQPSQQNPQ (SEQ ID NO: 26)

• Omega-gliadina, relevante para DQ-8 (trigo, U5UA46):
QPFPQPEQPFPW (SEQ ID NO: 27)

- de fresa: alergia principal a la fresa Fra a 1-E (Fra a 1); y
- de banano: profilina (Mus xp 1).

En las realizaciones del segundo aspecto de la invención, en las que el antígeno es un antígeno extraño contra el que se desarrolla una respuesta inmune, tal como los antígenos de animales, vegetales y ambientales, los antígenos específicos pueden ser, por ejemplo: de gato, ratón, perro, caballo, abeja, polvo, árbol y vara de oro, incluidas las siguientes proteínas o péptidos derivados de:

- malezas (incluidos los alérgenos de Amb a 1, 2, 3, 5 y 6, y Amb t 5; forraje de cerdos Che a 2 y 5; y otros alérgenos de malezas Par j 1, 2 y 3, y Par o 1);
- pasto (incluidos los principales alérgenos Cyn d 1, 7 y 12; Dac g 1, 2 y 5; Hol l 1.01203; Lol p 1, 2, 3, 5 y 11; Mer a 1; Pha a 1; Poa p 1 y 5);
- polen de ambrosía y otras malezas (incluido el muelle rizado, cuartos de cordero, forraje de cerdos, llantén, acedera de oveja y artemisa), pasto (incluidos pastos Bermuda, Johnson, Kentucky, Orchard, Sweet vernal y Timothy) y árboles (incluidos catalpa, olmo, nogal, aceituna, pacana, sicomoro y nuez);
- polvo (incluidos los principales alérgenos de las especies *Dermatophagoides pteronyssinus*, tales como Der p 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 18, 20, 21 y 23; de las especies *Dermatophagoides farina*, como Der f 1, 2, 3, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 22 y 24; de las especies *Blomia tropicalis* como Blo t 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 19 y 21; también alérgenos Eur m 2 de *Euroglyphus maynei*, Tyr p 13 de *Tyrophagus putrescentiae* y alérgenos Bla g 1, 2 y 4; Per a 1, 3 y 7 de cucaracha);
- mascotas (incluidos gatos, perros, roedores y animales de granja; los principales alérgenos de gatos incluyen Fel d 1 a 8, IgA de gato, BLA g 2 y albúmina de gato; los principales alérgenos de perro incluyen Can f 1 a 6 y albúmina de perro);
- picaduras de abeja, incluidos los principales alérgenos Api m 1 a 12; y
- hongos, incluidos alérgenos derivados de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, así como las especies *Alternaria alternata*, *Davidiella tassiana* y *Trichophyton rubrum*.

Como apreciarán los expertos en la técnica, un paciente puede probarse para identificar un antígeno contra el cual se ha desarrollado una respuesta inmune no deseada, y puede desarrollarse una proteína, péptido o similar basándose en ese antígeno e incorporarse como X en una composición de la presente divulgación.

Antígenos sialados, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos

Los siguientes son ejemplos de antígenos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que tienen sialilación que pueden eliminarse para dejar la glicosilación dirigida específicamente a ASGPR: hormona estimulante del folículo (FSH), gonadotropina coriónica humana (HCG), hormona luteinizante (LH), osteopontina, hormona estimulante de la tiroides (TSH), agalsidasa alfa, agalsidasa beta (FABRAZYME®; Genzyme), epoetina alfa y epoetina beta, folitropina alfa (GONAL-F®; Merck/Serono) y folitropina beta (FOLLISTIM®; Schering-Plough), proteína 6 de unión al factor de crecimiento de insulina (IGFBP-6), lutropina alfa (LUVERIS®; Merck/Serono), factor β1 de crecimiento transformante, antitrombina (ATryn®/TROMBATE-III®; Genzyme/Talecris Biotherapeutics), tirotropina alfa (THYROGEN®; Genzyme), lenograstim, sargramostim (LEUKINE®; Genzyme), interleucina3, prouroquinasa, linfotóxina, inhibidor de esterasa C1 (Berinert®; CSL), anticuerpos similares a IgG, interferón beta, factor de coagulación VIIa (NOVOSEVEN®; Novo Nordisk), factor VIII de coagulación (moroctocog alfa), factor IX de coagulación (nonacog alfa) (BENEFIX®; Wyeth) y la proteína de fusión del receptor de necrosis tumoral p55 (véase: Byrne et al., Drug Discovery Today, Vol 12, No. 7/8, páginas 319-326, abril de 2007 y Sola et al., BioDrugs2010; 24 (1): 9-21). Las proteínas farmacéuticamente relevantes que han sido previamente hiperglicosiladas y que pueden desialilarse para direccionamiento hepatocitos-ASGPR incluyen: interferón alfa y gamma, hormona luteinizante, fragmentos de anticuerpos Fv, asparaginasa, colinesterasa, darbepoetina alfa (AraNESP®; Amgen), trombopoyetina, leptina, FSH, IFN-α2, albúmina de suero y corifolitropina alfa.

Las proteínas con glicanos que normalmente no terminan en ácidos siálicos, incluidas las proteínas producidas en bacterias o levaduras (tales como arginasa, algunas insulinas y uricasa) no serían susceptibles a desialilación.

- 5 Los expertos en la técnica apreciarán que las referencias disponibles públicamente, tales como UNIPROT, divulgan la presencia y ubicación de sitios para la desialilación en la mayoría, si no en todos, de los antígenos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y ligandos de interés.

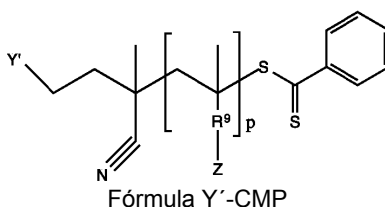
Anticuerpos y ligandos peptídicos

- 10 Se divulga que si se emplea un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando en las composiciones descritas, dichas fracciones se eligen para unirse específicamente a una proteína, péptido o anticuerpo circulante dirigido, y dar como resultado la captación hepática de la fracción dirigida circulante, posiblemente como un aducto con la fracción de direccionamiento, lo que finalmente da como resultado la eliminación y la inactivación de la fracción dirigida circulante. Por ejemplo, el factor VIII dirigido al hígado se unirá y eliminará los anticuerpos del factor VIII circulantes. Los procedimientos para la identificación de tales fracciones serán familiares para los expertos en la técnica.

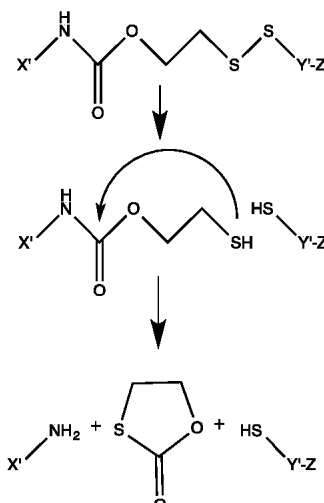
20 Enlazadores

- Los enlazadores empleados en las composiciones del primer y segundo aspecto de la presente invención ("Y" en la Fórmula 1) pueden incluir enlazadores de N-hidroxisuccinimidilo, enlazadores de maleimida, enlazadores de vinilsulfona, enlazadores de piridil-di-tiol-poli(etilenglicol). Enlazadores de piridil-di-tiol, enlazadores de carbonato de n-nitrofenilo, enlazadores de éster de NHS, enlazadores de éster de nitrofenoxi poli(etilenglicol) y similares.

- Un grupo particular de enlazadores de Fórmula Y'-CMP a continuación (en los que Y' indica la porción restante del enlazador y R⁹ y Z son como se definen). Más particularmente, en el grupo de enlazadores que incluyen la Fórmula Y'-CMP, el sustituyente R⁹ es un grupo etilacetamido, e incluso más particularmente el etilacetamido está conjugado con C1 de N-acetilgalactosamina.



- 35 Los enlazadores que contienen di-tiol, particularmente los enlazadores que contienen carbamato de disulfaniletilo (denominados que incluyen una amina libre de X, también denominada "éster disulfanil etílico" sin incluir la amina libre de X) son particularmente ventajosos en las presentes composiciones por tener la capacidad de escindir y liberar un antígeno en su forma original una vez dentro de una célula, por ejemplo, como se ilustra a continuación (en la que Y' indica la porción restante del enlazador y X' y Z son como se definen).



Particularmente con respecto a los enlazadores ilustrados a continuación en la Fórmula Ya a la Fórmula Yp:

el corchete izquierdo "(" indica la unión entre X y Y;

el corchete derecho o inferior ")" indica la unión entre Y y Z;

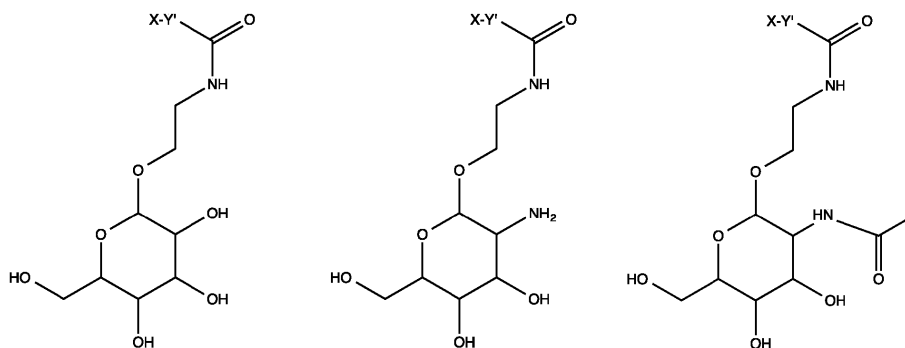
n es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 1 a 100, particularmente de aproximadamente 8 a 90 (por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95), más particularmente aproximadamente 40 a 80 (por ejemplo, 39, 40, 43, 45, 46, 48, 50, 52, 53, 55, 57, 60, 62, 65, 66, 68, 70, 73, 75, 78, 80 u 81) grupos etilenglicol, en los que la mezcla típicamente abarca el número entero especificado como $n \pm 10\%$;

p es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 2 a 150, particularmente de aproximadamente 20 a 100 (por ejemplo, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o 105) y más particularmente aproximadamente 30 a 40 (por ejemplo, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44), en la que la mezcla típicamente incluye el número entero especificado como $p \pm 10\%$;

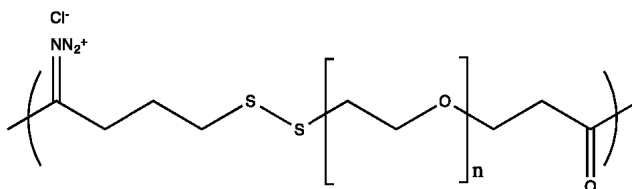
q es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 1 a 44, particularmente de aproximadamente 3 a 20 (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22) y más particularmente aproximadamente 4 a 12 (por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13), en la que la mezcla típicamente abarca el número entero especificado como $q \pm 10\%$; y

R^8 es $-\text{CH}_2-$ ("metilo") o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CN})-$ ("1-ciano-1-metil-propilo" o "CMP").

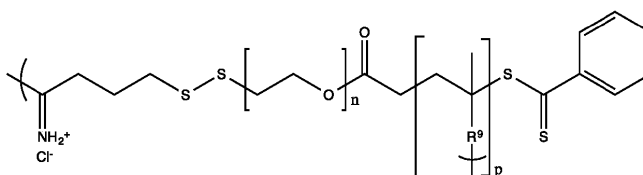
R^9 es un enlace directo o $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ (un grupo etilacetamido o "EtAcN"), como se ilustra en las siguientes estructuras de la Fórmula 1 (en las que se muestra el grupo EtAcN y el resto del enlazador se denomina Y'):



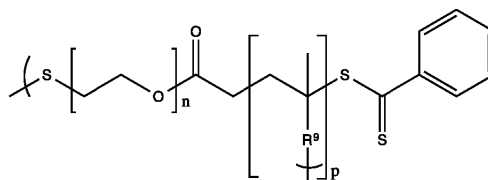
y Z es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina conjugada en C1.



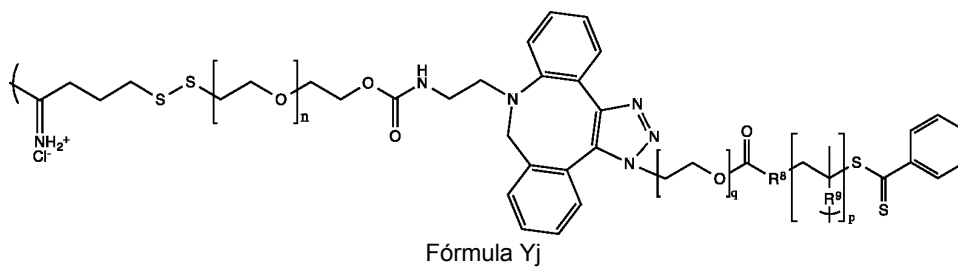
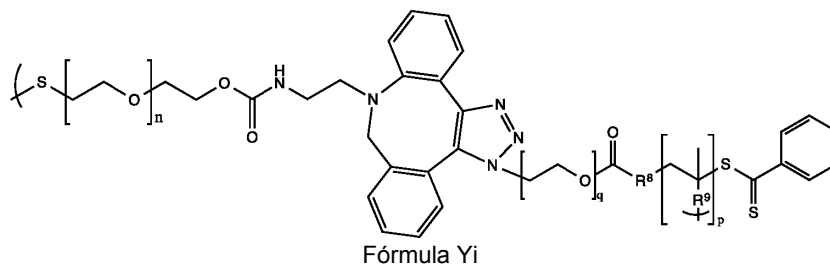
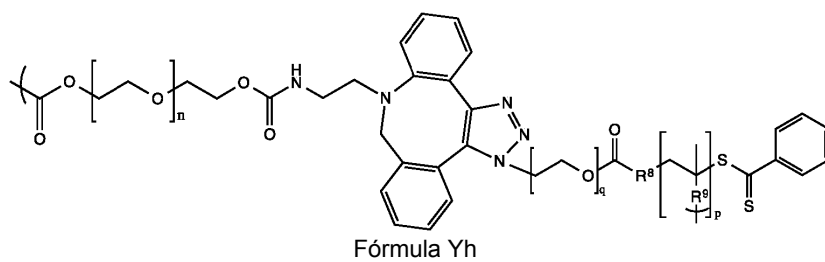
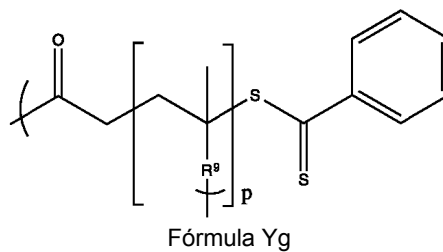
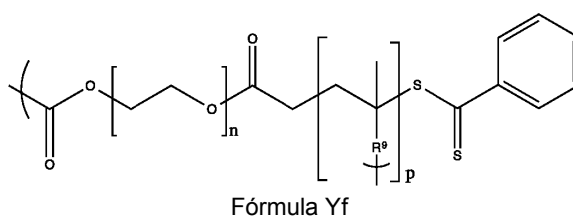
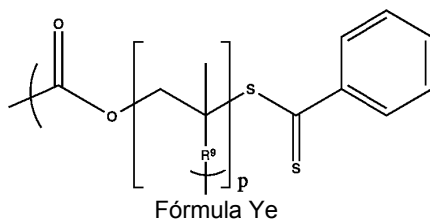
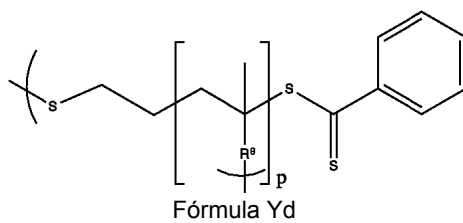
Fórmula Ya

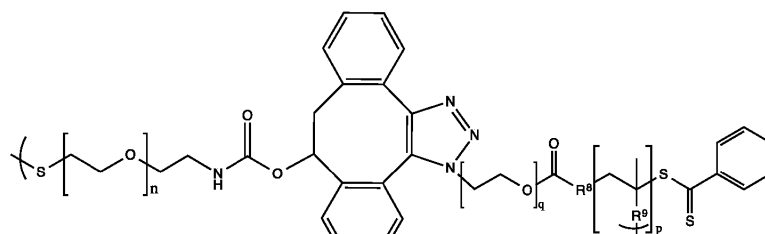


Fórmula Yb

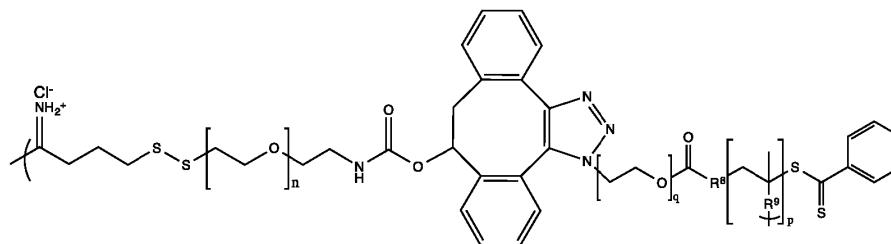


Fórmula Yc

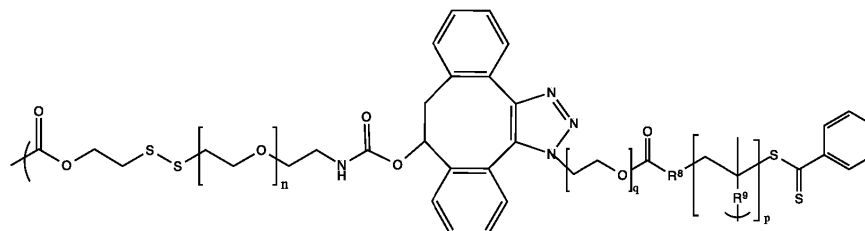




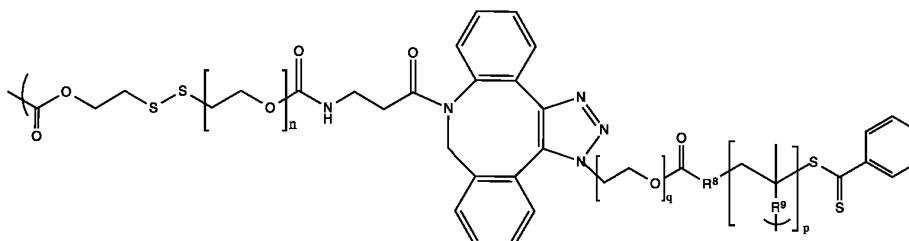
Fórmula Yk



Fórmula YL

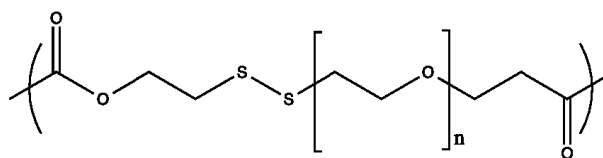


Fórmula Ym

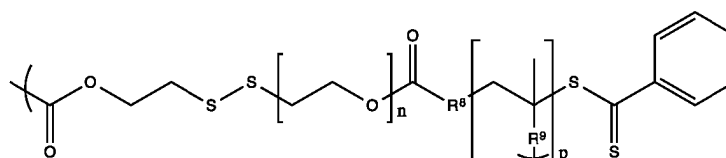


Fórmula Yn

(Los enlazadores de Fórmula Yn se pueden sintetizar a través de ciertos precursores que hacen que Yn sea particularmente adecuado para la conjugación con antígenos hidrófobos).



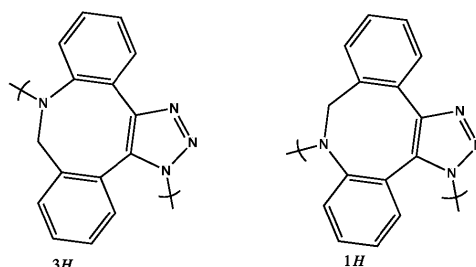
Fórmula Yo



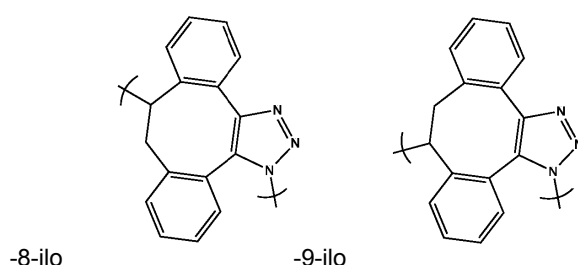
Fórmula Yp

Los enlazadores mostrados anteriormente como Fórmulas Yh a Yn se sintetizan como isómeros que se emplean sin separación. Por ejemplo, los enlazadores de Fórmulas Yh, Yi, Yj e Yn serán una mezcla de las estructuras 8,9-

dihidro-1H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-ilo y 8,9-dihidro-3H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-ilo ilustradas a continuación:



Los enlazadores de Fórmulas Yk, YL e Ym serán una mezcla de las estructuras 8,9-dihidro-1H-dibenzo[3,4:7,8]cicloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-8-ilo y 8,9-dihidro-1H-dibenzo[3,4:7,8]cicloocta[1,2-d][1,2,3]triazol-9-ilo ilustradas a continuación:



La presencia de tales mezclas isoméricas no altera la funcionalidad de las composiciones que emplean tales enlazadores.

Fracciones de galactosilación

Las fracciones de galactosilación empleadas en las composiciones del primer y segundo aspecto de la presente invención sirven para dirigir las composiciones a células hepáticas (por ejemplo, que se unen específicamente a hepatocitos) y pueden seleccionarse entre: galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina. Se ha informado que la afinidad de ASGPR se puede retener mientras se modifica cualquier lado del ancla de diol C3/C4 de la galactosa (Mamidyala, Sreeman K., et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1978-1981), por lo tanto, los puntos de conjugación están particularmente en C1, C2 y C6.

Las fracciones de galactosilación particulares incluyen galactosa conjugada en C1 o C6, galactosamina conjugada en C2 y N-acetilgalactosamina conjugada en C6. Otras fracciones de galactosilación particulares incluyen N-acetilgalactosamina conjugada en C2, más particularmente conjugada con un enlazador que porta un sustituyente R⁹ que es CH₂. Aún otras fracciones de galactosilación particulares incluyen galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina conjugada en C1, más particularmente conjugada con un enlazador que porta un sustituyente R⁹ que es un grupo etilacetamido.

Anticuerpos dirigidos a ASGPR

Se divulga que si se emplean anticuerpos específicos de ASGPR en las composiciones de la presente divulgación, también sirven para dirigir las composiciones de la divulgación a las células hepáticas y se pueden seleccionar de productos disponibles comercialmente, tales como: anticuerpo del receptor 1 anti-asialoglicoproteína (ab42488) de Abcam plc, Cambridge, Reino Unido y ASGPR1/2 (FL-291) (sc28977) de Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX. Alternativamente, dichos anticuerpos se pueden expresar usando cualquiera de una serie de secuencias publicadas, tales como el anticuerpo anti-ASGPR de dominio único Dom26h-196-61:

```
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWWRQAPGKGLEWWSRISARGVTTY
ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGLTVTVSS
(SEQ.ID.No:6)
```

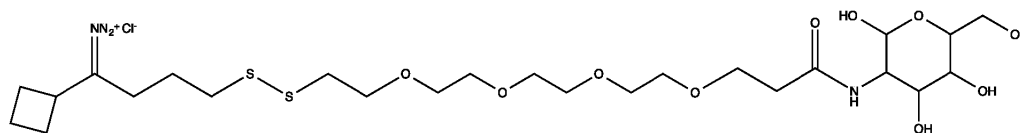
[Coulstock E, et al., (2013) "Liver-targeting of interferon-alpha with tissue-specific domain antibodies". PloS One. 8 (2): e57263 y el documento US 2013/0078216], o como una secuencia que tiene sustituciones conservadoras. La solicitud de patente de los estados Unidos mencionada anteriormente divulga moléculas dirigidas al hígado tales como DOM26h-196-61 para administrar ciertos compuestos terapéuticos [que incluyen interferón (interferón alfa 2, interferón alfa 5, interferón alfa 6 o interferón de consenso), ribavirina, Nexavar/sorafenib, Erbitus/Cetuximab,

Avastatina/bevacizumab y Herceptin/trastuzumab] para el tratamiento de enfermedades hepáticas. Las composiciones de materia correspondientes a la Fórmula 2 que emplean DOM26h-196-61 u otra molécula dirigida al hígado descritas en el documento US 2013/0078216 no incluyen interferón (interferón alfa 2, interferón alfa 5, interferón alfa 6 o interferón de consenso), ribavirina, Nexavar/Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatina/bevacizumab y Herceptin/trastuzumab dentro de su alcance.

Se pueden descubrir nuevas secuencias para un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o péptido que dirige específicamente a ASGPR usando varios métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos pueden incluir, entre otros, tecnología de vacunación, tecnología de hibridomas, tecnologías de visualización de bibliotecas (incluidas plataformas bacterianas y de fagos), tecnologías de cribado de repertorio endógeno, evolución dirigida y diseño racional.

Nomenclatura

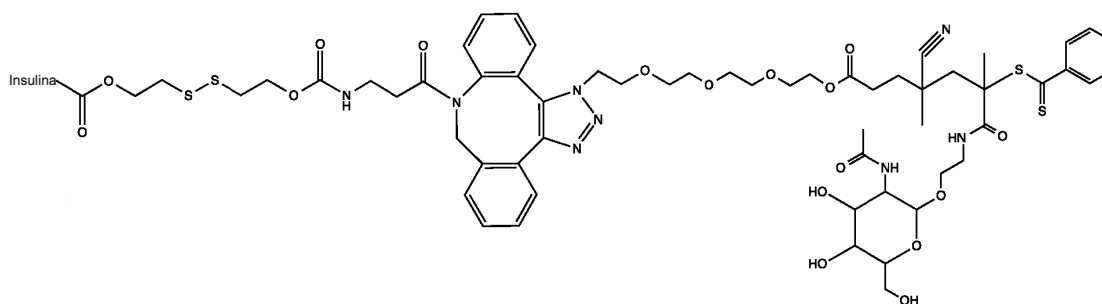
Las composiciones de Fórmula 1 se pueden nombrar usando una combinación de IUPAC y nombres triviales. Por ejemplo, un compuesto correspondiente a la Fórmula 1 en la que X es una fracción ciclobutilo (mostrada en lugar de un antígeno con fines ilustrativos), Y es la Fórmula Ya, m es 1, n es 4 y Z es N-acetilgalactosamin-2-ilo:



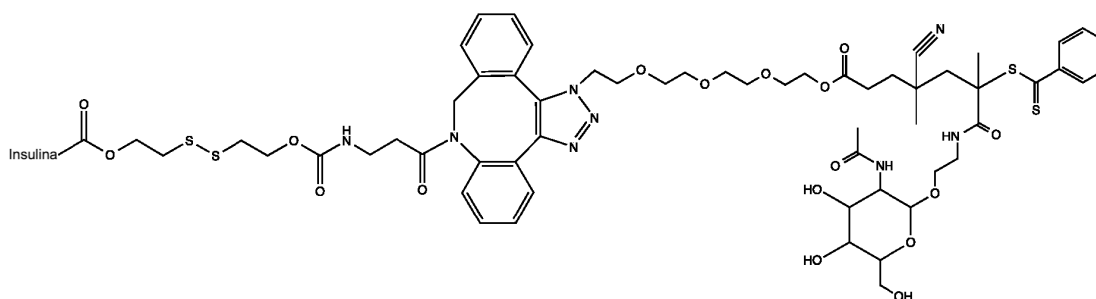
puede nombrarse cloruro de (Z)-((21-ciclobutil-1-oxo-1-((2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-ditiahenicosan-21-iliden)triaz-1-in-2-io, por lo que la composición correspondiente de la divulgación en la que X es transglutaminasa tisular puede nombrarse cloruro de (Z)-((21-(transglutaminasa tisular)-1-oxo-1-((2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-ditiahenico- san-21-iliden)triaz-1-in-2-io. La composición correspondiente de la divulgación en la que X'es transglutaminasa tisular, m es 2, n es 4 y Z' es N-acetilgalactosamin-2-ilo puede nombrarse cloruro de (3Z)-((transglutaminasa tisular)-1,3-diilbis(1-oxo-1-((2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-ditiahenico- san-21-il-21-iliden))bis(triaz-1-in-2-io).

En aras de la simplificación, las composiciones de Fórmula 1 se pueden nombrar usando un sistema de nomenclatura alternativo por referencia a X y correspondencia con una de las Fórmulas 1a a 1p (como se ilustra en los esquemas de reacción) seguido por la mención de los números enteros para variables m, n, py/oq, R⁸, R⁹ e identificación de la fracción de galactosilación y la posición en la que está conjugada. Bajo este sistema, la composición de Fórmula 1a en la que X es ovoalbúmina, m es 2, n es 4 y Z es N-acetilgalactosamin-2-ilo puede nombrarse "F1a-OVA-m₂-n₄-2NAcGAL".

De manera similar, la siguiente composición de Fórmula 1



se puede denominar "carboxilato de 2-((2-(((3-(22-((3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)-16-ciano-16,18-dimetil-13,19-dioxo-18-((fenilcarbonotioil)tio)-3,6,9,12-tetraoxa-20-azadocosil)-3,9-dihidro-8H-dibenzo[b,f] [1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-il)-3-oxopropil)carbamoil)oxi)etil)disulfanil)etilinsulina". El isómero:



puede nombrarse "carboxilato de 2-(((2-(((3-(1-(22-((3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-2-il)oxi)-16-ciano-16,18-dimetil-13,19-dioxo-18-((fenilcarbonotioil)tio)-3,6,9,12-tetraoxa-20-azadocosil)-**1,9-dihidro-8H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-il)-3-oxopropil)carbamoil)-oxi)etil)disulfanil)etil insulina"**(se agregaron resaltados en negrita para facilitar la identificación de la diferencia entre los nombres formales). Empleando el sistema de denominación utilizado para la presente divulgación, ambos isómeros pueden nombrarse "F1n-insulina-m₁-n₁-p₁-q₄-CMP-EtAcN-1NAcGAL" en la que CMP indica que R⁸ es 1-ciano-1-metil-propilo, EtAcN indica que R⁹ es etilacetamido y 1NAcGAL indica que Z" es N-acetilgalactosamina conjugada en C1. La ausencia de la abreviatura EtAcN antes de la designación de Z indicaría que R⁹ es un enlace directo.

En las composiciones de Fórmula 2, la orientación de izquierda a derecha no debe tomarse como una especificación de orden de N a C en ausencia de una indicación específica de lo contrario. Por ejemplo, el compuesto de Fórmula 2 en la que m'es 1, m'es 0, X es Ovoalbúmina, Y es Gly₃Ser y Z es Anti-ASGPR Dom26h-196-61, puede nombrarse OVA-Gly₃Ser-DOM y leerse como cubriendo ambas de las siguientes:

N- OVA- Gly₃Ser-DOM-C
y
N- DOM- Gly₃Ser-OVA- C

Las composiciones de Fórmula 2, por ejemplo, en la que m'es 1, m'es 0, X es Ovoalbúmina, Y es Gly₃Ser y Z es Anti-ASGPR Dom26h-196-61 (que tiene una etiqueta de purificación unida a través de un enlazador adicional) se pueden nombrar de la siguiente manera:

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

en la que el grupo Gly₃Ser-6xHis del terminal C representa una secuencia de aminoácidos que facilita el aislamiento y la purificación.

La composición de la Fórmula 2 en la que m'es 1, m'es 1, cada X es Factor VIII, cada Y es Gly₃Ser y Z es anti-ASGPR Dom26h-196-61 (que tiene una etiqueta de purificación unida a través de un enlazador adicional) se puede denominar FVIII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVIII-Gly₃Ser-6xHis y cubre las dos siguientes:

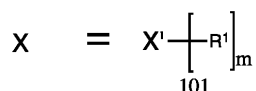
N-FVIII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVIII-Gly₃Ser-6xHis-C
y
N-6xHis-Gly₃Ser-FVIII-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-FVIII-C.

La composición de Fórmula 2 en la que m'es 3, m'es 0, uno, los tres antígenos X, respectivamente, son alfa-gliadinadesaminada de "33 mer" (SEQ ID NO: 25), Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27), cada Y es un enlazador que tiene un sitio de escisión de inmunoproteasoma ("IPC"), y Z es Anti-ASGPR Dom26h-196-61 se puede denominar:
Alfa-gliadina desamidada de "33 mer"-IPC-Alfa-gliadina-IPC-Omega-gliadina-IPC-DOM.

Preparación de las composiciones de la divulgación

Las composiciones de Fórmula 1 se pueden preparar, por ejemplo, ajustando los procedimientos descritos en Zhu, L., et al., Bioconjugate Chem. 2010, 21, 2119-2127. Las síntesis de ciertas composiciones de Fórmula 1 también se describen a continuación con referencia a los Esquemas de Reacción 1 a 14. Otros enfoques de síntesis resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

La Fórmula 101 (a continuación) es una representación alternativa de X



en la que R¹ es una fracción amino de superficie libre (-NH₂) o tiol (-SH) posicionado en la estructura tridimensional de X' para que sea accesible para la conjugación a un enlazador, y X' representa el resto de X excluyendo el o los grupos amino libres [(X" se usa en los esquemas de reacción para representar el resto de X excluyendo el o los grupos tiol libres)]. Dependiendo de la identidad de X, habrá al menos una (la amina terminal N) y pueden ser múltiples grupos R¹ (predominantemente de residuos de lisina o residuos de cisteína que no están implicados en el enlace disulfuro), como se representa por m, que es un número entero de aproximadamente 1 a 100, más típicamente 1 o de aproximadamente 4 a 20, y más típicamente de 1 a aproximadamente 10.

Las variables empleadas en los esquemas de reacción son como se definieron anteriormente, y además incluyen lo siguiente, que debe entenderse que tiene estos significados sin ninguna indicación específica de lo contrario con respecto a un esquema o etapa de reacción particular.

- R² es OH o un grupo protector;
- R³ es OH, NH₂, NHAc, un grupo protector o un grupo protector de NH;
- R⁴ es OH o un grupo protector;
- R⁵ es OH o un grupo protector;
- R⁶ es OH o un grupo protector;
- Z' es galactosa conjugada en C1 o C6, galactosamina conjugada en C2 o N-acetilgalactosamina conjugada en C6;
- R⁸ es -CH₂- o -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-; y
- R⁹ es un enlace directo y Z" es N-acetilgalactosamina conjugada en C2;
- R⁹ es un grupo etilacetamido y Z" es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina conjugada en C1.

Parámetros de la reacción de síntesis

Los términos "disolvente", "disolvente orgánico inerte" o "disolvente inerte" significan un disolvente inerte en las condiciones de la reacción que se describen junto con el mismo [que incluye, por ejemplo, benceno, tolueno, acetonitrilo, tetrahidrofurano ("THF"), dimetilformamida ("DMF"), cloroformo, cloruro de metileno (o diclorometano), éter dietílico, metanol, piridina y similares]. A menos que se especifique lo contrario, los disolventes usados en las reacciones de la presente divulgación son disolventes orgánicos inertes.

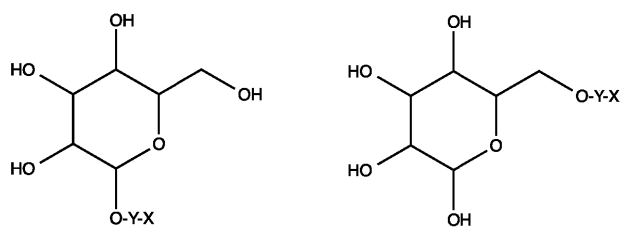
El término "qs" significa agregar una cantidad suficiente para lograr una función establecida, por ejemplo, para llevar una solución al volumen deseado (es decir, 100%).

El aislamiento y purificación de los compuestos e intermedios descritos en el presente documento puede realizarse, si se desea, mediante cualquier procedimiento de separación o purificación adecuado tal como, por ejemplo, filtración, extracción, cristalización, cromatografía en columna, cromatografía de capa delgada o cromatografía de capa gruesa, cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta resolución, recristalización, sublimación, cromatografía líquida rápida de proteínas, electroforesis en gel, diálisis o una combinación de estos procedimientos. Pueden obtenerse ilustraciones específicas de procedimientos de separación y aislamiento adecuados haciendo referencia a los ejemplos que se muestran a continuación. Sin embargo, también se pueden utilizar, por supuesto, otros procedimientos equivalentes de separación o aislamiento.

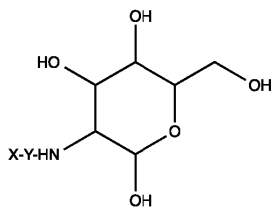
A menos que se especifique lo contrario (incluido en los ejemplos), todas las reacciones se realizan a presión atmosférica estándar (aproximadamente 1 atmósfera) y temperatura ambiente (o de laboratorio) (aproximadamente 20°C), a aproximadamente pH 7,0-8,0.

