(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106456743 A
(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580020044.3

(22)申请日 2015.02.20

(30)优先权数据
61/942,942 2014.02.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.10.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2015/001145 2015.02.20

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2015/140648 EN 2015.09.24

(71)申请人 洛桑聚合联合学院
地址 瑞士洛桑
申请人 阿诺基昂股份公司

(72)发明人 J.A.哈贝尔 S.康托斯 K.M.洛伦兹 D.S.威尔逊 S.盖

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张文辉

(51)Int.Cl.
A61K 39/35(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 47/54(2017.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 37/08(2006.01)

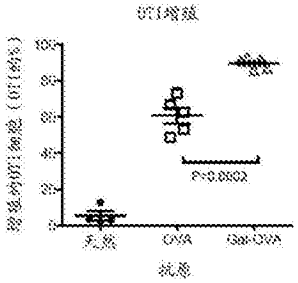
权利要求书11页 说明书83页
序列表76页 附图5页

(54)发明名称

糖靶向性治疗剂

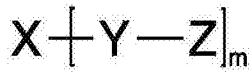
(57)摘要

糖靶向性治疗剂在移植排斥,自身免疫性疾病,食物过敏,以及针对治疗剂的免疫应答的治疗中是有用的。



CN 106456743 A

1.组合物,其包含通式1的化合物:



通式1

其中:

m为约1至100的整数;

X包括抗原或其致耐受性部分,患者针对所述抗原形成不想要的免疫应答;或者

X包括特异性结合循环蛋白质或肽或抗体的抗体,抗体片段或配体,所述循环蛋白质或肽或抗体成因性参与移植排斥,针对治疗剂的免疫应答,自身免疫性疾病,超敏反应和/或变态反应;

Y包括接头部分;和

Z包括肝靶向部分。

2.权利要求1的组合物,其中Z包括半乳糖,半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

3.权利要求2的组合物,其包括Z在其C1,C2或C6缀合至Y。

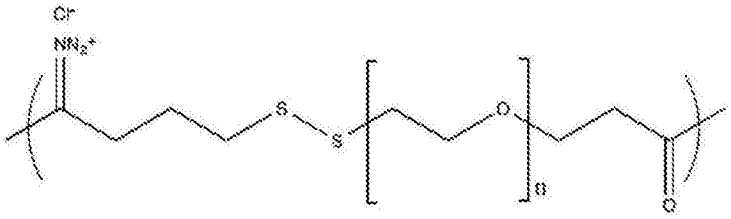
4.权利要求1的组合物,其中Y选自N-羟基琥珀酸酰胺基接头,马来酰亚胺(malaemide)接头,乙烯基砜接头,吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接头,吡啶基二硫醇接头,正-硝基苯基碳酸酯接头,NHS-酯接头,和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯接头。

5.权利要求1的组合物,其中Y包括:

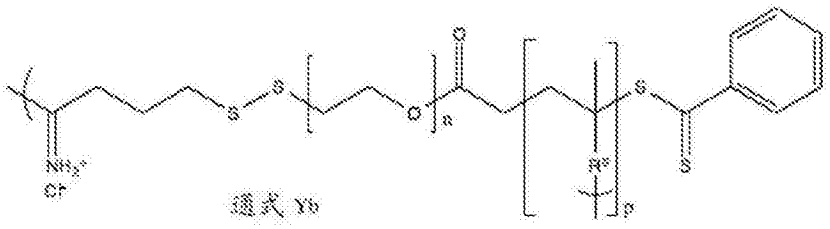
特异性结合X的抗体,抗体片段,肽或其他配体;

二硫烷基乙酯(disulfanyl ethyl ester);

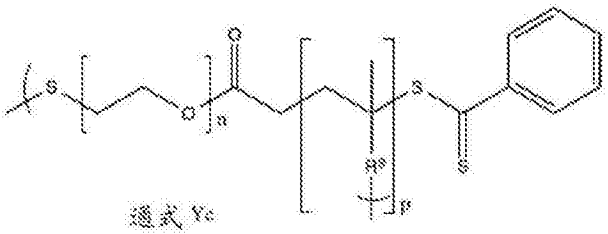
以通式Ya至Yp之一表示的结构:



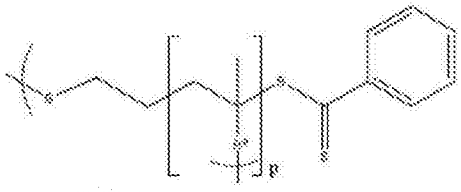
通式 Ya



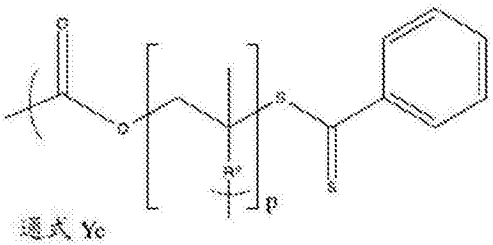
通式 Yb



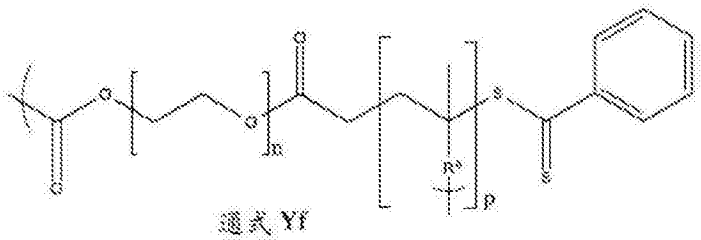
通式 Yc



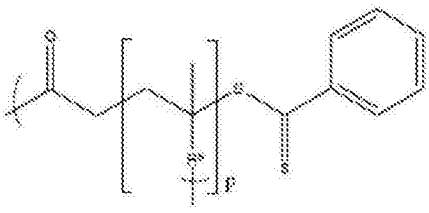
通式 Yd



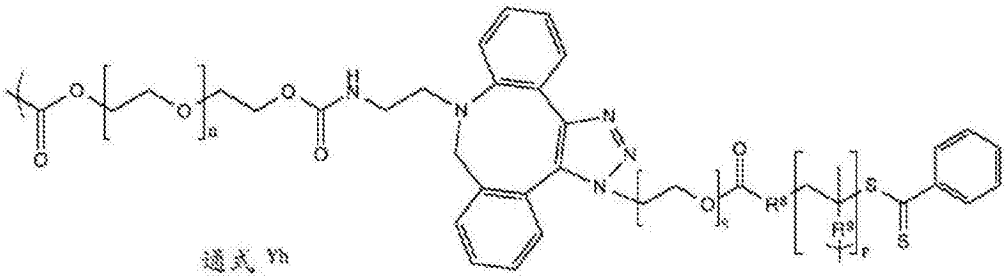
通式 Ye



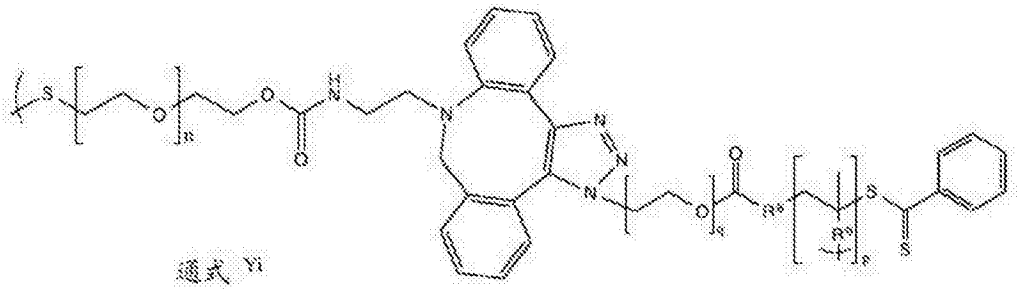
通式 Yf



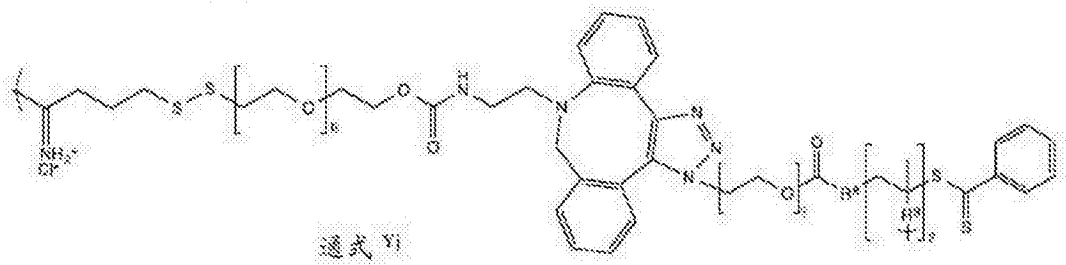
通式 Yg



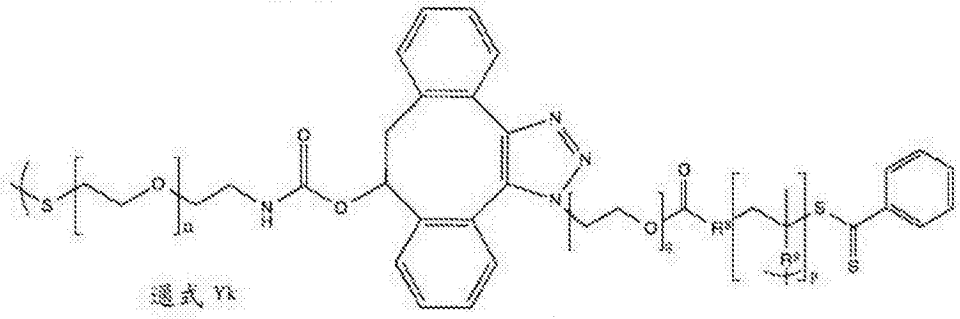
通式 Yh



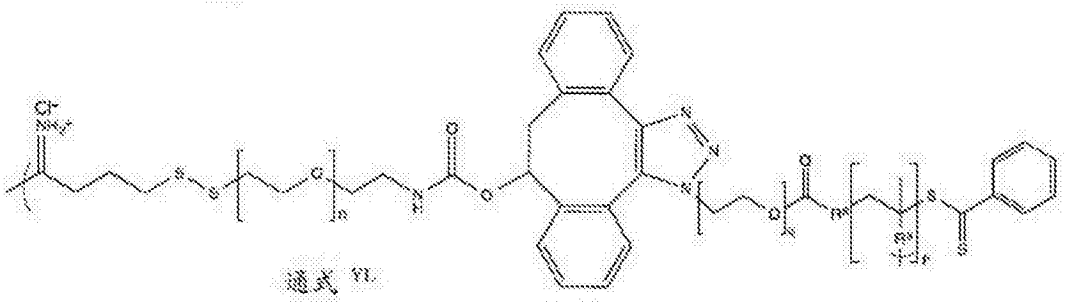
通式 Vi



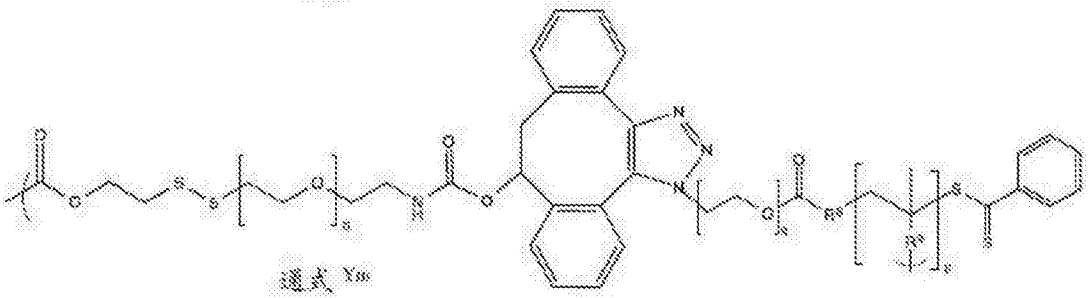
通式 Vj



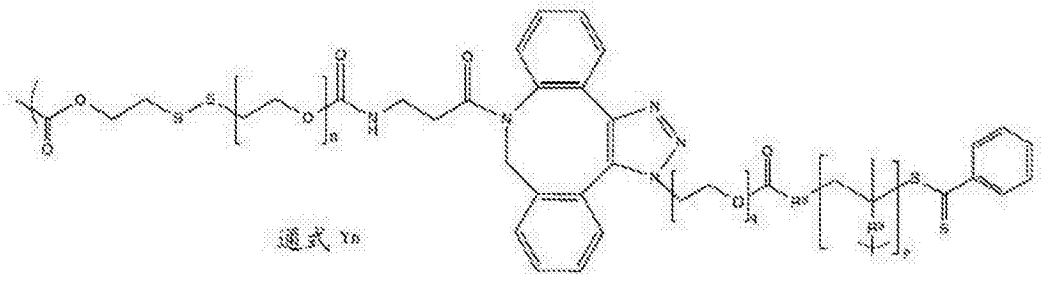
通式 Vk



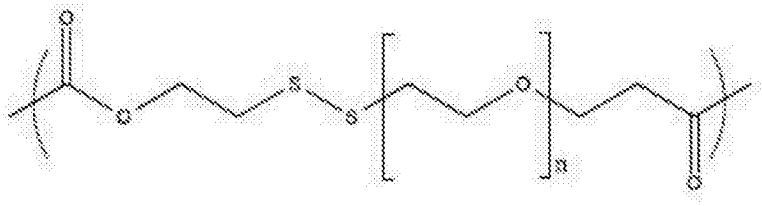
通式 Vl



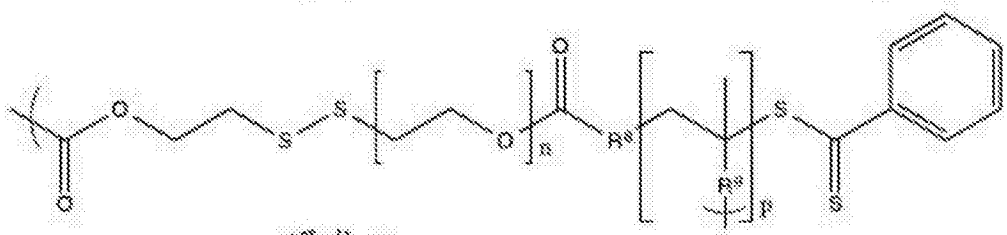
通式 Vm



通式 Vn

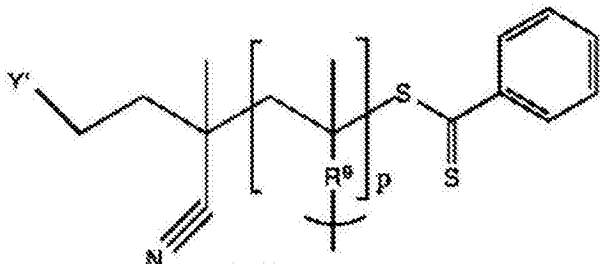


通式 Yo



通式 Yp

或具有由通式Y'-CMP表示的部分：



通式 Y'-CMP

其中：

左括号“(”表示X和Y之间的键；

右或底部括号和“)”表示Y和Z之间的键；

n为约1至100的整数；

p为约2至150的整数；

q为约1至44的整数；

R^8是$-CH_2-$或$-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$；

R^9为直接键或$-CH_2-CH_2--NH-C(O)-$；并且

Y'表示Y的剩余部分。

6.权利要求5的组合物，其中：

n为约40至80；

p为约10至100；

q为约3至20；

R^8是$-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-$；和

当R^9是$-CH_2-CH_2--NH-C(O)-$时，Z为在其C1缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

7.权利要求5的组合物，其中Y包括通式Ya、通式Yb、通式Yh、通式Yi、通式Yk、通式Ym或通式Yn。

8.权利要求5的组合物，其中Y包括通式Ya、通式Yb、或通式Yn。

9.权利要求6的组合物，其中Y包括通式Ya、通式Yb、通式Ym或通式Yn。

10.权利要求1的组合物，其中X包括：

外源移植抗原，移植接受体针对所述外源移植抗原形成不想要的免疫应答；

外源食品，动物，植物或环境抗原，患者针对所述外源食品，动物，植物或环境抗原形成不想要的免疫应答；

外源治疗剂，患者针对所述外源治疗剂形成不想要的免疫应答；或

合成自身抗原，患者针对所述合成自身抗原的内源形式形成不想要的免疫应答，

或它们的致耐受性部分。

11.组合物，其包含通式2的化合物

$$[X-Y]_{m'}-Z-[Y-X]_{m''}$$

通式2

其中：

m'是零或从约1至10的整数，m"是零或从约1至10的整数，且m'+m"的总和为约1至10的整数，且至少为1；

每个X包括外来抗原或自身抗原，或它们的致耐受性部分，患者针对所述外来抗原或自身抗原形成不想要的免疫应答；

每个Y包括接头部分或直接键，或特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；

Z包括肝靶向部分，

条件是当m'+m"等于1且Z是DOM 26h-196-61时，X不是干扰素，利巴韦林，Nexavar/索拉非尼，Erbitus/西妥昔单抗，Avastatin/贝伐单抗或赫赛汀/曲妥珠单抗。

12.权利要求11的组合物，其中Z包括ASGPR靶向抗体，ASGPR靶向抗体片段，ASGPR靶向肽，ASGPR靶向scFv，或另一ASGPR配体。

13.权利要求11的组合物，其中X包括一组相关抗原或它们的一组致耐受性片段，患者针对所述相关抗原形成不想要的免疫应答。

14.权利要求13的组合物，其中X选自下组：

以下中的两种或多种：胰岛素，胰岛素原，前胰岛素原，谷氨酸脱羧酶-65，GAD-67，葡萄糖-6-磷酸酶2，胰岛素瘤相关蛋白2，胰岛素瘤相关蛋白2β，ICA69，ICA12，羧基肽酶H，Imogen 38，GLIMA 38，嗜铬粒蛋白A，HSP-60，羧基肽酶E，外周蛋白，葡萄糖转运蛋白2，肝癌-肠-胰脏/胰腺相关蛋白，S100β，胶质纤维酸性蛋白，再生基因II，胰腺十二指肠同源框1，营养不良性肌强直激酶，胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白，和SST G蛋白偶联受体1-5；

以下中的两种或多种：髓磷脂碱性蛋白，髓鞘少突胶质糖蛋白，髓鞘蛋白脂质蛋白，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:12，SEQ ID NO:13，SEQ ID NO:14，SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16，和SEQ ID NO:17；和

以下中的两种或多种：SEQ ID NO:24，SEQ ID NO:25，SEQ ID NO:26，和SEQ ID NO:27。

15.权利要求11的组合物，其中Y是具有免疫蛋白体切割位点的接头

16.权利要求11的组合物，其中X包括：

外源移植抗原，移植接受体针对所述外源移植抗原形成不想要的免疫应答；

外源食品，动物，植物或环境抗原，患者针对所述外源食品，动物，植物或环境抗原形成

不想要的免疫应答；

外源治疗剂，患者针对所述外源治疗剂形成不想要的免疫应答；或

合成自身抗原，患者针对所述合成自身抗原的内源形式形成不想要的免疫应答，

或它们的致耐受性部分。

17.用于针对抗原的不想要的免疫应答的治疗方法，其通过对需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的包含通式1的化合物的组合物，

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

通式1

其中：

m为约1至100的整数；

X包括抗原或其致耐受性部分，患者针对所述抗原形成不想要的免疫应答；或者

X包括特异性结合循环蛋白质或肽或抗体的抗体，抗体片段或配体，所述循环蛋白质或肽或抗体成因性参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应；

Y包括接头部分；和

Z包括肝靶向部分。

18.权利要求17的方法，其中：

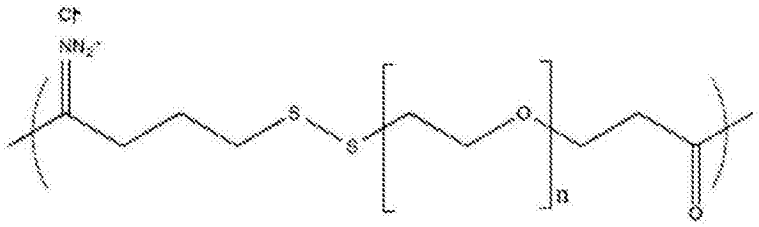
X包括抗原或其致耐受性部分，患者针对所述抗原形成不想要的免疫应答；和

Y包括：

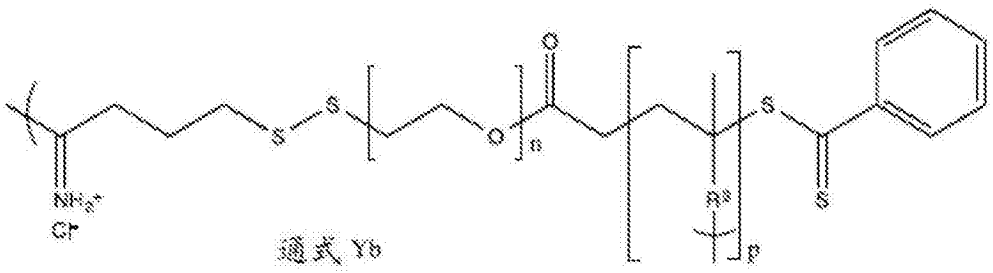
特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；