La caracterización de los productos de reacción se puede realizar por medios habituales, por ejemplo, RMN de protón y carbono, espectrometría de masas, cromatografía de exclusión por tamaño, espectroscopia infrarroja, electroforesis en gel.

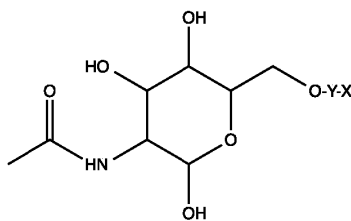
El Esquema de Reacción 1 ilustra la preparación de composiciones de Fórmula 1 en las que Z puede ser galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina. En ese sentido y como se definió anteriormente, Z' como se emplea en el Esquema de Reacción 1 abarca galactosa conjugada en C1 y C6 y que corresponde a las siguientes estructuras de acuerdo con la Fórmula 1:



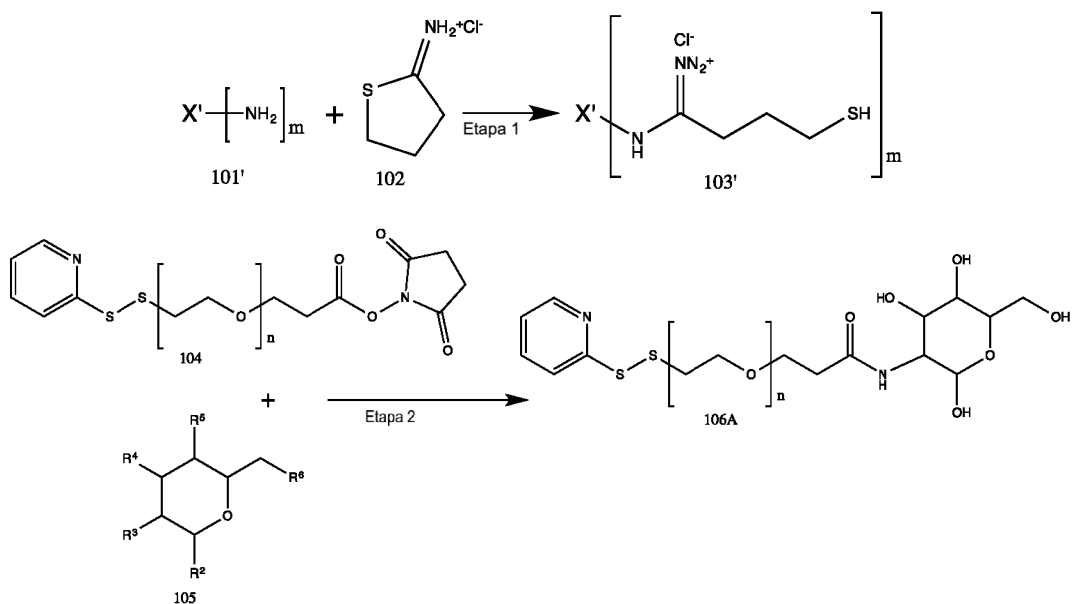
galactosamina conjugada en C2 y correspondiente a la siguiente estructura de acuerdo con Fórmula 1:

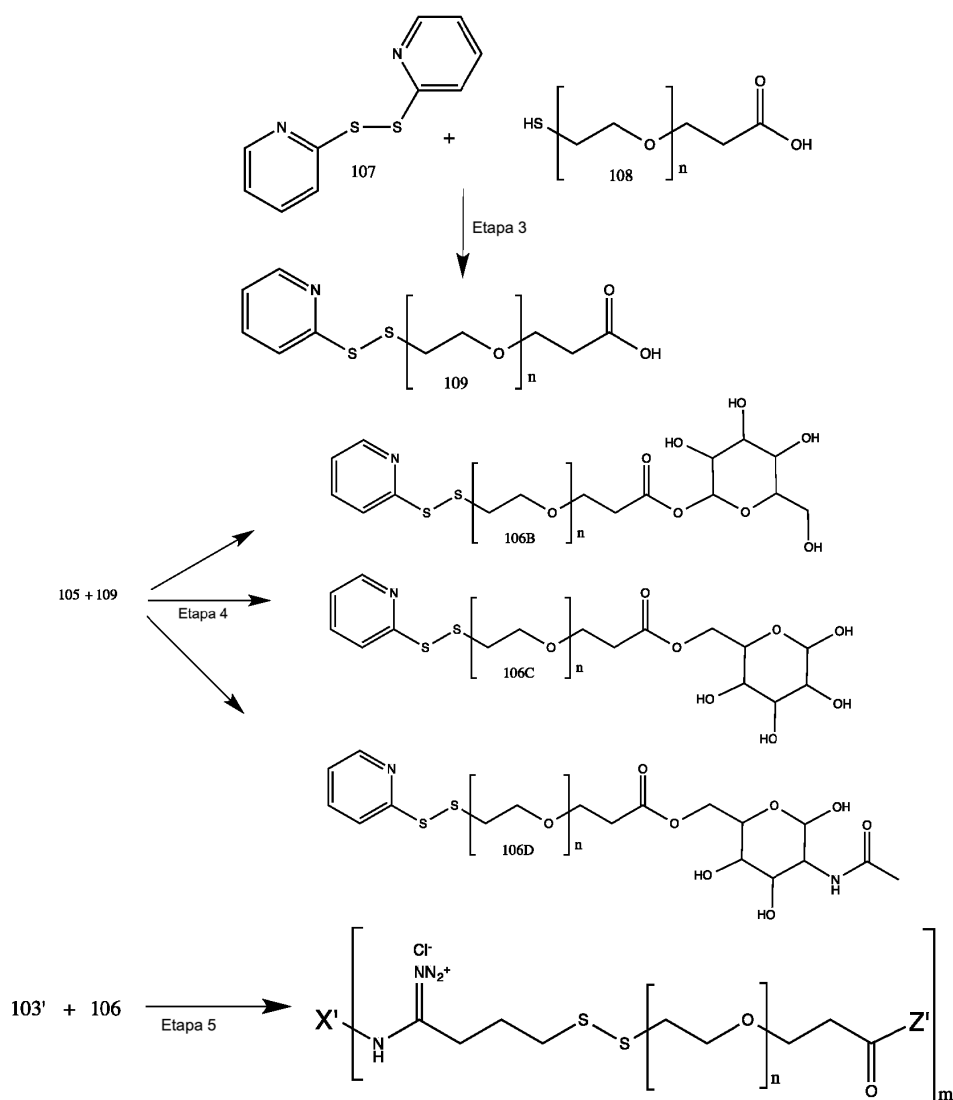


y N-acetilgalactosamina conjugada en C6 y correspondiente a la siguiente estructura de acuerdo con la Fórmula 1:

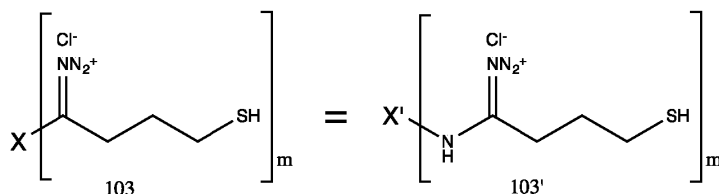


Esquema de Reacción 1





Como se ilustró anteriormente en el Esquema de Reacción 1, Etapa 1, se pueden generar un grupo o grupos tiol de superficie en un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino libre de superficie (Fórmula 101') por contacto con un reactivo de Traut (Fórmula 102) a un pH de aproximadamente 8,0 durante aproximadamente 1 hora para producir la Fórmula 103', de la cual se elimina el reactivo de Traut sin reaccionar, por ejemplo, mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño. Las dos estructuras que se muestran a continuación, ilustran el producto del Esquema de Reacción 1, Etapa 1, mostrando respectivamente el grupo o grupos amino libres de superficie encontrados originalmente en X (es decir, la Fórmula 103' en la que X' representa el resto de X excluyendo los grupos amino libre identificados de la superficie) y omitiendo el grupo o grupos amino libres de superficie (es decir, Fórmula 103). Esto es paralelo a la distinción ilustrada entre X y la Fórmula 101. Se ha seguido la convención en los esquemas de reacción posteriores.



En el Esquema de Reacción 1, Etapa 2, se pone en contacto un éster de piridil-di-tiol-poli(etilenglicol)-NHS (Fórmula 104) con galactosamina (Fórmula 105 en la que R^3 es NH_2 y R^2 , R^4 , R^5 y R^6 son OH) con agitación a aproximadamente pH 8 durante aproximadamente 1 hora para obtener el correspondiente piridil-di-tiol-poli(etilenglicol)-azúcar de Fórmula 106A, que se puede usar sin purificación adicional.

En el Esquema de Reacción 1, Etapa 3, se pone en contacto 4,4'-ditiodipiridina (Fórmula 107) con un ácido tiol-poli (etilenglicol)propanoico (Fórmula 108) para obtener el correspondiente ácido piridil-di-tiol-poli(etilenglicol)propanoico (Fórmula 109).

En el Esquema de Reacción 1, Etapa 4, el ácido de Fórmula 109 se pone en contacto con una galactosa protegida o N-acetilgalactosamina de Fórmula 105 en la que R^2 es OH y R^3 , R^4 , R^5 y R^6 son grupos protectores ("PG"), en la que R^6 es OH y R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son PG, o en la que R^6 es N-acetilo y R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son PG para obtener los correspondientes piridil-di-tiol-poli(etilenglicol)-azúcares de Fórmulas 106B, 106C y 106D, que se pueden utilizar después de la desprotección.

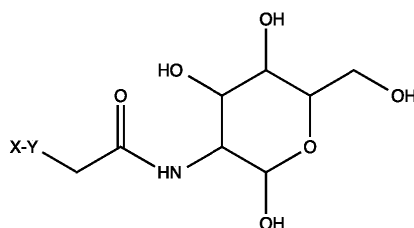
En el Esquema de Reacción 1, Etapa 5, a una solución agitada del producto de la Etapa 1 (Fórmula 103') se agrega un exceso (correspondiente al valor de m) del producto de la Etapa 2 o Etapa 4 (Fórmula 106, es decir, 106A, 106B, 106C o 106D) durante aproximadamente 1 hora, seguido por cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño para eliminar cualquier reactivo restante libre para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1a, respectivamente, Fórmula 1aA, Fórmula 1aB, Fórmula 1aC y Fórmula 1aD.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1a se pueden nombrar, respectivamente, por ejemplo, como sigue:

"F1aA-X'-m_m-n_n" o "F1a-X'-m_m-n_n-2NGAL"
 "F1aB-X'-m_m-n_n" o "F1a-X'-m_m-n_n-1GAL"
 "F1aC-X'-m_m-n_n" o "F1a-X'-m_m-n_n-6GAL"
 "F1aD-X'-m_m-n_n" o "F1a-X'-m_m-n_n-6NAcGAL"

respectivamente, para productos elaborados empleando un compuesto intermedio de acuerdo con las Fórmulas 106A-D.

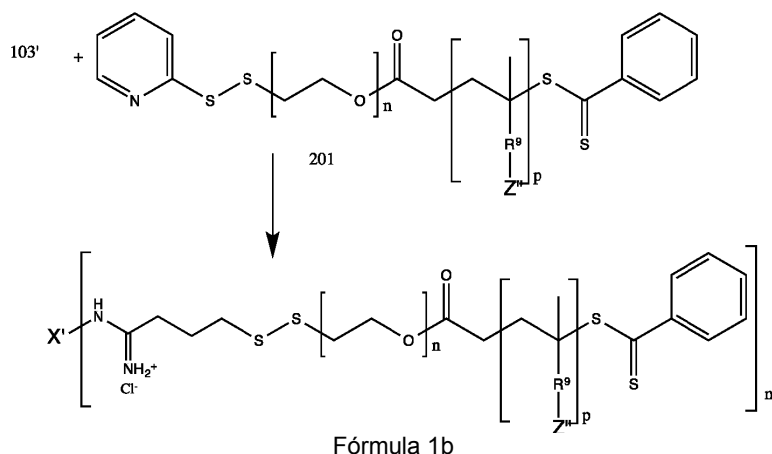
Volviendo a los esquemas de reacción 2-14 y para los propósitos de la nomenclatura empleada con ellos, excepto que se indique expresamente lo contrario, Z"se refiere a N-acetilgalactosamina conjugada en C2:



o a galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina conjugada en C1. Cabe señalar que las composiciones conjugadas en C1 necesitan protegerse durante la síntesis, por ejemplo, ciclando la amina con el hidroxilo C3 y desprotegiendo después de la incorporación de la galactosamina protegida en la porción adyacente del enlazador.

Los reactivos de poli(metacrilato de galactosa) de Fórmulas 201, 401, 501, 601, 701, 803 y 1401 se pueden preparar metacrilando galactosa, por ejemplo, poniendo en contacto galactosamina y anhídrido de metacrilato, seguido por polimerización de transferencia de cadena de adición-fragmentación reversible (RAFT) con un agente RAFT correspondiente en presencia de azobisisobutironitrilo (AIBN) en un disolvente adecuado, comenzando con ciclos de congelación-descongelación seguidos de calentamiento a aproximadamente 60-80 °C, preferiblemente 70 °C durante aproximadamente 5-8, preferiblemente aproximadamente 6 horas. El polímero se puede precipitar en un alcohol inferior, preferiblemente metanol.

Esquema de Reacción 2



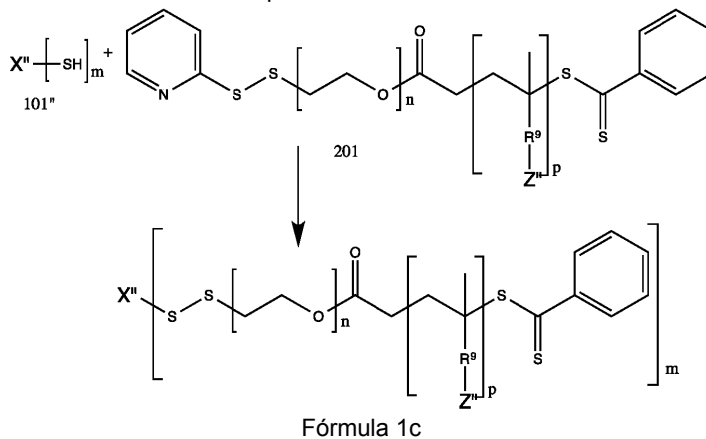
Como se ilustra en el Esquema de Reacción 2, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos tiol libres de superficie preparados, por ejemplo, como se describe con referencia al Esquema de Reacción 1, Etapa 1 (Fórmula 103') se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un piridil-di-tiol-poli(etilenglicol) de Fórmula 201 durante aproximadamente 1 hora para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1b.

Las composiciones de Fórmula 1b se pueden nombrar como sigue:

"F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NacGAL" o "F1b-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

Por ejemplo, la composición de Fórmula 1b en la que X'es uricasa, m es 1, n es 4, p es 4 y Z'es N-acetilgalactosamina conjugada en C2 puede nombrarse "F1b-uricasa-m₁-n₄-p₄-2NacGAL" o "30-(uricasa)-3,5,7,9-tetrametil-12-oxo-1-fenil-1-tioxo-3,5,7,9-tetrakis((2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-3-il)carbamoil)-13,16,19,22-tetraoxa-2, 25,26-tritriatriacontan-30-iminio".

Esquema de Reacción 3

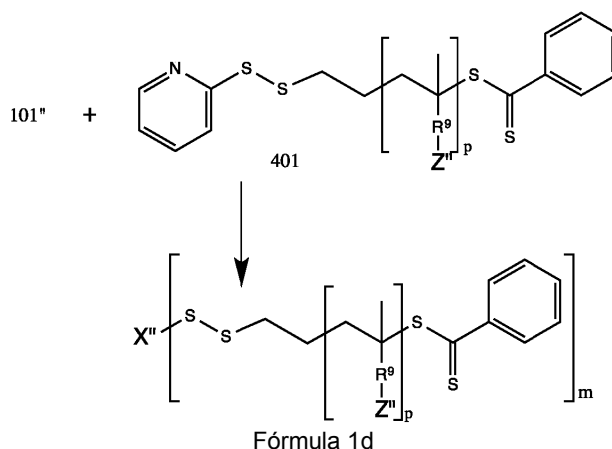


Como se ilustra en el Esquema de Reacción 3, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos tiol nativos libres de superficie (cisteínas) [Fórmula 101'' correspondiente a la Fórmula 101 y que se ilustran en la que X'', como será el término empleado posteriormente, representa X excluyendo el grupo o grupos tiol libres de superficie identificados] se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un piridil-di-tiol-poli(etilenglicol) de Fórmula 201 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1c.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1c se pueden nombrar como sigue:

"F1c-X'-m_m-n_n-p_p-2NacGAL" o "F1c-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

Esquema de Reacción 4

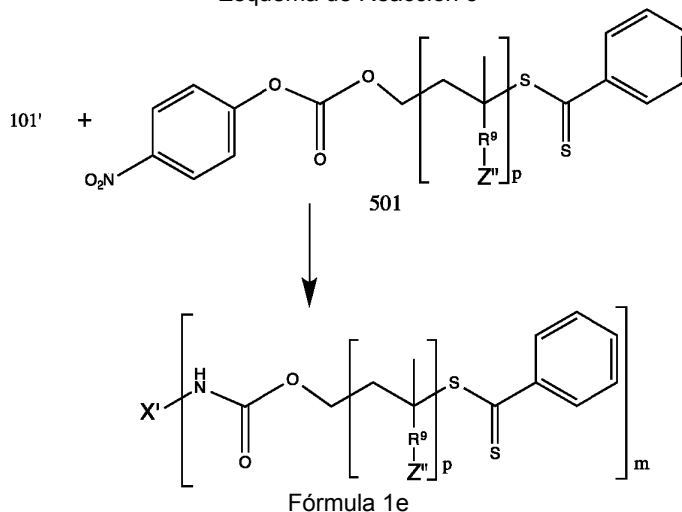


Como se ilustra en el Esquema de Reacción 4, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos tiol nativos libres de superficie de Fórmula 101'' se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un piridil-di- tiol de Fórmula 401 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1d.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1d se pueden nombrar de la siguiente manera:

"F1d-X'-m_m-p_p-2NacGAL" o "F1d-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z".

Esquema de Reacción 5

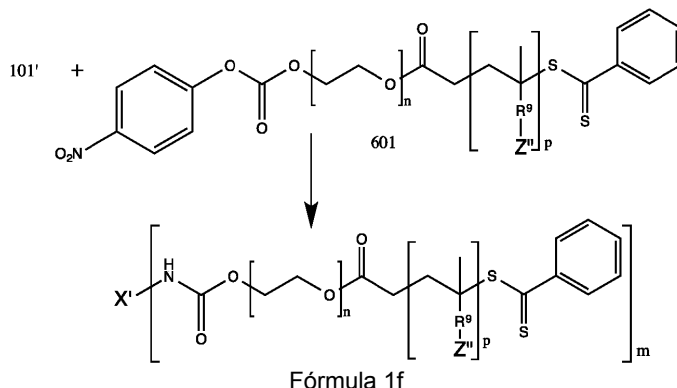


Como se ilustra en el Esquema de Reacción 5, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101' se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un carbonato de n-nitrofenilo de Fórmula 501 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1e.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1e se pueden nombrar como sigue:

"F1e-X'-m_m-p_p-2NacGAL" o "F1e-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z".

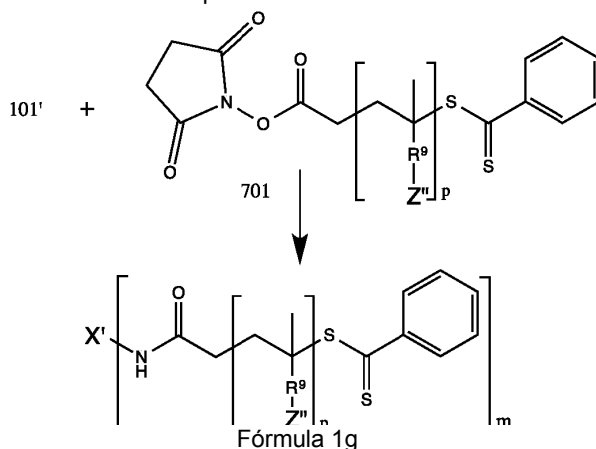
Esquema de Reacción 6



Como se ilustra en el Esquema de Reacción 6, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101'se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un éster de poli(etilenglicol) de carbonato de n-nitrofenilo de Fórmula 601 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1f.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1f se pueden nombrar como sigue:
"F1f-X'-m_m-n_n-p_p-2NACGAL" o "F1f-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

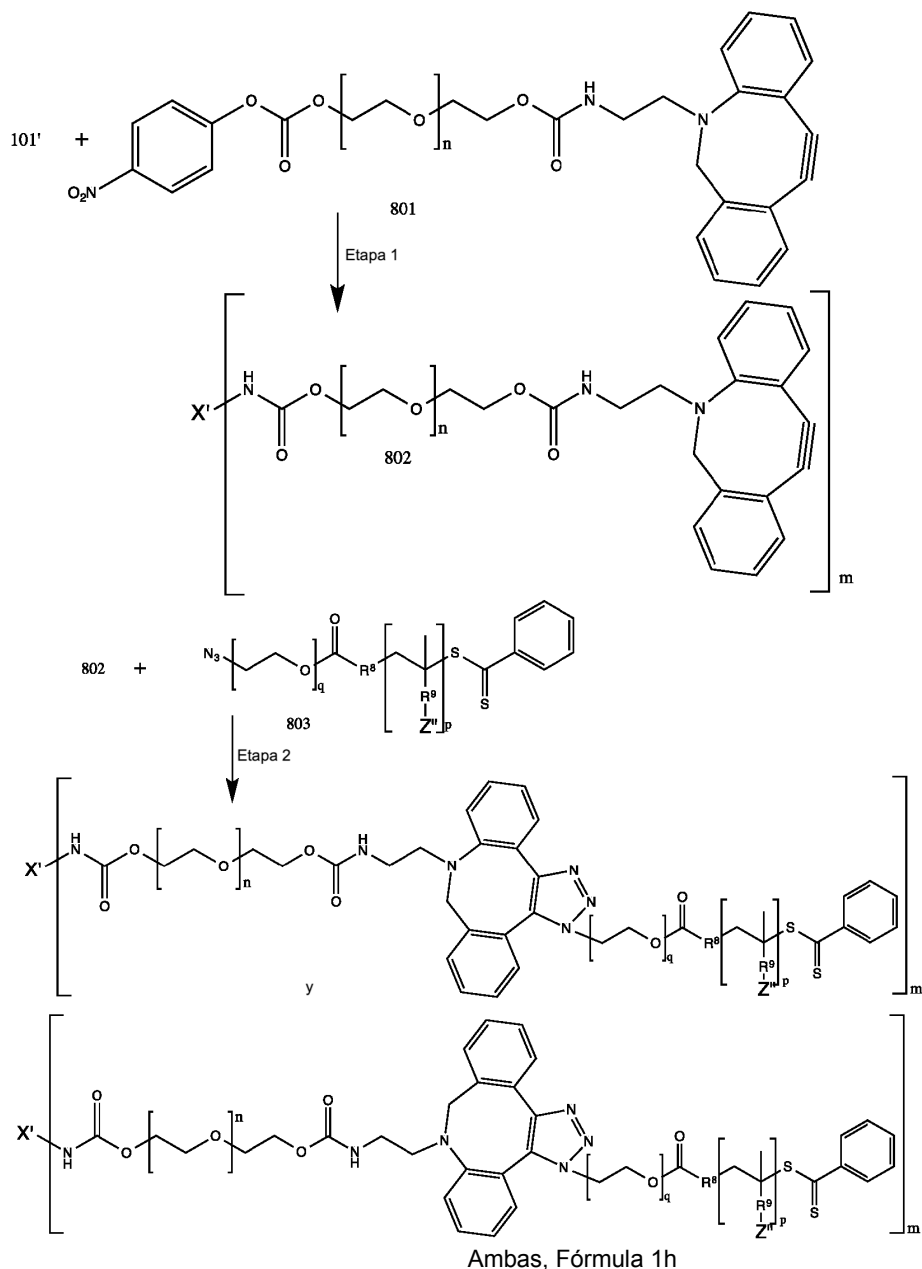
Esquema de Reacción 7



Como se ilustra en el Esquema de Reacción 7, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101'se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un éster de poli(etilenglicol) del éster de NHS de Fórmula 701 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1g.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1g se pueden nombrar como sigue:
"F1g-X'-m_m-p_p-2NACGAL" o "F1g-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z"

Esquema de Reacción 8



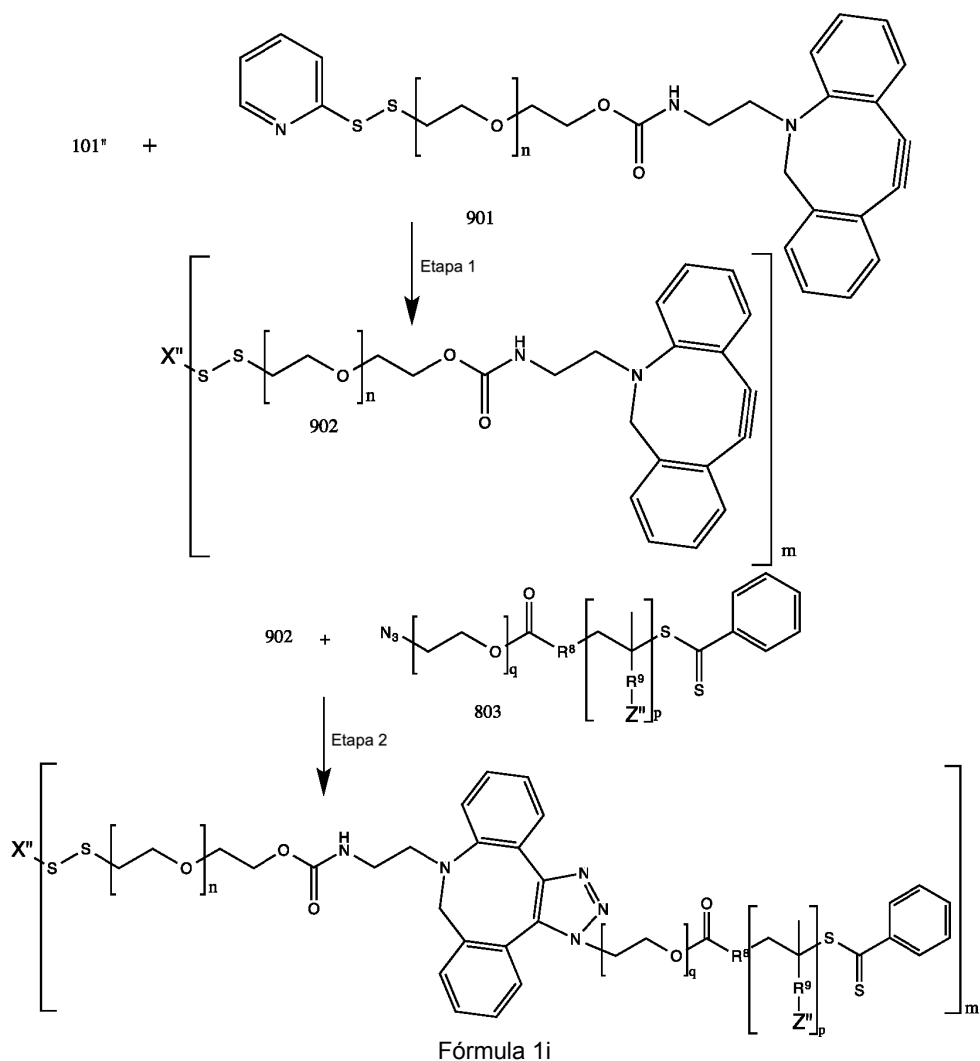
5 Como se ilustra en el Esquema de Reacción 8, Etapa 1, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101'se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un enlazador reactivo con amina para la química Click de Fórmula 801 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 802.

10 En el Esquema de Reacción 8, Etapa 2, el producto de Fórmula 802 se pone en contacto con una cantidad equivalente (de nuevo correspondiente al valor de m) de un polímero de galactos(amina) de Fórmula 803 para producir el producto isomérico correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1h. Los dos isómeros, ilustrados anteriormente, resultan de la ciclación inespecífica de la azida de Fórmula 803 con el triple enlace de Fórmula 802. Dicha ciclación inespecífica ocurre en la síntesis de otras composiciones en las que Y se selecciona de las Fórmulas

15 Yh a Yn, pero no se ilustrará en cada caso.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1h se pueden nombrar como sigue:
 "F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NACGAL" o "F1h-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

Esquema de Reacción 9



5

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 9, Etapa 1, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos tiol nativos libres de superficie de Fórmula 101'' se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un enlazador reactivo con tiol para la química Click de Fórmula 901 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 902".

10

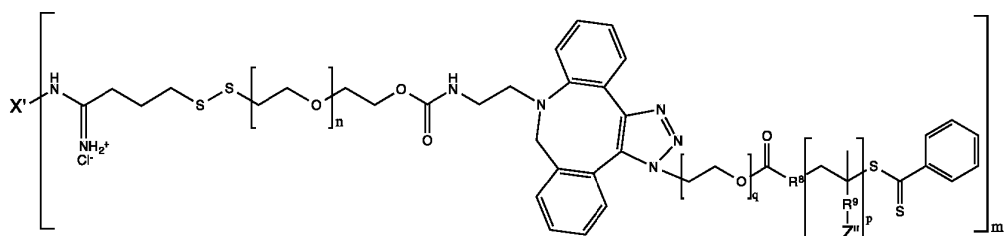
En el Esquema de Reacción 9, Etapa 2, el producto de Fórmula 902'' se pone en contacto con una cantidad equivalente (de nuevo correspondiente al valor de m) de un polímero de galactos(amina) de Fórmula 803 para producir el producto isomérico correspondiente de acuerdo con a la Fórmula 1i.

15

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1i se pueden nombrar como sigue:
 "F1i-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" o "F1i-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

Siguiendo los procedimientos descritos con respecto al Esquema de Reacción 9, pero sustituyendo el material de partida 101'' con un compuesto de Fórmula 103' (derivatizado con el reactivo de Traut) se obtiene el correspondiente producto isomérico de Fórmula 1j como se muestra a continuación.

20

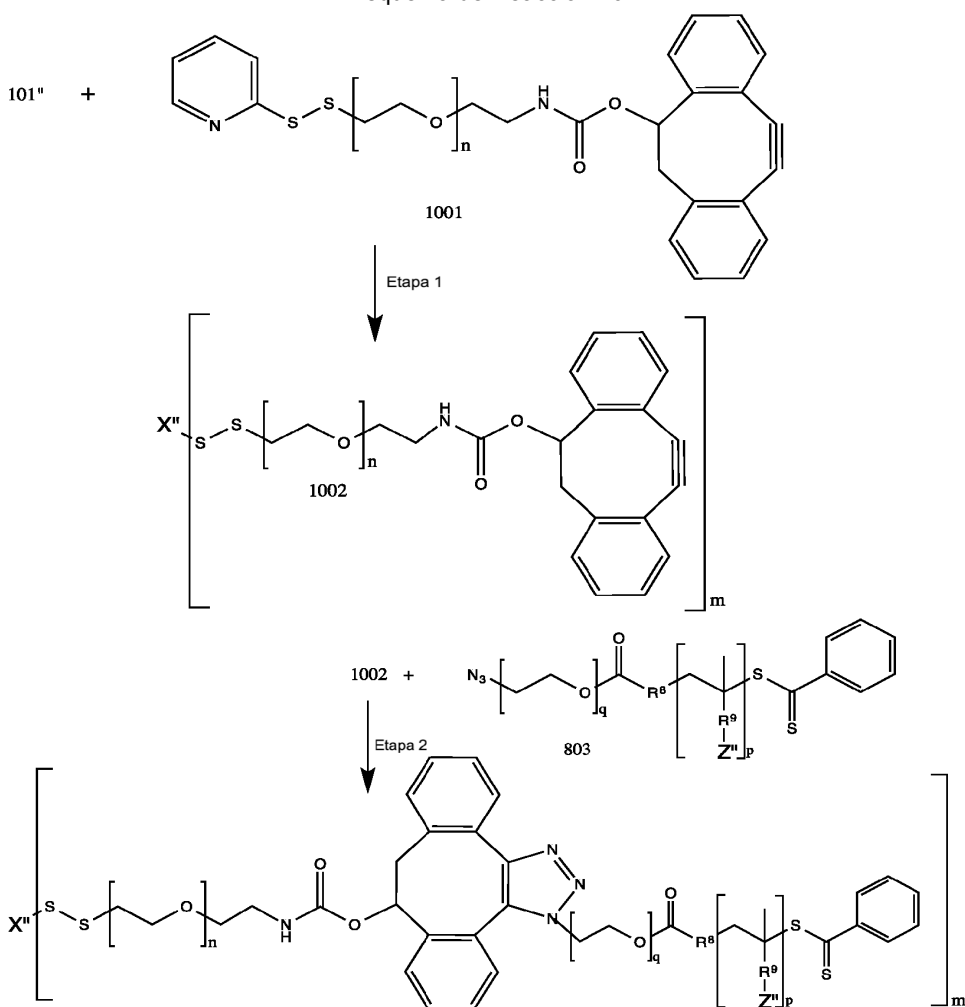


Fórmula 1j

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1j se pueden nombrar de la siguiente manera: "F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" o "F1j-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

5

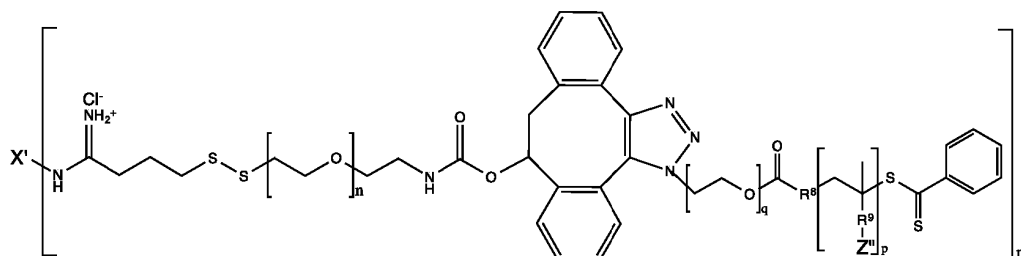
Esquema de Reacción 10



Fórmula 1k

- 10 Como se ilustra en el Esquema de Reacción 10, Etapa 1, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos tiol nativos libres de superficie de Fórmula 101"se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un enlazador reactivo con tiol para la química Click de Fórmula 1001 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1002.
- 15 En el Esquema de Reacción 10, Etapa 2, el producto de Fórmula 1002 se pone en contacto con una cantidad equivalente (de nuevo correspondiente al valor de m) de un polímero de galactos(amina) de Fórmula 803 para producir el producto isomérico correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1k.
- 20 Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1k se pueden nombrar como sigue:
"F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NacGAL" o "F1k-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

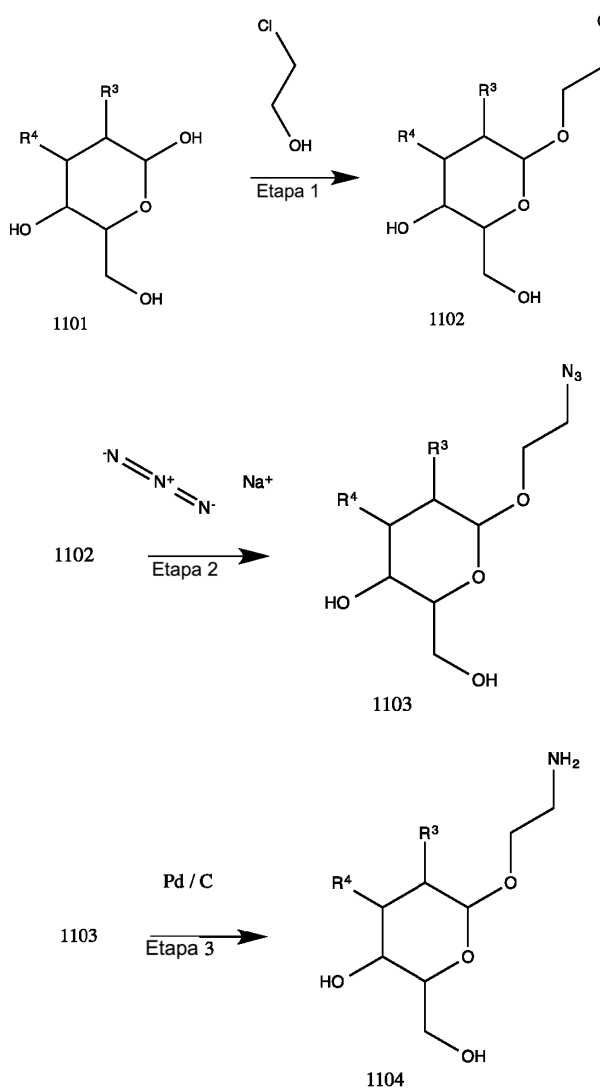
Siguiendo los procedimientos descritos con respecto al Esquema de Reacción 10, pero sustituyendo el material de partida 101" con un compuesto de Fórmula 103' (derivatizado con el reactivo de Traut) se obtiene el correspondiente producto isomérico de Fórmula 1L como se muestra a continuación.