二硫烷基乙酯；

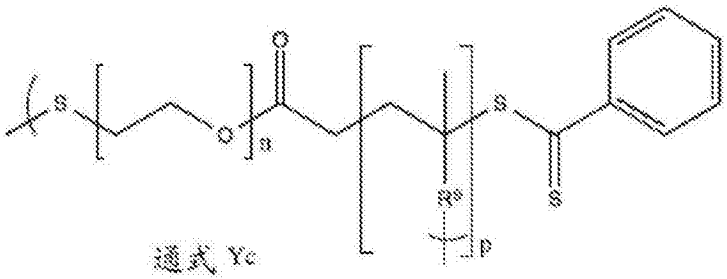
以通式Ya至Yp之一表示的结构：



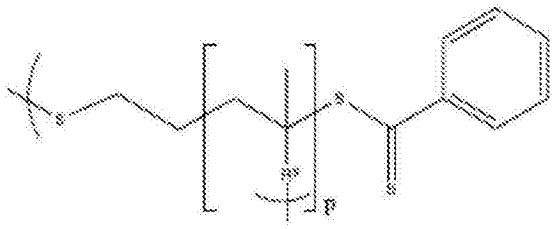
通式 Ya



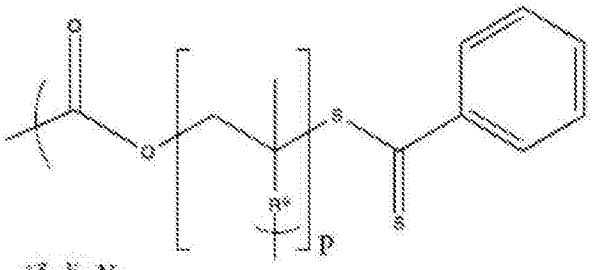
通式 Yb



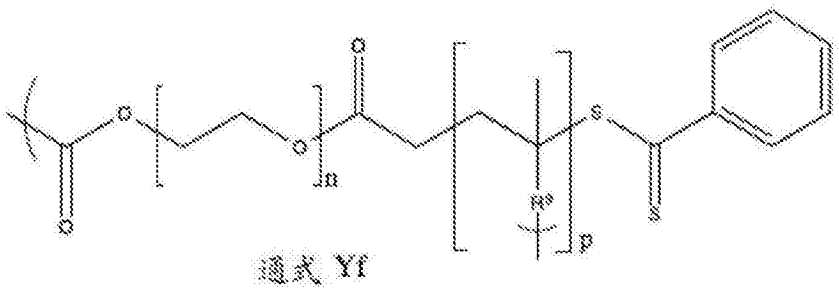
通式 Yc



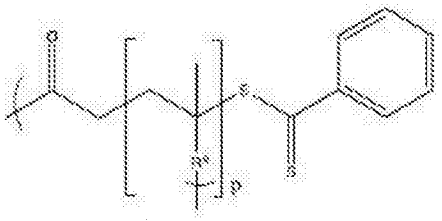
通式 Yd



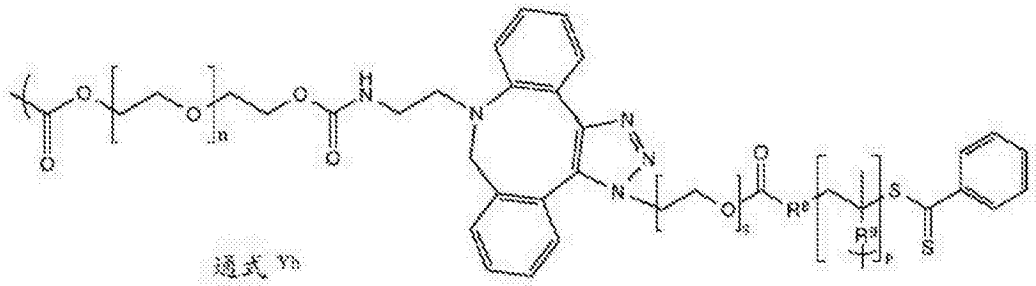
通式 Ye



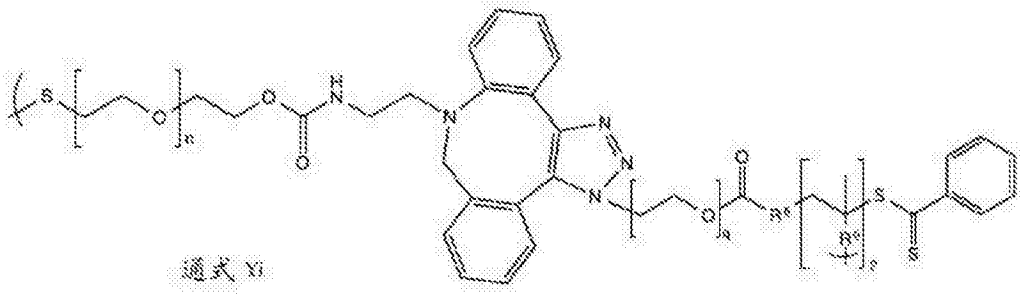
通式 Yf



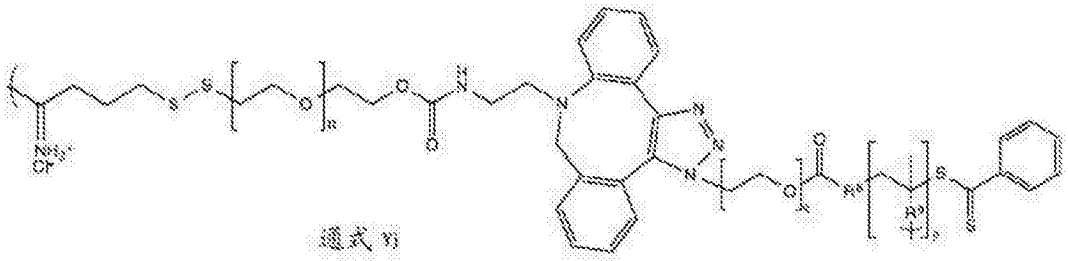
通式 Yg



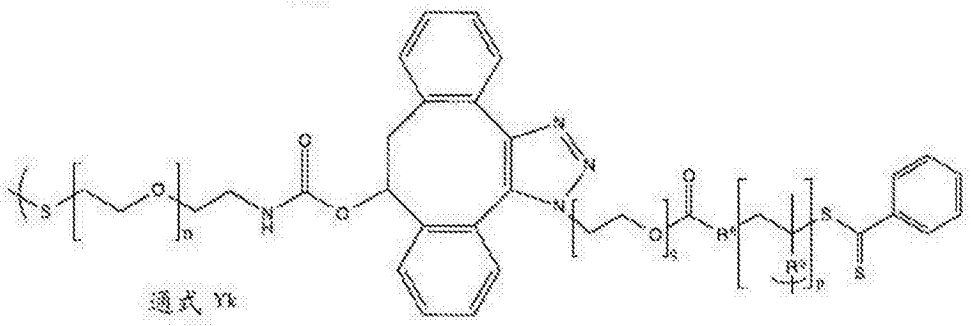
通式 Yh



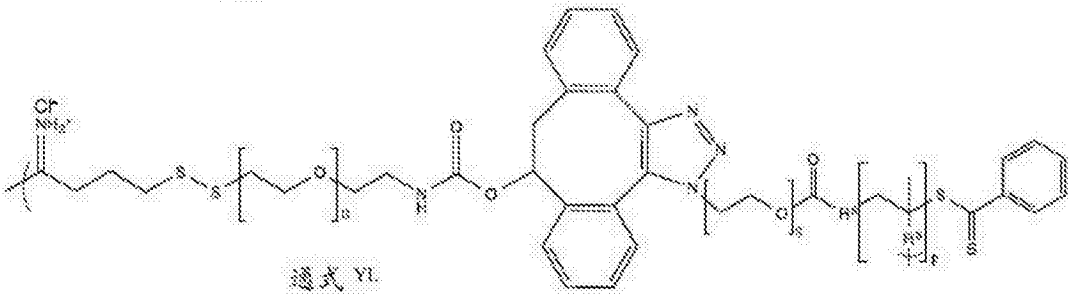
通式 Yi



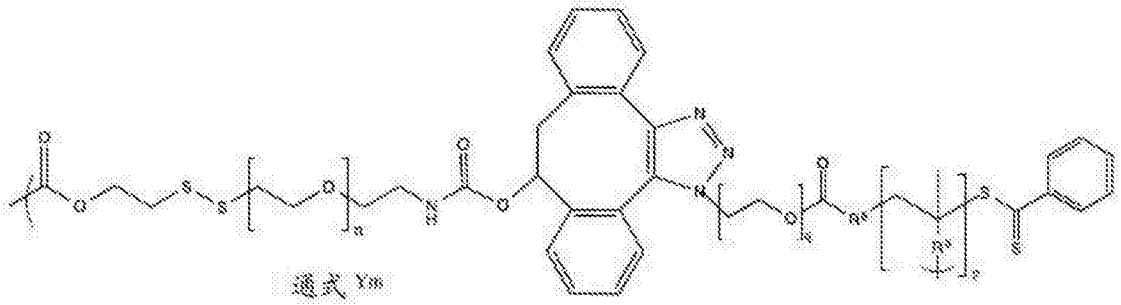
通式 Yj



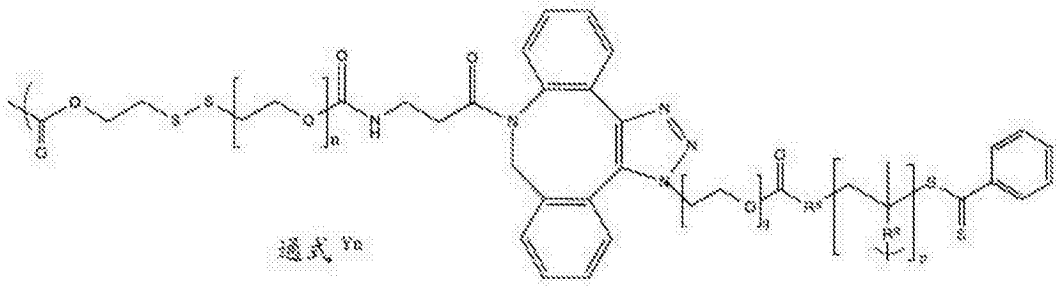
通式 Yk



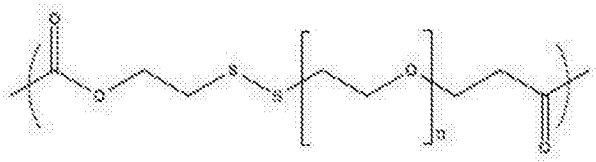
通式 Yl



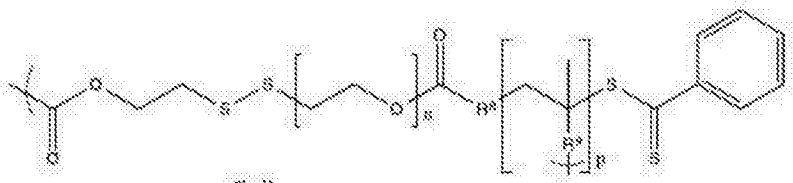
通式 Ym



通式 Yn

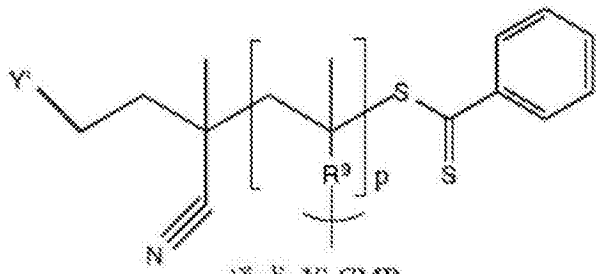


通式 Yo



通式 Yp

或具有由通式Y'-CMP表示的部分：



通式 Y'-CMP

其中：

左括号“(”表示X和Y之间的键；

右或底部括号和“)”表示Y和Z之间的键；

n为约1至100的整数；

p为约2至150的整数；

q为约1至44的整数；

R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-；

R9为直接键或-CH_2-CH_2--NH-C(O)-；和

Y'表示Y的剩余部分。

19.权利要求17的方法，其中X包括所述抗体，抗体片段或配体，并且施用所述组合物以清除特异性结合X的循环蛋白质或肽或抗体，所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应。

20.权利要求17的方法，其中X包括所述抗体，抗体片段或配体，并且根据在施用后约12至约48小时之间的时间进行的测量，以将患者血液中成因性参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应的抗体浓度有效降低至少50％w/w的量施用所述组合物。

21.权利要求17的方法，其中施用所述组合物用于就抗原部分X而言使患者耐受化(tolerization)。

22.权利要求17的方法，其中X包括：

外源移植抗原，移植接受体针对所述外源移植抗原形成不想要的免疫应答；

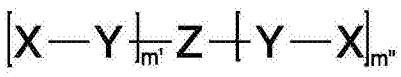
外源食品，动物，植物或环境抗原，患者针对外源食品，动物，植物或环境抗原形成不想要的免疫应答；

外源治疗剂，患者针对所述外源治疗剂形成不想要的免疫应答；或

合成自身抗原，患者针对所述合成自身抗原的内源形式形成不想要的免疫应答，

或它们的致耐受性部分。

23.用于针对抗原的不想要的免疫应答的治疗方法，其通过对需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的包含通式2的组合物，



通式2

其中：m'是零或从约1至10的整数，m"是零或从约1至10的整数，且m'+m"的总和为约1至10的整数，且至少为1；

每个X是抗原部分；

每个Y是接头部分或直接键，或特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；和

Z包括肝靶向部分，

条件是当m'+m"等于1且Z是DOM 26h-196-61时，X不是干扰素，利巴韦林，Nexavar/索拉非尼，Erbitus/西妥昔单抗，Avastatin/贝伐单抗或赫赛汀/曲妥珠单抗。

24.权利要求23的方法，其中施用所述组合物以清除特异性结合抗原部分X的循环蛋白质或肽或抗体，所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性地参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应。

25.权利要求23的方法，其中根据在施用后约12至约48小时之间的时间进行的测量，以将患者血液中的抗体浓度有效降低至少50％w/w的量施用所述组合物，所述抗体成因性参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应。

26.权利要求23的方法，其中施用所述组合物用于就抗原部分X而言使患者耐受化。

27.权利要求23的方法，其中Z包括ASGPR靶向抗体，ASGPR靶向抗体片段，ASGPR靶向肽，ASGPR靶向scFv，或另一ASGPR配体。

28.权利要求23的方法，其中X包括一组相关抗原或它们的一组致耐受性片段，患者针对所述相关抗原形成不想要的免疫应答。

29.权利要求23的方法，其中所述X选自下组：

以下中的两种或多种：胰岛素，胰岛素原，前胰岛素原，谷氨酸脱羧酶-65，GAD-67，葡萄糖-6-磷酸酶2，胰岛素瘤-相关蛋白2，胰岛素瘤相关蛋白2β，ICA69，ICA12，羧基肽酶H，Imogen 38，GLIMA 38，嗜铬粒蛋白A，HSP-60，羧基肽酶E，外周蛋白，葡萄糖转运蛋白2，肝癌-肠-胰脏/胰腺相关蛋白，S100β，胶质纤维酸性蛋白，再生基因II，胰腺十二指肠同源框1，营养不良性肌强直激酶，胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白，和SST G蛋白偶联受体1-5；

以下中的两种或多种：髓磷脂碱性蛋白，髓鞘少突胶质糖蛋白，髓鞘蛋白脂质蛋白，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:12，SEQ ID NO:13，SEQ ID NO:14，SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16，和SEQ ID NO:17；和

以下中的两种或多种：SEQ ID NO:24，SEQ ID NO:25，SEQ ID NO:26，和SEQ ID NO:27。

30.权利要求1-10或11-16中任一项的组合物在治疗不想要的免疫应答中的用途。

31.权利要求1-10中任一项的组合物的用途：

用于就抗原部分X而言使患者耐受化，其中X包括抗原或其致耐受性部分，患者针对所述抗原形成不想要的免疫应答，或

用于清除循环蛋白质或肽或抗体，所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性地参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应，其中所述X包括特异性结合所述循环蛋白质或肽或者抗体的抗体，抗体片段或配体。

32.权利要求11-16中任一项的组合物的用途，其中施用所述组合物用于患者就抗原部分X而言的耐受。

糖靶向性治疗剂

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在2014年2月21日提交的，标题为“糖靶向性治疗剂(GLYCOTARGETING THERAPEUTICS)”的共同悬而未决的临时申请美国系列号61/942,942的优先权，在此通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本公开的领域涉及药学可接受的组合物，其用于移植排斥，自身免疫性疾病，食物过敏，以及针对治疗剂的免疫应答的治疗中。

[0004] 发明背景

[0005] 申请US 2012/0039989，US 2012/0178139和WO 2013/121296描述将抗原靶向到红细胞以利用红细胞在抗原呈递中作用进行耐受化(tolerization)。尽管迄今为止用这种方法产生了阳性结果，对有可能的替代方法仍然是感兴趣的。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开的一个方面提供了包含通式1的化合物的组合物：

[0008] $X\left[Y-Z\right]_m$

[0009] 通式1

[0010] 其中：

[0011] m为约1至100的整数；

[0012] X包括抗原或其致耐受性部分，患者针对所述抗原形成不想要的免疫应答；或者

[0013] X包括特异性结合循环蛋白质或肽或抗体的抗体，抗体片段或配体，所述循环蛋白质或肽或抗体成因性参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应；

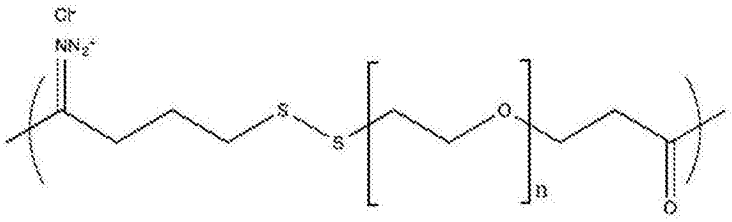
[0014] Y包括接头部分；和

[0015] Z包括肝靶向部分。

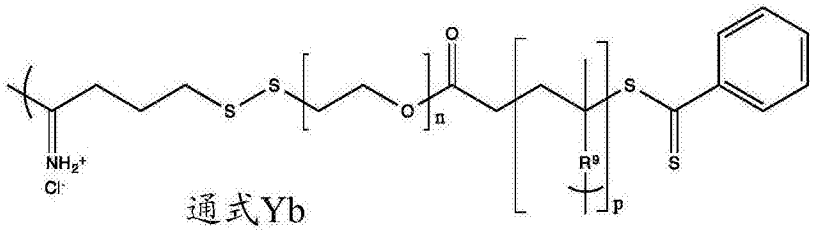
[0016] Z还可以包括半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺，例如，在它的C1，C2或C6缀合至Y上。

[0017] Y可以是选自下组的Y：N-羟基琥珀酸酰胺基(N-hydroxysuccinamidyl)接头，马来酰亚胺(malaemide)接头，乙烯基砜接头，吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接头，吡啶基二硫醇接头，正-硝基苯基碳酸酯接头，NHS-酯接头，和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯接头。

[0018] Y还可以包括：特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；二硫烷基乙酯；通式(formula)Ya至Yp之一表示的结构：

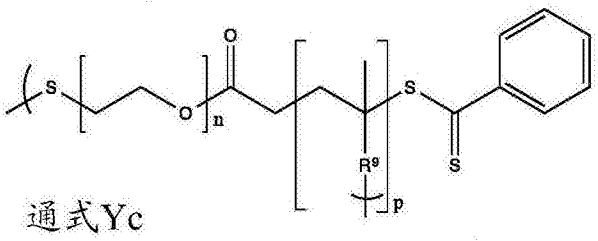


通式 Ya

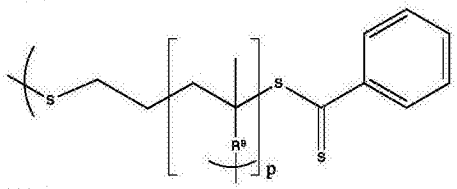


通式Yb

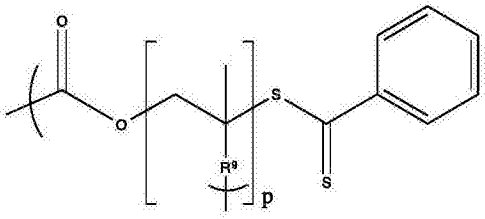
[0019]



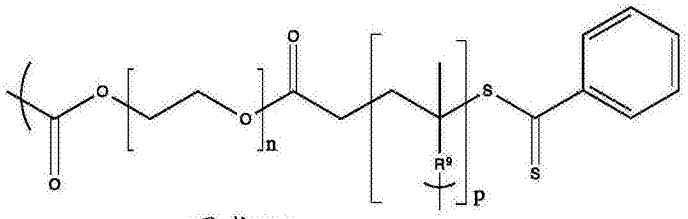
通式Yc



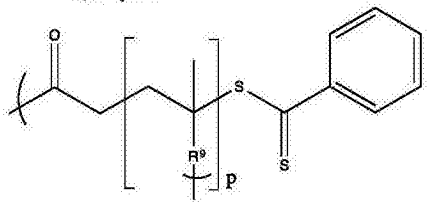
通式Yd



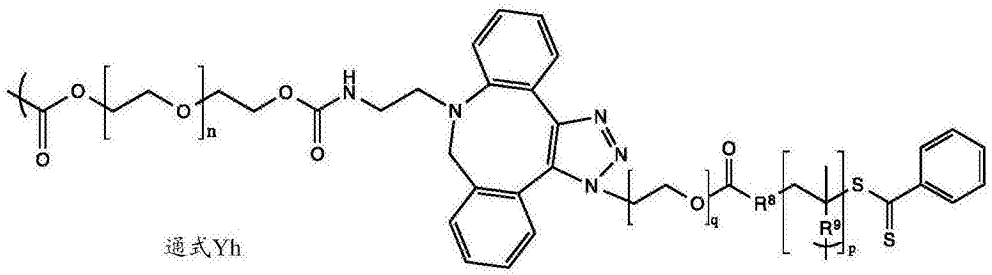
通式Ye



通式Yf

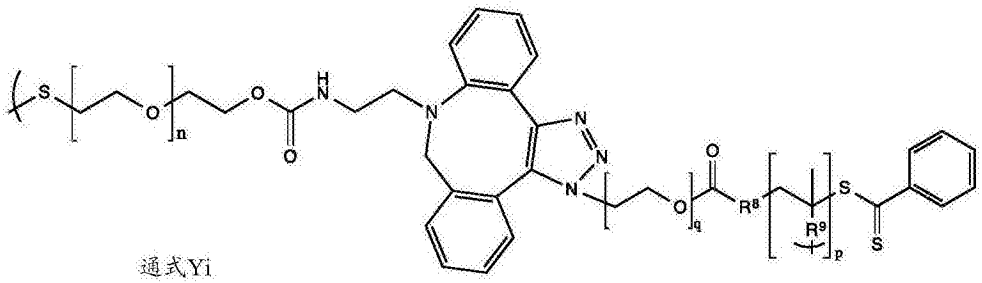


通式Yg

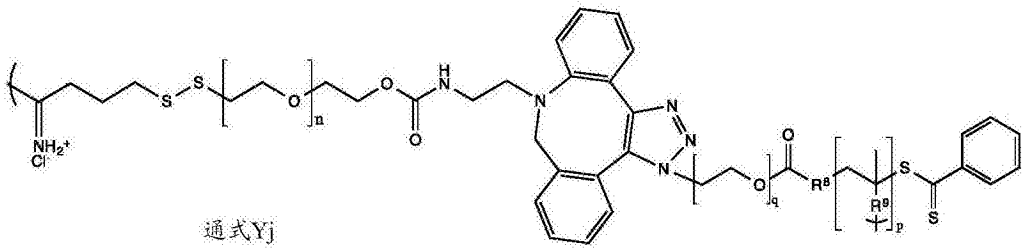


通式Yh

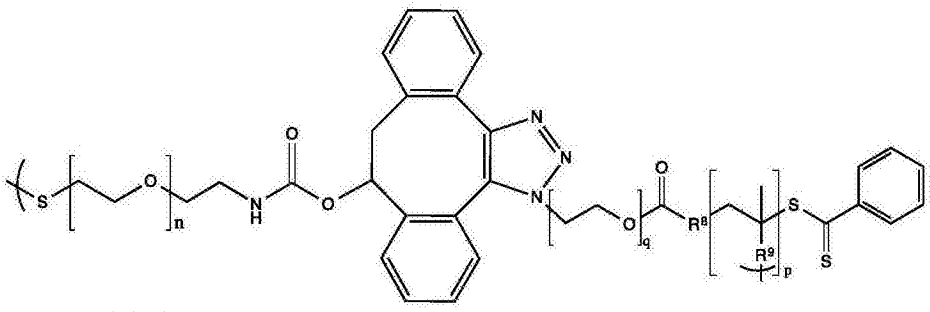
[0020]