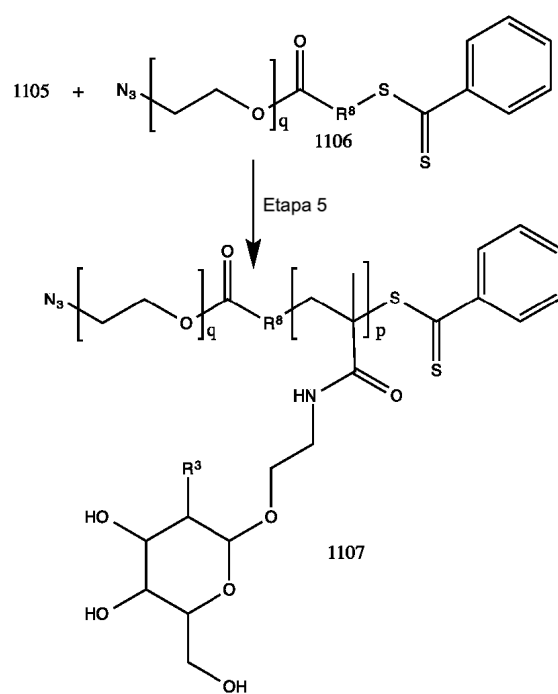
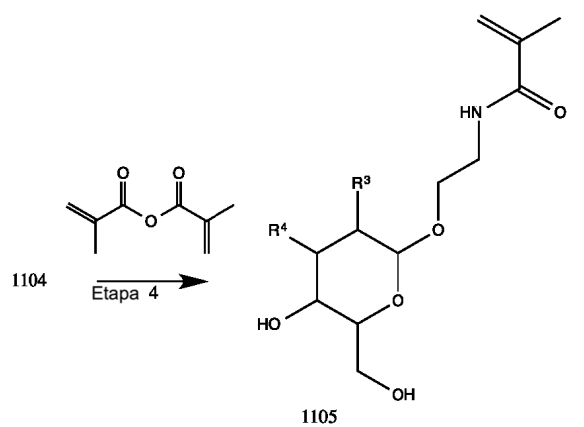


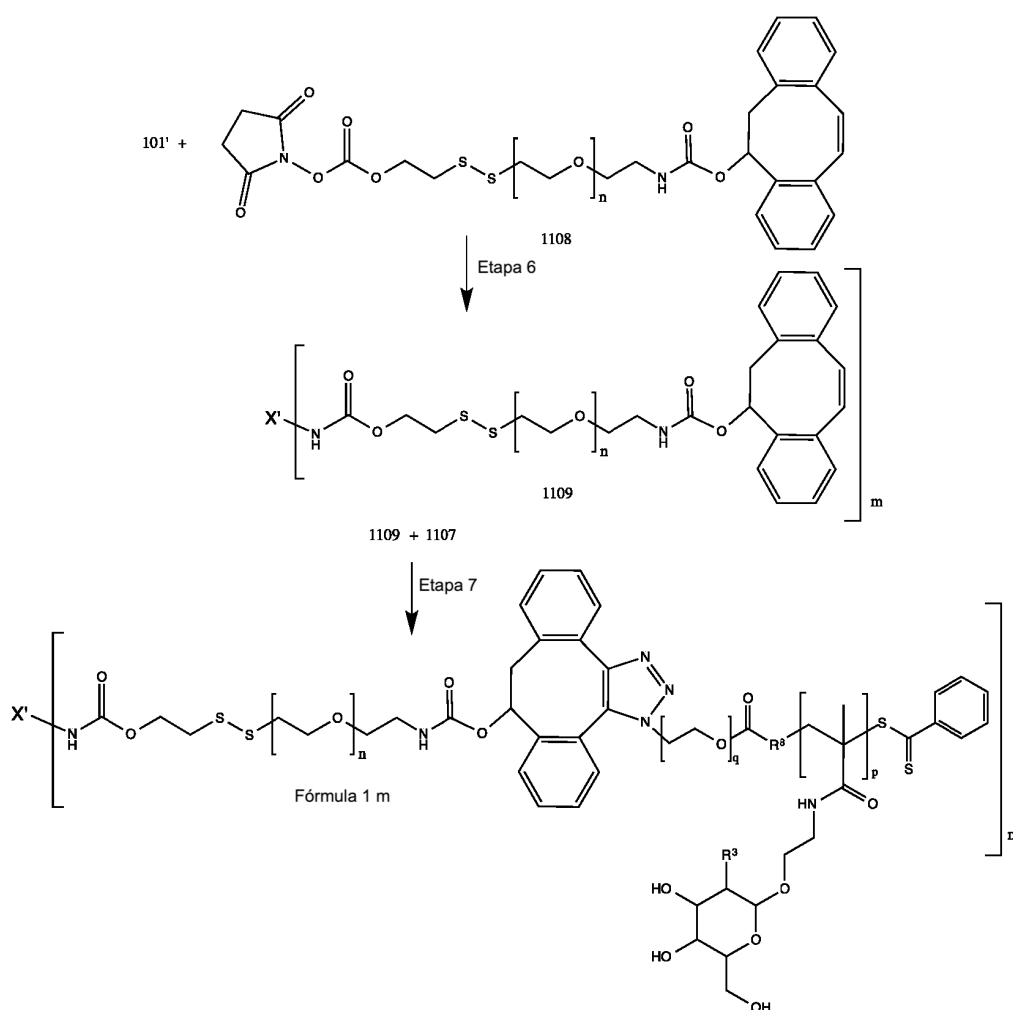
Fórmula 1L

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1L se pueden nombrar de la siguiente manera: "F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NACGAL" o "F1L-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z".

Esquema de Reacción 11







Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 1, galactosa, galactosamina protegida o N-acetil-D-galactosamina (Fórmula 1101 en la que R³ y R⁴ son OH, R³ es un grupo protector de NH (por ejemplo, ciclado con R⁴) o R³ es NHAc y R⁴ es OH, respectivamente) se pone en contacto con 2-cloroetan-1-ol seguido de enfriamiento y la adición gota a gota de cloruro de acetilo. La solución se calienta a temperatura ambiente y luego se calienta a 70 °C durante varias horas. Se añade etanol al producto crudo y la solución resultante se agita en presencia de carbono y luego se filtra seguido de la eliminación del disolvente para producir el producto correspondiente de Fórmula 1102.

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 2, el producto de Fórmula 1102 se agrega a un exceso de azida de sodio y se calienta a 90 °C durante varias horas, luego se filtra seguido de la eliminación del solvente para producir el producto correspondiente de Fórmula 1103.

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 3, el producto de Fórmula 1103 se agrega a una solución de paladio sobre carbono y etanol, y se agita bajo gas hidrógeno (3 atm) durante varias horas, luego se filtra seguido de eliminación del solvente para producir el producto correspondiente de Fórmula 1104.

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 4, el producto de Fórmula 1104 se agrega a una solución de anhídrido de metacrilato. Se añade trietilamina y la reacción se agita durante 2 horas seguido de la eliminación del disolvente y el aislamiento para producir el producto correspondiente de Fórmula 1105.

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 5, se agrega un agente uRAFT modificado con azida (Fórmula 1106) a una solución del producto de Fórmula 1105 con azobisisobutironitrilo, se somete a 4 ciclos de descongelación de bomba libre y luego se agita a 70 °C. Después de varias horas, se precipita el correspondiente producto polimérico de Fórmula 1107 mediante la adición de un alcohol inferior seguido de la eliminación del disolvente. Cuando R³ es un grupo protector de NH (por ejemplo, ciclado con R⁴), el grupo o grupos protectores se eliminan en este punto.

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 6, se añade un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101'a un tampón de pH

8,0 y se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de una dioxopirrolidina de Fórmula 1108 con agitación. Después de 1 hora, se elimina la Fórmula 1108 sin reaccionar y el producto resultante de Fórmula 1109 se usa sin purificación adicional.

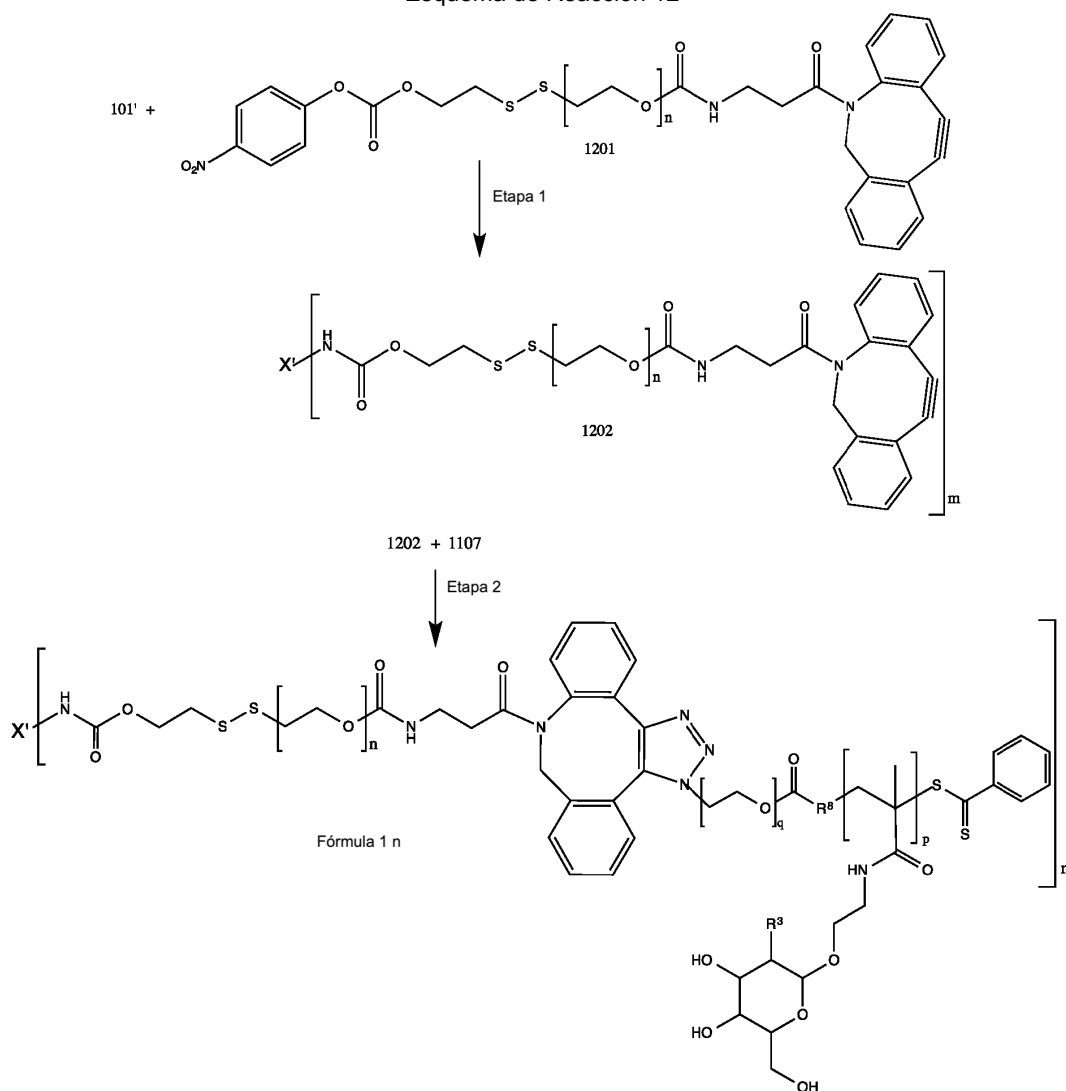
- 5 Como se ilustra en el Esquema de Reacción 11, Etapa 7, el producto de Fórmula 1107 se agrega a un tampón de pH 8,0, al cual se agrega el producto de Fórmula 1109. Después de agitar durante 2 horas, el exceso de Fórmula 1107 se elimina para producir el correspondiente producto isomérico de Fórmula 1m.

- 10 Sustituyendo N-(2,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahydro-2H-piran-3-il)metacrilamida por el producto de Fórmula 1105 en la Etapa 5 y continuando con las Etapas 6 y 7, se obtiene el correspondiente producto isomérico de Fórmula 1m en la que Z"es N-acetilgalactosamina conjugada en C2.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1m pueden nombrarse de la siguiente manera:

- 15 "F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z" en la que Z"es 1GAL, 1NGAL o 1NAcGAL, o
"F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL".

Esquema de Reacción 12



- 20 El enfoque de síntesis del Esquema de Reacción 12 es particularmente adecuado para antígenos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y ligandos hidrófobos (por ejemplo, insulina) debido al uso de disolventes orgánicos.

- 25 Como se ilustra en el Esquema de Reacción 12, Etapa 1, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101'se disuelve en un disolvente orgánico (por ejemplo, DMF) que contiene trietilamina. A esto se le añade una cantidad (correspondiente al valor de m) de un compuesto de Fórmula 1201 seguido de agitación y la adición de t-butilmetil éter. El producto correspondiente de Fórmula 1202 se recupera como un precipitado.

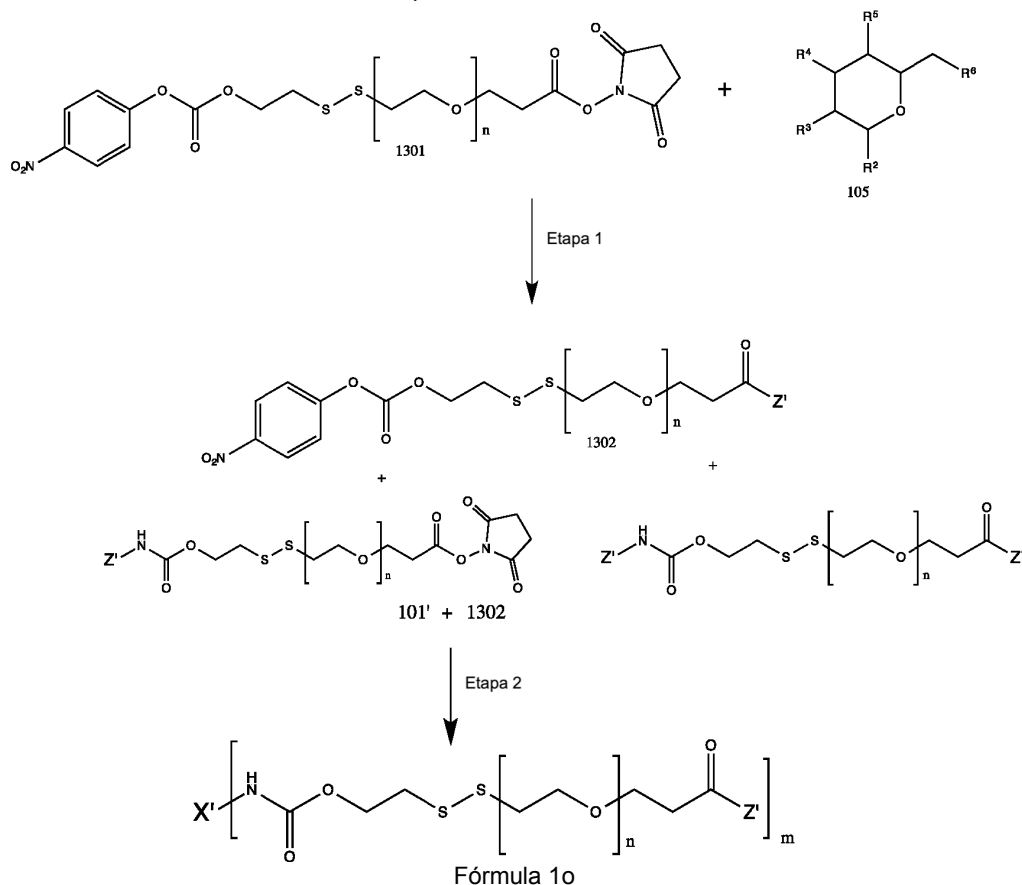
El producto de Fórmula 1202 se resuspende en el disolvente orgánico y se añade una cantidad (correspondiente al valor de m) de Fórmula 1107 (obtenida, por ejemplo, como se describe con referencia al Esquema de Reacción 11) seguido de agitación. El producto de reacción se precipita mediante la adición de diclorometano, seguido de filtración y eliminación del disolvente. La purificación (por ejemplo, resuspensión en PBS seguida de cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño produce el producto isomérico correspondiente de Fórmula 1n.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1n se pueden nombrar como sigue:

"F1n-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z" en la que Z"es 1GAL, 1NGAL o 1NAcGAL, o

"F1m-X'-n_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL".

Esquema de Reacción 13



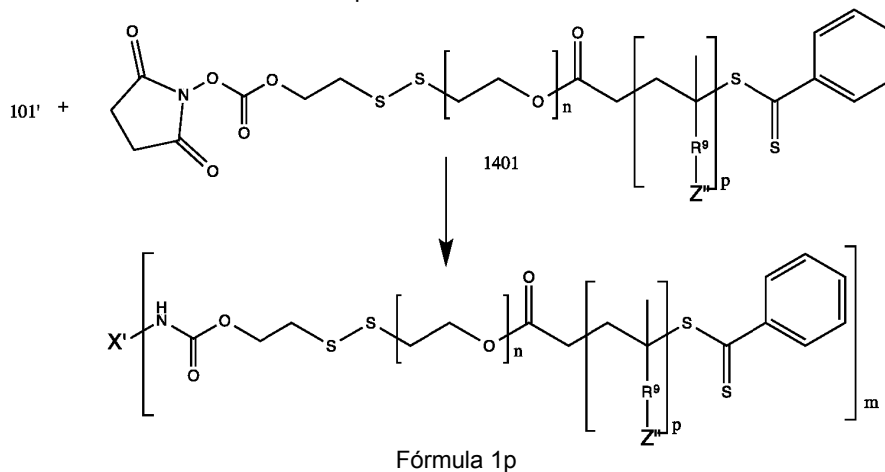
En el Esquema de Reacción 13, Etapa 1, se pone en contacto un éster de nitrofenoxycarbonil-oxalquil-di-tiol-poli(etilenglicol)-NHS (Fórmula 1301) con galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina (Fórmula 105) para obtener el producto correspondiente de Fórmula 1302, junto con los otros dos productos ilustrados, a partir de los cuales se aísla el nitrofenoxycarbonil-di-tiol-poli(etilenglicol)-carboxietil galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina deseada de Fórmula 1302 antes de pasar a la siguiente etapa.

Como se ilustra en el Esquema de Reacción 13, Etapa 2, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie de Fórmula 101'se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) del producto de Fórmula 1302 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1o.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1o pueden nombrarse de la siguiente manera:

"F1o-X'-m_m-n_n-Z"

Esquema de Reacción 14



Como se ilustra en el Esquema de Reacción 14, un antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que tiene grupo o grupos amino nativos libres de superficie (Fórmula 101') se pone en contacto con un exceso (correspondiente al valor de m) de un éster de piridil-di-tiol-poli(etilenglicol)-NHS de Fórmula 1401 para producir el producto correspondiente de acuerdo con la Fórmula 1p.

Las composiciones correspondientes a la Fórmula 1p se pueden nombrar como sigue: "F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NacGAL" o "F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z".

Preparación de proteínas de fusión

Las composiciones de proteína de fusión de Fórmula 2 se pueden expresar mediante metodología aceptada en la técnica usando vectores de expresión de células de insectos, levaduras, bacterias o mamíferos disponibles comercialmente, y secuencias de genes publicadas, descubiertas o modificadas por ingeniería genética. Las secuencias que codifican X, Y y Z junto con secuencias de etiqueta pueden clonarse en un vector de expresión, por ejemplo, en el vector de expresión de mamífero pSecTag A, en el que la proteína de fusión se inserta en el terminal C a la secuencia guía de secreción de la cadena κ de Ig. Se pueden emplear varias otras técnicas de clonación, que incluyen mutagénesis dirigida al sitio y variaciones del protocolo QuikChange (Geiser, et al.), y son conocidas por los expertos en la técnica. Las proteínas de fusión se pueden expresar transitoriamente en células de mamíferos [por ejemplo, en células de riñón embrionario humano (HEK293) o células de ovario de hámster chino (CHO)] mediante transfección transitoria con los vectores descritos anteriormente usando polietilenimina. Las células transfectadas se cultivan en un medio adecuado (por ejemplo, medio FreeStyle 293, Life Technologies) suplementado, por ejemplo, con ácido valproico o DMSO durante aproximadamente 7 días, después de lo cual las células se eliminan por centrifugación y los sobrenadantes del cultivo se recogen y esterilizan mediante filtración.

Alternativamente, las proteínas de fusión se pueden expresar de forma estable creando líneas de células de mamífero transfectadas de forma estable. Además, los vectores de expresión se pueden utilizar para producir proteínas de fusión en bacterias, tales como *Escherichia coli*, *Corynebacterium* o *Pseudomonas fluorescens* mediante el uso de medios compatibles (por ejemplo, LB, 2XYT, SOB, SOC, TB y otros caldos), suplementos con (por ejemplo, glicerol, glucosa, y otros suplementos), y condiciones adecuadas de crecimiento y expresión. Los sistemas de expresión en levadura pueden utilizar comúnmente *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, u otros organismos de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Yarrowia*, y organismos menos utilizados como los hongos filamentosos *Aspergillus*, *Trichoderma* o *Myceliophthora thermophila* C1. Los sistemas de expresión de insectos pueden utilizar células de insectos infectadas con baculovirus o expresión de células de insectos no líticas para lograr niveles de expresión de proteínas en cantidades elevadas; las células de insectos más comunes incluyen, pero no se limitan a, Sf9 y Sf21 (de *Spodoptera frugiperda*), Hi-5 (de *Trichoplusia ni*) y Schneider 2 y 3 (de *Drosophila melanogaster*).

Los productos de proteína de fusión expresados se pueden purificar a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando una columna de sefrosa HisTrap Ni²⁺, GE Healthcare, para una proteína de fusión marcada con His), seguida de otras etapas de pulido cromatográfico tales como cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, usando una columna Superdex 75, GE Healthcare) o cromatografía de intercambio iónico. La pureza de la proteína puede verificarse, por ejemplo, mediante tinción con azul brillante de Coomassie de geles SDS-PAGE y transferencia Western (por ejemplo, transferencia Western anti-etiqueta 6xHis para una proteína de fusión etiquetada con His). La concentración de proteína se puede determinar usando la Ley de Beer-Lambert, para la cual se puede medir la absorbancia a 280 nm, por ejemplo, usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). El peso molecular y el coeficiente de extinción se pueden estimar a partir de la

secuencia de aminoácidos de la proteína, por ejemplo, utilizando la herramienta ExPASy ProtParam. Los niveles de endotoxinas se pueden medir, por ejemplo, utilizando la línea celular indicadora HEK-Blue TLR4 (Invivogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de antígenos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y ligandos desialilados

5 Las proteínas desialiladas se pueden producir mediante una metodología aceptada en la técnica usando enzima neuraminidasa (también conocida como acetil-neuraminil hidrolasa o sialidasa) o ácido sulfúrico disponibles comercialmente. Para la desialilación enzimática de una proteína de interés, la proteína se puede incubar junto con neuraminidasa a 37 °C durante 1 hora, o más si es necesario. Para la desialilación química mediante hidrólisis ácida, una proteína de interés se puede tratar con ácido sulfúrico 0,025 N a 80 °C durante 1 hora, o más si es necesario. La proteína desialilada puede luego purificarse a partir de la mezcla de reacción mediante cromatografía de afinidad de 10 iones metálicos inmovilizados (por ejemplo, usando una columna de sefarosa HisTrap Ni²⁺, GE Healthcare), seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, usando una columna Superdex 75, GE Healthcare). La pureza de la proteína puede verificarse, por ejemplo, mediante tinción con azul brillante de Coomassie de geles 15 SDS-PAGE y transferencia Western anti-etiqueta 6xHis. La desialilación se puede verificar, por ejemplo, mediante la detección con base en lectina del contenido de ácido siálico proteico en transferencias Western o la cuantificación colorimétrica del contenido de ácido siálico utilizando kits disponibles comercialmente (por ejemplo, Abcam, ProZyme o Sigma). La concentración de proteína desialilada se puede determinar usando la Ley de Beer-Lambert, para la cual se puede medir la absorbancia a 280 nm, por ejemplo, usando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). 20 El peso molecular y el coeficiente de extinción se pueden estimar a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína, por ejemplo, utilizando la herramienta ExPASy ProtParam. Los niveles de endotoxinas se pueden medir, por ejemplo, utilizando la línea celular indicadora HEK-Blue TLR4 (Invivogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Procesos particulares y últimas etapas

Se pone en contacto un compuesto de Fórmula 103' con un exceso (correspondiente al valor de m) de un compuesto de Fórmula 106 para obtener el producto correspondiente de Fórmula 1a.

30 Se pone en contacto un compuesto de Fórmula 103' con un exceso (correspondiente al valor de m) de un compuesto de Fórmula 201 para obtener el producto correspondiente de Fórmula 1b.

Se pone en contacto un compuesto de Fórmula 802, 902 o 1002 con un exceso (correspondiente al valor de m) de un compuesto de Fórmula 803 para obtener el producto correspondiente de Fórmula 1h, Fórmula 1i o Fórmula 1k, 35 respectivamente.

Se pone en contacto un compuesto de Fórmula 1109 con un exceso (correspondiente al valor de m) de un compuesto de Fórmula 1107 para obtener el correspondiente producto de Fórmula 1m, particularmente cuando n es 40 aproximadamente 80, p es aproximadamente 30, q es aproximadamente 4, y m que es una función del antígeno es aproximadamente 2 a 10.

Se pone en contacto un compuesto de Fórmula 1202 con un exceso (correspondiente al valor de m) de un compuesto de Fórmula 1107 para obtener el producto correspondiente de Fórmula 1n, particularmente cuando n es 45 aproximadamente 1, p es aproximadamente 30, q es aproximadamente 4, y m que es una función del antígeno es aproximadamente 2 a 10.

Composiciones particulares para uso

50 A modo de ejemplo no limitativo, un grupo particular preferido para las composiciones y formulaciones farmacéuticas para uso en la tolerancia de un paciente de la presente invención son las siguientes combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes de Fórmula 1 (subagrupados, respectivamente, en orden creciente de preferencia):

- X es un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplante desarrollan una respuesta inmune, un antígeno extraño al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune, una proteína terapéutica a la 55 que los pacientes desarrollan una respuesta inmune, un antígeno propio al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune.
- X es una proteína terapéutica a la que los pacientes desarrollan una respuesta inmune seleccionada entre: Abatacept, Abciximab, Adalimumab, Adenosina desaminasa, Ado-trastuzumab emtansina, Agalsidasa alfa, Agalsidasa beta, Aldeslukina, Alglucerasa, Alglucosidasa alfa, inhibidor de α -1-proteinasa, Anakinra, Anistreplasa 60 (complejo activador de estreptoquinasa plasminógeno anisóilado), Antitrombina III, Globulina antitrombocitos, Ateplasa, Bevacizumab, Bivalirudina, Toxina botulínica tipo A, Toxina botulínica tipo B, Inhibidor de la esterasa C1, Canakinumab, Carboxipeptidasa G2 (Glucarpidasa y Voraxaza) Certolizumab pegol, Cetuximab colagenasa, Crotalidae Immune Fab, Darbepoetina- α , Denosumab, Digoxina Immune Fab, Dornasa alfa, Eculizumab, Etanercept, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XIII, Fibrinógeno, Filgrastim, Galsulfasa, Golimumab, acetato de 65 Histrelina, Hialuronidasa, Idursulfasa, Imiglucerasa, Infliximab, Insulina (incluida la insulina rHu y la insulina bovina),

- Interferón- α 2a, Interferón- α 2b, Interferón- β 1a, Interferón- β 1b, interferón- γ 1b, ipilimumab, L-arginasa, L-asparaginasa, L-metionasa, lactasa, laronidasa, lepirudina/hirudina, mecasermina, Rinfabato de mecasermina, Metoxi ofatumumab, Natalizumab, Octreótido, Oprelvekina, Amilasa pancreática, Lipasa pancreática, Papaína, Peg-asparaginasa, Peg-doxorrubicina HCl, PEG-epoetina- β , Pegfilgrastim, Peg-Interferón- α 2a, Peg-Interferón- α 2b, Pegloticasa, Pegvisomant, Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), Proteína C, Rasburicasa (uricasa), Sacrosidasa, Calcitonina de salmón, Sargramostim, Estreptoquinasa, Tenecteplasa, Teriparatida, Tocilizumab (atlizumab), trastuzumab, Interferón alfa tipo 1, Ustekinumab y factor vW.
- Especialmente cuando X es Abciximab, Adalimumab, Agalsidasa alfa, Agalsidasa beta, Aldeslukina, Alglucosidasa alfa, Factor VIII, Factor IX, Infliximab, L-asparaginasa, Laronidasa, Natalizumab, Octreotida, Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), o Rasburicasa (uricasa).
 - Particularmente cuando X es Factor VIII, Factor IX, uricasa, PAL o asparaginasa.
 - X es un polipéptido de antígeno propio seleccionado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple pediátrica, artritis reumatoide juvenil, enfermedad celíaca o alopecia universalis.
 - Especialmente cuando X es un polipéptido de antígeno propio seleccionado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 de nueva aparición, esclerosis múltiple pediátrica o enfermedad celíaca.
 - X es un antígeno extraño al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune.
 - De cacahuete, que incluye conaraquina (Ara h1)
 - De trigo, que incluye alfa-gliadina nativa de "33mer" (SEQ ID NO: 24), alfa-gliadina desamidada de "33mer" (SEQ ID NO: 25), alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27).
 - De gato, que incluye Fel d 1A (UNIPROT P30438) y Albúmina de gato (UNIPROT P49064).
 - De perro, que incluye Can f 1 (UNIPROT 018873) y Albúmina de perro (UNIPROT P49822).
 - X es un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplantes desarrollan una respuesta inmune, por ejemplo una proteína de antígeno leucocitario humano.
 - Y es un enlazador seleccionado de: Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Yh, Fórmula Yi, Fórmula Yk, Fórmula Ym, Fórmula Yn, Fórmula Yo y Fórmula Yp.
 - Especialmente cuando n es 8 a $90 \pm 10\%$, p es 20 a $100 \pm 10\%$ y q es 3 a 20 ± 3 .
 - Particularmente cuando n es 40 a $80 \pm 10\%$, p es 30 a $40 \pm 10\%$ y q es 4 a 12 ± 3 .
 - Especialmente cuando Y es de Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Ym o Fórmula Yn.
 - Particularmente cuando n es 8 a $90 \pm 10\%$, p es 20 a $100 \pm 10\%$ y q es 3 a 20 ± 3 .
 - Más particularmente, cuando n es 40 a $80 \pm 10\%$, p es 30 a $40 \pm 10\%$ y q es 4 a 12 ± 3 .
 - Particularmente cuando Z está conjugado con Y a través de un grupo etilacetamido.
 - Más particularmente cuando Z está conjugado con Y en su C1.
 - Más particularmente cuando R^8 es CMP.
 - Más particularmente donde R^8 es CMP.
 - Particularmente cuando R^8 es CMP.
 - Z es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.
 - Especialmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1, C2 o C6.
 - Particularmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1 o C2.
 - Más particularmente cuando Z es N-acetilgalactosamina conjugada en C1.
- Cada uno de los grupos y subgrupos descritos anteriormente se prefieren individualmente y se pueden combinar para describir aspectos preferidos adicionales de la divulgación, por ejemplo, pero no a modo de limitación, como sigue:
- X es un polipéptido de antígeno propio seleccionado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple pediátrica, artritis reumatoide juvenil, enfermedad celíaca o alopecia universalis.
 - Especialmente cuando X es un polipéptido de antígeno propio seleccionado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 de nueva aparición, esclerosis múltiple pediátrica o enfermedad celíaca.
 - Particularmente cuando Y es un enlazador seleccionado de: Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Yh, Fórmula Yi, Fórmula Yk, Fórmula Ym, Fórmula Yn, Fórmula Yo y Fórmula Yp.
 - Especialmente cuando n es 8 a $90 \pm 10\%$, p es 20 a $100 \pm 10\%$ y q es 3 a 20 ± 3 .
 - Particularmente cuando n es 40 a $80 \pm 10\%$, p es 30 a $40 \pm 10\%$ y q es 4 a 12 ± 3 .
 - Especialmente cuando Y es de Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Ym o Fórmula Yn.

- Particularmente cuando n es 8 a 90 ± 10%, p es 20 a 100 ± 10% y q es 3 a 20 ± 3.
- Más particularmente cuando n es de 40 a 80 ± 10%, p es de 30 a 40 ± 10% y q es de 4 a 12 ± 3.
- Incluso más particularmente cuando Z está conjugado con Y a través de un grupo etilacetamido.
- Más particularmente cuando Z está conjugado con Y a través de un grupo etilacetamido.
- Particularmente cuando Z está conjugado con Y a través de un grupo etilacetamido.
- Especialmente cuando Z es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.
- Particularmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1, C2 o C6.
- Más particularmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1 o C2.
- Incluso más particularmente cuando Z es N-acetilgalactosamina conjugada en C1.
- Particularmente cuando Z es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.
- Especialmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1, C2 o C6.
- Particularmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1 o C2.
- Más particularmente cuando Z es N-acetilgalactosamina conjugada en C1.
- Especialmente cuando Y es un enlazador seleccionado de: Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Yh, Fórmula Yi, Fórmula Yk, Fórmula Ym, Fórmula Yn, Fórmula Yo y Fórmula Yp.
- Particularmente cuando n es 8 a 90 ± 10%, p es 20 a 100 ± 10% y q es 3 a 20 ± 3.
- Más particularmente, cuando n es 40 a 80 ± 10%, p es 30 a 40 ± 10% y q es 4 a 12 ± 3.
- Particularmente cuando Y es de Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Ym o Fórmula Yn.
- Más particularmente cuando n es 8 a 90 ± 10%, p es 20 a 100 ± 10% y q es 3 a 20 ± 3.
- Más preferiblemente, cuando n es 40 a 80 ± 10%, p es 30 a 40 ± 10% y q es 4 a 12 ± 3.
- Más particularmente cuando Z está conjugado con Y a través de un grupo etilacetamido.
- Especialmente cuando Z es galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.
- Particularmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1, C2 o C6.
- Más particularmente cuando Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en C1 o C2.
- Más preferiblemente cuando Z es N-acetilgalactosamina conjugada en C1.
- m es un número entero de aproximadamente 1 a 100.
- m es 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 o 110.
- Particularmente m es de aproximadamente 1 a 20.
- m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22.
- Más particularmente, m es aproximadamente 10.
- m es 9, 10 u 11.
- n es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 1 a 100
- n es 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 o 110.
- Particularmente n es aproximadamente 8 a 90.
- Particularmente n es 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 o 99.
- Más particularmente, n es aproximadamente 40 a 80.
- Más particularmente, n es 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 u 88.

◦ n representa una mezcla que abarca los intervalos 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 y 107-113.

▪ Particularmente n representa una mezcla que abarca los intervalos 7-13, 6-14, 15-25, 26-30, 42-50, 46-57, 60-82, 85-90 y 82-99.

5

• Más particularmente, n representa una mezcla que abarca los intervalos 36-44, 42-50, 46-57, 60-82 y 75-85.

◦ p es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 2 a 150.

10 ▪ p es 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 o 165.

▪ Particularmente cuando n es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 1 a 100.

15 • Particularmente n es 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 o 110.

◦ Más particularmente cuando n es aproximadamente 8 a 90.

20 ◦ Más particularmente n es 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 o 99.

▪ Incluso más particularmente cuando n es aproximadamente de 40 a 80.

▪ Aún más particularmente n es 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 u 88.

25 • Más particularmente, p es 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o 110.

◦ Particularmente cuando n es un número entero que representa una mezcla que incluye de aproximadamente 1 a 100.

30 ▪ Particularmente n es 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 o 110.

• Más particularmente cuando n es de aproximadamente 8 a 90.

35 • Más particularmente, n es 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 o 99.