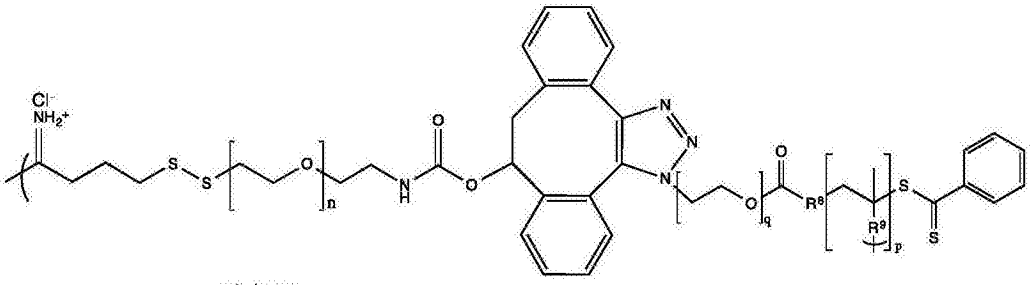
通式Yi



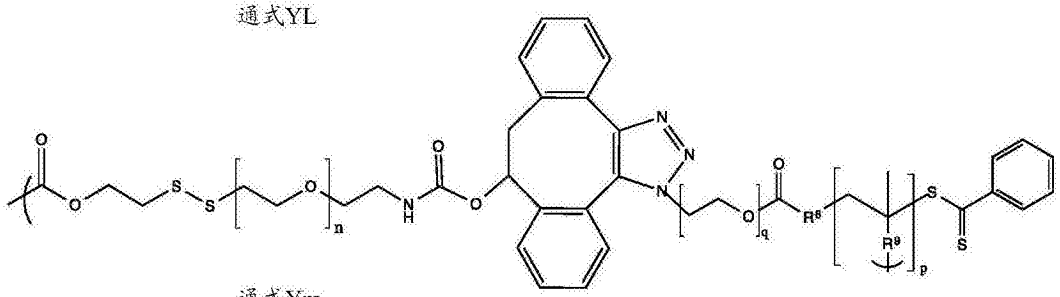
通式Yj



通式Yk

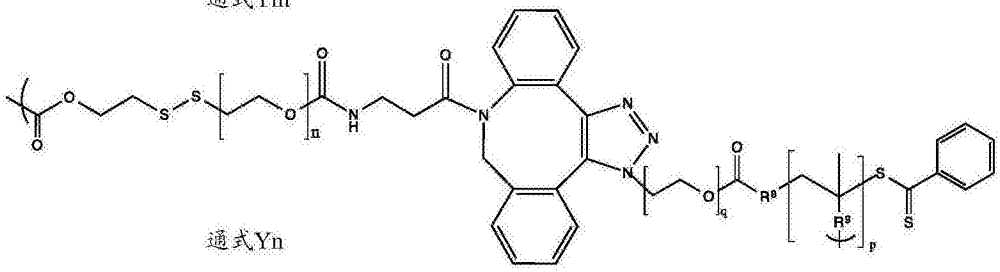


通式YL

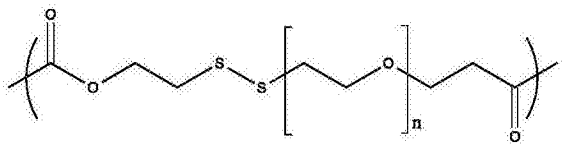


通式Ym

[0021]

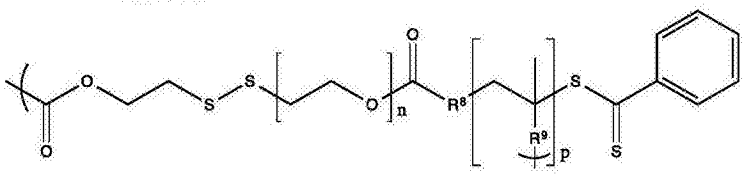


通式Yn



通式Yo

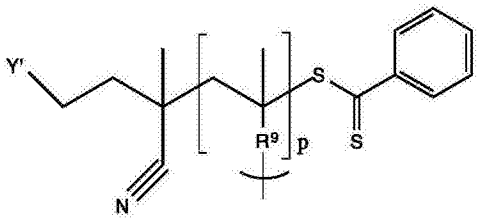
和



通式Yp ,

[0022] 或由通式Y'-CMP表示的部分

[0023]



通式Y'-CMP

[0024] 其中:左括号"("表示X和Y之间的键(bond);右或底部括号和")"表示Y和Z之间的键;n为约1至100的整数;p为约2至150的整数;q为约1至44的整数;R^8是-CH_2-或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-;R^9为直接键或-CH_2-CH_2--NH-C(O)-;和Y'表示Y的剩余部分

[0025] 在上述的另一个方面中,n为约40至80,p为约10至100,q为约3至20,R^8是-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-;当R^9是-CH_2-CH_2--NH-C(O)-时,Z为在其C1端缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖

胺。

[0026] 在上面的另一个方面，Y包括通式Ya，通式Yb，通式Yh，通式Yi，通式Yk，通式Ym或通式Yn，特别是通式Ya，通式Yb，通式Ym或通式Yn。

[0027] X可以进一步包括：移植接受体(transplant recipient)针对其形成不想要的免疫应答的外源移植抗原；患者针对其形成不想要的免疫应答的外源食品，动物，植物或环境抗原；患者针对其形成不想要的免疫应答的外源治疗药物；或患者针对其内源形式形成不想要的免疫应答的合成自身抗原，或它们的致耐受性部分。

[0028] 本公开还涉及用于针对抗原的不想要的免疫应答的治疗方法，其通过对需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的包含如以上所讨论的通式1的化合物的组合物。在这样的方法中，可以施用组合物来清除特异性结合抗原部分X的循环蛋白质或肽或抗体，其中所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性地参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应。如在施用后约12至约48小时之间的时间进行测量的，组合物可以以有效降低患者血液中至少50％w/w的抗体的浓度的量施用，所述抗体成因性地参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应。可以施用组合物以用于就抗原部分X而言使患者耐受化。

[0029] 本公开的另一个方面提供了包含通式2的化合物的组合物

[0030] $$[X-Y]_{m'}-Z-[Y-X]_{m''}$$

通式(2)

[0031] 其中：m’是零或从约1至10的整数，m”是零或从约1至10的整数，且m’+m”的总和为约1至10的整数，且至少为1；每个X是患者针对其形成不想要的免疫应答的外来抗原或自身抗原，或它们的致耐受性部分；每个Y是接头部分或直接键，或特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；Z是肝靶向部分，条件是当m’+m”等于1且Z是DOM 26h-196-61时，X不是干扰素，利巴韦林(Ribavirin)，Nexavar/索拉非尼(Sorafenib)，Erbitus/西妥昔单抗(Cetuximab)，Avastatin/贝伐单抗(bevacizumab)或赫赛汀(Herceptin)/曲妥珠单抗(trastuzumab)。

[0032] 在涉及通式2的上述方面中，Z可以包括ASGPR靶向抗体，ASGPR靶向抗体片段，ASGPR靶向肽，ASGPR靶向scFv，或另一ASGPR配体。Y可以是具有免疫蛋白体(immunoproteosome)切割位点的接头。X可以包括患者针对其形成不想要的免疫应答的一组相关抗原或它们的一组致耐受性片段。例如，X可以从下组中选择：

[0033] • 以下中的两种或多种：胰岛素，胰岛素原，前胰岛素原，谷氨酸脱羧酶-65，GAD-67，葡萄糖-6-磷酸酶2，胰岛素瘤-相关蛋白2，胰岛素瘤相关蛋白2β，ICA69，ICA12，羧基肽酶H，Imogen 38，GLIMA 38，嗜铬粒蛋白A，HSP-60，羧基肽酶E，外周蛋白，葡萄糖转运蛋白2，肝癌-肠-胰脏/胰腺相关蛋白，S100β，胶质纤维酸性蛋白，再生基因II，胰腺十二指肠同源框1，营养不良性肌强直激酶，胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白，和SST G蛋白偶联受体1-5；

[0034] • 以下中的两种或多种：髓磷脂碱性蛋白，髓鞘少突胶质糖蛋白，髓鞘蛋白脂质蛋白，SEQ ID NO:11，SEQ ID NO:12，SEQ ID NO:13，SEQ ID NO:14，SEQ ID NO:15，SEQ ID NO:16，和SEQ ID NO:17；和

[0035] • 以下中的两种或多种:SEQ ID NO:24,SEQ ID NO:25,SEQ ID NO:26,和SEQ ID NO:27。

[0036] 本公开还涉及用于针对抗原的不想要的免疫应答的治疗方法,其通过对需要这种治疗的哺乳动物施用有效量的包含如以上所讨论的通式2的化合物的组合物。在这样的方法中,可以施用组合物来清除特异性结合抗原部分X的循环蛋白质或肽或抗体,其中所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性地参与移植排斥,针对治疗剂的免疫应答,自身免疫性疾病,超敏反应和/或变态反应。如在施用后约12至约48小时之间的时间进行测量的,组合物可以以有效降低患者血液中至少50%w/w的抗体的浓度的量施用,所述抗体成因性地参与移植排斥,针对治疗剂的免疫应答,自身免疫性疾病,超敏反应和/或变态反应。可以施用组合物以用于就抗原部分而言使X患者耐受化(tolerization)。

[0037] 附图简述

[0038] 图1是一系列图,显示半乳糖缀合物[F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-PE)]优先地将OVA靶向至肝细胞,包括以下:(A.)肝窦内皮细胞(LSECs),(B.)肝巨噬细胞(Kupffer cell)(KC),(C.)肝细胞,和(D)其它抗原呈递细胞(APC)。

[0039] 图2是显示在用F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA),OVA或盐水(即,天然)处理的小鼠中OTI CD8+T细胞增殖的图。

[0040] 图3是一系列图,显示在用盐水,OVA或F1aA-OVA-m_4-n_{80}(GAL-OVA)处理的增殖T细胞的世代中呈递表面标记(A.)PD-1+和(B.)膜联蛋白-V的OT-ICD8$^+$T细胞的百分比。

[0041] 图4是显示通过OVA特异性抗体效价测定的,半乳糖缀合[F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)]降低OVA的免疫原性(以抗体效价$\log^{-1}$显示)的图。

[0042] 图5显示F1aA-OVA-m_4-n_{80}(Gal-OVA)能够耗尽来自血清的OVA特异性抗体。

[0043] 图6显示在用OVA和佐剂LPS真皮内攻击后,F1aA-OVA-m_4-n_{80}(mGal-OVA),F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}(pGal-OVA),和N'-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C'(Dom-OVA)能够减轻排出淋巴结的OVA特异性免疫应答。

[0044] 图7显示了F1aA-OVA-m_4-n_{80}和F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}的表征。(A)F1aA-OVA-m_4-n_{80}(品红色),F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}(蓝色)和未缀合OVA(黑色)的大小排阻HPCL迹线。移位到左边表示分子量的增加。(B.)聚丙烯酰胺凝胶显示OVA缀合后分子量增加:(1)未缀合的OVA,(2)F1aA-OVA-m_4-n_{80}和(3.)F1b-OVA-m_1-n_{44}-p_{34}。

[0045] 图8是表示以静脉内推注(i.v.bolus)注射后在小鼠的循环中N-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(OVA),N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(DOM-OVA),或N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C(OVA-DOM)的归一化(normalized)量的图。

[0046] 图9是一系列图,显示用盐水,DOM和OVA,DOM-OVA,或OVA-DOM处理后抗OVA IgG抗体在个体小鼠循环中的滴度。抗OVA IgG的产生通过静脉内注射单独的OVA(a)或OVA和CpG-B(b)诱导。处理时间由垂直虚线表示。滴度计算为具有可检测的抗OVA IgG的血浆的最大倍稀释的$\log_{10}$。

[0047] 发明详述

[0048] 两种已知的去唾液酸糖蛋白受体("ASGPR")在肝细胞和肝窦内皮细胞(或"LSEC")上表达。其它半乳糖/半乳糖胺/N-乙酰半乳糖胺受体的各种形式可以在多种细胞类型[例如,树突细胞,肝细胞,LSECs和肝巨噬细胞]中找到。树突细胞被认为是"专门的抗原呈递细

胞”，因为它们的主要功能是将抗原呈递至免疫系统用于产生免疫应答。已知肝脏内的一些细胞能够呈递抗原，但更已知肝参与致耐受性。肝脏被理解为是一个致耐受性的器官。例如，在多器官移植的情况下且当肝脏是被移植的器官之一时，报导了排斥的较低的发生率。对于文献，LSEC是新得多的；因此它们在致耐受性和/或减轻炎性免疫应答中的作用尚未得到广泛承认或很好的理解。然而，越来越清楚的是，它们也可以在抗原特异性耐受的诱导中发挥显著作用。

[0049] 红细胞表面的显著特征之一是它的糖基化，即存在显著数目的糖基化蛋白。事实上，血型糖蛋白(例如，血型糖蛋白A)已被利用为红细胞结合的靶标。血型糖蛋白是具有许多共价连接的糖链的蛋白质，其末端是唾液酸。当红细胞成长并且变得成熟以清除，其血型糖蛋白的末端唾液酸趋于丢失，留下N-乙酰半乳糖胺在自由端。N-乙酰半乳糖胺是由与肝细胞相关的ASGPR选择性接收的配体，这导致含N乙酰半乳糖胺的物质被肝细胞结合和它们随后在肝脏中的摄取和加工。

[0050] 迄今为止，本领域技术人员已经理解，由于肝脏的首次通过清除率，导致治疗剂的循环半衰期差，应避免导致肝靶向的方式的治疗剂的糖基化。出于同样的原因，一些单克隆抗体需要在Asn297上被特异性糖基化以优化与其Fc受体的结合。现已令人惊讶地发现，半乳糖苷化可以以诱导致耐受性的方式使用。

[0051] 本公开提供了某些治疗性组合物，其被靶向递送至肝脏，特别是肝细胞，LSEC，肝巨噬细胞和/或星形细胞，更具体地肝细胞和/或LSEC(和被这些细胞摄取)，和甚至更具体地特异性结合ASGPR。肝靶向促进了治疗的两种机制：耐受化和清除。耐受化利用肝脏在清理凋亡细胞并处理它们的被免疫系统识别为“自身”的蛋白质的作用，以及肝脏在取样用于免疫耐受的外周蛋白中的作用。清除利用肝脏通过快速除去和分解毒素，多肽等的血液净化作用。使这些组合物靶向肝脏是由以下完成的：糖基化部分(例如，半乳糖，半乳糖胺和N-乙酰半乳糖胺，特别是在C1，C2或C6缀合)，另一个肝靶向部分(例如，单克隆抗体，或其片段或scFv)，或去唾液酸化期望此类肝靶向的多肽。半乳糖基化或其它肝靶向部分可以化学缀合至或重组融合至抗原上，而去唾液酸化(desialylation)暴露抗原多肽上的半乳糖状部分。抗原可以是内源(自身抗原)或外源(外源抗原)，包括但不限于：移植接受者针对其形成不想要的免疫应答(例如，移植排斥)的外源移植抗原，患者针对其形成不想要的免疫应答(例如，超敏反应或变态反应)的外源食品，动物，植物或环境抗原，患者针对其形成不想要的免疫应答(例如，超敏反应和/或降低治疗活性)的治疗剂，患者针对其形成不想要的免疫应答的自身抗原(例如，自身免疫疾病)，或其致耐受性部分(例如，片段或表位)；这些组合物可用于诱导对抗原的耐受化。可替代地，半乳糖基化或其它肝靶向部分可以与以下缀合：特异性结合循环蛋白质或肽或者抗体的抗体，抗体片段或配体，其中所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性地参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫疾病，和/或变态反应(如以上所讨论)；这些组合物可用于清除循环蛋白质，肽或抗体。因此，本公开的组合物可用于治疗不想要的免疫应答，例如，移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫疾病，和/或超敏反应。还提供了含有治疗有效量的本公开的组合物的药物组合物，所述组合物与至少一种药用赋形剂混合。在另一个方面，本公开提供了一种用于治疗不想要的免疫应答，如移植排斥，对治疗剂的应答，自身免疫疾病或变态反应的方法。

[0052] 定义

[0053] 如在本说明书中所使用的，以下词语和短语通常旨在具有下述含义，除非在使用它们的上下文中另有说明。

[0054] 单数形式“一”，“一个”和“该”包括复数对象，除非上下文清楚地另外指明。

[0055] 当术语“约”与数值结合使用时涵盖范围内的数值，该范围内通常具有下限，例如，比所指示的数值小5-10％，并具有上限，例如，比所指示的数值大5-10％。

[0056] “抗原”是指用作适应性免疫应答的受体，如T细胞受体，B细胞受体或抗体的靶标的任何物质。抗原可来源于机体内(“自身”，“自体”或“内源性”)。抗原可来源于机体外(“非自身”，“外来”(foreign)或“外源”(exogenous))，例如，通过吸入，摄取，注射，或移植已经进入。外来抗原包括但不限于，食物抗原，动物抗原，植物抗原，环境抗原，治疗剂，以及同种异体移植中存在的抗原。

[0057] 如本文所使用的“抗原结合分子”涉及分子，尤其是蛋白质，例如免疫球蛋白分子，其包含提供与表位特异性结合的抗体可变区。抗体可变区可以存在于例如完整的抗体，抗体片段，和抗体或抗体片段的重组衍生物。如本文所用的，抗体的术语“抗原结合片段”(或“结合部分”)指保留特异性结合靶序列的能力的抗体的一个或多个片段。含有抗体可变区的抗原结合片段包括(但不限于)“Fv”，“Fab”，和“$F(ab')_2$”，“单结构域抗体(SDAB)”，“纳米抗体”，“单链Fv(scFv)”片段，“串联scFv”(V_HA-V_LA-V_HB-V_LB)，“双抗体”，“三抗体”或“三体(tribodies)”，“单链双抗体(scDb)”和“双特异性T细胞接合器(BiTEs)”。

[0058] “化学修饰”是指在多肽的一个或多个氨基酸的天然存在的化学结构中的变化。这样的修饰可以在侧链或末端进行，例如，改变氨基末端或羧基末端。在一些实施方案中，修饰是用于创建化学基团，其可以方便地用于将多肽链接到其它材料，或附接至治疗剂上。

[0059] 术语“包含”，与“包括”，“含有”，或“特征在于”同义，是包括的或开放性的，并且不排除额外的，未陈述的要素或方法步骤。“由.....组成”一词排除未指定的任何元素，步骤或成分。术语“基本上由…组成”将描述的主题范围限制到指定的材料或步骤和那些不会实质上影响其基础和新特征的那些材料或步骤。

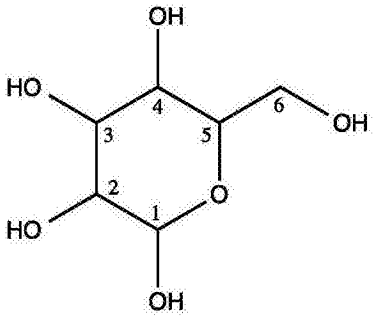
[0060] 一般可以对氨基酸序列进行“保守性的变化”而不改变活性。这些变化称作“保守取代”或突变；也就是说，可以用属于具有特定大小或特征的氨基酸群组的氨基酸替换另一氨基酸。氨基酸序列的取代可以选自氨基酸所属的类别的其它成员。例如，非极性(疏水性)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、和酪氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。此类取代预期不会实质性影响通过聚丙烯酰胺凝胶电泳测定的表观分子量或等电点。保守取代还包括用序列的光学异构体替换其它光学异构体，具体地，对于序列的一个或多个残基用D氨基酸替换L氨基酸。此外，序列中的所有氨基酸可以经历D-L(D至L)异构体取代。例示性的保守取代包括但不限于用Lys取代Arg及反之亦然，以维持正电荷；用Glu取代Asp及反之亦然，以维持负电荷；用Ser取代Thr，以维持游离的OH；以及用Gln取代Asn以维持游离的NH_2。另一种类型的保守取代包含这样的情况，其中如果需要进行化学衍生化(derivatization)，那么引入具有所需的化学反应性的氨基酸以赋予用于化学缀合反应的反应位点。这样的氨基酸包括但不限于半胱氨酸(插入硫氢基)，赖氨酸(以插入伯胺)，天冬氨酸和谷氨酸(以插入羧酸基团)，或含酮，叠氮化物，炔，烯烃和四嗪侧链的专门

的非规范氨基酸。保守取代或添加具有游离-NH_2或-SH的氨基酸对于与通式1的接头和糖基化部分的化学缀合可以是特别有利的。此外，在一些情况中，可以进行多肽序列或相应的核酸序列的点突变、缺失、和插入而不丧失多肽或核酸片段的功能。取代可以包括例如1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,20,25,30,35,40,45,50或更多个残基。本发明中使用的变体可以表现出在氨基酸序列中的变化(即交换，插入，缺失，N-末端截短，和/或C-末端截短)的总数量高达200(最多1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190或200)。本文中所描述的氨基酸残基采用单字母氨基酸标志符或三字母缩写，与标准多肽命名一致，J.Biol.Chem.,(1969),243,3552-3559。所有氨基酸残基序列在本文中以左右朝向的表达式按照常规的氨基端至羧基端方向呈现。

[0061] 术语“有效量”或“治疗有效量”指当在需要这种治疗的哺乳动物中施用时，足以实现如下面所定义的治疗的本公开的组合物的量。该量会随受试者，和待治疗的疾病状况，受试者的体重和年龄，疾病状况的严重程度，所选择的本公开的特定组合物，待遵循的施用方案，施用时机，施用方式等变化，所有这些都可以是本领域的普通技术人员容易确定的。

[0062] “表位”，也称为抗原决定簇，是大分子，例如蛋白质的片段，它是由适应性免疫系统识别，例如通过抗体，B细胞，或T细胞识别。表位是能够结合抗体或其抗原结合片段的大分子的部分或片段。在此上下文中，术语结合”尤其涉及特异性结合。在本发明的上下文中，优选的是，术语“表位”是指由免疫系统识别的蛋白质或多聚蛋白的片段。