◦ Incluso más particularmente cuando n es aproximadamente de 40 a 80.

◦ Incluso más particularmente, n es 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 u 88.

◦ Más particularmente, p es 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44.

40 ▪ Particularmente cuando n es 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 o 110.

• Más particularmente cuando n es aproximadamente 8 a 90.

45 • Más particularmente, n es 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 o 99.

◦ Incluso más particularmente cuando n es aproximadamente de 40 a 80.

◦ Incluso más particularmente, n es 37, 40, 41, 45, 50, 54, 55, 59, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 83 u 88.

50 ◦ q es un número entero que representa una mezcla que incluye desde aproximadamente 1 hasta 44.

▪ q es 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 o 48.

A modo de ejemplo no limitativo, un grupo particular preferido para las composiciones divulgadas, formulaciones farmacéuticas, métodos de fabricación y uso son las siguientes combinaciones y permutaciones de grupos sustituyentes de Fórmula 2 (subagrupados, respectivamente, en orden creciente de preferencia):

55 • X es una proteína terapéutica a la que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada seleccionada entre: Abatacept, Abciximab, Adalimumab, Adenosina desaminasa, Ado-trastuzumab emtansina, Agalsidasa alfa, Agalsidasa beta, Aldeslukina, Alglucerasa, Alglucosidasa alfa, inhibidor de α -1-proteinasa, Anakinra, Anistreplasa, Bevacizumab, Bivalirudina, Toxina botulínica tipo A, Toxina botulínica tipo B, Inhibidor de la esterasa C1, Canakinumab, Carboxipeptidasa G2 (Glucarpidasa y Voraxaza) Certolizumab pegol, Cetuximab colagenasa, Crotaledae Inmune Fab, Darbepoetina- α , Denosumab, Digoxina Inmune Fab, Dornasa alfa, Eculizumab, Etanercept, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor XI, Factor XIII, Fibrinógeno, Filgrastim, Galsulfasa, Golimumab, Acetato de

60 Histrelina, Hialuronidasa, Idursulfasa, Imiglucerasa, Infliximab, Insulina, Interferón- α 2a, Interferón- α 2b, Interferón-

65

β 1a, Interfeón $-\beta$ 1b, Interfeón $-\gamma$ 1b, Ipilimumab, L-arginasa, L-asparaginasa, L-metionasa, Lactasa, Laronidasa, Lepirudina/hirudina, Mecasermina, Rinfabato de mecasermina, Metoxi ofatumumab, Natalizumab, Octreótido, Oprelvequina, Amilasa pancreática, Lipasa pancreática, Papaína, Peg-asparaginasa, Peg-doxorrubicina HCl, PEG-epoetina- β , Pegfilgrastim, Peg-Interferón- α 2a, Peg-Interferón- α 2b, Pegloticasa, Pegvisomant, Fenilalanina amoniaco-liasa (PAL), Proteína C, Rasburicasa (uricasa), Sacrosidasa, Calcitonina de salmón, Sargramostim, Estreptoquinasa, Tenecteplasa, Teriparatida, Tocilizumab (atlizumab), Trastuzumab, Interferón alfa tipo 1, Ustekinumab y Factor vW; siempre que el Interferón (interferón alfa 2, interferón alfa 5, interferón alfa 6 o interferón de consenso), Ribavirina, Nexavar/Sorafenib, Erbitus/Cetuximab, Avastatina/Bevacizumab y Herceptina/Trastuzumab estén excluidos del alcance de la Fórmula 2 cuando $m' + m''$ sea igual a 1 y Z sea DOM 26h-196-61 u otra de las moléculas dirigidas al hígado descritas en el documento US 2013/0078216.

◦ Especialmente cuando X es Abciximab, Adalimumab, Agalsidasa alfa, Agalsidasa beta, Aldeslukina, Alglucosidasa alfa, Factor VIII, Factor IX, Infliximab, L-asparaginasa, Laronidasa, Natalizumab, Octreótida, Fenilalanina amoniacal-liasa (PAL), o Rasburicasa (uricasa).

• Particularmente cuando X es Factor VIII, Factor IX, uricasa, PAL o asparaginasa.

• X es un polipéptido de antígeno propio seleccionado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple pediátrica, artritis reumatoide juvenil, enfermedad celíaca o alopecia universalis.

◦ Especialmente cuando X es un polipéptido de antígeno propio seleccionado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 1 de nueva aparición, esclerosis múltiple pediátrica o enfermedad celíaca.

• X es un antígeno extraño al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada.

◦ De cacahuete, que incluye conaraquina (Ara h1)

◦ De trigo, que incluye alfa-gliadina nativa de "33 mer" (SEQ ID NO: 24), alfa-gliadina desamidada de "33 mer" (SEQ ID NO: 25), alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27).

◦ De gato, que incluye Fel d 1A (UNIPROT P30438) y Albúmina de gato (UNIPROT P49064).

◦ De perro, que incluye Can f 1 (UNIPROT 018873) y Albúmina de perro (UNIPROT P49822).

• X es un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplantes desarrollan una respuesta inmune no deseada, por ejemplo, una proteína de antígeno leucocitario humano.

• X es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando que se une específicamente a una proteína, péptido o anticuerpo circulante, cuya proteína o péptido o anticuerpo circulante da lugar al rechazo del trasplante, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, una enfermedad autoinmune y/o alergia.

◦ Especialmente cuando X se une a una proteína, péptido o anticuerpo circulante endógeno.

• Y es Gly₃Ser.

• Z es Anti-ASGPR Dom26h-196-61 o una sustitución conservadora.

• $m' + m''$ es igual a 1 o 2 y X es una proteína de longitud completa, incluidos los compuestos terapéuticos de proteínas.

• $m' + m''$ es igual a 1 o 2 cuando m' es 1 y m'' es 0 o 1.

• $m' + m''$ es igual a 2 a aproximadamente 10 cuando X es un grupo de péptidos de antígeno propio (epítomos) que se sabe que están asociados con una enfermedad autoinmune particular o para el tratamiento de poblaciones diana genéticamente diversas.

◦ $m' + m''$ es igual a aproximadamente 4 a 7 cuando la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple y X se selecciona independientemente de: MBP13-32 (SEQ ID NO: 11), MBP83-99 (SEQ ID NO: 12), MBP111-129 (SEQ ID NO: 13), MBP146-170 (SEQ ID NO: 14), MOG1-20 (SEQ ID NO: 15), MOG35-55 (SEQ ID NO: 16) y PLP139-154 (SEQ ID NO: 17).

• $m' + m''$ es igual a 7 y X es, respectivamente, MBP13-32 (SEQ ID NO: 11), MBP83-99 (SEQ ID NO: 12), MBP111-129 (SEQ ID NO: 13), MBP146-170 (SEQ ID NO: 14), MOG1-20 (SEQ ID NO: 15), MOG35-55 (SEQ ID NO: 16) y PLP139-154 (SEQ ID NO: 17).

Al igual que con la discusión anterior con respecto a la Fórmula 1, cada uno de los grupos y subgrupos descritos anteriormente para la Fórmula 2 se prefieren individualmente y se pueden combinar para describir aspectos preferidos adicionales de la divulgación.

Utilidad, pruebas y administración

Utilidad general

Las composiciones para uso de la invención encuentran uso en una variedad de aplicaciones que incluyen, como apreciarán los expertos en la técnica, el tratamiento del rechazo de trasplantes, la respuesta inmune contra un agente terapéutico, la enfermedad autoinmune y la alergia alimentaria.

En una realización preferida, las composiciones para uso de la invención se usan para modular, particularmente subregular, la respuesta inmune indeseable específica de antígeno.

Las composiciones de la divulgación son útiles para unirse y eliminar de la circulación proteínas no deseadas específicas, incluidos anticuerpos generados endógenamente en un paciente (es decir, no anticuerpos exógenos).

administrados a un paciente), péptidos y similares, que causan autoinmunidad y patologías asociadas, alergias, respuestas inmunitarias inflamatorias y anafilaxia.

En la presente divulgación, los antígenos se dirigen al hígado para su presentación a través de células presentadoras de antígenos para subregular específicamente el sistema inmunológico o para la eliminación de proteínas circulantes no deseadas. Esto es distinto de los usos previos del direccionamiento al hígado, por ejemplo, como se describe en el documento US 2013/0078216, en el que el propósito de moléculas dirigidas al hígado tales como DOM26h-196-61 era la administración de agentes terapéuticos para tratar enfermedades hepáticas tales como fibrosis, hepatitis, cirrosis y cáncer de hígado.

La presente divulgación proporciona composiciones y composiciones para uso para tratar la respuesta inmune no deseada a antígeno propios y antígenos extraños, que incluyen, entre otros: un antígeno de trasplante extraño contra el cual los receptores de trasplante desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, rechazo de trasplante), un antígeno extraño al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, alérgica o hipersensibilidad), un agente terapéutico al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, hipersensibilidad y/o actividad terapéutica reducida), un antígeno propio al que los pacientes desarrollan una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, enfermedad autoinmune).

Los estados de enfermedad autoinmunitaria que se pueden tratar usando los métodos y composiciones descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a: encefalomiелitis diseminada aguda (ADEM); Nefritis alérgica intersticial aguda (alergias a medicamentos); Leucoencefalitis hemorrágica necrosante aguda; Enfermedad de Addison; Alopecia areata; Alopecia universalis; Espondilitis anquilosante; Artritis, juvenil; Artritis, psoriásica; Artritis, reumatoide; Dermatitis atópica; Anemia aplásica autoinmune; Gastritis autoinmune; Hepatitis autoinmune; Hipofisitis autoinmune; Ooforitis autoinmune; Orquitis autoinmune; Síndrome poliendocrino autoinmune tipo 1; Síndrome poliendocrino autoinmune tipo 2; Tiroiditis autoinmune; Enfermedad de Behcet; Bronquiolitis obliterante; Penfigoide ampolloso; Enfermedad celíaca; Síndrome de Churg-Strauss; Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; Penfigoide cicatricial; Enfermedad de Crohn; Miocarditis de Coxsackie; Dermatitis herpetiforme de Duhring; Diabetes mellitus (tipo 1); Eritema nudoso; Epidermólisis ampollosa adquirida, Arteritis de células gigantes (Arteritis temporal); Miocarditis de células gigantes; Síndrome de Goodpasture; Enfermedad de Graves; Síndrome de Guillain-Barré; Encefalitis de Hashimoto; Tiroiditis de Hashimoto; Enfermedad esclerosante relacionada con IgG4; Síndrome de Lambert-Eaton; Enfermedad mixta del tejido conectivo; Enfermedad de Mucha-Habermann; Esclerosis múltiple; Miastenia grave; Neuritis óptica; Neuromielitis óptica; Pénfigo vulgar y variantes; Angemias perniciosas; Enfermedad autoinmune hipofisaria; Polimiositis; Síndrome pospericardiotomía; Insuficiencia ovárica prematura; Cirrosis biliar primaria; Colangitis esclerosante primaria; Soriasis; Enfermedad cardíaca reumática; Síndrome de Sjogren; Lupus eritematoso sistémico; Esclerosis sistémica; Colitis ulcerosa; Enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD); Uveítis; Vitiligo; y Granulomatosis de Wegener.

Un grupo particular de estados de enfermedad autoinmunitaria que se pueden tratar usando las composiciones para uso proporcionadas en este documento incluyen, pero no se limitan a: Leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda; Enfermedad de Addison; Artritis psoriásica; Artritis reumatoide; Anemia aplásica autoinmune; Hipofisitis autoinmune; Gastritis autoinmune; Síndrome poliendocrino autoinmune tipo 1; Penfigoide ampolloso; Enfermedad celíaca; Miocarditis de Coxsackie; Dermatitis herpetiforme de Duhring; Diabetes mellitus (tipo 1); Epidermólisis ampollosa adquirida; Miocarditis de células gigantes; Síndrome de Goodpasture; Enfermedad de Graves; Tiroiditis de Hashimoto; Enfermedad mixta del tejido conectivo; Esclerosis múltiple; Miastenia grave; Neuromielitis óptica; Angemias perniciosas; Pénfigo vulgar y variantes; Enfermedad autoinmune hipofisaria; Insuficiencia ovárica prematura; Enfermedad cardíaca reumática; Esclerosis sistémica; Síndrome de Sjogren; Lupus eritematoso sistémico; y vitiligo.

En las realizaciones del segundo aspecto de la invención que emplean un antígeno contra el cual se desarrolla una respuesta inmune, tal como antígenos alimentarios, se puede proporcionar tratamiento para reacciones contra, por ejemplo: cacahuete, manzana, leche, claras de huevo, yemas de huevo, mostaza, apio, camarones, trigo (y otros cereales), fresa y plátano.

Como apreciarán los expertos en la técnica, se puede analizar un paciente para identificar un antígeno extraño contra el que se ha desarrollado una respuesta inmune no deseada, y se puede desarrollar una composición de la divulgación basada en ese antígeno.

Pruebas

Al establecer la utilidad de las composiciones y composiciones para uso de la invención, debe determinarse inicialmente la especificidad en la unión a células presentadoras de antígeno en el hígado (particularmente unión a hepatocitos y específicamente ASGPR). Esto se puede lograr, por ejemplo, empleando un marcador (tal como el marcador fluorescente ficoeritrina ("PE")) en una composición de la divulgación. La composición se administra a sujetos experimentales adecuados. Los controles, por ejemplo, PE no conjugado o vehículo (solución salina) se administran a otro grupo o grupos de sujetos. La composición y los controles se dejan circular durante un período de 1 a 5 horas, después de lo cual se recogen los bazo y los hígados de los sujetos y se mide la fluorescencia. Las células específicas en las que se encuentra la fluorescencia pueden identificarse posteriormente. Las composiciones

de la divulgación, cuando se prueban de esta manera, muestran niveles más altos de concentración en las células presentadoras de antígeno del hígado en comparación con la PE no conjugada o el vehículo.

La eficacia en la modulación inmunitaria se puede probar midiendo la proliferación de células CD8⁺OT-I (trasplantadas a ratones huésped) en respuesta a la administración de una composición de la divulgación que incorpora un antígeno conocido, tal como la ovoalbúmina ("OVA"), en comparación con la administración de antígeno o vehículo únicamente. Las composiciones de la divulgación, cuando se prueban de esta manera, muestran un aumento de la proliferación de células OT1 en comparación con el antígeno solo o el vehículo, lo que demuestra un mayor cebado cruzado de células T CD8⁺. Para distinguir las células T que se expanden en un fenotipo efector funcional de las que se expanden y eliminan, las células T CD8⁺OT-I en proliferación se pueden analizar fenotípicamente para detectar signos moleculares de agotamiento [tales como la muerte programada-1 (PD-1), FasL y otros], así como la anexina-V como un sello distintivo de la apoptosis y, por lo tanto, de la eliminación. Las células T CD8⁺OT-I también pueden evaluarse en cuanto a su capacidad de respuesta a un desafío de antígeno con adyuvante con el fin de demostrar la falta de respuesta funcional y, por lo tanto, la tolerancia inmune hacia el antígeno. Para hacerlo, las células se analizan en busca de firmas inflamatorias después de la administración de las composiciones de la divulgación a ratones huésped seguido de una exposición al antígeno. Las composiciones de la divulgación cuando se prueban de esta manera demuestran niveles muy bajos (por ejemplo, de fondo) de respuestas inflamatorias de células T CD8⁺OT-I hacia OVA, demostrando así tolerancia inmune.

La respuesta inmune humoral puede ensayarse administrando una composición de la divulgación que incorpora un antígeno conocido, tal como OVA, en comparación con la administración del antígeno o vehículo solamente, y midiendo los niveles de anticuerpos resultantes. Las composiciones de la divulgación cuando se prueban de esta manera muestran niveles muy bajos (por ejemplo, de fondo) de formación de anticuerpos en respuesta a su administración y la administración del vehículo, con niveles significativamente más altos de formación de anticuerpos en respuesta a la administración del antígeno.

La eficacia en la tolerancia contra un antígeno se puede probar como anteriormente con referencia a la respuesta inmune humoral, cuando varias semanas después del tratamiento o tratamientos con una composición de la divulgación, un grupo de sujetos es desafiado por la administración del antígeno solo, seguido de la medición de los niveles de anticuerpos contra el antígeno. Las composiciones de la divulgación cuando se prueban de esta manera muestran bajos niveles de formación de anticuerpos que responden a la exposición al antígeno en grupos tratados previamente con tales composiciones en comparación con grupos que no se trataron previamente.

Los modelos experimentales centrados en la enfermedad son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen el modelo de ratón NOD (o diabético no obeso) de autoinmunidad y tolerancia y el modelo EAE (encefalomielitis autoinmune experimental) para la enfermedad desmielinizante inflamatoria humana, esclerosis múltiple. En particular, el ratón NOD desarrolla diabetes autoinmune espontánea (similar a la diabetes tipo 1a en humanos). Se tratan grupos de ratones NOD con compuesto de prueba o un control negativo, seguido de la medición de GLUCOSA EN SANGRE. El tratamiento exitoso corresponde a la probabilidad de tratar la diabetes en humanos o la prueba del mecanismo para enfoques para el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes (véase, por ejemplo, Anderson y Bluestone, Annu. Rev. Immunol.2005; 23: 447-85).

Administración

Las composiciones y composiciones para uso de la divulgación se administran en una dosis terapéuticamente eficaz, por ejemplo, una dosis suficiente para proporcionar tratamiento para los estados patológicos descritos anteriormente. La administración de los compuestos de la divulgación o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos puede ser a través de cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que tienen utilidades similares.

Aunque los niveles de dosificación en humanos aún no se han optimizado para los compuestos de la divulgación, estos pueden extrapolarse inicialmente de las dosis de aproximadamente 10 µg a 100 µg administradas a ratones. Generalmente, una dosis humana individual es de aproximadamente 0,01 a 2,0 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a 1,5 mg/kg de peso corporal y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,3 a 1,0 mg/kg de peso corporal. El tratamiento se puede administrar durante un solo día o un período de días, y se puede repetir a intervalos de varios días, una o varias semanas, o uno o varios meses. La administración puede ser como una dosis única (por ejemplo, como un bolo) o como un bolo inicial seguido de una infusión continua de la porción restante de una dosis completa a lo largo del tiempo, por ejemplo, de 1 a 7 días. La cantidad de compuesto activo administrado dependerá, por supuesto, de cualquiera o de todos los siguientes factores: el sujeto y el estado de enfermedad que se está tratando, la gravedad de la afección, la forma y programa de administración y el criterio del médico que prescribe. También se apreciará que las cantidades administradas dependerán del peso molecular del antígeno, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o ligando, así como del tamaño del enlazador.

Las composiciones y composiciones para uso de la divulgación se pueden administrar solas o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Aunque se contemplan todas las vías de administración típicas,

actualmente se prefiere proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para inyección. Las formulaciones incluirán típicamente un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y una composición de la divulgación o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, estas composiciones pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos y similares, que incluyen, entre otros, la proteína terapéutica, péptido, anticuerpo o molécula similar al anticuerpo correspondiente al antígeno (X) empleado en la composición de la divulgación y otros agentes activos que pueden actuar como agentes inmunomoduladores y más específicamente pueden tener efectos inhibidores sobre las células B, que incluye antifolatos, inmunosupresores, citostáticos, inhibidores mitóticos y anti-metabolitos, o combinaciones de los mismos.

Generalmente, dependiendo del modo de administración pretendido, la composición farmacéuticamente aceptable contendrá aproximadamente 0,1% a 95%, preferiblemente aproximadamente 0,5% a 50%, en peso de una composición de la divulgación, siendo el resto excipientes, vehículos farmacéuticos adecuados, etc. Se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contengan el ingrediente activo en el intervalo de 0,005% a 95% pudiéndose preparar el resto a partir del vehículo no tóxico.

Las composiciones líquidas administrables farmacéuticamente se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, dispersando, etc., una composición activa de la divulgación (por ejemplo, un polvo liofilizado) y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua (agua para inyección), solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol o similares (excluidas las galactosas), para formar así una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes solubilizantes, agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina y oleato de trietanolamina, etc., osmolitos, aminoácidos, azúcares y carbohidratos, proteínas y polímeros, sales, tensioactivos, quelantes y antioxidantes, conservantes y ligandos específicos. Los métodos reales de preparación de tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Pharmaceutical Press, 22a edición, 2012. La composición o formulación a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad del compuesto activo en una cantidad eficaz para tratar los síntomas del sujeto que está siendo tratado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la divulgación descrita anteriormente, así como para establecer los mejores modos contemplados para llevar a cabo el primer o segundo aspecto de la invención. Se entiende que estos ejemplos de ninguna manera sirven para limitar el verdadero alcance de esta divulgación, sino que se presentan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1

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

1A. Fórmula 103' en la que X' es OVA y m es 4

En un tubo sin endotoxina, se añadió OVA (5,0 mg, 0,00012 mmol) a 100 µl de PBS pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM y se agitó. Por separado, se disolvió 1 mg de reactivo de Traut en 100 µl de PBS pH 7,0 y se añadieron 16 µl (0,00119 mmol) de la solución de reactivo de Traut así obtenida a la solución agitada de OVA con agitación continua. Después de 1 hora, se eliminó el reactivo de Traut en exceso usando una columna centrífuga de exclusión por tamaño para proporcionar el producto correspondiente de Fórmula 103'.

1B. Fórmula 106A en la que n es 80

En un tubo sin endotoxina, se disolvió galactosamina (10,0 mg, 0,04638 mmol) con agitación en 100 µl de PBS pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM. Se añadió éster de piridil-ditiol-poli(etilenglicol)-NHS (Fórmula 104 en la que n es 80) (16,23 mg, 0,00464 mmol) disuelto en 100 µl de PBS de pH 7,0 a la solución en agitación de galactosamina. Después de 1 hora, la piridil-ditiol-poli(etilenglicol)-N-acetilgalactosamina resultante (Fórmula 106A) estaba lista para usarse sin purificación adicional.

1C. Fórmula 1aA en la que X' es OVA, m es 4, n es 80 (y Z' es galactosamina C2)

El conjugado de OVA-Traut purificado de Fórmula 103' preparado en el Ejemplo 1A se añadió directamente al producto de agitación de Fórmula 106A preparado en el Ejemplo 1B. Después de 1 hora, el producto resultante de Fórmula 1a se purificó haciendo pasar la mezcla de reacción a través de una columna centrífuga de exclusión por tamaño. La caracterización (UHPLC SEC, electroforesis en gel) confirmó la identidad del producto (véase la Figura 5).

1D. Otros compuestos de fórmula 103'

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1A y sustituyendo OVA con lo siguiente:

- Abciximab,
- Adalimumab,
- 5 • Agalsidasa alfa,
- Agalsidasa beta,
- Aldeslukina,
- Alglucosidasa alfa,
- Factor VIII,
- 10 • Factor IX,
- L-asparaginasa,
- Laronidasa,
- Octreótido,
- Fenilalanina amoniaco liasa,
- 15 • Rasburicasa,
- Insulina (SEQ ID NO: 5),
- GAD-65 (SEQ ID NO: 6),
- IGRP (SEQ ID NO: 7)
- MBP (SEQ ID NO: 8),
- 20 • MOG (SEQ ID NO: 9),
- PLP (SEQ ID NO: 10),
- MBP13-32 (SEQ ID NO: 11),
- MBP83-99 (SEQ ID NO: 12),
- MBP111-129 (SEQ ID NO: 13),
- 25 • MBP146-170 (SEQ ID NO: 14),
- MOG1-20 (SEQ ID NO: 15),
- MOG35-55 (SEQ ID NO: 16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO: 17),
- MART1 (SEQ ID NO: 18),
- 30 • Tirosinasa (SEQ ID NO: 19),
- PMEL (SEQ ID NO: 20),
- Acuaporina-4 (SEQ ID NO: 21),
- S-arrestina (SEQ ID NO: 22),
- IRBP (SEQ ID NO: 23),
- 35 • Conaraquina (UNIPROT Q6PSU6),
- Alfa-gliadina nativa de "33 mer" (SEQ ID NO: 24),
- Alfa-gliadina desamidada de "33mer" (SEQ ID NO: 25),
- Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26),
- Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27),
- 40 • Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- Albúmina de gato (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT 018873),
- Albúmina de perro (UNIPROT P49822) y
- Ejemplo de RhCE (UNIPROT P18577).

se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 103'en la que:

- X es Abciximab y m es 10,
- X es Adalimumab y m es 11,
- 50 • X es agalsidasa alfa y m es 14,
- X es agalsidasa beta y m es 14,
- X es Aldeslukina y m es 6,
- X es Alglucosidasa alfa y m es 13,
- X es Factor VIII y m es 100,
- 55 • X es Factor IX y m es 18,
- X es L-asparaginasa y m es 5,
- X es Laronidasa y m es 7,
- X es Octreótido y m es 1,
- X es Fenilalanina amoniaco liasa y m es 12,
- 60 • X es Rasburicasa y m es 12,
- X es Insulina (SEQ ID NO: 5) y m es 2,
- X es GAD-65 (SEQ ID NO: 6) y m es 8,

- X es IGRP (SEQ ID NO: 7) y m es 7,
- X es MBP (SEQ ID NO: 8) y m es 6,
- X es MOG (SEQ ID NO: 9) y m es 5,
- X es PLP (SEQ ID NO: 10) y m es 8,
- 5 • X es MBP13-32 (SEQ ID NO: 11) y m es 1,
- X es MBP83-99 (SEQ ID NO: 12) y m es 1,
- X es MBP111-129 (SEQ ID NO: 13) y m es 1,
- X es MBP146-170 (SEQ ID NO: 14) y m es 2,
- X es MOG1-20 (SEQ ID NO: 15) y m es 1,
- 10 • X es MOG35-55 (SEQ ID NO: 16) y m es 2,
- X es PLP139-154 (SEQ ID NO: 17) y m es 3,
- X es MART1 (SEQ ID NO: 18) y m es 4,
- X es Tirosinasa (SEQ ID NO: 19) y m es 8,
- X es PMEL (SEQ ID NO: 20) y m es 5,
- 15 • X es Acuaporina-4 (SEQ ID NO: 21) y m es 4,
- X es S-arrestina (SEQ ID NO: 22) y m es 12,
- X es IRBP (SEQ ID NO: 23) y m es 21,
- X es Conaraquina y m es 21,
- X es Alfa-gliadina nativa de "33mer" (SEQ ID NO: 24) y m es 1,
- 20 • X es Alfa-gliadina desamidada de "33mer" (SEQ ID NO: 25) y m es 1,
- X es Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y m es 1,
- X es Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27) y m es 1,
- X es Fel d 1 y m es 4,
- X es Albúmina de gato y m es 16,
- 25 • X es Can f1 y m es 6,
- X es Albúmina de perro y m es 23, y
- X es un ejemplo de RhCE y m es 10.

1E. Otros compuestos de Fórmula 1aA

30 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1C y sustituyendo los compuestos de Fórmula 103', por ejemplo como se obtuvo en el Ejemplo 1D, se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1aA:

- F1aA-Abciximab-m₁₀-n₈₀,
- 35 • F1aA-Adalimumab-m₁₁-n₈₀,
- F1aA-Agalsidasa alfa-m₁₄-n₈₀,
- F1aA-Agalsidasa beta-m₁₄-n₈₀,
- F1aA-Aldeslukin-m₆-n₈₀,
- F1aA-Alglucosidasa alfa-m₁₃-n₈₀,
- 40 • F1aA-Factor VIII-m₁₀₀-n₈₀,
- F1aA-Factor IX-m₁₈-n₈₀,
- F1aA-L-asparaginasa-m₅-n₈₀,
- F1aA-Aaronidasa-m₇-n₈₀,
- F1aA-Octreótido-m₁-n₈₀,
- 45 • F1aA-Fenilalanina amoniaco-liasa-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-Rasburicasa-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-Insulina-m₂-n₈₀,
- F1aA-GAD-65-m₈-n₈₀,
- F1aA-IGRP-m₇-n₈₀,
- 50 • F1aA-MBP-m₆-n₈₀,
- F1aA-MOG-m₅-n₈₀,
- F1aA-PLP-m₈-n₆₆,
- F1aA-MBP13-32-m₁-n₈₀,
- F1aA-MBP83-99-m₁-n₈₀,
- 55 • F1aA-MBP111-129-m₁-n₈₀,
- F1aA-MBP146-170-m₂-n₈₀,
- F1aA-MOG1-20-m₁-n₈₀,
- F1aA-MOG35-55-m₂-n₈₀,
- F1aA-PLP1 39-154-m₃-n₈₀,
- 60 • F1aA-MART1-m₄-n₈₀,
- F1aA-Tirosinasa-m₈-n₈₀,
- F1aA-PMEL-m₅-n₈₀,

- F1aA-Acuaporina-4-m₄-n₈₀,
- F1aA-S-arrestin-m₁₂-n₈₀,
- F1aA-IRBP-m₂₁-n₈₀,
- F1aA-Conaraquina-m₂₁-n₈₀,
- 5 • F1aA-Alfa-gliadina nativo de "33mer"-m₁-n₈₀,
- F1aA-Alfa-gliadina desamidada de "33mer"-m₁-n₈₀,
- F1aA-Alfa-gliadina-m₁-n₈₀,
- F1aA-Omega-gliadina-m₁-n₈₀,
- F1aA-Fel d 1-m₄-n₈₀,
- 10 • F1aA-Albúmina de gato-m₁₆-n₈₀,
- F1aA-Can f 1-m₆-n₈₀,
- F1aA-Albúmina de perro-m₂₃-n₈₀, y
- F1aA-RhCE-m₁₀-n₈₀.

15 1F. Otros compuestos de fórmula 106A

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1B y sustituyendo el éster de piridil-ditiol-poli(etilenglicol)-NHS (Fórmula 104 en la que n es 80) con lo siguiente:

- 20 • Fórmula 104 en la que n es 12,
- Fórmula 104 en la que n es 33,
- Fórmula 104 en la que n es 40,
- Fórmula 104 en la que n es 43,
- Fórmula 104 en la que n es 50,
- 25 • Fórmula 104 en la que n es 60,
- Fórmula 104 en la que n es 75 y
- Fórmula 104 en la que n es 80.

se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 106A en la que:

- 30 • n es 12,
- n es 33,
- n es 40,
- n es 43,
- 35 • n es 50,
- n es 60,
- n es 75 y
- n es 84.

40 1G. Otros compuestos de Fórmula 1aA

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1E y sustituyendo el compuesto de Fórmula 106A con los compuestos obtenidos en el Ejemplo 1F, se obtienen los correspondientes compuestos de Fórmula 1aA en la que n es 12, 33, 40, 43, 50, 60, 75 y 84, tal como:

- 45 • F1aA-insulina-m₂-n₁₂,
- F1aA-insulina-m₂-n₃₃,
- F1aA-insulina-m₂-n₄₀,
- F1aA-insulina-m₂-n₄₃,
- 50 • F1aA-insulina-m₂-n₅₀,
- F1aA-insulina-m₂-n₆₀,
- F1aA-Insulin-m₂-n₇₅, y
- F1aA-Insulina-m₂-n₈₄.

55 Ejemplo 2

F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄-2NACGAL

2A. Fórmula 103 en la que X' es ovoalbúmina y m es 1

- 60 En un tubo sin endotoxinas, se añadió OVA (6,5 mg, 0,000155 mmol) a 200 µl de PBS pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM y se agitó. Por separado, se disolvió 1 mg de reactivo de Traut en 100 µl de PBS pH 7,0 y se añadieron 43 µl (0,00310 mmol) de la solución de reactivo de Traut así obtenida a la solución agitada de OVA con agitación

continua. Después de 1 hora, se eliminó el reactivo de Traut sin reaccionar usando una columna centrífuga de exclusión por tamaño para producir el producto de Fórmula 103'.

2B. Fórmula 1b en la que X'es ovoalbúmina, m es 1, n es 4, p es 34, R⁹ es un enlace directo y Z'es 2NAcGAL

En un tubo de microcentrífuga, se solubilizó poli(metacrilato de galactosamina)-(disulfuro de piridilo) (Fórmula 201) (20,0 mg, 0,0020 mmol) en 50 µl de PBS pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM. A esto se le añadió el producto OVA-Traut purificado del Ejemplo 2A seguido de agitación durante 1 hora. El producto resultante de Fórmula 1b se purificó pasando la mezcla de reacción a través de una columna centrífuga de exclusión por tamaño. La caracterización (UHPLC SEC, electroforesis en gel) confirmó la identidad del producto (véase la Figura 5).

2C. Otros compuestos de Fórmula 1b

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2B y sustituyendo los compuestos de Fórmula 103', por ejemplo como se obtuvo en el Ejemplo 1D, se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1b:

- F1b-Abciximab-m₁₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Adalimumab-m₁₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-agalsidasa alfa-m₁₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-agalsidasa beta-m₁₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Aldeslukina-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-alglucosidasa alfa-m₁₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1 b-Factor VIII-m₁₀₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Factor IX-m₁₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-L-asparaginasa-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Laronidasa-m₇-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Octreótido-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Fenilalanina amoniaco-liasa-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Rasburicasa-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Insulina-m₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-GAD-65-m₈-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-IGRP-m₇-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MOG-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PLP-m₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP13-32-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP83-99-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP111-129-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MBP146-170-m₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1 b-MOG1-20-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-MOG35-55-m₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PLP139-154-m₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1 b-MART1-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Tirosinasa-m₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-PMEL-m₅-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Acuaporina-4-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-S-arrestina-m₁₂-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-IRBP-m₂₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Conaraquina-m₂₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Alfa-gliadina nativa de "33mer"-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Aalfa-gliadina desaminada de "33mer"-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Alfa-gliadina-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Omega-gliadina-m₁-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Fel d 1-m₄-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Albúmina de gato-m₁₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Can f 1-m₆-n₄-p₃₄-2NAcGAL,
- F1b-Albúmina de perro-m₂₃-n₄-p₃₄-2NAcGAL, y
- F1b-RhCE-m₁₀-n₄-p₃₄-2NAcGAL.

Ejemplo 3

F1f-OVA-m₁-n₄-p₃₃-2NAcGAL

3A. Fórmula 1f en la que X'es ovoalbúmina y m es 1, n es 4, p es 33, R⁹ es un enlace directo y Z'es 2NAcGAL

En un tubo sin endotoxina, se añadió OVA (4,0 mg, 0,0000952381 mmol) a 0,1 ml de PBS de pH 7,4 y se agitó. Por separado, se añadió carbonato de poli(n-acetilgalactosamina)-p-nitrofenilo de Fórmula 601 en la que n es 4 y p es 33 (33,0 mg, 0,002380952 mmol) a 100 µl de PBS de pH 7,5 y se agitó con agitación tipo vórtice hasta que se disolvió. Las dos soluciones se combinaron y la mezcla se agitó vigorosamente durante 1 hora. Después, la mezcla se recogió y se dializó durante 3 días frente a PBS de pH 7,4 (corte de peso molecular 30 kDa) para proporcionar el producto de Fórmula 1f.

Ejemplo 4

F1g-PVA-m₁-p₉₀-2NAcGAL

4A. Fórmula 1q en la que X'es ovoalbúmina y m es 1, p es 90, R⁹ es un enlace directo y Z'es 2NAcGAL

En un tubo sin endotoxina, se añadió OVA (5,0 mg, 0,000119048 mmol) a 0,2 ml de PBS de pH 7,4 y se agitó. A la solución en agitación se le añadieron 75 mg (0,00297619 mmol) de poli(metacrilato de galactosamina)-NHS (Fórmula 701) disuelto en 0,4 ml de PBS de pH 7,4. Se dejó agitar la mezcla durante 2 horas. Después, la mezcla se recogió y se dializó durante 3 días frente a PBS de pH 7,4 (corte de peso molecular de 30 kDa) para proporcionar el producto de Fórmula 1q.

Ejemplo 5

F1h-OVA-m₂-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL

5A. Fórmula 802' en la que X' es ovoalbúmina, m es 2 y n es 45

En un tubo sin endotoxina, se añadió OVA (3,0 mg, 0,0000714286 mmol) a 150 µl de PBS de pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM y se agitó. Se añadió dibenzociclooctina-PEG- carbonato de p-nitrofenilo (Fórmula 801) (5,265 mg, 0,002142857 mmol) disuelto en DMF a la solución de OVA y se agitó durante 1 hora. El exceso de dibenzociclooctina-PEG-(carbonato de p-nitrofenilo) se eliminó usando una columna centrífuga de exclusión por tamaño para producir el producto de Fórmula 802'.

5B. Fórmula 1h en la que X'es ovoalbúmina, m es 2, n es 45, p es 55, q es 4, R⁸ es CH₂, R⁹ es un enlace directo y Z'es 2NAcGAL

Se disolvió poli(metacrilato de galactosamina)-N3 (Fórmula 803 en la que p es 55, q es 4 y Z'es N-acetilgalactosamina) (33 mg, 0,002142857 mmol) en 100 µl de PBS de pH 7,4 y se añadió al producto del Ejemplo 5A con agitación. Después de 1 hora, el producto resultante de Fórmula 1h se purificó mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño.

Ejemplo 6

F1j-OVA-m₁₀-n₄₅-p₅₅-q₄-2NAcGAL

6A. Fórmula 103' en la que X' es ovoalbúmina y m es 10

En un tubo sin endotoxina, se añadió OVA (5,0 mg, 0,00019 mmol) a 150 µl de PBS de pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM y se agitó. Por separado, se disolvió 1 mg de reactivo de Traut en 100 µl de PBS de pH 7,0 y se añadieron 16 µl (0,0019 mmol) de la solución de reactivo de Traut así obtenida a la solución agitada de OVA con agitación continua. Después de 1 hora, se eliminó el reactivo de Traut sin reaccionar usando una columna centrífuga de exclusión por tamaño para producir el producto de Fórmula 103'.

6B. Fórmula 902' en la que X'es ovoalbúmina, m es 10 y n es 45

Se disolvió dibenzociclooctina-PEG-(disulfuro de piridilo) (Fórmula 901 en la que n es 45) (6,0 mg, 0,00238 mmol) en DMF y la solución resultante se añadió a la solución de OVA obtenida en el Ejemplo 6A y se agitó durante 1 hora. El exceso de dibenzociclooctina-PEG-(disulfuro de piridilo) se eliminó usando cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño para proporcionar el producto de Fórmula 902'.

6C. Fórmula 1j en la que X'es ovoalbúmina, m es 10, n es 45, p es 55, q es 4, R⁸ es CH₂, R⁹ es un enlace directo y Z'es 2NAcGAL

Se disolvió poli(metacrilato de galactosamina)-N3 (Fórmula 803 en la que p es 55, q es 4 y Z'es N-acetilgalactosamina) (36 mg, 0,00238 mmol) en 150 µl de PBS de pH 7,4 y se añadió al producto del Ejemplo 6B con agitación. Después de 1 hora, el producto resultante de Fórmula 1j se purificó (se eliminó el exceso de p(GMA)-

N3) mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño. La caracterización (UHPLC SEC, electroforesis en gel) confirmó la identidad del producto.

Ejemplo 7

F1L-OVA-m₂-n₈₀-p₅₅-q₄-2NACGAL

7A. Fórmula 1002 en la que X'es ovoalbúmina, m es 2 y n es 80

Se disolvió dibenzociclooctina-PEG-(disulfuro de piridilo) (Fórmula 1001 en la que n es 80) (9,0 mg, 0,00238 mmol) en DMF y la solución resultante se añadió a una solución de OVA purificada de Fórmula 103' (en la que X' es ovoalbúmina y m es 2), por ejemplo preparada como se describe en el Ejemplo 6A y agitado durante 1 hora. El exceso de dibenzociclooctina-PEG-(disulfuro de piridilo) se eliminó usando cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño para proporcionar el producto de Fórmula 1002.

7B. Fórmula 1L en la que X'es ovoalbúmina, m es 2, n es 80, p es 55, q es 4, R⁸ es C_{H2}, R⁹ es un enlace directo y Z'es 2NACGAL

Se disolvió poli(metacrilato de galactosamina)-N3 (Fórmula 803 en la que p es 55, q es 4 y Z'es N-acetilgalactosamina) (36 mg, 0,00238 mmol) en 150 µl de PBS de pH 7,4 y se añadió al producto del Ejemplo 7A con agitación. Después de 1 hora, el producto resultante de Fórmula 1L se purificó (se eliminó el exceso de poli(metacrilato de galactosamina)-N3) mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño. La caracterización (UHPLC SEC, electroforesis en gel) confirmó la identidad del producto.

Ejemplo 8

Preparación de polímeros de poli(metacrilato de galactosamina)

8A. Metacrilato de galactosamina

A hidrocloreto de galactosamina agitado (2,15 g, 10,0 mmol) se le añadió metóxido de sodio 0,5 M (22 ml, 11,0 mmol). Después de 30 minutos, se añadió anhídrido de metacrilato (14,694 g, 11,0 mmol) y se continuó agitando durante 4 horas. El metacrilato de galactosamina resultante se cargó en gel de sílice mediante un evaporador rotatorio y se purificó mediante cromatografía en columna usando DCM:MeOH (85:15).

8B. Fórmula 201 en la que n es 4 y p es 30

Se añadieron metacrilato de galactosa (600 mg, 2,43 mmol), 2-((fenilcarbonotioil)tio)acetato de 2-(2-(2-(piridin-2-ildisulfanil)etoxi)etoxi)etoxi)etilo (44,8 mg, 0,081 mmol) y AIBN (3,174089069 mg, 0,016 mmol) a 1,5 ml de DMF en un matraz Schlenk. La mezcla de reacción se sometió a 4 ciclos de congelación-descongelación y luego se agitó a 70°C durante 6 horas. El producto polimérico deseado de Fórmula 201 se precipitó en 12 ml de metanol y el exceso de disolvente se eliminó a presión reducida.

Ejemplo 9

Preparación de F1aA-PE-m₃-n₈₀

9A. Fórmula 103' en la que X' es ficoeritrina

En un tubo sin endotoxina, se añadió ficoeritrina ("PE") (adquirida a través de Pierce) (200 µl, 0,000004 mmol) a 50 µl de PBS de pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM y se agitó. Por separado, se disolvió 1 mg de reactivo de Traut en 100 µl de PBS de pH 7,0 y se añadieron 21 µl (0,00013 mmol) de la solución de reactivo de Traut así obtenida a la solución agitada de PE con agitación continua. Después de 1 hora, se eliminó el reactivo de Traut en exceso usando una columna centrífuga de exclusión por tamaño para producir el producto de Fórmula 103'.

9B. Fórmula 106A en la que n es 80

En un tubo sin endotoxina, se disolvió galactosamina (7,0 mg, 0,03246 mmol) con agitación en 100 µl de PBS de pH 8,0 que contenía EDTA 5 mM. Se añadió éster de piridil-ditiol-poli (etilenglicol)-NHS (fórmula 104 en la que n es 80) (16,23 mg, 0,00464 mmol) disuelto en 50 µl de PBS de pH 7,0 a la solución en agitación de galactosamina. Después de 1 hora, el producto resultante de Fórmula 106A estaba listo para usarse sin purificación adicional.

9C. Fórmula 1a en la que X'es ficoeritrina, m es 3, n es 80 y Z' es galactosamina

Los conjugados de PE-Traut purificados preparados en el Ejemplo 9A se añadieron directamente al producto en agitación de Fórmula 106A preparado en el Ejemplo 9B. Después de 1 hora, el producto resultante de Fórmula 1a se

purificó haciendo pasar la mezcla de reacción a través de una columna centrífuga de exclusión por tamaño. La caracterización (UHPLC SEC, electroforesis en gel) confirmó la identidad del producto.

5

Ejemplo 10

10 OVA-DOM

10 A. Preparación del vector de expresión

El vector de expresión de células de mamífero pSecTag A se adquirió a través de Life Technologies. El gen que codifica el anticuerpo anti-dominio ASGPR, Dom26h-196-61, denominado en el presente documento como "DOM", se adquirió como una secuencia de codones optimizados para la expresión de proteínas en células humanas, a través del proveedor Genscript. Las secuencias que codifican OVA, DOM, el enlazador flexible Gly₃Ser y la etiqueta 6xHis se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pSecTag A, en el terminal C a la secuencia guía de secreción de la cadena de Ig, mediante mutagénesis dirigida al sitio, siguiendo una variación del protocolo QuikChange (Geiser et al.)

10B. Expresión y purificación de la Fórmula 2 en la que m'es 1, m'es 0, X es ovoalbúmina, Y es Gly₃Ser, Z es Anti-ASGPR Dom26h-196-61

Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con vectores pSecTag A modificados, preparados, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 10A, usando polietilenimina. Las células transfectadas se cultivaron en medio FreeStyle 293 (Life Technologies) suplementado con ácido valproico durante 7 días, después de lo cual las células se retiraron por centrifugación y los sobrenadantes del cultivo se recogieron y esterilizaron por filtración. Las proteínas de fusión OVA/DOM de Fórmula 2 se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados utilizando una columna de sefrosa HisTrap Ni²⁺ (GE Healthcare), seguida de cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare), que tiene la siguiente estructura generalizada:
N- OVA- Gly₃Ser- DOM- Gly₃Ser-6xHis -C
y la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRQINKVVRFDKLPFGGDSI
EAQCGTSVNVHSSRLDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYIPILPEYLQCVKELYRGGLLEPINFQTAA
DQARELINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQES
KPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTETWSSNVM
EERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSLVMAMGITDVFSSANLSGSSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVV
GSAEAGVDAASVSEEFRAHPFLFCIKHIATNAVLFGRGVSPGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRL
SCAASGFTFEKYAMAWWRQAPGKLEWWSRISARGVTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLLTVSSGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:28)
```

La pureza de la proteína se verificó mediante tinción con azul brillante de Coomassie de geles SDS-PAGE y transferencia Western anti-etiqueta 6xHis. La concentración de proteínas se determinó mediante la Ley de Beer-Lambert, para lo cual se midió la absorbancia a 280 nm con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), y el peso molecular (57,3 kDa) y el coeficiente de extinción (57.090 M⁻¹ cm⁻¹) se estimaron a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína, utilizando la herramienta ExPASy ProtParam. Los niveles de endotoxinas se midieron utilizando la línea celular indicadora HEK-BLUE TLR (Invivogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10C. Otras composiciones de Fórmula 2

Siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 10A y 10B y sustituyendo los vectores pSecTag A en consecuencia, se obtuvieron las siguientes proteínas de fusión de Fórmula 2:

N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C

que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWWRQAPGKGLEWWSRISARGVTTYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGLTVTVSSGGGSGSIGAAS
MEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAkdSTRtQINKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTS
VNVHSSSLRDILNQITKPNdVYSFSLASRLYAERYPIlPEYLQCVKELyRGGLEPINFQTAADQARELIN
SWVESQTNgiRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMY
QIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVY
LPRMKMEEKYNLTsvLMAMGITdVFSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGV
DAASVSEEFRAHDPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:29);

y
N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

5

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAkdSTRtQINKVVRFDKLPFGGDSI
EAQCGTSVNVHSSSLRDILNQITKPNdVYSFSLASRLYAERYPIlPEYLQCVKELyRGGLEPINFQTA
DQARELINSWVESQTNgiRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQES
KPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNV
MEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTsvLMAMGITdVFSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREV
VGSAEAGVDAASVSEEFRAHDPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRL
SCAASGFTFEKYAMAWWRQAPGKGLEWWSRISARGVTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGLTVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIF
YCPIAIMSALAMVYLGAkdSTRtQINKVVRFDKLPFGGDSIEAQCGTSVNVHSSSLRDILNQITKPNdVY
SFSLASRLYAERYPIlPEYLQCVKELyRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNgiRNVLQPSSV
DSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELP
FASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTsvLMAMG
ITdVFSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRAHDPFLFCIKHI
ATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:30).

10D. Otras composiciones de Fórmula 2

10 Siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 10A y 10B y sustituyendo por Gly₃Ser los vectores para un enlazador que tiene un sitio de escisión de inmunoproteasoma ("IPC"), y por OVA los vectores para:

15 MBP13-32 (SEQ ID NO: 11),
MBP83-99 (SEQ ID NO: 12),
MBP111-129 (SEQ ID NO: 13),
MBP146-170 (SEQ ID NO: 14),
MOG1-20 (SEQ ID NO: 15),
MOG35-55 (SEQ ID NO: 16) y
PLP139-154 (SEQ ID NO: 17),

20

o los vectores para:

Alfa-gliadina desamidada de "33mer" (SEQ ID NO: 25)
Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y
25 Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27),

se obtienen las siguientes proteínas de fusión de Fórmula 2:

- 30 • MBP13-32-IPC-MBP83-99-IPC-MBP111-129-IPC-MBP146-170-IPC-MOG1-20-IPC-MOG35-55-IPC-PLP139-154-IPC-DOM, y
- Alfa-gliadina desamidada de "33mer"-IPC-Alfa-gliadina-IPC-Omega-gliadina-IPC-DOM.

Ejemplo 11

35 OVA desialilada

11A. Preparación del vector de expresión

40 El vector de expresión de células de mamífero pSecTag A se adquirió a través de Life Technologies. Las secuencias que codifican OVA, el enlazador flexible Gly₃Ser y la etiqueta 6xHis se clonaron en pSecTag A, terminal C a la secuencia guía de secreción de la cadena κ de Ig, mediante mutagénesis dirigida al sitio, siguiendo una variación del protocolo de QuikChange (Geiser, et al.)

11B. Expresión y purificación de OVA

Las células HEK293 se transfectaron transitoriamente con el vector pSecTag A modificado, preparado por ejemplo como se describe en el Ejemplo 10A, usando polietilenimina. Las células transfectadas se cultivaron en medio FreeStyle 293 (Life Technologies) suplementado con ácido valproico durante 7 días, después de lo cual las células se retiraron por centrifugación y los sobrenadantes del cultivo se recogieron y esterilizaron por filtración. La proteína OVA se purificó del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados utilizando una columna de sefarosa HisTrap Ni²⁺ (GE Healthcare), seguida de cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 (GE Healthcare), que tiene la siguiente estructura:

N'-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C'

y la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRQINKVVRFDKLPFGFDSI
EAQCGTSTNVHSSLRDILNQITKPNVDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAA
DQARELINSWVESQTNGIIRNVLPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQES
KPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLSEINFEKLTETWSSNMV
EERKIKVYLPKMKMEKYNLTSVLMAMGITDVFSANLSSGSSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVV
GSAEAGVDAASVSEEFRAHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH (SEQ ID NO:31)

```

La pureza de la proteína se verificó mediante tinción con azul brillante de Coomassie de geles SDS-PAGE y transferencia Western anti-etiqueta 6xHis. La concentración de proteínas se determinó mediante la Ley de Beer-Lambert, para lo cual se midió la absorbancia a 280 nm con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), y se midió el peso molecular (43,8 kDa) y el coeficiente de extinción (31.525 M⁻¹ cm⁻¹), estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína, utilizando la herramienta ExPASy ProtParam.

11C. Desialilación

Se desialiló OVA mediante incubación con neuraminidasa durante 1 hora a 37°C (New England Biolabs). OVA desialilada se purifica a partir de la mezcla de reacción mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (por ejemplo, usando una columna de sefarosa HisTrap Ni²⁺, GE Healthcare), seguida de cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, usando una columna Superdex 75, GE Healthcare).

La pureza de la proteína se verifica mediante tinción con azul brillante de Coomassie de geles SDS-PAGE y transferencia Western anti-etiqueta 6xHis. La desialilación se verifica mediante la detección con base en lectina de Sambucus nigra del contenido de ácido siálico de proteína en transferencias Western (Vector Biolabs) y mediante un ensayo de fluorescencia mediado por ácido siálico (ProZyme). La concentración de proteína desialilada se determina usando la Ley de Beer-Lambert, como se describió anteriormente para la proteína antes de la desialilación. Los niveles de endotoxinas se miden utilizando la línea celular indicadora HEK-Blue TLR4 (Invivogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 12

Distribución hepática

12A. Se preparó F1aA-PE-m₃-n₈₀, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 9. Se preparó una solución de 30 µg/100 µl en solución salina estéril para inyección.

La solución de F1aA-PE-m₃-n₈₀ (30 µg) se administró a uno de los tres grupos de 6 ratones negros C57 (3 por grupo) mediante inyección en la vena de la cola. Los otros dos grupos de ratones recibieron un volumen equivalente de ficoeritrina en 100 µl de solución salina o vehículo salino. Tres horas después de la administración, se recolectaron los hígados y bazo de estos animales y se determinó el nivel de fluorescentes celulares en estos órganos mediante citometría de flujo como una indicación del contenido de PE celular.

Como se muestra en la Figura 1, las células endoteliales sinusoidales (LSEC), hepatocitos, células de Kupffer (KC) y otras células presentadoras de antígeno (APC) de los hígados de ratones tratados con F1aA-PE-m₃-n₈₀ exhibieron al menos un aumento de tres veces en la fluorescencia en comparación con los animales que recibieron solución de PE. No se encontró ninguna diferencia detectable en la fluorescencia en las células del bazo recolectadas de los tres grupos. Estos resultados confirman que F1aA-PE-m₃-n₈₀ tiene suficiente especificidad para unirse a las células presentadoras de antígenos en el hígado.

12B. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 12A y sustituyendo F1aA-PE-m₃-n₈₀ con los compuestos F1b-PE-m₃-n₄-p₃₄-2NacGAL, F1f-PE-m₃-n₄-p₃₃-2NacGAL, F1g-PE-m₃-p₉₀-2NacGAL, F1h-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NacGAL, F1j-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NacGAL, F1l-PE-m₃-n₈₀-p₅₅-q₄-2NacGAL, F1m-PE-m₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, F1m-PE-m₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, F1n-PE-m₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc y F1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH, preparados,

por ejemplo, como se describe con referencia al Ejemplo 9 por sustitución de X en los Ejemplos 2B, 3, 4, 5B, 6B, 7B, 19G, 19L, 20B y 20F, respectivamente se confirma que los compuestos F1aA-PE-m₃-n₉₀ con los compuestos F1b-PE-m₃-n₄-p₃₄-2NacGAL, F1f-PE-m₃-n₄-p₃₃-2NacGAL, F1g-PE-m₃-p₉₀-2NacGAL, F1h-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NacGAL, F1j-PE-m₃-n₄₅-p₅₅-q₄-2NacGAL, F1L-PE-M₃-n₈₀-p₅₅-q₄-2NacGAL, F1m-PE-m₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, F1m-PE-m₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, F1n-PE-m₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc y F1n-PE-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH tienen suficiente especificidad para unirse a las células presentadoras de antígenos en el hígado.

Ejemplo 13

10 Proliferación de células T CD8⁺ OT1 específicas de antígeno

13A. Se preparó F1aA-OVA-m₄-n₈₀ sintetizado, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1, como una solución salina para inyección de 10 µg/100 µl. El día 0, se marcaron con fluorescencia 10⁶ células T OT-1 y se transfirieron adoptivamente a 3 grupos de ratones CD 45.2 (5 por grupo) mediante inyección en la vena de la cola. Al día siguiente (es decir, día 1), a cada uno de los 3 grupos de ratones se les administraron, respectivamente, 10 µg de F1aA-OVA-m₄-n₈₀, OVA o solución salina mediante inyección en la vena de la cola. El día 6, se sacrificaron los animales y se determinó el% de células OT-1 proliferantes esplénicas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia.

Los resultados de este estudio (véase la Figura 2) muestran que el porcentaje de células T OT1 proliferantes en ratones tratados con F1aA-OVA-m₄-n₈₀ ("Gal-OVA" en la Figura 2) fue significativamente mayor que el porcentaje de células OT1 en proliferación en los bazo de ratones tratados con OVA o solución salina ("sin tratamiento" en la Figura 2). El aumento en la proliferación de células OT1 demuestra el aumento de cebado cruzado de células T CD8⁺ en animales tratados con F1aA-OVA-m₄-n₈₀ frente a las otras terapias. De acuerdo con los resultados del Ejemplo 12, estos resultados indican que la capacidad de F1aA-OVA-m₄-n₈₀ para dirigir antígenos al hígado aumenta la presentación de OVA por las células presentadoras de antígeno en el hígado a células T OT1 específicas de OVA.

13B. Para distinguir las células T que se expandieron a un fenotipo efector funcional de las que se expandieron y eliminaron, se analizaron las células T CD8⁺OT1 en proliferación para determinar la anexina-V, como un sello distintivo de la apoptosis y, por lo tanto, la eliminación, así como el marcador de agotamiento programado muerte-1 (PD-1). Como se muestra en la Figura 3, F1aA-OVA-m₄-n₈₀ ("Gal-OVA" en la Figura 3) indujo un número mucho mayor de células T CD8⁺OT1 proliferante con anexina-V⁺ y PD-1⁺ que OVA soluble.

13C. Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 13A y 13B, y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈ con los compuestos de Fórmula 1 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G, se muestra que los compuestos de los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G inducen un número mucho mayor de células T CD8⁺OT1 que proliferan con anexina-V⁺ y PD-1⁺ que OVA soluble.

13D. Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 13A y 13B y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈ con los compuestos de Fórmulas 1 y 2 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F, y sustituyendo OVA con los antígenos correspondientes a X (o X'o X"), respectivamente, se muestra que los compuestos de los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F inducen un número mucho mayor de células T CD8⁺OT1 que proliferan con anexina-V⁺ y PD-1⁺ que el antígeno soluble X.

Ejemplo 14

F1aA-OVA-m₄-n₈ no induce una respuesta de anticuerpos específica de OVA

14A. Con el fin de evaluar la respuesta inmune humoral a F1aA-OVA-m₄-n₈, se trataron los ratones con una inyección iv semanalmente de F1aA-OVA-m₄-n₈ u OVA, luego se midieron los niveles de anticuerpos específicos de OVA en la sangre. En los días 0, 7 y 14 del experimento, se administró a los ratones una inyección iv de 100 µl de solución salina continuando con una de las siguientes opciones: 1.) 6 µg de OVA; 2.) 6 µg de F1aA-OVA-m₄-n₈; 3.) 30 µg de OVA; 4.) 30 µg de F1aA-OVA-m₄-n₈, o 5.) solución salina solamente. Cada grupo contenía 5 ratones. El día 19, se extrajo sangre de los ratones mediante punción en el pómulo y se determinó el título de anticuerpos específicos de OVA en la sangre de cada ratón mediante ELISA. Los resultados de este estudio muestran que aunque los ratones tratados con 6 y 30 µg de OVA tenían títulos de anticuerpos específicos de OVA aumentados, los ratones tratados con 6 y 30 µg de F1aA-OVA-m₄-n₈ ("Gal-OVA" en la Figura 4) tenían títulos en sangre similares a los de los ratones tratados con solución salina (es decir, animales tratados con vehículo) (Figura 4). Por ejemplo, los ratones tratados con 6 y 30 µg de OVA tenían un título promedio de anticuerpos de 3,5 y 2,5, respectivamente; mientras que los ratones tratados con 6 y 30 µg de OVA tenían un título promedio de anticuerpos de 0,75 y 0,25, respectivamente.

14B. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 14A y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈ con los compuestos de Fórmula 1 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G, se muestra que los

ratones tratados con los compuestos de los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G tienen títulos de anticuerpos específicos de OVA similares a los de los ratones tratados con solución salina.

14C. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 14A y sustituyendo **F1aA-OVA-m₄-n₈** con los compuestos de Fórmulas 1 y 2 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F, y sustituyendo OVA con los antígenos correspondientes a X (o X' o X''), respectivamente, se muestra que los ratones tratados con los compuestos de los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F tienen títulos de anticuerpos específicos del antígeno X similares a los de los ratones tratados con solución salina.

Ejemplo 15

F1aA-OVA-m₄-n₈ agota los anticuerpos específicos de OVA

15A. Se trataron ratones que tenían diferentes títulos en sangre de anticuerpos OVA (cada ratón tenía un título de 0 a 4,5) con una inyección iv de 20 µg de F1aA-OVA-m₄-n₈ solubilizado en 100 µl de solución salina. A los ratones se les administró inyecciones iv de F1aA-OVA-m₄-n₈ en los días 0, 5, 7, 12 y 14 (las inyecciones de F1aA-OVA-m₄-n₈ están etiquetadas como "Gal-OVA" y se muestran como flechas verdes en el eje x de la Figura 5). Con el fin de determinar la capacidad de F1aA-OVA-m₄-n₈ para agotar los anticuerpos en suero específicos de OVA, se extrajo sangre de los ratones el día -1 para establecer un título de anticuerpo inicial y luego se realizaron hemorragias posteriores después de cada inyección de F1aA-OVA-m₄-n₈ los días 2, 6, 9, 13 y 16. El título de anticuerpos para cada ratón se determinó mediante ELISA. Los resultados de este estudio muestran que F1aA-OVA-m₄-n₈ puede reducir los niveles de anticuerpos en suero en ratones. Por ejemplo, un día después de la primera inyección de F1aA-OVA-m₄-n₈ (es decir, el día 2), los ratones con títulos positivos de anticuerpos OVA experimentan una disminución de 5 a 100 veces en los niveles de anticuerpos en suero (Figura 5). Estos resultados muestran que aunque en el transcurso del experimento de 19 días, los títulos de anticuerpos aumentaron para ciertos ratones, los niveles de títulos nunca alcanzaron el título de anticuerpos inicial medido el día -1 y las dosis posteriores de F1aA-OVA-m₄-n₈ fueron efectivas reduciendo estos aumentos transitorios en los títulos de anticuerpos. Estos resultados demuestran que F1aA-OVA-m₄-n₈ tiene la especificidad para unirse a anticuerpos en suero específicos de OVA y la cinética requerida para reducir los anticuerpos en suero específicos de OVA.

15B. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 15A y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈ con los compuestos de Fórmula 1 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G, se muestra que los compuestos de los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G tienen la especificidad para unirse a anticuerpos en suero específicos de OVA y la cinética requerida para reducir los anticuerpos en suero específicos de OVA.

15C. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 15A y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈ con los compuestos de Fórmulas 1 y 2 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F, y sustituyendo OVA con los antígenos correspondientes a X (o X' o X''), respectivamente, se muestra que los compuestos de los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F tienen la especificidad para unir anticuerpos en suero específicos del antígeno X y la cinética necesaria para reducir los anticuerpos en suero específicos del antígeno X.

Ejemplo 16

Modelo de desafío a la tolerancia de OT-1

16A. Usando un modelo establecido de desafío a la tolerancia de OTI (Liu, Iyoda, et al., 2002), se demostró la capacidad de F1aA-OVA-m₄-n₈ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ (pGal-OVA) y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (Dom-OVA) para prevenir las respuestas inmunes posteriores a la exposición al antígeno mediada por la vacuna, incluso con una exposición que implicaba un adyuvante muy potente derivado de bacterias (es decir, lipopolisacárido). Para tolerar, se administraron por vía intravenosa 233 nmol de F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄, N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C u OVA soluble en 100 µl de solución salina a 1 y 6 días después de la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ (CD45.2⁺) OTI a ratones CD45.1⁺ (n = 5 ratones por grupo). Después de 9 días adicionales para permitir la posible eliminación de las células T transferidas, los ratones receptores se expusieron a OVA (10 µg) adyuvado con lipopolisacárido (LPS) (50 ng) mediante inyección intradérmica. La caracterización de los ganglios linfáticos que drenan 4 días después de la exposición permitió determinar si realmente tuvo lugar o no la eliminación.

16B. La administración intravenosa de F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C dio como resultado reducciones profundas en las poblaciones de células T CD8⁺ OTI en los ganglios linfáticos de drenaje en comparación con los ratones tratados con OVA sin modificar antes de la exposición al antígeno con LPS, lo que demuestra tolerancia a la eliminación. Por ejemplo, la Fig.6 muestra que los ganglios linfáticos de drenaje de ratones tratados con F1aA-OVA-m₄-n₈ (mGal-OVA), F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ (pGal-OVA) y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (Dom-OVA) contenía más de 9 veces menos células T CD8⁺ OTI en comparación con los ratones tratados con OVA, y más de 43 veces menos que los ratones de control expuestos que no recibieron inyecciones intravenosas de antígeno; las respuestas en las células del bazo fueron similares. Estos resultados demuestran que

F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C mitigaron una respuesta inmune específica de OVA después de la exposición adyuvada con OVA.

16C. Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 16A y B, y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-exHis-C con los compuestos de Fórmula 1 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G, se muestra que los compuestos de los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G mitigan una respuesta inmune específica de OVA después de la exposición adyuvada con OVA.

16D. Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 16A y B, y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C con los compuestos de Fórmulas 1 y 2 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F, y sustituyendo OVA con los antígenos correspondientes a X (o X'o X "), respectivamente, se muestra que los compuestos de los Ejemplos 1 E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F mitigan una respuesta inmune específica del antígeno X después de la exposición adyuvada con antígeno X.

Ejemplo 17

Farmacocinética

17A. Las proteínas OVA y de fusión N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C y N-OVA-Gly₃Ser-DOM-Gly₃Ser-6xHis-C (preparadas, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 10) se marcan con IRDye 800CW (LI-COR Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tinte que no ha reaccionado se elimina utilizando columnas de desalación Zeba (Thermo Scientific). Las proteínas marcadas, 50 µg en 100 µl de PBS por dosis, se administran iv o sc en ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo). En el tiempo = 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 y 96 horas después de la inyección, se recogen muestras de sangre de la punta de la cola en tubos capilares recubiertos de heparina. Las muestras se almacenan a 4 °C, protegidas de la luz, hasta su análisis.

El día del análisis, las muestras de sangre se centrifugan para eliminar los componentes celulares. El plasma se transfiere a tubos capilares nuevos y se escanea utilizando un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences). La señal se adquiere en el canal de 800 nm. Usando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos), cada muestra se aproxima como una línea de ancho 2 y la intensidad media a lo largo de la línea se determina como una medida relativa de la cantidad de proteína circulante en ese momento.

Las señales de fluorescencia (normalizadas a la fluorescencia en el tiempo = 0) frente al tiempo para las proteínas OVA y de fusión DOM-OVA y OVA-DOM, junto con los ajustes de curva en forma de desintegraciones biexponenciales, en la Figura 8, muestran que el Las proteínas de fusión OVA dirigidas a ASGPR se eliminan de la circulación más rápidamente que OVA sin modificar.

17B. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 17A y sustituyendo la proteína de fusión N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C y OVA con asialo-Factor VIII y Factor VIII, respectivamente, se muestra que asialo-Factor VIII se elimina de la circulación mucho más rápidamente que el Factor VIII sin modificar.

Ejemplo 18

Biodistribución

18A. La proteína de fusión OVA y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C (preparada, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 10) se marcan con Alexa Fluor 647 (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tinte que no ha reaccionado se elimina utilizando columnas de desalación Zeba (Thermo Scientific). Las proteínas marcadas, 50 µg en 100 µl de PBS por dosis, se administran iv o sc en ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo). Dos horas después de la inyección, los ratones se sacrifican mediante asfixia con CO₂. Se obtienen imágenes de la sangre, el corazón, los intestinos, los riñones, el hígado, los pulmones, el estómago, el bazo y la carcasa restante utilizando un sistema de imágenes IVIS Spectrum (Caliper Life Sciences). Los datos se adquieren y analizan utilizando el software Living Image (Caliper Life Sciences). Se preparan suspensiones de células individuales de hígado y bazo y se tiñen con anticuerpos conjugados con fluorescencia contra MHC clase II, CD1d, CD3, CD4, CD8α, CD11b, CD11c, CD14, CD19, CD45, CD123 y/o Lin en PBS con BSA al 0,1% (p/v). Las muestras se analizan utilizando un citómetro de flujo LSR II y el software FACS Diva (BD Biosciences).

Un histograma que muestra las densidades de señal de fluorescencia (fotones/peso) para cada órgano y cada proteína muestra que en los animales inyectados con la proteína de fusión N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C, la señal de fluorescencia más alta se encuentra en el hígado, en comparación con los tratados con OVA sin modificar.

Un histograma que muestra los porcentajes de células positivas para N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C y OVA muestra que los animales inyectados con proteínas de fusión N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C tienen un porcentaje significativamente mayor de hepatocitos positivos en comparación con los tratados con OVA sin modificar.

18B. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 18A y sustituyendo la proteína de fusión N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C y OVA con asialo-Factor VIII y Factor VIII, respectivamente, se muestra que los animales inyectados con asialo-Factor VIII tienen un porcentaje significativamente mayor de hepatocitos positivos en comparación con los tratados con Factor VIII sin modificar.

18C. Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 18A y sustituyendo la proteína de fusión N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C con los compuestos de Fórmula 1 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G, se muestra que los animales inyectados con los compuestos de los Ejemplos 3A, 4A, 5B, 6C, 7B y 19G tienen un porcentaje significativamente mayor de hepatocitos positivos en comparación con los tratados con OVA.

18D. Siguiendo el procedimiento descrito en los Ejemplos 18A y B, y sustituyendo F1aA-OVA-m₄-n₈, F1b-OVA-m₁-n₄-p₃₄ y N-DOM-Gly₃Ser-OVA-Gly₃Ser-6xHis-C con los compuestos de Fórmulas 1 y 2 obtenidos, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F, y sustituyendo OVA con los antígenos correspondientes a X (o X' o X''), respectivamente, se muestra que se demuestra que los animales inyectados con los compuestos de los Ejemplos 1E, 1G, 2C, 10D, 19I, 19L, 20B, 20D y 20F tienen un porcentaje significativamente mayor de hepatocitos positivos en comparación con los tratados con el antígeno X.

Ejemplo 19

F1m-OVA-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc

19A. Fórmula 1102 en la que R³ es NHAc y R⁴ es OH

Se añadió N-acetil-D-galactosamina (Fórmula 1101 en la que R³ es NHAc y R⁴ es OH) (5 g, 22,6 mmol) a una solución agitada de cloroetanol (200 ml) a temperatura ambiente. La solución se enfrió a 4°C y se añadió gota a gota cloruro de acetilo a la solución. La solución se llevó a temperatura ambiente y luego se calentó a 70°C. Después de 4 horas, se eliminó el cloroetanol sin reaccionar a presión reducida. Se añadieron 100 ml de etanol al producto crudo y la solución resultante se agitó en presencia de carbono durante 2 horas. La solución se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto correspondiente de Fórmula 1102, N-(2-(2-cloroetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil) tetrahidro-2H-piran-3-il)acetamida, se usó sin purificación adicional.

19B. Fórmula 1103 en la que R³ es NHAc y R⁴ es OH

Se añadió la N-(2-(2-cloroetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)acetamida preparada en el Ejemplo 19A (2 g, 7,4 mmol) a una solución agitada de DMF (100 ml) y azida de sodio (4 g, 61,5 mmol). La solución se calentó a 90 °C durante 12 horas y luego se filtró. El disolvente residual se eliminó a presión reducida y el producto crudo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (MeOH al 10% en diclorometano) para obtener el producto correspondiente de Fórmula 1103, N-(2-(2-azidoetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)acetamida.

19C. Fórmula 1104 en la que R³ es NHAc y R⁴ es OH

Se añadió la N-(2-(2-azidoetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)acetamida preparada en el Ejemplo 19B (2 g, 6,9 mmol) a una solución de paladio sobre carbono y etanol (50 ml). La solución se agitó bajo hidrógeno gaseoso (3 atm) durante 4 horas. La solución resultante se filtró y el disolvente residual se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto correspondiente de Fórmula 1104, N-(2-(2-aminoetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirano-3-il)acetamida, que se utilizó sin purificación adicional.

19D. Fórmula 1105 en la que R³ es NHAc y R⁴ es OH

Se añadió la N-(2-(2-aminoetoxi)-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-3-il)acetamida preparada en el Ejemplo 19C (1,0 g, 3,78 mmol) a una solución de anhídrido de metacrilato (0,583 g, 3,78 mmol) en DMF (50 ml). Luego se añadió trietilamina a la solución y la reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 2 horas, el exceso de disolvente se eliminó a presión reducida y se aisló el producto correspondiente de Fórmula 1105, N-(2-((3-acetamido-4,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)etil)metacrilamida, a través de cromatografía ultrarrápida.

19E. Fórmula 1107 en la que p es 30, q es 4, R³ es NHAc, R⁴ es OH y R⁸ es CMP

Se añadió un agente uRAFT modificado con azida de Fórmula 1106 en la que q es 4 (28 mg) a una solución de N-(2-((3-acetamido-4,5-dihidroxi-6 (hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il oxi etil metacrilamida preparada en el Ejemplo 19D (579 mg, 1,74 mmol) y azobisisobutironitrilo (2,2 mg, 0,0116 mmol) en DMF. La mezcla de reacción se sometió a 4 ciclos de descongelación de bomba libre y luego se agitó a 70°C. Después de 12 horas, el producto polimérico de Fórmula 1107, en la que p es 30 y q es 4, se precipitó de la mezcla de reacción mediante la adición de metanol. El disolvente se decantó del sólido y el sólido se recogió y el disolvente residual se eliminó mediante presión reducida.