[0063] 术语半乳糖在本领域中是公知的，指的是存在开链形式和环状形式两种，具有D-和L-异构体的单糖。在环状形式中有两种异头物，即α和β。在α形式中，C1醇基处于轴向位置，而在β形式中，C1醇基是在赤道轴位置。具体地，“半乳糖”是指环状六元吡喃糖，更具体地，D-异构体和甚至更具体地α-D型(α-D吡喃半乳糖)。半乳糖的结构和编号显示如下：

[0064] 

[0065] 术语“糖基化部分”是指一种特定类型的肝靶向部分。糖基化部分包括，但不限于：半乳糖，半乳糖胺和/或N-乙酰半乳糖胺残基。

[0066] 术语“肝靶向部分”是指具有将例如多肽导向至肝脏的能力的部分。肝包含不同类型的细胞，包括但不限于肝细胞，肝窦上皮细胞，肝巨噬细胞，星状细胞，和/或树突状细胞。通常，肝靶向部分将多肽导向至这些细胞中的一个或多个。在相应的肝细胞的表面上，存在识别和特异性结合肝靶向部分的受体。肝靶向可以通过以下来实现：抗原或配体与糖基化部分的化学缀合，抗原或配体的去唾液酸化(desialylation)以暴露潜在的半乳糖基部分，抗原或配体重组融合或化学缀合至ASGPR结合部分，或内源性抗体与抗原或配体特异性结合，其中将该抗原或配体去唾液酸化以暴露潜在的半乳糖基部分，缀合到半乳糖基化部分或重组融合或化学缀合至ASGPR结合部分。天然存在的去唾液酸化蛋白不涵盖在本公开的

范围内。

[0067] 为各种取代基提供的“数值”和“范围”旨在包括所述范围内的所有整数。例如，当定义n为表示包括约1至100，特别是约8至90，更特别是约40至80个乙二醇基团的混合物(其中该混合物通常包含指定为n±约10％的整数(或从1至约25，±3的较小的整数))的整数时，应该理解的是，n可以是约1至100的整数(例如，1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，22，25，30，34，35，37，40，41，45，50，54，55，59，60，65，70，75，80，82，83，85，88，90，95，99，100，105或110)，并且所公开的混合物包括范围如1-4，2-4，2-6，3-8，7-13，6-14，18-23，26-30，42-50，46-57，60-78，85-90，90-110和107-113个乙二醇基团。组合的术语“约”和“±10％”或“±3”应该被理解为公开并提供对于无论何处使用的等同范围的具体的支持。

[0068] 术语“任选的”或“任选地”是指随后描述的事件或情况可以发生或不发生，并且该描述包括其中所述事件或情况发生的情况和它不发生的情况。

[0069] 特异性结合特定靶标的肽被称为该靶标的“配体”。

[0070] 术语“多肽”是下述术语，指氨基酸残基的链，无论翻译后修饰(例如，磷酸化或糖基化)，和/或与另外的多肽复合，和/或与核酸和/或碳水化合物或其它分子一起合成为多亚基复合物。因此，蛋白聚糖在本文中也被称为多肽。长的多肽(具有超过约50个氨基酸)被称为“蛋白质”。短的多肽(具有小于约50个氨基酸)被称为“肽”。根据大小，氨基酸组成和三维结构，某些多肽可以称为“抗原结合分子”，“抗体”，“抗体片段”或“配体”。多肽可以通过许多方法产生，其中许多在本领域中是公知的。例如，多肽可以通过以下获得：通过提取(例如，自分离的细胞)，通过表达编码多肽的重组核酸，或通过化学合成。多肽可以通过例如，重组技术并将编码所述多肽的表达载体导入用于表达编码多肽的宿主细胞(例如，通过转化或转染)来产生。

[0071] 如本文所用，“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的赋形剂”包括任何和所有溶剂，分散介质，包衣，抗细菌剂和抗真菌剂，等张剂和吸收延迟剂等。用于药学活性物质的此类介质和药剂的使用在本领域中是众所周知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容，预期其在治疗组合物中的用途。补充的活性成分也可掺入组合物中。

[0072] 术语“纯化的”在本文中就多肽而言使用，是指已经过化学合成并且因此基本上不被其它多肽污染，或者已经自与其天然伴随的其它大多数细胞组分(例如，其它细胞蛋白质、多核苷酸、或细胞组分)分离开来或分开的多肽。纯化的多肽的一个例子是至少70％(按干重计)不含与其天然关联的蛋白质和天然存在的有机分子的多肽。因此，纯化的多肽的制备物可以是例如至少80％、至少90％、或至少99％(按干重计)的该多肽。多肽也可以工程化改造从而含有标签序列(例如，多组氨酸标记、myc标记、或FLAG®标记或其它亲和标记)，其促进纯化或标记(例如，捕获到亲和基质上，在显微镜下显现)。因此，包含多肽的纯化的组合物是指纯化的多肽，除非另有指示。术语“分离的”表明本公开的多肽或核酸不处于其天然环境中。因此，本公开的分离的产物可以包含在培养上清液中，经过部分富集，自异源来源产生，克隆在载体中，或者与媒介物(vehicle)配制在一起，等等。

[0073] 术语“序列同一性”就多肽序列比较而言使用。具体地，这种表述是指相对于相应的参考多肽或相应的参考多核苷酸的序列同一性的百分比，例如至少80％，至少81％，至少82％，至少83％，至少84％，至少85％，至少86％，在至少87％，至少88％，至少89％，至少

90%，至少91%，至少92%，至少93%，至少94%，至少95%，至少96%，在至少97%，至少98%，或至少99%。具体地，所讨论的多肽和参考多肽显示出在超过20，30，40，45，50，60，70，80，90，100或更多个氨基酸的连续区段上或在参考多肽的全长上的指定的序列同一性。

[0074] “特异性结合”，如同该术语通常在生物学领域中使用一样，是指与非靶标组织相比以相对较高的亲和力结合靶表的分子，并且一般牵涉多种非共价相互作用，诸如静电相互作用、范德华相互作用、氢键键合，等等。特异性结合相互作用表征抗体-抗原结合、酶-底物结合、以及某些蛋白质-受体相互作用；虽然此类分子有时可能结合其特异性靶标以外的组织，在这样的非靶标结合无关紧要的程度上，但是高亲和力结合对仍可以落在特异性结合的定义内。

[0075] 术语“治疗”是指在哺乳动物中的疾病或病症的任何治疗，其包括：

[0076] 预防或防止疾病或病症，即，使临床症状不发展；

[0077] 抑制疾病或病症，即，阻止或抑制临床症状的发展；和/或

[0078] 减轻疾病或病症，即，使临床症状消退。

[0079] 术语“不想要的免疫应答”是指受试者的免疫系统的反应，其在给定的情况下是不想要的。如果此类反应不会导致预防，减轻或治愈疾病或病症，但反而引起，增强或恶化病症或疾病，那么免疫系统的反应是不想要的。通常，如果免疫系统的反应针对不恰当的靶标，那么该反应引起，增强或恶化疾病。示例性的不想要的免疫应答包括但不限于移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，和变态反应或超敏反应。

[0080] 术语“变体”应理解为与其来源的蛋白质相比的不同之处在于在其长度，序列或结构中的一个或多个改变的蛋白质。蛋白质变体所来源的多肽也被称为亲本多肽或多核苷酸。术语“变体”包括亲本分子的“片段”或“衍生物”。通常情况下，“片段”是在长度或大小上比亲本分子更小，而“衍生物”与亲本分子相比，展示在它们的序列或结构中的一个或多个差异。也包括修饰的分子，例如但不限于翻译后修饰的蛋白质(例如糖基化，磷酸化，泛素化，棕榈酰化，或经蛋白水解切割的蛋白质)和经修饰的核酸，如甲基化的DNA。术语“变体”也涵盖不同分子的混合物如但不限于RNA-DNA杂交体。天然存在的和人工构建的变体将被理解为由如本文所用的术语“变体”所涵盖。另外，本发明中可使用的变体也可以来源于亲本分子的同系物，直向同源物(ortholog)，或旁系同源物(paralog)或人工构建的变体，条件是该变体展示出亲本分子的至少一种生物活性，即是功能上有活性的。变体可以通过与从其来源的亲本多肽的一定程度的序列同一性来表征。更确切地说，在本公开内容的上下文中，蛋白质变体可以展示出与其亲本多肽至少80%的序列同一性。优选地，蛋白质变体的序列同一性在20，30，40，45，50，60，70，80，90，100个或更多个氨基酸的连续区段上。

[0081] 组合物

[0082] 本公开的一个方面涉及如由通式1表示的组合物，药物制剂，以及使用这种组合物的治疗方法：

[0083] $$X-[Y-Z]_m$$

通式1

[0084] 其中：

[0085] m为约1至100，特别是约1至20，并且最特别是1至约10的整数

[0086] X是抗原部分，特别是外来抗原或自身抗原，患者针对所述抗原部分形成不想要的免疫应答，或此类抗原部分的致耐受性部分(例如，片段或表位)；

[0087] Y是接头部分或直接键，或特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；和

[0088] Z为肝靶向部分，特别是半乳糖基化部分。

[0089] 在通式1中m的值将取决于X的性质，因为每个抗原，抗体，抗体片段或配体将具有位点(主要是N-末端胺，赖氨酸残基和半胱氨酸残基)的个别数量和密度，所述位点抗原与接头或半乳糖基化部分结合。具有有限数目的此类位点的抗原可例如通过加入赖氨酸或半胱氨酸残基(任选地通过可切割的接头，特别是具有免疫蛋白体切割位点的接头)在N或C末端衍生化。一般地，优选在通式1的组合物中提供半乳糖基化的适当程度，以促进肝细胞的吸收。药物制剂和本公开的方法可以使用通式1的组合物的混合物，所述组合物分别具有不同的X部分(例如，与特定的不想要的免疫应答相关的几个表位)。

[0090] 通式1的组合物包括亚属(subgenuse)，其中X是：移植接受体形成不想要的免疫应答(例如移植排斥)针对的外源移植抗原；患者形成不想要的免疫应答(例如，变态反应或超敏反应)针对的外源食品，动物，植物或环境抗原；患者形成不想要的免疫应答(例如，超敏反应和/或降低的治疗活性)针对的外源治疗药物；或患者形成不想要的免疫应答(例如，自身免疫疾病)针对的自身抗原；其中如通过下文参考反应方案描述的通式1a至1p描述的，Y是通式Ya至Yp的接头；和/或其中Z是半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

[0091] 本公开进一步提供了由通式2表示的药学上可接受的组合物：

[0092] 

通式2

[0093] 其中：

[0094] m'是零或从约1至10的整数，m"是零或从约1至10的整数，且m'+m"的总和为约1至10的整数，且至少为1；

[0095] X是抗原部分，特别是外源抗原或自身抗原，患者针对所述抗原部分形成不想要的免疫应答，或此类抗原部分的致耐受性部分(例如，片段或表位)；

[0096] Y是接头部分或直接键，或特异性结合X的抗体，抗体片段，肽或其他配体；

[0097] Z是肝靶向部分，特别是ASGPR靶向抗体，ASGPR靶向抗体片段，ASGPR靶向肽，ASGPR靶向scFv，或另一ASGPR配体，

[0098] 此类组合物任选地包括促进分离和纯化的氨基酸序列[例如，具有序列：HHHHHH(SEQ ID NO:1)的"His标记"或"6xHis"和额外的接头[例如，"Gly_3Ser"，其具有序列：GGGS(SEQ ID NO:2)]。在通式2的组合物中，其中，m'+m"大于1，X部分可以是相同或不同，且Y部分可以是相同或不同的。当X是全蛋白质时，m'+m"的值将较小(例如，3或更小)，或当X是肽时，该值较大(高达约10)。接头"Y"可以有利地包括切割位点，特别是免疫蛋白体切割位点。