19F. Fórmula 1109 en la que X'es OVA, m es 2 y n es 80

Se añadió ovoalbúmina (5 mg, 0,00012 mmol) a 100 µl de tampón de fosfato de sodio (pH 8,0) y se agitó. A esta solución se le añadió 5 mg del compuesto de Fórmula 1108 en la que n es 80. Después de 1 hora, el compuesto de Fórmula 1108 sin reaccionar se eliminó de la solución mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño. La solución tamponada resultante que contenía el producto correspondiente de Fórmula 1109 se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

19G. Fórmula 1m en la que X'es OVA, m es 2, n es 80, p es 30, q es 4, R³ es NHAc y R⁸ es CMP

La solución preparada en el Ejemplo 19F se añadió a 100 µl de tampón de fosfato de sodio (pH 8,0) que contenía 10 mg del producto de Fórmula 1107 preparado en el Ejemplo 19E. Se dejó agitar la reacción durante 2 horas y luego se eliminó el exceso de Fórmula 1107 mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaños para proporcionar el correspondiente producto isomérico de Fórmula 1m en solución, que se usó en estudios biológicos sin purificación adicional. El sustituyente R³ se muestra en el nombre del compuesto del título como 2NHAc.

19H. Otros compuestos de Fórmula 1109

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19F y sustituyendo OVA con lo siguiente:

- Abciximab,
- Adalimumab,
- Agalsidasa alfa,
- Agalsidasa beta,
- Aldeslukina,
- Alglucosidasa alfa,
- Factor VIII,
- Factor IX,
- L-asparaginasa,
- Laronidasa,
- Octreótido,
- Fenilalanina amoniaco liasa,
- Rasburicasa,
- Insulina (SEQ ID NO: 5),
- GAD-65 (SEQ ID NO: 6),
- IGRP (SEQ ID NO: 7)
- MBP (SEQ ID NO: 8),
- MOG (SEQ ID NO: 9),
- PLP (SEQ ID NO: 10),
- MBP13-32 (SEQ ID NO: 11),
- MBP83-99 (SEQ ID NO: 12),
- MBP111-129 (SEQ ID NO: 13),
- MBP146-170 (SEQ ID NO: 14),
- MOG1-20 (SEQ ID NO: 15),
- MOG35-55 (SEQ ID NO: 16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO: 17),
- MART1 (SEQ ID NO: 18),
- Tirosinasa (SEQ ID NO: 19),
- PMEL (SEQ ID NO: 20),
- Acuaporina-4 (SEQ ID NO: 21),
- S-arrestina (SEQ ID NO: 22),
- IRBP (SEQ ID NO: 23),
- Conaraquina (UNIPROT Q6PSU6),
- Alfa-gliadina nativa de "33 mer" (SEQ ID NO: 24),
- Alfa-gliadina desamidada de "33 mer" (SEQ ID NO: 25),
- Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26),
- Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27),

- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- Albúmina de gato (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT 018873),
- Albúmina de perro (UNIPROT P49822) y
- 5 • Ejemplo de RhCE (UNIPROT P18577).

se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1109 en la que n es 80:

- X es Abciximab y m es 10,
- 10 • X es Adalimumab y m es 11,
- X es agalsidasa alfa y m es 14,
- X es agalsidasa beta y m es 14,
- X es Aldeslukina y m es 6,
- X es Alglucosidasa alfa y m es 13,
- 15 • X es Factor VIII y m es 100,
- X es Factor IX y m es 18,
- X es L-asparaginasa y m es 5,
- X es Laronidasa y m es 7,
- X es Octreótido y m es 1,
- 20 • X es Fenilalanina amoniaco liasa y m es 12,
- X es Rasburicasa y m es 12,
- X es Insulina (SEQ ID NO: 5) y m es 2,
- X es GAD-65 (SEQ ID NO: 6) y m es 8,
- X es IGRP (SEQ ID NO: 7) y m es 7,
- 25 • X es MBP (SEQ ID NO: 8) y m es 6,
- X es MOG (SEQ ID NO: 9) y m es 5,
- X es PLP (SEQ ID NO: 10) y m es 8,
- X es MBP13-32 (SEQ ID NO: 11) y m es 1,
- X es MBP83-99 (SEQ ID NO: 12) y m es 1,
- 30 • X es MBP111-129 (SEQ ID NO: 13) y m es 1,
- X es MBP146-170 (SEQ ID NO: 14) y m es 2,
- X es MOG1-20 (SEQ ID NO: 15) y m es 1,
- X es MOG35-55 (SEQ ID NO: 16) y m es 2,
- X es PLP139-154 (SEQ ID NO: 17) y m es 3,
- 35 • X es MART1 (SEQ ID NO: 18) y m es 4,
- X es Tirosinasa (SEQ ID NO: 19) y m es 8,
- X es PMEL (SEQ ID NO: 20) y m es 5,
- X es Acuaporina-4 (SEQ ID NO: 21) y m es 4,
- X es S-arrestina (SEQ ID NO: 22) y m es 12,
- 40 • X es IRBP (SEQ ID NO: 23) y m es 21,
- X es Conaraquina y m es 21,
- X es Alfa-gliadina nativa de "33 mer" (SEQ ID NO: 24) y m es 1,
- X es Alfa-gliadina desamidada de "33 mer" (SEQ ID NO: 25) y m es 1,
- X es Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y m es 1,
- 45 • X es Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27) y m es 1,
- X es Fel d 1 y m es 4,
- X es Albúmina de gato y m es 16,
- X es Can f1 y m es 6,
- X es Albúmina de perro y m es 23, y
- 50 • X es un ejemplo de RhCE y m es 10.

19I. Otros compuestos de Fórmula 1m

- 55 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19G y sustituyendo los compuestos de Fórmula 1109, por ejemplo como se obtuvo en el Ejemplo 19H, se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1m:

- F1m-Abciximab-m₁₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Adalimumab-m₁₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Agalsidasa alfa-m₁₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- 60 F1m-Agalsidasa beta-m₁₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Aldeslukina-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-alglucosidasa alfa-m₁₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1m-Factor VIII-m₁₀₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,

- 5 F1m-Factor IX-m₁₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-L-asparaginasa-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Laronidasa-m₇-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Octreótido-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Fenilalanina amoniaco-liasa-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Rasburicasa-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Insulina-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-GAD-65-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-IGRP-m₇-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 10 F1m-MBP-m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-MOG-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-PLP-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-MBP13-32-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-MBP83-99-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 15 F1m-MBP111-129-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-MBP146-170-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-MOG1-20-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-MOG35-55-m₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-PLP139-154-m₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 20 F1m-MART1-M4-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Tirosinasa-m₈-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-PMEL-m₅-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Acuaporina-4-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-S-arrestina-m₁₂-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 25 F1m-IRBP-m₂₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Conaraquina-m₂₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Alfa-gliadina nativa de "33 mer"-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Alfa-gliadinadesamidada de "33 mer"-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Alfa-gliadina-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 30 F1m-Omega-gliadina-m₁-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Fel d 1-m₄-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Albúmina de gato-m₁₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Can f1m₆-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
 F1m-Albúmina de perro-m₂₃-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, y
 35 F1m-RhCE-m₁₀-n₈₀-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc.

19J. Fórmula 1107 en la que p es 30, q es 8, R³ es OH, R⁴ es OH y R⁸ es CMP

- 40 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19A y sustituyendo la N-acetil-D-galactosamina con galactosa, y
 siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19E, excepto que se usa un agente uRAFT modificado con azida
 de Fórmula 1106 en la que q es 8, se obtiene el compuesto de Fórmula 1107 en la que p es 30, q es 8, R³ es OH, R⁴
 es OH y R⁸ es CMP.

- 45 19K. Fórmula 1109 en la que n es 62 y en la que X'ym son como en el Ejemplo 19H

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19F, sustituyendo la OVA con los compuestos descritos en el
 Ejemplo 19H y empleando el compuesto de Fórmula 1108 en la que n es 62, se obtienen los correspondientes
 compuestos de Fórmula 1109 en la que n es 62.

- 50 19L. Otros compuestos de Fórmula 1m

Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19G y sustituyendo el compuesto de Fórmula 1107 con los
 compuestos obtenidos en el Ejemplo 19J, y sustituyendo el compuesto de Fórmula 1109 con los compuestos
 obtenidos en el Ejemplo 19K, se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1m:

- 55 F1m-Abciximab-m₁₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Adalimumab-m₁₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Agalsidasa alfa-m₁₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Agalsidasa beta-m₁₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 60 F1m-Aldeslukin-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Alglucosidasa alfa-m₁₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Factor VIII-m₁₀₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Factor IX-m₁₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-L-asparaginasa-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 65 F1m-Laronidasa-m₇-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Octreótido-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,

- 5 F1m-Fenilalanina amoniaco-liasa-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Rasburicasa-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Insulina-m₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-GAD-65-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 10 F1m-IGRP-m₇-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MBP-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MOG-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-PLP-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MBP13-32-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 15 F1m-MBP83-99-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MBP111-129-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MBP146-170-m₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MOG1-20-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MOG35-55-m₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 20 F1m-PLP139-154-m₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-MART1-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Tirosinasa-m₈-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-PMEL-m₅-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Acuaporina-4-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 25 F1m-S-arrestina-m₁₂-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-IRBP-m₂₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Conaraquina-m₂₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Alfa-gliadinanativa de "33 mer"-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Alfa-gliadinadesamidada de "33 mer"-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 30 F1m-Alfa-gliadina-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Omega-gliadina-m₁-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Fel d1-m₄-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Albúmina de gato-m₁₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 F1m-Can f1-m₆-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
 30 F1m-Albúmina de perro-m₂₃-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH, y
 F1m-RhCE-m₁₀-n₆₂-p₃₀-q₈-CMP-2OH.

Ejemplo 20

- 35 F1n-insulina-m₂-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc

20A. Fórmula 1202 en la que X'es insulina, m es 2 y n es 1

- 40 Se añadió insulina humana recombinante (5 mg) a 100 µl de DMF que contenía 10 µl de trietilamina y se agitó hasta que la insulina se volvió soluble. A esta solución se le añadieron 10 mg (0,0161 mmol) de un precursor de enlazador de Fórmula 1201 en la que n es 1 (obtenido a partir de ???) y se dejó agitar la reacción. Después de 1 hora, se añadieron 1,3 ml de terc-butilmetil éter para aislar el producto correspondiente de Fórmula 1202, que se recuperó como precipitado. La DMF residual y el terc-butilmetil éter se eliminaron a presión reducida. La caracterización mediante cromatografía líquida, espectroscopia de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida confirmó la identidad del producto. El producto de insulina modificado de Fórmula 1202 se utilizó sin purificación adicional.

20B. Fórmula 1n en la que X'es insulina, m es 2, n es 1, p es 30, q es 4 y R⁸ es CMP

- 50 El producto de Fórmula 1202 obtenido en el Ejemplo 20A se resuspendió en 100 µl de DMF. Se añadió el producto polimérico de Fórmula 1107 obtenido en el Ejemplo 19E (10 mg) y se dejó agitar la reacción durante 1 hora. Después de 1 hora, los productos de reacción se precipitaron mediante la adición de diclorometano (1,3 ml). El producto se filtró y el disolvente residual se eliminó a presión reducida. A continuación, el producto crudo se resuspendió en 500 µl de PBS y los componentes de bajo peso molecular se eliminaron mediante cromatografía centrífuga de exclusión por tamaño para producir el producto isomérico correspondiente de Fórmula 1n. La caracterización mediante cromatografía líquida, espectroscopia de masas y electroforesis en gel de poliacrilamida confirmó la identidad del producto. El producto de insulina modificado de Fórmula 1202 se utilizó sin purificación adicional.

20C. Otros compuestos de Fórmula 1202

- 60 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19F y sustituyendo la insulina OVA con lo siguiente:

- Abciximab,
- Adalimumab,
- 65 • Agalsidasa alfa,

- Agalsidasa beta,
- Aldeslukina,
- Alglucosidasa alfa,
- Factor VIII,
- 5 • Factor IX,
- L-asparaginasa,
- Laronidasa,
- Octreótido,
- Fenilalanina amoniaco liasa,
- 10 • Rasburicasa,
- GAD-65 (SEQ ID NO: 6),
- IGRP (SEQ ID NO: 7)
- MBP (SEQ ID NO: 8),
- MOG (SEQ ID NO: 9),
- 15 • PLP (SEQ ID NO: 10),
- MBP13-32 (SEQ ID NO: 11),
- MBP83-99 (SEQ ID NO: 12),
- MBP111-129 (SEQ ID NO: 13),
- MBP146-170 (SEQ ID NO: 14),
- 20 • MOG1-20 (SEQ ID NO: 15),
- MOG35-55 (SEQ ID NO: 16),
- PLP139-154 (SEQ ID NO: 17),
- MART1 (SEQ ID NO: 18),
- Tirosinasa (SEQ ID NO: 19),
- 25 • PMEL (SEQ ID NO: 20),
- Acuaporina-4 (SEQ ID NO: 21),
- S-arrestina (SEQ ID NO: 22),
- IRBP (SEQ ID NO: 23),
- Conaraquina (UNIPROT Q6PSU6),
- 30 • Alfa-gliadina nativa de "33 mer" (SEQ ID NO: 24),
- Alfa-gliadina desamidada de "33 mer" (SEQ ID NO: 25),
- Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26),
- Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27),
- Fel d 1A (UNIPROT P30438),
- 35 • Albúmina de gato (UNIPROT P49064),
- Can f 1 (UNIPROT 018873),
- Albúmina de perro (UNIPROT P49822) y
- Ejemplo de RhCE (UNIPROT P18577).
- 40 se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1202 en la que n es 1:
- X es Abciximab y m es 10,
- X es Adalimumab y m es 11,
- X es agalsidasa alfa y m es 14,
- 45 • X es agalsidasa beta y m es 14,
- X es Aldeslukina y m es 6,
- X es Alglucosidasa alfa y m es 13,
- X es Factor VIII y m es 100,
- X es Factor IX y m es 18,
- 50 • X es L-asparaginasa y m es 5,
- X es Laronidasa y m es 7,
- X es Octreótido y m es 1,
- X es Fenilalanina amoniaco liasa y m es 12,
- X es Rasburicasa y m es 12,
- 55 • X es GAD-65 (SEQ ID NO: 6) y m es 8,
- X es IGRP (SEQ ID NO: 7) y m es 7,
- X es MBP (SEQ ID NO: 8) y m es 6,
- X es MOG (SEQ ID NO: 9) y m es 5,
- X es PLP (SEQ ID NO: 10) y m es 8,
- 60 • X es MBP13-32 (SEQ ID NO: 11) y m es 1,
- X es MBP83-99 (SEQ ID NO: 12) y m es 1,
- X es MBP111-129 (SEQ ID NO: 13) y m es 1,

- X es MBP146-170 (SEQ ID NO: 14) y m es 2,
- X es MOG1-20 (SEQ ID NO: 15) y m es 1,
- X es MOG35-55 (SEQ ID NO: 16) y m es 2,
- X es PLP139-154 (SEQ ID NO: 17) y m es 3,
- 5 • X es MART1 (SEQ ID NO: 18) y m es 4,
- X es Tirosinasa (SEQ ID NO: 19) y m es 8,
- X es PMEL (SEQ ID NO: 20) y m es 5,
- X es Acuaporina-4 (SEQ ID NO: 21) y m es 4,
- X es S-arrestina (SEQ ID NO: 22) y m es 12,
- 10 • X es IRBP (SEQ ID NO: 23) y m es 21,
- X es Conaraquina y m es 21,
- X es Alfa-gliadina nativa de "33 mer" (SEQ ID NO: 24) y m es 1,
- X es Alfa-gliadina desamidada de "33 mer" (SEQ ID NO: 25) y m es 1,
- X es Alfa-gliadina (SEQ ID NO: 26) y m es 1,
- 15 • X es Omega-gliadina (SEQ ID NO: 27) y m es 1,
- X es Fel d 1 y m es 4,
- X es Albúmina de gato y m es 16,
- X es Can f1 y m es 6,
- X es Albúmina de perro y m es 23, y
- 20 • X es un ejemplo de RhCE y m es 10.

20D. Otros compuestos de Fórmula 1n

25 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo B y sustituyendo los compuestos de Fórmula 1202, por ejemplo como se obtuvo en el Ejemplo 20C, se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1m:

- F1n-Abciximab-m₁₀-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Adalimumab-m₁₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Agalsidasa alfa-m₁₄-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 30 • F1n-Agalsidasa beta-m₁₄-n₁-p₃₀.q₄-CMP-NHAc,
- F1n-Aldeslukina-m₆-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alglucosidasa alfa-m₁₃-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Factor VIII-m₁₀₀-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Factor IX-m₁₈-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 35 • F1n-L-asparaginasa-m₅-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Laronidasa-m₇-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Octreótido-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Fenilalanina amoniaco-liasa-m₁₂-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Rasburicasa-m₁₂-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 40 • F1n-GAD-65-m₈-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-IGRP-m₇-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP-m₆-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MOG-m₅-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PLP-m₈-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 45 • F1n-MBP13-32-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP83-99-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP111-129-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MBP146-170-m₂-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MOG1-20-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 50 • F1n-MOG35-55-m₂-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PLP139-154-m₃-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-MART1-m₄-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Tirosinasa-m₈-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-PMEL-m₅-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 55 • F1n-Acuaporina-4-m₄-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-S-arrestina-m₁₂-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-IRBP-m₂₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Conaraquina-m₂₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alfa-gliadinanativa de "33 mer"-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- 60 • F1n-Alfa-gliadinadesamidada de "33 mer"-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Alfa-gliadina-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Omega-gliadina-m₁-n₁-p₃₀.q₄-CMP-2NHAc,

- F1n-Fel d1-m₄-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Albumina de gato-m₁₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Can f1-m₆-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc,
- F1n-Albúmina de perro-m₂₃-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc, y
- F1n-RhCE-m₁₀-n₁-p₃₀-q₄-CMP-2NHAc.

20E. Fórmula 1202 en la que n es 33 y en la que X'ym son como en el Ejemplo 20C

10 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19F, sustituyendo la insulina con los compuestos descritos en el Ejemplo 20C y empleando el compuesto de Fórmula 1201 en la que n es 33, se obtienen los correspondientes compuestos de Fórmula 1202 en la que n es 33.

20F. Otros compuestos de Fórmula 1n

15 Siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 20B y sustituyendo el compuesto de Fórmula 1107 con los compuestos obtenidos en el Ejemplo 19J, y sustituyendo el compuesto de Fórmula 1202 con los compuestos obtenidos en el Ejemplo 20E, se obtienen los siguientes compuestos correspondientes de Fórmula 1n:

- F1n-Abciximab-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Adalimumab-m₁₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Agalsidasa alfa-m₁₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Agalsidasa beta-m₁₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Aldeslukina-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alglucosidasa alfa-m₁₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Factor VIII-m₁₀₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Factor IX-m₁₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-L-asparaginasa-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Laronidasa-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Octreótido-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Fenilalanina amoniaco-liasa-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Rasburicasa-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-GAD-65-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-IGRP-m₇-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MOG-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PLP-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP13-32-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP83-99-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP111-129-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MBP146-170-m₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MOG1-20-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MOG35-55-m₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PLP139-154-m₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-MART1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Tirosinasa-m₈-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-PMEL-m₅-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Acuaporina-4-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-S-arrestina-m₁₂-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-IRBP-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Conaraquina-m₂₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alfa-gliadinanativa de "33 mer"-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alfa-gliadinadesamidada de "33 mer"-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Alfa-gliadina-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Omega-gliadina-m₁-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Fel d 1-m₄-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Albúmina de gato-m₁₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Can f1-m₆-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH,
- F1n-Albúmina de perro-m₂₃-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH, y
- F1n-RhCE-m₁₀-n₃₃-p₃₀-q₈-CMP-2OH.

Ejemplo 21

Eliminación de anticuerpos específicos de OVA de la circulación

Para inducir la producción de anticuerpos específicos de OVA para el agotamiento posterior, se inyectaron ratones C57BL/6 iv con hasta cinco dosis de 10 µg de OVA hasta que un título de IgG anti-OVA en plasma, determinado por ELISA, alcanzó 3 (Figura 9A). Las muestras de plasma se prepararon mediante centrifugación de sangre recogida en tubos recubiertos con EDTA a 2000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C hasta el análisis. El título se define como el log₁₀ de la dilución máxima de plasma con IgG anti-OVA detectable. En este documento, las muestras de plasma se analizaron en diluciones de 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 y 50.000 veces, produciendo mediciones de títulos potenciales de 0, 1, 1.7, 2, 2.7, 3, 3.7, 4 y 4.7. A los ratones con títulos por debajo de 3 después de cinco dosis de 10 µg de OVA se les administraron dos dosis adicionales de 10 µg de OVA adyuvadas con 10 µg de CpG-B para estimular la producción de IgG anti-OVA y, por lo tanto, la cantidad de IgG anti-OVA circulante disponible para el agotamiento (Figura 9B).

Para evaluar la eficacia de OVA dirigido a ASGPR de hepatocitos para la eliminación de anticuerpos anti-OVA, se inyectaron iv ratones con IgG anti-OVA circulante con solución salina o solución salina que contiene equivalentes molares de DOM y OVA, DOM-OVA u OVA-DOM. En particular, los ratones se trataron con equivalentes molares de 10, 50, 100 o 200 µg de OVA, como se indica en la Figura 9. En los momentos t = -1 día, +3 horas, +1 día y +7 días, en relación con el momento de la inyección del tratamiento, se recolectaron muestras de sangre para evaluar, mediante análisis ELISA de plasma, la cantidad de IgG anti-OVA en circulación. Se espera que la eliminación de IgG anti-OVA de la circulación disminuya la cantidad de IgG anti-OVA en el plasma y, por lo tanto, disminuya el título de IgG anti-OVA en plasma de acuerdo con lo determinado por ELISA. En ratones inmunizados con OVA solo y tratados con DOM-OVA u OVA-DOM, los títulos de IgG anti-OVA disminuyeron hasta en 3 o 2, respectivamente, lo que representa una disminución en la cantidad de IgG anti-OVA circulante de 1000 o 100 veces, que es hasta 50 veces más eficaz que el tratamiento de control que utiliza solución salina o DOM y OVA (Figura 9A). En ratones inmunizados con OVA adyuvado con CpG-B, no se observó la eliminación de IgG anti-OVA circulante (Figura 9B).

Ejemplo 22

Ratón NOD

Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son susceptibles a la aparición espontánea de diabetes mellitus autoinmune, que es el resultado de una respuesta autoinmune a varios autoantígenos pancreáticos. La diabetes se desarrolla en ratones NOD como resultado de insulitis, caracterizada por la infiltración de varios leucocitos en los islotes pancreáticos.

Para evaluar la eficacia de un tratamiento para la diabetes mellitus, a partir de las 6 semanas de edad, los ratones NOD se dividen en grupos de control o de prueba y se tratan, respectivamente, con inyecciones intravenosas semanales de una composición de prueba (10 µg) o un control inactivo como la solución salina. Las inyecciones continúan durante 18 semanas consecutivas.

La concentración de glucosa en sangre de los ratones se mide semanalmente. Los ratones que mantienen una concentración de glucosa en sangre de menos de 300 mg/ml durante el experimento se consideran no diabéticos. Además, al final del estudio, se recolectan los páncreas de los ratones y se determina la infiltración de células T en el páncreas mediante inmunohistoquímica como evaluación de la insulitis. La inducción de tolerancia se evalúa mediante el agotamiento de las células T CD8 específicas de autoantígeno en comparación con los ratones que se tratan con solución salina y desarrollan diabetes. La existencia de células T CD8 específicas de autoantígeno se determina mediante el ensayo ELISpot.

Cuando se ensayan como se describió anteriormente, las composiciones de Fórmulas 1 y 2 en las que X es insulina, tal como F1m-insulina-m₂-n₁-p₃₀-q₄-2NACGAL, muestran eficacia para tratar la diabetes mellitus.

Listado de secuencias

<110> ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE ANOKION SA

<120> Compuestos terapéuticos dirigidos a la glucosa

<130> 2968.10US02

<150> 61/942.942

<151> 2014-02-21

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213>Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223>Etiqueta His
 <400> 1
 10
 His His His His His His
 1 5
 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213>Secuencia Artificial
 <220>
 <223>Gly3Ser
 20 <400> 2
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 3
 <211> 20
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 30 20
 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala
 40 20
 <210> 5
 <211> 110
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 5

ES 2 874 884 T3

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30

Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
100 105 110

<210> 6

5 <211> 585

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

10

Met Ala Ser Pro Gly Ser Gly Phe Trp Ser Phe Gly Ser Glu Asp Gly
1 5 10 15

Ser Gly Asp Ser Glu Asn Pro Gly Thr Ala Arg Ala Trp Cys Gln Val
20 25 30

Ala Gln Lys Phe Thr Gly Gly Ile Gly Asn Lys Leu Cys Ala Leu Leu
35 40 45

ES 2 874 884 T3

Tyr Gly Asp Ala Glu Lys Pro Ala Glu Ser Gly Gly Ser Gln Pro Pro
 50 55 60

Arg Ala Ala Ala Arg Lys Ala Ala Cys Ala Cys Asp Gln Lys Pro Cys
 65 70 75 80

Ser Cys Ser Lys Val Asp Val Asn Tyr Ala Phe Leu His Ala Thr Asp
 85 90 95

Leu Leu Pro Ala Cys Asp Gly Glu Arg Pro Thr Leu Ala Phe Leu Gln
 100 105 110

Asp Val Met Asn Ile Leu Leu Gln Tyr Val Val Lys Ser Phe Asp Arg
 115 120 125

Ser Thr Lys Val Ile Asp Phe His Tyr Pro Asn Glu Leu Leu Gln Glu
 130 135 140

Tyr Asn Trp Glu Leu Ala Asp Gln Pro Gln Asn Leu Glu Glu Ile Leu
 145 150 155 160

Met His Cys Gln Thr Thr Leu Lys Tyr Ala Ile Lys Thr Gly His Pro
 165 170 175

Arg Tyr Phe Asn Gln Leu Ser Thr Gly Leu Asp Met Val Gly Leu Ala
 180 185 190

Ala Asp Trp Leu Thr Ser Thr Ala Asn Thr Asn Met Phe Thr Tyr Glu
 195 200 205

Ile Ala Pro Val Phe Val Leu Leu Glu Tyr Val Thr Leu Lys Lys Met
 210 215 220

Arg Glu Ile Ile Gly Trp Pro Gly Gly Ser Gly Asp Gly Ile Phe Ser
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Ala Ile Ser Asn Met Tyr Ala Met Met Ile Ala Arg Phe
 245 250 255

Lys Met Phe Pro Glu Val Lys Glu Lys Gly Met Ala Ala Leu Pro Arg
 260 265 270

Leu Ile Ala Phe Thr Ser Glu His Ser His Phe Ser Leu Lys Lys Gly
 275 280 285

Ala Ala Ala Leu Gly Ile Gly Thr Asp Ser Val Ile Leu Ile Lys Cys

ES 2 874 884 T3

290		295		300
Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser Asp Leu Glu Arg Arg Ile Leu				
305		310		315
Glu Ala Lys Gln Lys Gly Phe Val Pro Phe Leu Val Ser Ala Thr Ala				
		325		330
				335
Gly Thr Thr Val Tyr Gly Ala Phe Asp Pro Leu Leu Ala Val Ala Asp				
		340		345
				350
Ile Cys Lys Lys Tyr Lys Ile Trp Met His Val Asp Ala Ala Trp Gly				
		355		360
				365
Gly Gly Leu Leu Met Ser Arg Lys His Lys Trp Lys Leu Ser Gly Val				
		370		375
				380
Glu Arg Ala Asn Ser Val Thr Trp Asn Pro His Lys Met Met Gly Val				
		385		390
				395
Pro Leu Gln Cys Ser Ala Leu Leu Val Arg Glu Glu Gly Leu Met Gln				
		405		410
				415
Asn Cys Asn Gln Met His Ala Ser Tyr Leu Phe Gln Gln Asp Lys His				
		420		425
				430
Tyr Asp Leu Ser Tyr Asp Thr Gly Asp Lys Ala Leu Gln Cys Gly Arg				
		435		440
				445
His Val Asp Val Phe Lys Leu Trp Leu Met Trp Arg Ala Lys Gly Thr				
		450		455
				460
Thr Gly Phe Glu Ala His Val Asp Lys Cys Leu Glu Leu Ala Glu Tyr				
		465		470
				475
Leu Tyr Asn Ile Ile Lys Asn Arg Glu Gly Tyr Glu Met Val Phe Asp				
		485		490
				495
Gly Lys Pro Gln His Thr Asn Val Cys Phe Trp Tyr Ile Pro Pro Ser				
		500		505
				510
Leu Arg Thr Leu Glu Asp Asn Glu Glu Arg Met Ser Arg Leu Ser Lys				
		515		520
				525
Val Ala Pro Val Ile Lys Ala Arg Met Met Glu Tyr Gly Thr Thr Met				
		530		535
				540

ES 2 874 884 T3

Val Ser Tyr Gln Pro Leu Gly Asp Lys Val Asn Phe Phe Arg Met Val
545 550 555 560

Ile Ser Asn Pro Ala Ala Thr His Gln Asp Ile Asp Phe Leu Ile Glu
565 570 575

Glu Ile Glu Arg Leu Gly Gln Asp Leu
580 585

<210> 7

<211> 355

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asp Phe Leu His Arg Asn Gly Val Leu Ile Ile Gln His Leu Gln
1 5 10 15

Lys Asp Tyr Arg Ala Tyr Tyr Thr Phe Leu Asn Phe Met Ser Asn Val
20 25 30

Gly Asp Pro Arg Asn Ile Phe Phe Ile Tyr Phe Pro Leu Cys Phe Gln
35 40 45

Phe Asn Gln Thr Val Gly Thr Lys Met Ile Trp Val Ala Val Ile Gly
50 55 60

Asp Trp Leu Asn Leu Ile Phe Lys Trp Ile Leu Phe Gly His Arg Pro
65 70 75 80

Tyr Trp Trp Val Gln Glu Thr Gln Ile Tyr Pro Asn His Ser Ser Pro
85 90 95

Cys Leu Glu Gln Phe Pro Thr Thr Cys Glu Thr Gly Pro Gly Ser Pro
100 105 110

Ser Gly His Ala Met Gly Ala Ser Cys Val Trp Tyr Val Met Val Thr
115 120 125

Ala Ala Leu Ser His Thr Val Cys Gly Met Asp Lys Phe Ser Ile Thr
130 135 140

Leu His Arg Leu Thr Trp Ser Phe Leu Trp Ser Val Phe Trp Leu Ile
145 150 155 160

Gln Ile Ser Val Cys Ile Ser Arg Val Phe Ile Ala Thr His Phe Pro
165 170 175

ES 2 874 884 T3

His Gln Val Ile Leu Gly Val Ile Gly Gly Met Leu Val Ala Glu Ala
180 185 190

Phe Glu His Thr Pro Gly Ile Gln Thr Ala Ser Leu Gly Thr Tyr Leu
195 200 205

Lys Thr Asn Leu Phe Leu Phe Leu Phe Ala Val Gly Phe Tyr Leu Leu
210 215 220

Leu Arg Val Leu Asn Ile Asp Leu Leu Trp Ser Val Pro Ile Ala Lys
225 230 235 240

Lys Trp Cys Ala Asn Pro Asp Trp Ile His Ile Asp Thr Thr Pro Phe
245 250 255

Ala Gly Leu Val Arg Asn Leu Gly Val Leu Phe Gly Leu Gly Phe Ala
260 265 270

Ile Asn Ser Glu Met Phe Leu Leu Ser Cys Arg Gly Gly Asn Asn Tyr
275 280 285

Thr Leu Ser Phe Arg Leu Leu Cys Ala Leu Thr Ser Leu Thr Ile Leu
290 295 300

Gln Leu Tyr His Phe Leu Gln Ile Pro Thr His Glu Glu His Leu Phe
305 310 315 320

Tyr Val Leu Ser Phe Cys Lys Ser Ala Ser Ile Pro Leu Thr Val Val
325 330 335

Ala Phe Ile Pro Tyr Ser Val His Met Leu Met Lys Gln Ser Gly Lys
340 345 350

Lys Ser Gln
355

<210> 8
<211> 304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly Asn His Ala Gly Lys Arg Glu Leu Asn Ala Glu Lys Ala Ser
1 5 10 15

Thr Asn Ser Glu Thr Asn Arg Gly Glu Ser Glu Lys Lys Arg Asn Leu
20 25 30

ES 2 874 884 T3

Gly Glu Leu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Asp Asn Glu Val Phe Gly Glu
 35 40 45
 Ala Asp Ala Asn Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ser Gln Asp Thr Ala Val
 50 55 60
 Thr Asp Ser Lys Arg Thr Ala Asp Pro Lys Asn Ala Trp Gln Asp Ala
 65 70 75 80
 His Pro Ala Asp Pro Gly Ser Arg Pro His Leu Ile Arg Leu Phe Ser
 85 90 95
 Arg Asp Ala Pro Gly Arg Glu Asp Asn Thr Phe Lys Asp Arg Pro Ser
 100 105 110
 Glu Ser Asp Glu Leu Gln Thr Ile Gln Glu Asp Ser Ala Ala Thr Ser
 115 120 125
 Glu Ser Leu Asp Val Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His
 130 135 140
 Gly Ser Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His
 145 150 155 160
 Gly Phe Leu Pro Arg His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly
 165 170 175
 Arg Phe Phe Gly Gly Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys
 180 185 190
 Asp Ser His His Pro Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln
 195 200 205
 Lys Ser His Gly Arg Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe
 210 215 220
 Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly
 225 230 235 240
 Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg
 245 250 255
 Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His
 260 265 270
 Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe
 275 280 285

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
 290 295 300

5 <210> 9
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 9

Met Ala Ser Leu Ser Arg Pro Ser Leu Pro Ser Cys Leu Cys Ser Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Ser Tyr Ala Gly Gln Phe
 20 25 30

Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val Gly Asp Glu
 35 40 45

Val Glu Leu Pro Cys Arg Ile Ser Pro Gly Lys Asn Ala Thr Gly Met
 50 55 60

Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu Tyr
 65 70 75 80

Arg Asn Gly Lys Asp Gln Asp Gly Asp Gln Ala Pro Glu Tyr Arg Gly
 85 90 95

Arg Thr Glu Leu Leu Lys Asp Ala Ile Gly Glu Gly Lys Val Thr Leu
 100 105 110

Arg Ile Arg Asn Val Arg Phe Ser Asp Glu Gly Gly Phe Thr Cys Phe
 115 120 125

Phe Arg Asp His Ser Tyr Gln Glu Glu Ala Ala Met Glu Leu Lys Val
 130 135 140

Glu Asp Pro Phe Tyr Trp Val Ser Pro Gly Val Leu Val Leu Leu Ala
 145 150 155 160

Val Leu Pro Val Leu Leu Leu Gln Ile Thr Val Gly Leu Ile Phe Leu
 165 170 175

Cys Leu Gln Tyr Arg Leu Arg Gly Lys Leu Arg Ala Glu Ile Glu Asn
 180 185 190

Leu His Arg Thr Phe Asp Pro His Phe Leu Arg Val Pro Cys Trp Lys
 195 200 205

ES 2 874 884 T3

Ile Thr Leu Phe Val Ile Val Pro Val Leu Gly Pro Leu Val Ala Leu
210 215 220

Ile Ile Cys Tyr Asn Trp Leu His Arg Arg Leu Ala Gly Gln Phe Leu
225 230 235 240

Glu Glu Leu Arg Asn Pro Phe
245

<210> 10

5 <211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 10

Met Gly Leu Leu Glu Cys Cys Ala Arg Cys Leu Val Gly Ala Pro Phe
1 5 10 15

Ala Ser Leu Val Ala Thr Gly Leu Cys Phe Phe Gly Val Ala Leu Phe
20 25 30

Cys Gly Cys Gly His Glu Ala Leu Thr Gly Thr Glu Lys Leu Ile Glu
35 40 45

Thr Tyr Phe Ser Lys Asn Tyr Gln Asp Tyr Glu Tyr Leu Ile Asn Val
50 55 60

Ile His Ala Phe Gln Tyr Val Ile Tyr Gly Thr Ala Ser Phe Phe Phe
65 70 75 80

Leu Tyr Gly Ala Leu Leu Leu Ala Glu Gly Phe Tyr Thr Thr Gly Ala
85 90 95

Val Arg Gln Ile Phe Gly Asp Tyr Lys Thr Thr Ile Cys Gly Lys Gly
100 105 110

Leu Ser Ala Thr Val Thr Gly Gly Gln Lys Gly Arg Gly Ser Arg Gly
115 120 125

Gln His Gln Ala His Ser Leu Glu Arg Val Cys His Cys Leu Gly Lys
130 135 140

Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile Thr Tyr Ala Leu Thr
145 150 155 160

Val Val Trp Leu Leu Val Phe Ala Cys Ser Ala Val Pro Val Tyr Ile
165 170 175

ES 2 874 884 T3

Tyr Phe Asn Thr Trp Thr Thr Cys Gln Ser Ile Ala Phe Pro Ser Lys
180 185 190

Thr Ser Ala Ser Ile Gly Ser Leu Cys Ala Asp Ala Arg Met Tyr Gly
195 200 205

Val Leu Pro Trp Asn Ala Phe Pro Gly Lys Val Cys Gly Ser Asn Leu
210 215 220

Leu Ser Ile Cys Lys Thr Ala Glu Phe Gln Met Thr Phe His Leu Phe
225 230 235 240

Ile Ala Ala Phe Val Gly Ala Ala Ala Thr Leu Val Ser Leu Leu Thr
245 250 255

Phe Met Ile Ala Ala Thr Tyr Asn Phe Ala Val Leu Lys Leu Met Gly
260 265 270

Arg Gly Thr Lys Phe
275

<210> 11
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Tyr Leu Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe
1 5 10 15

Leu Pro Arg His
20

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Glu Asn Pro Trp His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr Pro Arg Thr Pro
1 5 10 15

<210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly

ES 2 874 884 T3

1 5 10 15

Tyr Gly Gly

5 <210> 14
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

10 Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser
 1 5 10 15

Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg
 20 25

15 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Gly Gln Phe Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val
 1 5 10 15

20 Gly Asp Glu Val
 20

25 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Trp His Leu Tyr
 1 5 10 15

30 Arg Asn Gly Lys
 20

35 <210> 17
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile
 1 5 10 15

40 <210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

ES 2 874 884 T3

<400> 18

```

Met Pro Arg Glu Asp Ala His Phe Ile Tyr Gly Tyr Pro Lys Lys Gly
1          5          10          15

His Gly His Ser Tyr Thr Thr Ala Glu Glu Ala Ala Gly Ile Gly Ile
          20          25          30

Leu Thr Val Ile Leu Gly Val Leu Leu Leu Ile Gly Cys Trp Tyr Cys
          35          40          45

Arg Arg Arg Asn Gly Tyr Arg Ala Leu Met Asp Lys Ser Leu His Val
          50          55          60

Gly Thr Gln Cys Ala Leu Thr Arg Arg Cys Pro Gln Glu Gly Phe Asp
65          70          75          80

His Arg Asp Ser Lys Val Ser Leu Gln Glu Lys Asn Cys Glu Pro Val
          85          90          95

Val Pro Asn Ala Pro Pro Ala Tyr Glu Lys Leu Ser Ala Glu Gln Ser
          100          105          110

Pro Pro Pro Tyr Ser Pro
          115

```

5 <210> 19
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 19

```

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Leu Trp Ser Phe Gln Thr Ser
1          5          10          15

Ala Gly His Phe Pro Arg Ala Cys Val Ser Ser Lys Asn Leu Met Glu
          20          25          30

Lys Glu Cys Cys Pro Pro Trp Ser Gly Asp Arg Ser Pro Cys Gly Gln
          35          40          45

Leu Ser Gly Arg Gly Ser Cys Gln Asn Ile Leu Leu Ser Asn Ala Pro
          50          55          60

Leu Gly Pro Gln Phe Pro Phe Thr Gly Val Asp Asp Arg Glu Ser Trp

```

ES 2 874 884 T3

65						70										75						80
Pro	Ser	Val	Phe	Tyr	Asn	Arg	Thr	Cys	Gln	Cys	Ser	Gly	Asn	Phe	Met							
				85					90					95								
Gly	Phe	Asn	Cys	Gly	Asn	Cys	Lys	Phe	Gly	Phe	Trp	Gly	Pro	Asn	Cys							
			100					105					110									
Thr	Glu	Arg	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Arg	Asn	Ile	Phe	Asp	Leu	Ser	Ala							
		115					120					125										
Pro	Glu	Lys	Asp	Lys	Phe	Phe	Ala	Tyr	Leu	Thr	Leu	Ala	Lys	His	Thr							
	130					135					140											
Ile	Ser	Ser	Asp	Tyr	Val	Ile	Pro	Ile	Gly	Thr	Tyr	Gly	Gln	Met	Lys							
145					150					155					160							
Asn	Gly	Ser	Thr	Pro	Met	Phe	Asn	Asp	Ile	Asn	Ile	Tyr	Asp	Leu	Phe							
				165					170					175								
Val	Trp	Met	His	Tyr	Tyr	Val	Ser	Met	Asp	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser							
			180					185					190									
Glu	Ile	Trp	Arg	Asp	Ile	Asp	Phe	Ala	His	Glu	Ala	Pro	Ala	Phe	Leu							
		195					200					205										
Pro	Trp	His	Arg	Leu	Phe	Leu	Leu	Arg	Trp	Glu	Gln	Glu	Ile	Gln	Lys							
	210					215					220											
Leu	Thr	Gly	Asp	Glu	Asn	Phe	Thr	Ile	Pro	Tyr	Trp	Asp	Trp	Arg	Asp							
225					230					235					240							
Ala	Glu	Lys	Cys	Asp	Ile	Cys	Thr	Asp	Glu	Tyr	Met	Gly	Gly	Gln	His							
				245					250					255								
Pro	Thr	Asn	Pro	Asn	Leu	Leu	Ser	Pro	Ala	Ser	Phe	Phe	Ser	Ser	Trp							
			260					265					270									
Gln	Ile	Val	Cys	Ser	Arg	Leu	Glu	Glu	Tyr	Asn	Ser	His	Gln	Ser	Leu							
		275					280					285										
Cys	Asn	Gly	Thr	Pro	Glu	Gly	Pro	Leu	Arg	Arg	Asn	Pro	Gly	Asn	His							
	290					295					300											
Asp	Lys	Ser	Arg	Thr	Pro	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	Asp	Val	Glu	Phe							
305					310					315					320							

ES 2 874 884 T3

Cys Leu Ser Leu Thr Gln Tyr Glu Ser Gly Ser Met Asp Lys Ala Ala
325 330 335

Asn Phe Ser Phe Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Ala Ser Pro Leu Thr
340 345 350

Gly Ile Ala Asp Ala Ser Gln Ser Ser Met His Asn Ala Leu His Ile
355 360 365

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val Gln Gly Ser Ala Asn Asp Pro
370 375 380

Ile Phe Leu Leu His His Ala Phe Val Asp Ser Ile Phe Glu Gln Trp
385 390 395 400

Leu Arg Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala
405 410 415

Pro Ile Gly His Asn Arg Glu Ser Tyr Met Val Pro Phe Ile Pro Leu
420 425 430

Tyr Arg Asn Gly Asp Phe Phe Ile Ser Ser Lys Asp Leu Gly Tyr Asp
435 440 445

Tyr Ser Tyr Leu Gln Asp Ser Asp Pro Asp Ser Phe Gln Asp Tyr Ile
450 455 460

Lys Ser Tyr Leu Glu Gln Ala Ser Arg Ile Trp Ser Trp Leu Leu Gly
465 470 475 480

Ala Ala Met Val Gly Ala Val Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gly Leu Val
485 490 495

Ser Leu Leu Cys Arg His Lys Arg Lys Gln Leu Pro Glu Glu Lys Gln
500 505 510

Pro Leu Leu Met Glu Lys Glu Asp Tyr His Ser Leu Tyr Gln Ser His
515 520 525

Leu

<210> 20

<211> 661

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 874 884 T3

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu Ala Val Ile Gly
1 5 10 15

Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp
20 25 30

Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn Arg Gln Leu
35 40 45

Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Cys Trp Arg Gly Gly
50 55 60

Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro Thr Leu Ile Gly Ala
65 70 75 80

Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu Asn Phe Pro Gly Ser Gln Lys Val
85 90 95

Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly
100 105 110

Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp
115 120 125

Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly Gly Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser
130 135 140

Gln Lys Arg Ser Phe Val Tyr Val Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp
145 150 155 160

Gln Val Leu Gly Gly Pro Val Ser Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg
165 170 175

Ala Met Leu Gly Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg
180 185 190

Gly Ser Arg Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr
195 200 205

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala
210 215 220

Leu Asp Gly Gly Asn Lys His Phe Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe
225 230 235 240

Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Ala Asp Leu
245 250 255

ES 2 874 884 T3

Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Ser Ser Gly Thr Leu Ile Ser Arg
 260 265 270
 Ala Leu Val Val Thr His Thr Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
 275 280 285
 Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser Cys Gly Ser Ser
 290 295 300
 Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly His Arg Pro Thr Ala Glu Ala Pro
 305 310 315 320
 Asn Thr Thr Ala Gly Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Val Gly Thr Thr
 325 330 335
 Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro Ser Gly Thr Thr Ser Val Gln
 340 345 350
 Val Pro Thr Thr Glu Val Ile Ser Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr
 355 360 365
 Ala Glu Ser Thr Gly Met Thr Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val
 370 375 380
 Met Gly Thr Thr Leu Ala Glu Met Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met
 385 390 395 400
 Thr Pro Ala Glu Val Ser Ile Val Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala
 405 410 415
 Gln Val Thr Thr Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro
 420 425 430
 Ile Pro Glu Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu
 435 440 445
 Ser Ile Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu
 450 455 460
 Arg Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
 465 470 475 480
 Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser Ala
 485 490 495
 Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu
 500 505 510

ES 2 874 884 T3

Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys Met Glu Ile
515 520 525

Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu Cys Gln Pro Val
530 535 540

Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val Leu His Gln Ile Leu Lys Gly
545 550 555 560

Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser Leu Ala Asp Thr Asn Ser
565 570 575

Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile Met Pro Gly Gln Glu Ala Gly
580 585 590

Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala
595 600 605

Val Val Leu Ala Ser Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp
610 615 620

Phe Ser Val Pro Gln Leu Pro His Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu
625 630 635 640

Pro Arg Ile Phe Cys Ser Cys Pro Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu
645 650 655

Ser Gly Gln Gln Val
660

<210> 21

<211> 323

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ser Asp Arg Pro Thr Ala Arg Arg Trp Gly Lys Cys Gly Pro Leu
1 5 10 15

Cys Thr Arg Glu Asn Ile Met Val Ala Phe Lys Gly Val Trp Thr Gln
20 25 30

Ala Phe Trp Lys Ala Val Thr Ala Glu Phe Leu Ala Met Leu Ile Phe
35 40 45

Val Leu Leu Ser Leu Gly Ser Thr Ile Asn Trp Gly Gly Thr Glu Lys
50 55 60

ES 2 874 884 T3

Pro Leu Pro Val Asp Met Val Leu Ile Ser Leu Cys Phe Gly Leu Ser
 65 70 75 80
 Ile Ala Thr Met Val Gln Cys Phe Gly His Ile Ser Gly Gly His Ile
 85 90 95
 Asn Pro Ala Val Thr Val Ala Met Val Cys Thr Arg Lys Ile Ser Ile
 100 105 110
 Ala Lys Ser Val Phe Tyr Ile Ala Ala Gln Cys Leu Gly Ala Ile Ile
 115 120 125
 Gly Ala Gly Ile Leu Tyr Leu Val Thr Pro Pro Ser Val Val Gly Gly
 130 135 140
 Leu Gly Val Thr Met Val His Gly Asn Leu Thr Ala Gly His Gly Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Glu Leu Ile Ile Thr Phe Gln Leu Val Phe Thr Ile Phe Ala
 165 170 175
 Ser Cys Asp Ser Lys Arg Thr Asp Val Thr Gly Ser Ile Ala Leu Ala
 180 185 190
 Ile Gly Phe Ser Val Ala Ile Gly His Leu Phe Ala Ile Asn Tyr Thr
 195 200 205
 Gly Ala Ser Met Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Pro Ala Val Ile Met
 210 215 220
 Gly Asn Trp Glu Asn His Trp Ile Tyr Trp Val Gly Pro Ile Ile Gly
 225 230 235 240
 Ala Val Leu Ala Gly Gly Leu Tyr Glu Tyr Val Phe Cys Pro Asp Val
 245 250 255
 Glu Phe Lys Arg Arg Phe Lys Glu Ala Phe Ser Lys Ala Ala Gln Gln
 260 265 270
 Thr Lys Gly Ser Tyr Met Glu Val Glu Asp Asn Arg Ser Gln Val Glu
 275 280 285
 Thr Asp Asp Leu Ile Leu Lys Pro Gly Val Val His Val Ile Asp Val
 290 295 300
 Asp Arg Gly Glu Glu Lys Lys Gly Lys Asp Gln Ser Gly Glu Val Leu
 305 310 315 320
 Ser Ser Val

ES 2 874 884 T3

<210> 22
 <211> 405
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 22

```

Met Ala Ala Ser Gly Lys Thr Ser Lys Ser Glu Pro Asn His Val Ile
1          5          10          15

Phe Lys Lys Ile Ser Arg Asp Lys Ser Val Thr Ile Tyr Leu Gly Asn
20          25          30

Arg Asp Tyr Ile Asp His Val Ser Gln Val Gln Pro Val Asp Gly Val
35          40          45

Val Leu Val Asp Pro Asp Leu Val Lys Gly Lys Lys Val Tyr Val Thr
50          55          60

Leu Thr Cys Ala Phe Arg Tyr Gly Gln Glu Asp Ile Asp Val Ile Gly
65          70          75          80

Leu Thr Phe Arg Arg Asp Leu Tyr Phe Ser Arg Val Gln Val Tyr Pro
85          90          95

Pro Val Gly Ala Ala Ser Thr Pro Thr Lys Leu Gln Glu Ser Leu Leu
100         105         110

Lys Lys Leu Gly Ser Asn Thr Tyr Pro Phe Leu Leu Thr Phe Pro Asp
115         120         125

Tyr Leu Pro Cys Ser Val Met Leu Gln Pro Ala Pro Gln Asp Ser Gly
130         135         140

Lys Ser Cys Gly Val Asp Phe Glu Val Lys Ala Phe Ala Thr Asp Ser
145         150         155         160

Thr Asp Ala Glu Glu Asp Lys Ile Pro Lys Lys Ser Ser Val Arg Leu
165         170         175

Leu Ile Arg Lys Val Gln His Ala Pro Leu Glu Met Gly Pro Gln Pro
180         185         190

Arg Ala Glu Ala Ala Trp Gln Phe Phe Met Ser Asp Lys Pro Leu His

```

ES 2 874 884 T3

195	200	205
Leu Ala Val Ser Leu Asn Lys Glu Ile Tyr Phe His Gly Glu Pro Ile		
210	215	220
Pro Val Thr Val Thr Val Thr Asn Asn Thr Glu Lys Thr Val Lys Lys		
225	230	235 240
Ile Lys Ala Phe Val Glu Gln Val Ala Asn Val Val Leu Tyr Ser Ser		
	245	250 255
Asp Tyr Tyr Val Lys Pro Val Ala Met Glu Glu Ala Gln Glu Lys Val		
	260	265 270
Pro Pro Asn Ser Thr Leu Thr Lys Thr Leu Thr Leu Leu Pro Leu Leu		
	275	280 285
Ala Asn Asn Arg Glu Arg Arg Gly Ile Ala Leu Asp Gly Lys Ile Lys		
290	295	300
His Glu Asp Thr Asn Leu Ala Ser Ser Thr Ile Ile Lys Glu Gly Ile		
305	310	315 320
Asp Arg Thr Val Leu Gly Ile Leu Val Ser Tyr Gln Ile Lys Val Lys		
	325	330 335
Leu Thr Val Ser Gly Phe Leu Gly Glu Leu Thr Ser Ser Glu Val Ala		
	340	345 350
Thr Glu Val Pro Phe Arg Leu Met His Pro Gln Pro Glu Asp Pro Ala		
	355	360 365
Lys Glu Ser Tyr Gln Asp Ala Asn Leu Val Phe Glu Glu Phe Ala Arg		
370	375	380
His Asn Leu Lys Asp Ala Gly Glu Ala Glu Glu Gly Lys Arg Asp Lys		
385	390	395 400
Asn Asp Val Asp Glu		
	405	

<210> 23
 <211> 1247
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Met Arg Glu Trp Val Leu Leu Met Ser Val Leu Leu Cys Gly Leu

ES 2 874 884 T3

1		5						10					15			
Ala	Gly	Pro	Thr	His	Leu	Phe	Gln	Pro	Ser	Leu	Val	Leu	Asp	Met	Ala	
			20					25					30			
Lys	Val	Leu	Leu	Asp	Asn	Tyr	Cys	Phe	Pro	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly	Met	
		35					40					45				
Gln	Glu	Ala	Ile	Gln	Gln	Ala	Ile	Lys	Ser	His	Glu	Ile	Leu	Ser	Ile	
	50					55					60					
Ser	Asp	Pro	Gln	Thr	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Ala	Gly	Val	Gln	Ser	
65					70					75					80	
Ser	Leu	Asn	Asp	Pro	Arg	Leu	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Pro	Ser	Thr	Pro	
				85					90					95		
Glu	Pro	Pro	Pro	Gln	Val	Pro	Ala	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	
			100					105					110			
Leu	Leu	Ala	Trp	Leu	Gln	Arg	Gly	Leu	Arg	His	Glu	Val	Leu	Glu	Gly	
		115					120					125				
Asn	Val	Gly	Tyr	Leu	Arg	Val	Asp	Ser	Val	Pro	Gly	Gln	Glu	Val	Leu	
	130					135					140					
Ser	Met	Met	Gly	Glu	Phe	Leu	Val	Ala	His	Val	Trp	Gly	Asn	Leu	Met	
145					150					155					160	
Gly	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Asp	Leu	Arg	His	Cys	Thr	Gly	Gly	Gln	
				165				170						175		
Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Tyr	Ile	Ile	Ser	Tyr	Leu	His	Pro	Gly	Asn	Thr	
			180					185					190			
Ile	Leu	His	Val	Asp	Thr	Ile	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ser	Asn	Thr	Thr	Thr	
		195					200					205				
Glu	Ile	Trp	Thr	Leu	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Glu	Arg	Tyr	Gly	Ala	Asp	
	210					215					220					
Lys	Asp	Val	Val	Val	Leu	Thr	Ser	Ser	Gln	Thr	Arg	Gly	Val	Ala	Glu	
225					230					235					240	
Asp	Ile	Ala	His	Ile	Leu	Lys	Gln	Met	Arg	Arg	Ala	Ile	Val	Val	Gly	
				245					250					255		

ES 2 874 884 T3

Glu Arg Thr Gly Gly Gly Ala Leu Asp Leu Arg Lys Leu Arg Ile Gly
 260 265 270
 Glu Ser Asp Phe Phe Phe Thr Val Pro Val Ser Arg Ser Leu Gly Pro
 275 280 285
 Leu Gly Gly Gly Ser Gln Thr Trp Glu Gly Ser Gly Val Leu Pro Cys
 290 295 300
 Val Gly Thr Pro Ala Glu Gln Ala Leu Glu Lys Ala Leu Ala Ile Leu
 305 310 315 320
 Thr Leu Arg Ser Ala Leu Pro Gly Val Val His Cys Leu Gln Glu Val
 325 330 335
 Leu Lys Asp Tyr Tyr Thr Leu Val Asp Arg Val Pro Thr Leu Leu Gln
 340 345 350
 His Leu Ala Ser Met Asp Phe Ser Thr Val Val Ser Glu Glu Asp Leu
 355 360 365
 Val Thr Lys Leu Asn Ala Gly Leu Gln Ala Ala Ser Glu Asp Pro Arg
 370 375 380
 Leu Leu Val Arg Ala Ile Gly Pro Thr Glu Thr Pro Ser Trp Pro Ala
 385 390 395 400
 Pro Asp Ala Ala Ala Glu Asp Ser Pro Gly Val Ala Pro Glu Leu Pro
 405 410 415
 Glu Asp Glu Ala Ile Arg Gln Ala Leu Val Asp Ser Val Phe Gln Val
 420 425 430
 Ser Val Leu Pro Gly Asn Val Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Ser Phe Ala
 435 440 445
 Asp Ala Ser Val Leu Gly Val Leu Ala Pro Tyr Val Leu Arg Gln Val
 450 455 460
 Trp Glu Pro Leu Gln Asp Thr Glu His Leu Ile Met Asp Leu Arg His
 465 470 475 480
 Asn Pro Gly Gly Pro Ser Ser Ala Val Pro Leu Leu Leu Ser Tyr Phe
 485 490 495
 Gln Gly Pro Glu Ala Gly Pro Val His Leu Phe Thr Thr Tyr Asp Arg
 500 505 510

ES 2 874 884 T3

Arg	Thr	Asn	Ile	Thr	Gln	Glu	His	Phe	Ser	His	Met	Glu	Leu	Pro	Gly
		515					520					525			
Pro	Arg	Tyr	Ser	Thr	Gln	Arg	Gly	Val	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ser	His	Arg
	530					535					540				
Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Glu	Glu	Phe	Ala	Phe	Leu	Met	Gln	Ser	Leu	Gly
545					550					555					560
Trp	Ala	Thr	Leu	Val	Gly	Glu	Ile	Thr	Ala	Gly	Asn	Leu	Leu	His	Thr
				565					570					575	
Arg	Thr	Val	Pro	Leu	Leu	Asp	Thr	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Thr
			580					585					590		
Val	Pro	Val	Leu	Thr	Phe	Ile	Asp	Asn	His	Gly	Glu	Ala	Trp	Leu	Gly
		595					600					605			
Gly	Gly	Val	Val	Pro	Asp	Ala	Ile	Val	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Leu	Asp
	610					615					620				
Lys	Ala	Gln	Glu	Val	Leu	Glu	Phe	His	Gln	Ser	Leu	Gly	Ala	Leu	Val
625					630					635					640
Glu	Gly	Thr	Gly	His	Leu	Leu	Glu	Ala	His	Tyr	Ala	Arg	Pro	Glu	Val
				645					650					655	
Val	Gly	Gln	Thr	Ser	Ala	Leu	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Ala	Gln	Gly	Ala
			660					665					670		
Tyr	Arg	Thr	Ala	Val	Asp	Leu	Glu	Ser	Leu	Ala	Ser	Gln	Leu	Thr	Ala
		675					680					685			
Asp	Leu	Gln	Glu	Val	Ser	Gly	Asp	His	Arg	Leu	Leu	Val	Phe	His	Ser
	690					695					700				
Pro	Gly	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Val
705					710					715					720
Pro	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ile	Glu	Ala	Leu	Phe	Lys	Thr
				725					730					735	
Glu	Val	Leu	Pro	Gly	Gln	Leu	Gly	Tyr	Leu	Arg	Phe	Asp	Ala	Met	Ala
			740					745					750		
Glu	Leu	Glu	Thr	Val	Lys	Ala	Val	Gly	Pro	Gln	Leu	Val	Arg	Leu	Val
		755					760					765			

ES 2 874 884 T3

Trp Gln Gln Leu Val Asp Thr Ala Ala Leu Val Ile Asp Leu Arg Tyr
 770 775 780
 Asn Pro Gly Ser Tyr Ser Thr Ala Ile Pro Leu Leu Cys Ser Tyr Phe
 785 790 795 800
 Phe Glu Ala Glu Pro Arg Gln His Leu Tyr Ser Val Phe Asp Arg Ala
 805 810 815
 Thr Ser Lys Val Thr Glu Val Trp Thr Leu Pro Gln Val Ala Gly Gln
 820 825 830
 Arg Tyr Gly Ser His Lys Asp Leu Tyr Ile Leu Met Ser His Thr Ser
 835 840 845
 Gly Ser Ala Ala Glu Ala Phe Ala His Thr Met Gln Asp Leu Gln Arg
 850 855 860
 Ala Thr Val Ile Gly Glu Pro Thr Ala Gly Gly Ala Leu Ser Val Gly
 865 870 875 880
 Ile Tyr Gln Val Gly Ser Ser Pro Leu Tyr Ala Ser Met Pro Thr Gln
 885 890 895
 Met Ala Met Ser Ala Thr Thr Gly Lys Ala Trp Asp Leu Ala Gly Val
 900 905 910
 Glu Pro Asp Ile Thr Val Pro Met Ser Glu Ala Leu Ser Ile Ala Gln
 915 920 925
 Asp Ile Val Ala Leu Arg Ala Lys Val Pro Thr Val Leu Gln Thr Ala
 930 935 940
 Gly Lys Leu Val Ala Asp Asn Tyr Ala Ser Ala Glu Leu Gly Ala Lys
 945 950 955 960
 Met Ala Thr Lys Leu Ser Gly Leu Gln Ser Arg Tyr Ser Arg Val Thr
 965 970 975
 Ser Glu Val Ala Leu Ala Glu Ile Leu Gly Ala Asp Leu Gln Met Leu
 980 985 990
 Ser Gly Asp Pro His Leu Lys Ala Ala His Ile Pro Glu Asn Ala Lys
 995 1000 1005
 Asp Arg Ile Pro Gly Ile Val Pro Met Gln Ile Pro Ser Pro Glu

ES 2 874 884 T3

1010	1015	1020
Val Phe Glu Glu Leu Ile Lys 1025	Phe Ser Phe His Thr 1030	Asn Val Leu 1035
Glu Asp Asn Ile Gly Tyr Leu 1040	Arg Phe Asp Met Phe 1045	Gly Asp Gly 1050
Glu Leu Leu Thr Gln Val Ser 1055	Arg Leu Leu Val 1060	Glu His Ile Trp 1065
Lys Lys Ile Met His Thr Asp 1070	Ala Met Ile Ile 1075	Asp Met Arg Phe 1080
Asn Ile Gly Gly Pro Thr Ser 1085	Ser Ile Pro Ile 1090	Leu Cys Ser Tyr 1095
Phe Phe Asp Glu Gly Pro Pro 1100	Val Leu Leu Asp 1105	Lys Ile Tyr Ser 1110
Arg Pro Asp Asp Ser Val Ser 1115	Glu Leu Trp Thr 1120	His Ala Gln Val 1125
Val Gly Glu Arg Tyr Gly Ser 1130	Lys Lys Ser Met 1135	Val Ile Leu Thr 1140
Ser Ser Val Thr Ala Gly Thr 1145	Ala Glu Glu Phe 1150	Thr Tyr Ile Met 1155
Lys Arg Leu Gly Arg Ala Leu 1160	Val Ile Gly Glu 1165	Val Thr Ser Gly 1170
Gly Cys Gln Pro Pro Gln Thr 1175	Tyr His Val Asp 1180	Asp Thr Asn Leu 1185
Tyr Leu Thr Ile Pro Thr Ala 1190	Arg Ser Val Gly 1195	Ala Ser Asp Gly 1200
Ser Ser Trp Glu Gly Val Gly 1205	Val Thr Pro His 1210	Val Val Val Pro 1215
Ala Glu Glu Ala Leu Ala Arg 1220	Ala Lys Glu Met 1225	Leu Gln His Asn 1230
Gln Leu Arg Val Lys Arg Ser 1235	Pro Gly Leu Gln 1240	Asp His Leu 1245

<210> 24
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 5
 <400> 24

 Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5 10 15

 Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
 20 25 30

 Phe
 10
 <210> 25
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Alfa-gliadinadesamidada de 33 mer
 <400> 25

 Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
 1 5 10 15

 Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Glu Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
 20 25 30

 Phe
 20
 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 25
 <213> Triticum aestivum
 <400> 26

 Gln Gln Tyr Pro Ser Gly Gln Gly Ser Phe Gln Pro Ser Gln Gln Asn
 1 5 10 15

 Pro Gln
 30
 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Triticum aestivum
 35
 <400> 27

 Gln Pro Phe Pro Gln Pro Glu Gln Pro Phe Pro Trp
 1 5 10

 40
 <210> 28
 <211> 519
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 874 884 T3

<400> 28

Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ala	Ser	Met	Glu	Phe	Cys	Phe	Asp	Val	Phe	Lys	1	5	10	15
Glu	Leu	Lys	Val	His	His	Ala	Asn	Glu	Asn	Ile	Phe	Tyr	Cys	Pro	Ile	20	25	30	
Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Leu	Ala	Met	Val	Tyr	Leu	Gly	Ala	Lys	Asp	Ser	35	40	45	
Thr	Arg	Thr	Gln	Ile	Asn	Lys	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Lys	Leu	Pro	Gly	50	55	60	
Phe	Gly	Asp	Ser	Ile	Glu	Ala	Gln	Cys	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Val	His	65	70	75	80
Ser	Ser	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Asn	Gln	Ile	Thr	Lys	Pro	Asn	Asp	Val	85	90	95	
Tyr	Ser	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr	Ala	Glu	Glu	Arg	Tyr	Pro	100	105	110	
Ile	Leu	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gln	Cys	Val	Lys	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gly	Gly	115	120	125	
Leu	Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Gln	Thr	Ala	Ala	Asp	Gln	Ala	Arg	Glu	Leu	130	135	140	
Ile	Asn	Ser	Trp	Val	Glu	Ser	Gln	Thr	Asn	Gly	Ile	Ile	Arg	Asn	Val	145	150	155	160
Leu	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Met	Val	Leu	Val	Asn	165	170	175	
Ala	Ile	Val	Phe	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Glu	Asp	180	185	190	
Thr	Gln	Ala	Met	Pro	Phe	Arg	Val	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Lys	Pro	Val	195	200	205	

ES 2 874 884 T3

Gln	Met	Met	Tyr	Gln	Ile	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Ser	Met	Ala	Ser	210	215	220
Glu	Lys	Met	Lys	Ile	Leu	Glu	Leu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Ser	225	230	235
Met	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu	245	250	255
Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Trp	Thr	Ser	Ser	Asn	Val	260	265	270
Met	Glu	Glu	Arg	Lys	Ile	Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Arg	Met	Lys	Met	Glu	275	280	285
Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Leu	Met	Ala	Met	Gly	Ile	Thr	Asp	290	295	300
Val	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Glu	Ser	305	310	315
Leu	Lys	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	His	Ala	Ala	His	Ala	Glu	Ile	Asn	Glu	325	330	335
Ala	Gly	Arg	Glu	Val	Val	Gly	Ser	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Ala	340	345	350
Ser	Val	Ser	Glu	Glu	Phe	Arg	Ala	Asp	His	Pro	Phe	Leu	Phe	Cys	Ile	355	360	365
Lys	His	Ile	Ala	Thr	Asn	Ala	Val	Leu	Phe	Phe	Gly	Arg	Cys	Val	Ser	370	375	380
Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	385	390	395
Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	405	410	415
Thr	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ala	Met	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	420	425	430
Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Arg	Ile	Ser	Ala	Arg	Gly	Val	Thr	Thr	Tyr	435	440	445
Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	450	455	460

ES 2 874 884 T3

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
465 470 475 480

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe
485 490 495

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
500 505 510

Ser His His His His His His
515

<210> 29

<211> 519

5 <212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

<223>Proteína de fusión

10

<400> 29

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Lys Tyr
20 25 30

Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ile Gly
115 120 125

Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe Lys Glu Leu Lys Val
130 135 140

ES 2 874 884 T3

His 145	His	Ala	Asn	Glu	Asn 150	Ile	Phe	Tyr	Cys	Pro 155	Ile	Ala	Ile	Met	Ser 160
Ala	Leu	Ala	Met	Val 165	Tyr	Leu	Gly	Ala	Lys 170	Asp	Ser	Thr	Arg	Thr 175	Gln
Ile	Asn	Lys	Val 180	Val	Arg	Phe	Asp	Lys 185	Leu	Pro	Gly	Phe	Gly 190	Asp	Ser
Ile	Glu	Ala 195	Gln	Cys	Gly	Thr	Ser 200	Val	Asn	Val	His	Ser 205	Ser	Leu	Arg
Asp 210	Ile	Leu	Asn	Gln	Ile	Thr 215	Lys	Pro	Asn	Asp	Val 220	Tyr	Ser	Phe	Ser
Leu 225	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr 230	Ala	Glu	Glu	Arg	Tyr 235	Pro	Ile	Leu	Pro	Glu 240
Tyr	Leu	Gln	Cys	Val 245	Lys	Glu	Leu	Tyr	Arg 250	Gly	Gly	Leu	Glu	Pro 255	Ile
Asn	Phe	Gln	Thr 260	Ala	Ala	Asp	Gln	Ala 265	Arg	Glu	Leu	Ile	Asn 270	Ser	Trp
Val	Glu	Ser 275	Gln	Thr	Asn	Gly	Ile 280	Ile	Arg	Asn	Val	Leu 285	Gln	Pro	Ser
Ser 290	Val	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala 295	Met	Val	Leu	Val	Asn 300	Ala	Ile	Val	Phe
Lys 305	Gly	Leu	Trp	Glu	Lys 310	Ala	Phe	Lys	Asp	Glu 315	Asp	Thr	Gln	Ala	Met 320
Pro	Phe	Arg	Val	Thr 325	Glu	Gln	Glu	Ser	Lys 330	Pro	Val	Gln	Met	Met 335	Tyr
Gln	Ile	Gly	Leu 340	Phe	Arg	Val	Ala	Ser 345	Met	Ala	Ser	Glu	Lys 350	Met	Lys
Ile	Leu	Glu 355	Leu	Pro	Phe	Ala	Ser 360	Gly	Thr	Met	Ser	Met 365	Leu	Val	Leu
Leu 370	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Gly 375	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu 380	Ser	Ile	Ile	Asn
Phe 385	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu 390	Trp	Thr	Ser	Ser	Asn 395	Val	Met	Glu	Glu	Arg 400

ES 2 874 884 T3

Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met Glu Glu Lys Tyr Asn
405 410 415

Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr Asp Val Phe Ser Ser
420 425 430

Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu Ser Leu Lys Ile Ser
435 440 445

Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly Arg Glu
450 455 460

Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala Ala Ser Val Ser Glu
465 470 475 480

Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys Ile Lys His Ile Ala
485 490 495

Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val Ser Pro Gly Gly Gly
500 505 510

Ser His His His His His His
515

<210> 30

<211> 908

5 <212> PRT

<213>Secuencia Artificial

<220>

10 <223>Proteína de fusión

<400> 30

Gly Ser Ile Gly Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe Lys
1 5 10 15

Glu Leu Lys Val His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro Ile
20 25 30

Ala Ile Met Ser Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp Ser
35 40 45

Thr Arg Thr Gln Ile Asn Lys Val Val Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly
50 55 60

Phe Gly Asp Ser Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val His
65 70 75 80

ES 2 874 884 T3

Ser	Ser	Leu	Arg	Asp	Ile	Leu	Asn	Gln	Ile	Thr	Lys	Pro	Asn	Asp	Val	85	90	95
Tyr	Ser	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr	Ala	Glu	Glu	Arg	Tyr	Pro	100	105	110
Ile	Leu	Pro	Glu	Tyr	Leu	Gln	Cys	Val	Lys	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gly	Gly	115	120	125
Leu	Glu	Pro	Ile	Asn	Phe	Gln	Thr	Ala	Ala	Asp	Gln	Ala	Arg	Glu	Leu	130	135	140
Ile	Asn	Ser	Trp	Val	Glu	Ser	Gln	Thr	Asn	Gly	Ile	Ile	Arg	Asn	Val	145	150	155
Leu	Gln	Pro	Ser	Ser	Val	Asp	Ser	Gln	Thr	Ala	Met	Val	Leu	Val	Asn	165	170	175
Ala	Ile	Val	Phe	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Lys	Ala	Phe	Lys	Asp	Glu	Asp	180	185	190
Thr	Gln	Ala	Met	Pro	Phe	Arg	Val	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Lys	Pro	Val	195	200	205
Gln	Met	Met	Tyr	Gln	Ile	Gly	Leu	Phe	Arg	Val	Ala	Ser	Met	Ala	Ser	210	215	220
Glu	Lys	Met	Lys	Ile	Leu	Glu	Leu	Pro	Phe	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Ser	225	230	235
Met	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Glu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu	245	250	255
Ser	Ile	Ile	Asn	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr	Glu	Trp	Thr	Ser	Ser	Asn	Val	260	265	270
Met	Glu	Glu	Arg	Lys	Ile	Lys	Val	Tyr	Leu	Pro	Arg	Met	Lys	Met	Glu	275	280	285
Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Leu	Met	Ala	Met	Gly	Ile	Thr	Asp	290	295	300
Val	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Asn	Leu	Ser	Gly	Ile	Ser	Ser	Ala	Glu	Ser	305	310	315
Leu	Lys	Ile	Ser	Gln	Ala	Val	His	Ala	Ala	His	Ala	Glu	Ile	Asn	Glu	325	330	335

ES 2 874 884 T3

Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala Ala
340 345 350

Ser Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys Ile
355 360 365

Lys His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val Ser
370 375 380

Pro Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu
385 390 395 400

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
405 410 415

Thr Phe Glu Lys Tyr Ala Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
420 425 430

Gly Leu Glu Trp Val Ser Arg Ile Ser Ala Arg Gly Val Thr Thr Tyr
435 440 445

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
450 455 460

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
465 470 475 480

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser His Lys Arg His Glu His Thr Arg Phe
485 490 495

Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
500 505 510

Ser Gly Ser Ile Gly Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe
515 520 525

Lys Glu Leu Lys Val His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro
530 535 540

Ile Ala Ile Met Ser Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp
545 550 555 560

Ser Thr Arg Thr Gln Ile Asn Lys Val Val Arg Phe Asp Lys Leu Pro
565 570 575

Gly Phe Gly Asp Ser Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val
580 585 590

ES 2 874 884 T3

His Ser Ser Leu Arg Asp Ile Leu Asn Gln Ile Thr Lys Pro Asn Asp
 595 600 605
 Val Tyr Ser Phe Ser Leu Ala Ser Arg Leu Tyr Ala Glu Glu Arg Tyr
 610 615 620
 Pro Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Gln Cys Val Lys Glu Leu Tyr Arg Gly
 625 630 635 640
 Gly Leu Glu Pro Ile Asn Phe Gln Thr Ala Ala Asp Gln Ala Arg Glu
 645 650 655
 Leu Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg Asn
 660 665 670
 Val Leu Gln Pro Ser Ser Val Asp Ser Gln Thr Ala Met Val Leu Val
 675 680 685
 Asn Ala Ile Val Phe Lys Gly Leu Trp Glu Lys Ala Phe Lys Asp Glu
 690 695 700
 Asp Thr Gln Ala Met Pro Phe Arg Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Pro
 705 710 715 720
 Val Gln Met Met Tyr Gln Ile Gly Leu Phe Arg Val Ala Ser Met Ala
 725 730 735
 Ser Glu Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met
 740 745 750
 Ser Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu
 755 760 765
 Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn
 770 775 780
 Val Met Glu Glu Arg Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met
 785 790 795 800
 Glu Glu Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr
 805 810 815
 Asp Val Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu
 820 825 830
 Ser Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn

ES 2 874 884 T3

835

840

845

Glu Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala
850 855 860

Ala Ser Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys
865 870 875 880

Ile Lys His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val
885 890 895

Ser Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His
900 905

<210> 31

<211> 395

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Ser Ile Gly Ala Ala Ser Met Glu Phe Cys Phe Asp Val Phe Lys
1 5 10 15

Glu Leu Lys Val His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro Ile
20 25 30

Ala Ile Met Ser Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp Ser
35 40 45

Thr Arg Thr Gln Ile Asn Lys Val Val Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly
50 55 60

Phe Gly Asp Ser Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val His
65 70 75 80

Ser Ser Leu Arg Asp Ile Leu Asn Gln Ile Thr Lys Pro Asn Asp Val
85 90 95

Tyr Ser Phe Ser Leu Ala Ser Arg Leu Tyr Ala Glu Glu Arg Tyr Pro
100 105 110

Ile Leu Pro Glu Tyr Leu Gln Cys Val Lys Glu Leu Tyr Arg Gly Gly
115 120 125

Leu Glu Pro Ile Asn Phe Gln Thr Ala Ala Asp Gln Ala Arg Glu Leu
130 135 140

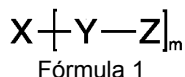
Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg Asn Val

ES 2 874 884 T3

145		150		155		160
Leu Gln Pro Ser Ser Val Asp Ser Gln Thr Ala Met Val Leu Val Asn						
		165		170		175
Ala Ile Val Phe Lys Gly Leu Trp Glu Lys Ala Phe Lys Asp Glu Asp						
		180		185		190
Thr Gln Ala Met Pro Phe Arg Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Pro Val						
		195		200		205
Gln Met Met Tyr Gln Ile Gly Leu Phe Arg Val Ala Ser Met Ala Ser						
		210		215		220
Glu Lys Met Lys Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met Ser						
		225		230		235
Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu						
		245		250		255
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn Val						
		260		265		270
Met Glu Glu Arg Lys Ile Lys Val Tyr Leu Pro Arg Met Lys Met Glu						
		275		280		285
Glu Lys Tyr Asn Leu Thr Ser Val Leu Met Ala Met Gly Ile Thr Asp						
		290		295		300
Val Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu Ser						
		305		310		315
Leu Lys Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu						
		325		330		335
Ala Gly Arg Glu Val Val Gly Ser Ala Glu Ala Gly Val Asp Ala Ala						
		340		345		350
Ser Val Ser Glu Glu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Cys Ile						
		355		360		365
Lys His Ile Ala Thr Asn Ala Val Leu Phe Phe Gly Arg Cys Val Ser						
		370		375		380
Pro Gly Gly Gly Ser His His His His His His						
		385		390		395

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un compuesto de Fórmula 1:



en la que:

m es un número entero de 1 a 100;
X comprende

un antígeno alimentario seleccionado de la SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, al que los pacientes desarrollan una respuesta alérgica o de hipersensibilidad,

o

un antígeno seleccionado de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, contra el cual un paciente desarrolla una respuesta autoinmune;

Y comprende una fracción enlazadora; y

Z comprende una fracción dirigida al hígado;

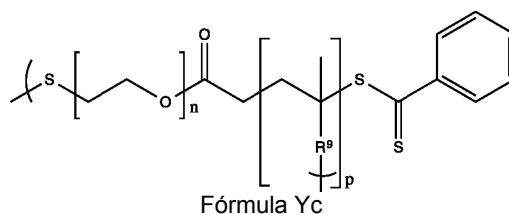
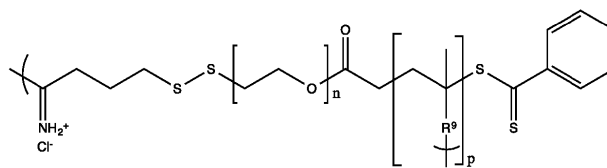
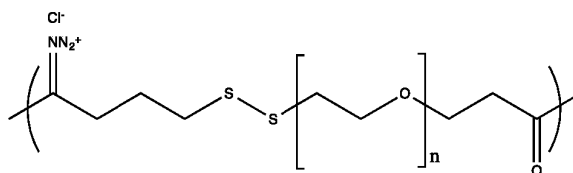
en la que la fracción dirigida al hígado comprende galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina.

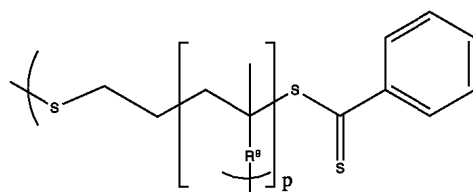
2. La composición de la reivindicación 1 en la que Z está conjugado con Y en C1, C2 o C6.

3. La composición de la reivindicación 1 en la que Y se selecciona de enlazadores de N-hidroxysuccinamidilo, enlazadores de maleimida, enlazadores de vinilsulfona, enlazadores de piridil-di-tiol-poli(etilenglicol), enlazadores de piridil-di-tiol, enlazadores de carbonato de n-nitrofenilo, enlazadores de éster de NHS y enlazadores de éster de nitrofenoxi-poli(etilenglicol).

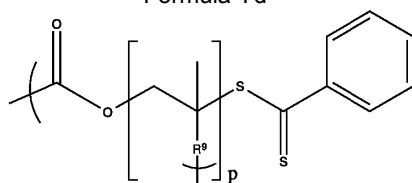
4. La composición de la reivindicación 1 en la que Y comprende:

una estructura representada por una de las fórmulas Ya a Yp:

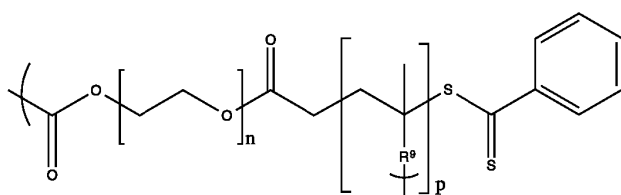




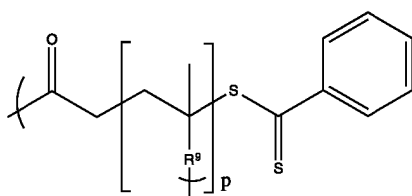
Fórmula Yd



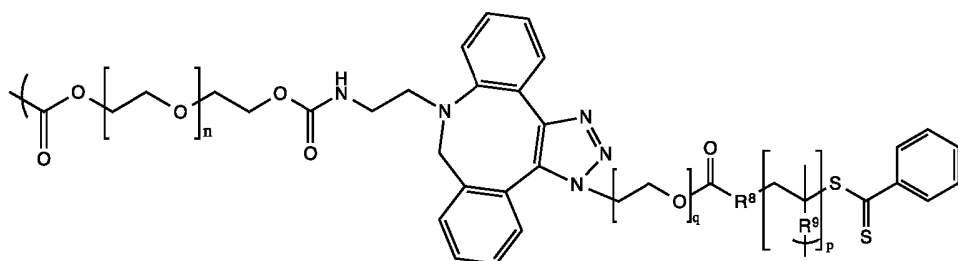
Fórmula Ye



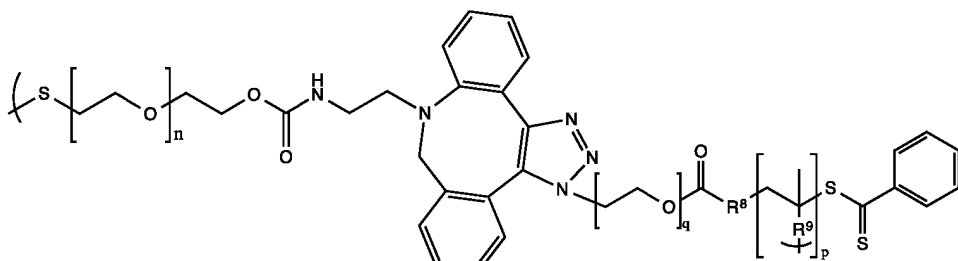
Fórmula Yf



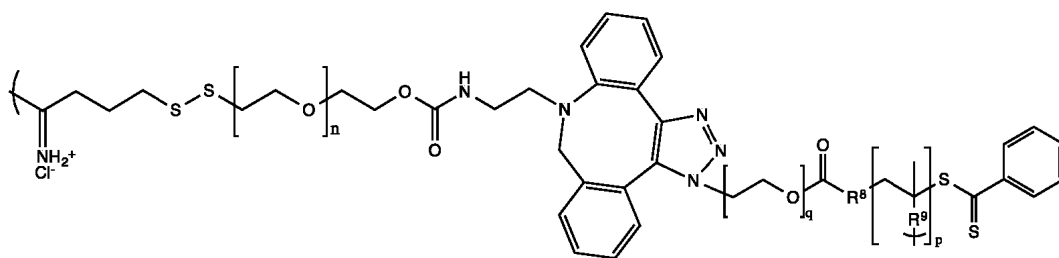
Fórmula Yg



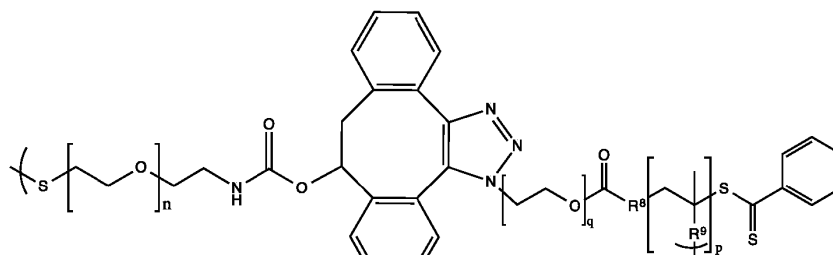
Fórmula Yh



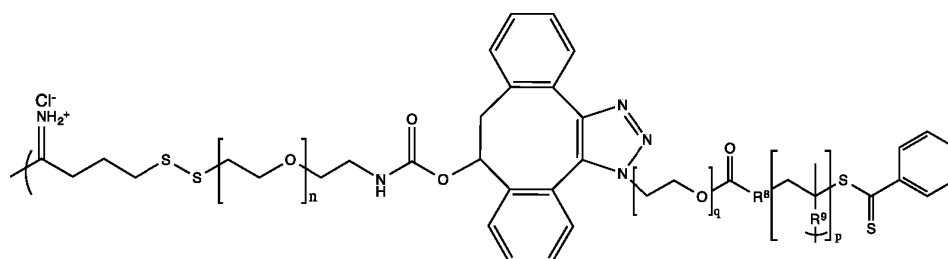
Fórmula Yi



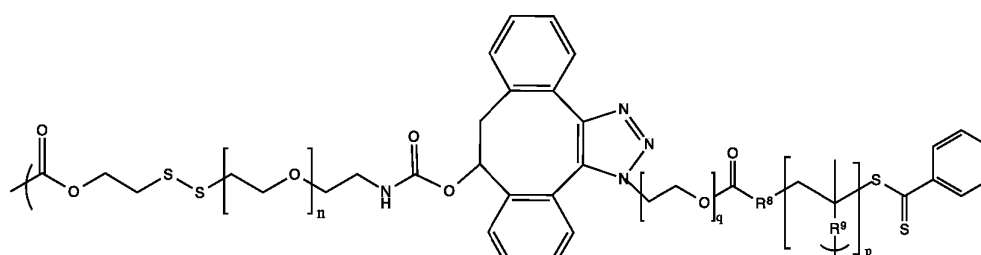
Fórmula Yj



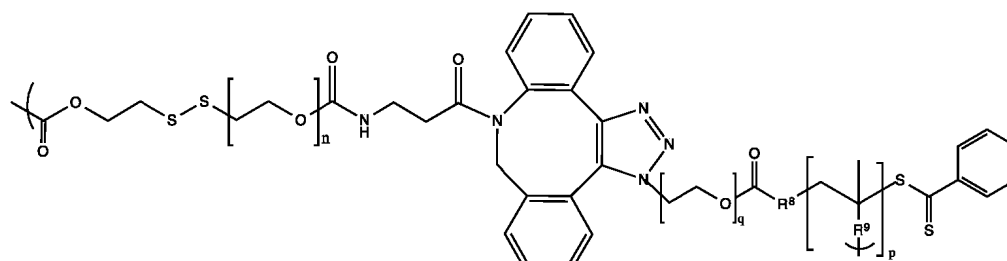
Fórmula Yk



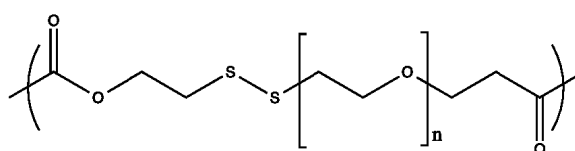
Fórmula YL



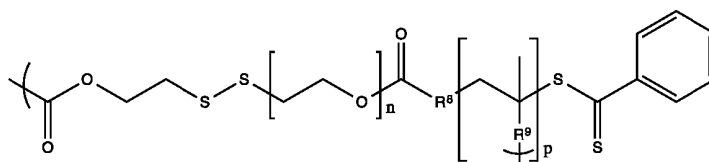
Fórmula Ym



Fórmula Yn



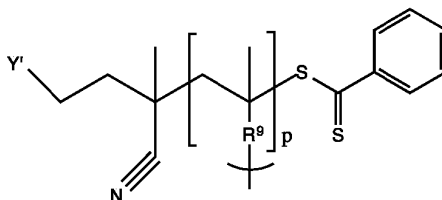
Fórmula Yo



Fórmula Yp

o tiene una porción representada por la Fórmula Y'-CMP:

5



Fórmula Y'-CMP

10 en las que:

el corchete izquierdo "(" indica el enlace entre X y Y;
 el corchete derecho o inferior ")" indica el enlace entre Y y Z;
 n es un número entero de 1 a 100;
 p es un número entero de 2 a 150;
 q es un número entero de 1 a 44;
 R⁸ es -CH₂- o -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-;
 R⁹ es un enlace directo o -CH₂-CH₂-NH-C(O)-; y
 Y' representa la porción restante de Y, en la que preferiblemente:

20

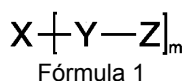
(i) n es de 40 a 80;
 p es de 10 a 100;
 q es de 3 a 20;

25 R⁸ es -CH₂-CH₂-C(CH₃)(CN)-; y
 cuando R⁹ es -CH₂-CH₂-NH-C(O)-, Z es galactosa o N-acetilgalactosamina conjugada en su C1; y/o
 (ii) Y comprende la Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Yh, Fórmula Yi, Fórmula Yk, Fórmula Ym o Fórmula Yn; o
 (iii) Y comprende la Fórmula Ya, Fórmula Yb, Fórmula Ym o Fórmula Yn.

30 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que Y comprende la Fórmula Yc.

6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que Y comprende la Fórmula Ym.

35 7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición que comprende un compuesto de Fórmula 1:



Fórmula 1

40

en la que:

m es un número entero de 1 a 100;

X comprende un antígeno contra el cual un paciente desarrolla una respuesta inmune;

45 Y comprende una fracción enlazadora; y

Z comprende una fracción dirigida al hígado;

en la que la fracción dirigida al hígado comprende galactosa, galactosamina o N-acetilgalactosamina, para uso en la tolerancia de dicho paciente con respecto alafracción de antígeno X.

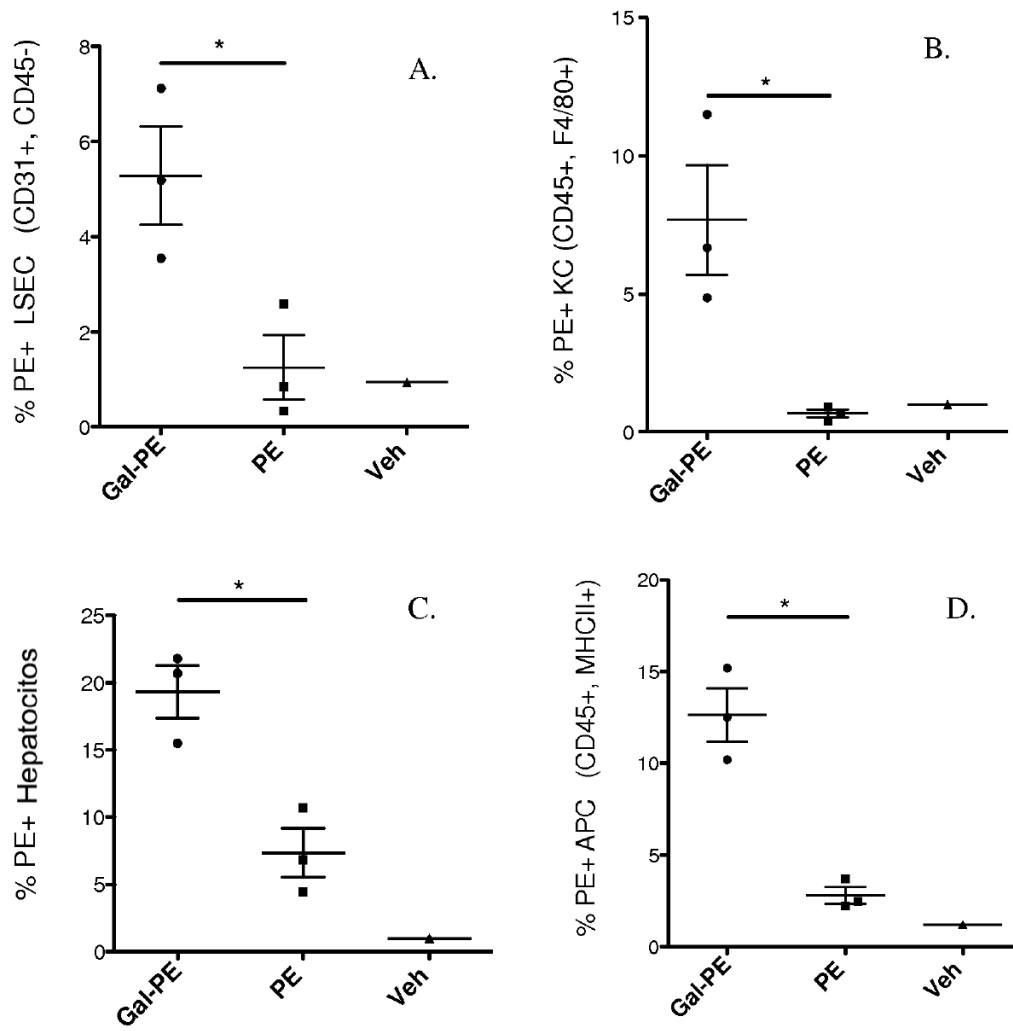


FIG. 1

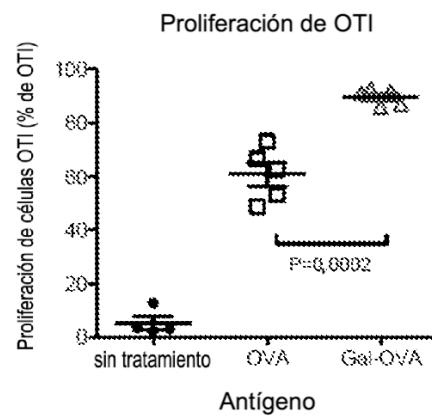


FIG. 2

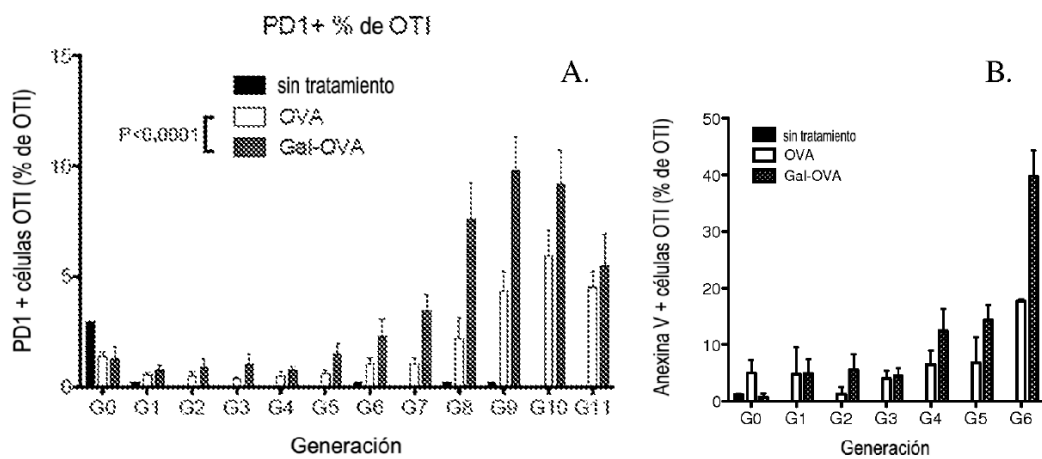


FIG. 3

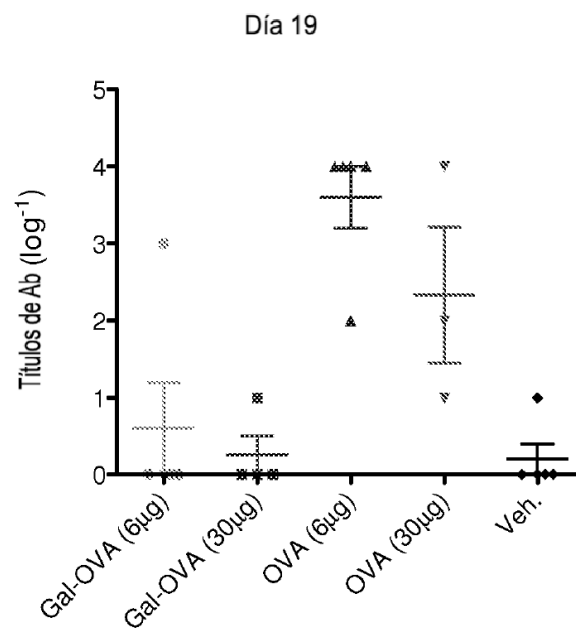


FIG. 4

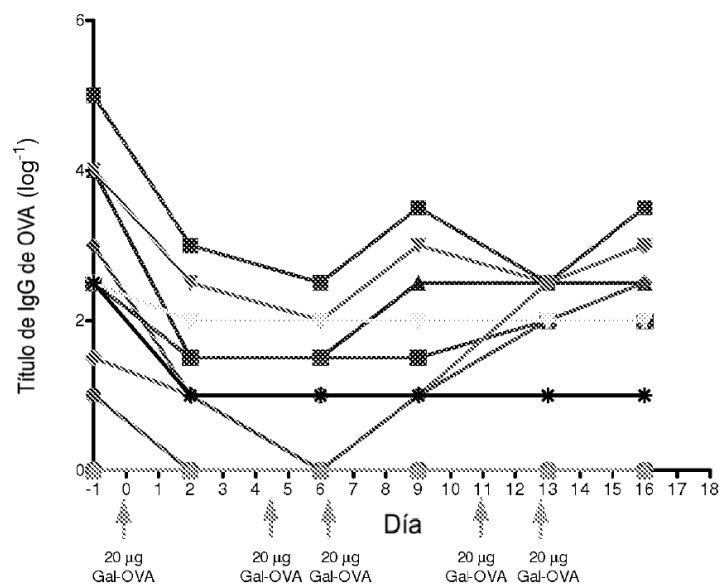


FIG. 5

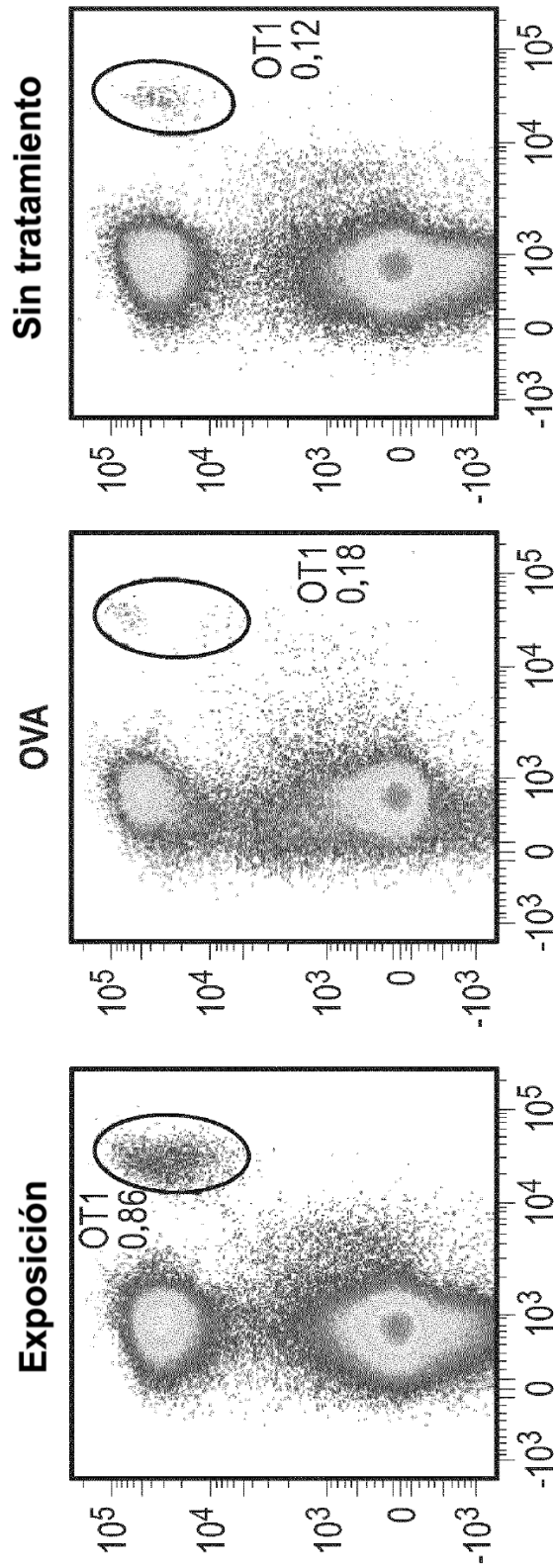


FIG. 6A

FIG. 6B

FIG. 6C

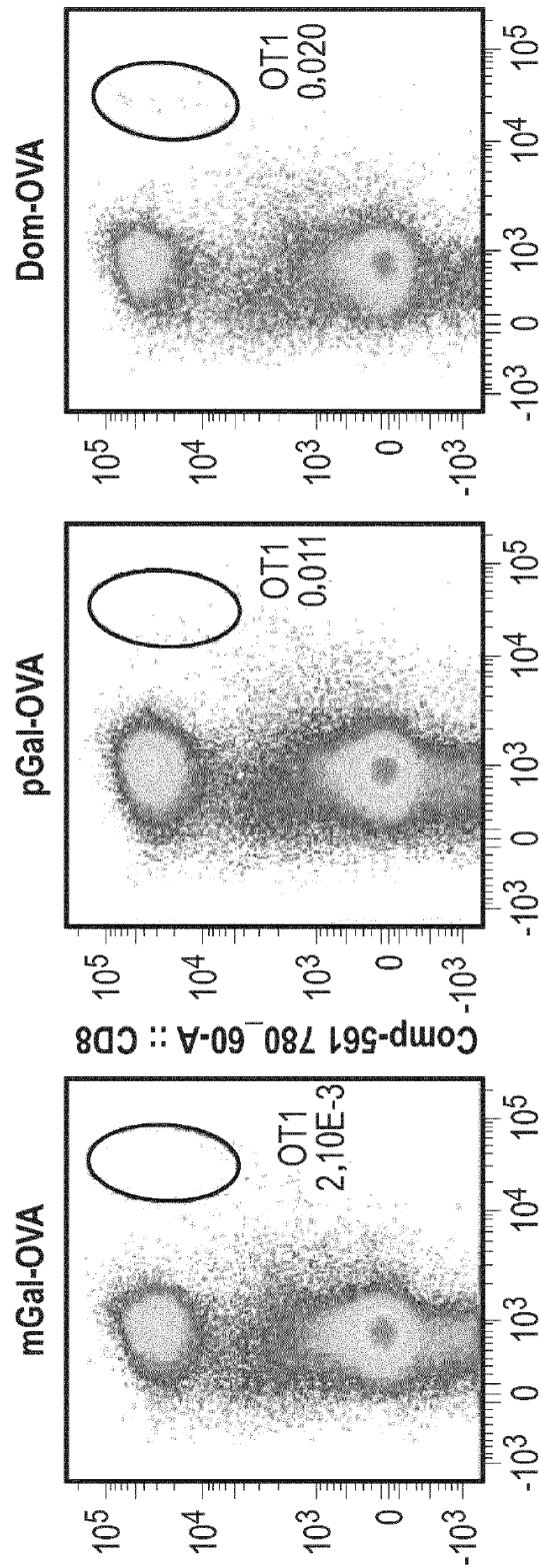
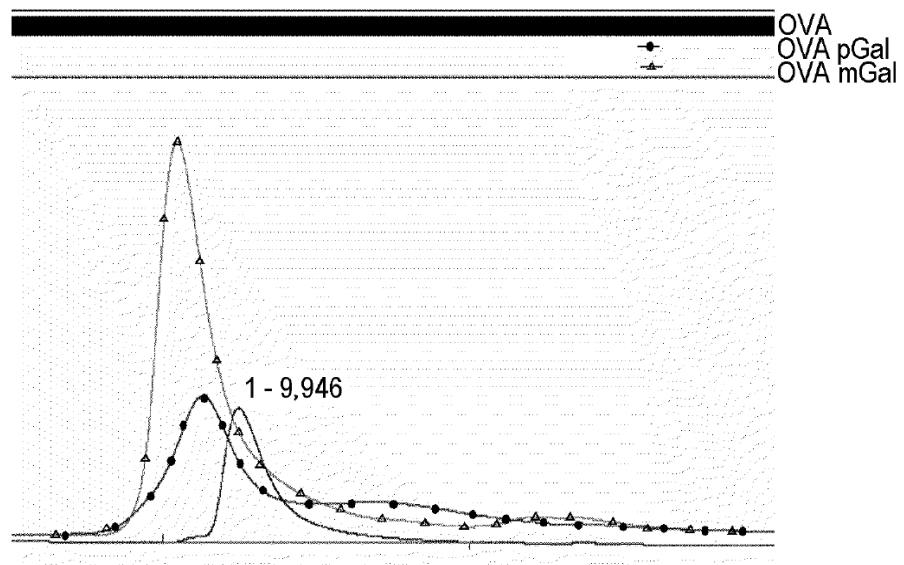


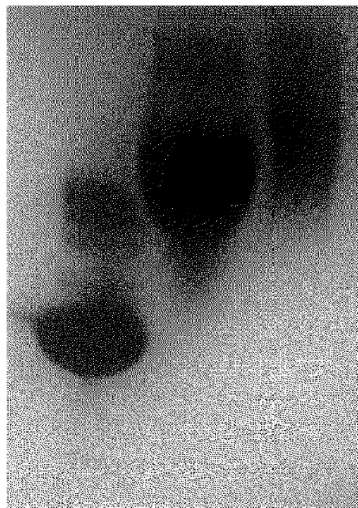
FIG. 6D

FIG. 6E

FIG. 6F



A



B

FIGS. 7A-7B

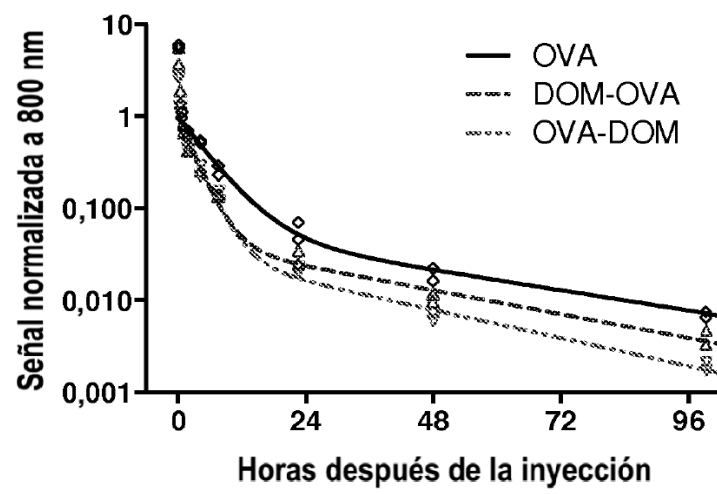
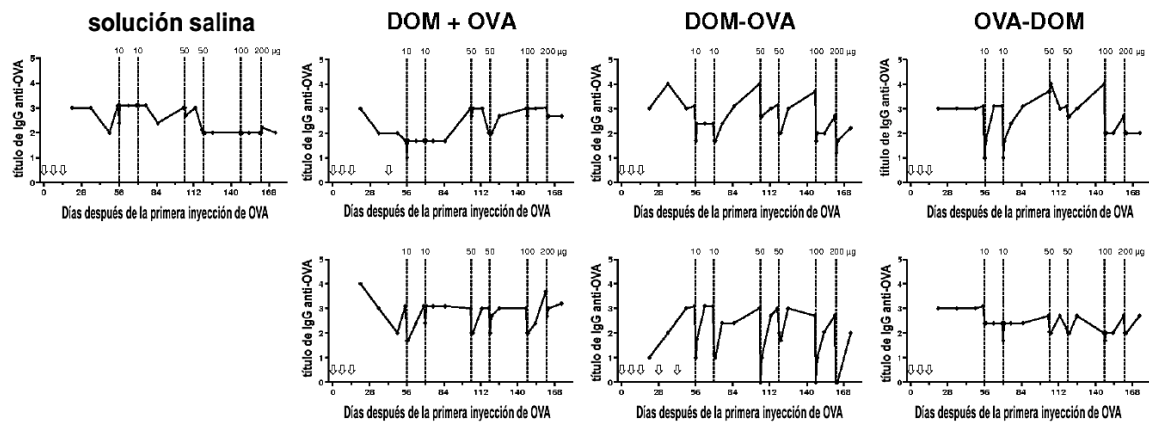


FIG. 8

(a)



(b)

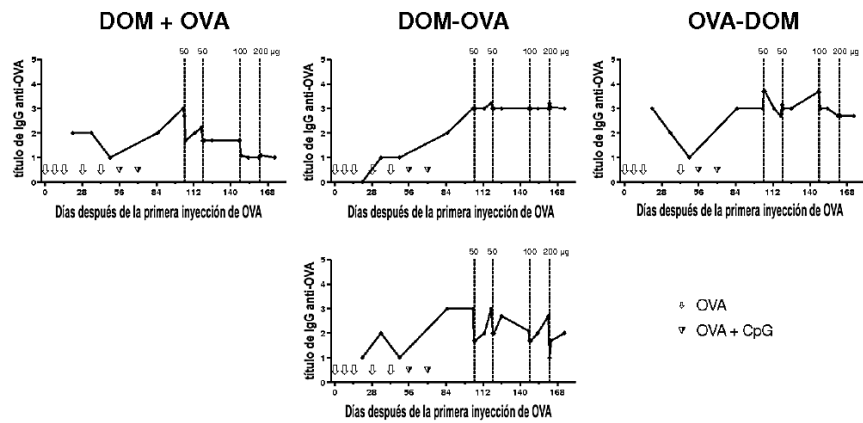


FIG. 9