[0099] 通式2的组合物包括亚属，其中X是移植接受体形成不想要的免疫应答(例如移植排斥)针对的外源移植抗原；患者形成不想要的免疫(例如，变应性或超敏反应)应答针对的外源食品，动物，植物或环境抗原；患者形成不想要的免疫应答(例如，超敏反应和/或降低的治疗活性)针对的外源治疗药物；或患者形成不想要的免疫应答(例如，自身免疫疾病)针

对的自身抗原。

[0100] 备选地，在通式1和/或通式2的组合物中，X可以是特异性结合循环蛋白质或肽或者抗体的抗体，抗体片段或配体，所述循环蛋白质或肽或者抗体成因性参与移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫性疾病，超敏反应和/或变态反应中。

[0101] 通式2的组合物可以制备为融合蛋白，并且可以包括用于它们的制备和纯化的几个组分，如将表达的多肽导向特定的运输途径，并随后从多肽上切割下来的信号序列或前导序列；因此，信号序列可以是表达的蛋白质和编码其的DNA的一部分，但不是最终组合物的一部分。在表达系统中使用的哺乳动物信号序列的一个例子是Igκ链序列，其指导蛋白质分泌：METDTLLLWVLLLWVPGSTG(SEQ ID NO:3)。同样地，在表达系统中使用的常见的细菌信号序列的一个例子是pelB信号序列，其将表达的蛋白质导向细菌周质：MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA(SEQ ID NO:4)。

[0102] 抗原

[0103] 在通式1和/或通式2的组合物中用作X的抗原可以是蛋白质或肽，例如抗原可以是完整的或部分的治疗剂，全长移植蛋白或其肽，全长自身抗原或其肽，全长变应原或其肽和/或核酸，或上述抗原的模拟物。

[0104] 在本公开内容的实践中使用的抗原可以是一种或多种以下物质：

[0105] • 治疗剂，其是蛋白质，肽，抗体和抗体样分子，包括抗体片段和具有抗体和抗体片段的融合蛋白。这些包括人，非人(例如小鼠)和非天然(即，工程化)蛋白质，抗体，嵌合抗体，人源化抗体和非抗体结合的支架，如纤连蛋白，DARPins，knottins等。

[0106] • 人同种异体(allograft)移植抗原，移植接受者针对该人同种异体移植抗原形成不想要的免疫应答。

[0107] • 自身抗原，其引起不想要的自身免疫应答。本领域的技术人员将理解，虽然自身抗原在自身免疫性疾病的患者中是内源性来源的，但是在所公开的组合物中使用的多肽通常是外源合成的(与从起源来源纯化并浓缩形成对比)。

[0108] • 外来抗原，如食品，动物，植物和环境抗原，患者针对所述外来抗原经历不想要的免疫应答。本领域技术人员将理解，尽管治疗性蛋白质由于其外源性起源也可以被认为是外来抗原，但为了描述本公开中的清楚目的，此种治疗剂被描述为单独的组。相似地，植物或动物抗原可被食用并认为是食物抗原，并且环境抗原可以来源于植物。然而，它们均是外来抗原。为简单起见，没有试图描述以区别和定义所有此类可能重叠的组，因为本领域技术人员可以理解在本公开的组合物中可利用的抗原，特别是鉴于详细描述和实施例。

[0109] 抗原可以是完整蛋白质，完整蛋白质的一部分，肽等，并且可被衍生化(如上所述)以用于附接接头和/或半乳糖基化部分，可以是变体和/或可以包含保守取代，特别是维持序列同一性的保守取代，和/或可以是去唾液酸化的。

[0110] 在抗原是治疗性蛋白质，肽，抗体或抗体样分子的实施方案中，特异性抗原可以选自：阿巴他塞(Abatacept)，阿昔单抗(Abciximab)，阿达木单抗(Adalimumab)，腺苷脱氨酶，Ado-trastuzumab emtansine，阿加糖酶α(Agalsidase alfa)，阿加糖酶β(Agalsidase beta)，Aldeslukin，阿糖脑苷酶(Alglucerase)，阿葡糖苷酶α(Alglucosidase alfa)，α-1-蛋白酶抑制剂，阿那白滞素(Anakinra)，阿尼普酶(Anistreplase)(茴香酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物(anisoylated plasminogen streptokinase activator complex))，抗凝

血酶III(Antithrombin III),抗胸腺细胞球蛋白(Antithymocyte globulin),Ateplase,贝伐单抗,比伐卢定(Bivalirudin),A型肉毒杆菌毒素(Botulinum toxin type A),B型肉毒毒素(Botulinum toxin type B),C1酯酶抑制剂(C1-esterase inhibitor),Canakinumab,羧肽酶G2(Glucarpidase和Voraxaze),Certolizumab pegol,西妥昔单抗(Cetuximab),胶原酶,响尾蛇科免疫的Fab(Crotalidae immune Fab),达贝泊汀-α(Darbepoetin-α),Denosumab,地高辛免疫的Fab(Digoxin immune Fab),α链道酶(Dornase alfa),Eculizumab,依那西普(Etanercept),因子VIIa,因子VIII,因子IX,因子XI,凝血因子XIII,纤维蛋白原(Fibrinogen),非格司亭(Filgrastim),Galsulfase,戈利木单抗(Golimumab),组氨瑞林醋酸酯(Histrelin acetate),透明质酸酶(Hyaluronidase),Idursulphase,伊米苷酶(Imiglucerase),英夫利昔单抗(Infliximab),胰岛素[包括重组人胰岛素(“rHu人胰岛素”)和牛胰岛素],干扰素-α2a,干扰素α2b,干扰素-β1a,干扰素-β1b,干扰素-γ1b,Ipilimumab,L-精氨酸,L-天冬酰胺酶,L-methionase,乳糖酶,拉罗尼酶(Laronidase),来匹卢定(Lepirudin)/水蛭素(hirudin),美卡舍明(Mecasermin),Mecasermin rinfabate,甲氧基那他珠单抗(Methoxy Natalizumab),奥曲肽(Octreotide),Ofatumumab,奥普瑞白介素(Oprelvekin),胰淀粉酶(Pancreatic amylase),胰脂肪酶,木瓜蛋白酶,Peg-天冬酰胺酶(Peg-asparaginase),Peg-多柔比星HCl,PEG红细胞生成素-β(PEG-epoetin-β),培非司亭(Pegfilgrastim),聚乙二醇化干扰素-α2a,聚乙二醇化干扰素-α2b,pegloticase,培维索孟(Pegvisomant),苯丙氨酸氨裂解酶(Phenylalanine ammonia-lyase,PAL),蛋白C,拉布立酶(Rasburicase)(尿酸酶(uricase)),Sacrosidase,鲑鱼降钙素(Salmon calcitonin),沙格司亭(Sargramostim),链激酶(Streptokinase),替奈普酶(Tenecteplase),特立帕肽(Teriparatide),Tocilizumab(atlizumab),曲妥珠单抗,1型α-干扰素,Ustekinumab,vW因子。治疗性蛋白质可以从天然来源获得(例如,浓缩和纯化)或合成,例如重组合成,并包括通常是IgG单克隆抗体或片段或融合物的抗体治疗剂。

[0111] 特定的治疗蛋白质,肽,抗体或抗体样分子包括阿昔单抗,阿达木单抗,阿加糖酶α,阿加糖酶β,Aldeslukin,阿葡糖苷酶α,因子VIII,因子IX,英夫利昔单抗,胰岛素(包括rHu胰岛素),L-天冬酰胺酶,拉罗尼酶(Laronidase),那他珠单抗(Natalizumab),奥曲肽(Octreotide),苯丙氨酸氨裂解酶(PAL),或拉布立酶(尿酸酶)和通常其不同形式的IgG单克隆抗体。

[0112] 另一特定组包括止血剂(因子VIII和IX),胰岛素(包括rHu胰岛素),以及非人类治疗性尿酸酶,PAL和天冬酰胺酶。

[0113] 在血液学和移植中不想要的免疫应答包括自身免疫性再生障碍性贫血,移植排斥(通常),和移植物抗宿主病(Graft vs.Host Disease)(骨髓移植排斥)。在抗原是人类同种异体移植抗原的实施方案中,具体的序列可以选自:各种MHC I类和MHC II类单倍型蛋白质(例如,在组织交叉匹配中鉴定的供体/接受者差异)的亚基,和在次要血型抗原(minor blood group antigen)上的单氨基酸多态性,包括RhCE、Kell、Kidd、Duffy和Ss。此类组合物可以单独制备以用于给定供体/接受者对。

[0114] 在抗原是自身抗原的实施方案中,特定抗原(以及与它们相关的自身免疫性疾病)可以选自:

[0115] • 在1型糖尿病中，已经鉴定出几种主要的抗原：胰岛素、胰岛素原、前胰岛素原、谷氨酸脱羧酶-65(GAD-65或谷氨酸脱羧酶2)，GAD-67，葡萄糖-6-磷酸酶2(IGRP或胰岛特异性葡萄糖6磷酸酶催化亚基相关蛋白)、胰岛素瘤关联蛋白2(IA-2)、和胰岛素瘤关联蛋白2β(IA-2β)；其它抗原包括ICA69、ICA12(SOX-13)、羧肽酶H、Imogen 38、GLIMA 38、嗜铬粒蛋白-A、HSP-60、羧肽酶E、外周蛋白、葡萄糖转运蛋白2、肝癌-肠-胰/胰腺关联蛋白、S100β、胶质细胞原纤维酸性蛋白、再生基因II、胰十二指肠同源框1、萎缩性肌强直病(dystrophia myotonica)激酶、胰岛特异性葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基相关蛋白、和SST G蛋白偶联受体1-5。应当注意的是，胰岛素是抗原的例子，其可表征为自身抗原和治疗性蛋白质抗原两者。例如，rHu胰岛素和牛胰岛素是治疗性蛋白质抗原(其是不想要免疫攻击的对象)，而内源人胰岛素为自身抗原(其是不希望的免疫攻击的对象)。由于内源性的人胰岛素不可用于在药物组合物中采用，本公开的组合物中利用重组形式。

[0116] o人胰岛素，包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT P01308)：

[0117] MALWMRLLPL LALLALWGPD PAAAFVNQHL CGSHLVEALYLVCGERGFFY TPKTRREAED LQVGQVELGG GPGAGSLQPLALEGSLQKRG IVEQCCTSIC SLYQLENYCN(SEQ ID NO:5)。

[0118] o GAD-65，包括可用于本公开的组合物的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT Q05329)：

[0119] MASPGSGFWS FGSEDGSGDS ENPGTARAWC QVAQKFTGGIGNKLCALLYG DAEKPAESGG SQPPRAAARK AACACDQKPCSCSKVDVNYA FLHATDLLPA CDGERPTLAF LQDVMNILLQYVVKSFDRST KVIDFHYPNE LLQEYNWELA DQPQNLEEILMHCQTTLKYA IKTGHPRYFN QLSTGLDMVG LAADWLTSTANTNMFTYEIA PVFVLLEYVT LKKMREIIGW PGGSGDGIFSPGGAISNMYA MMIARFKMFP EVKEKGMAAL PRLIAFTSEHSHFSLKKGAA ALGIGTDSVI LIKCDERGKM IPSDLERRIL EAKQKGFVPFLVSATAGTTV YGAFDPLLAV ADICKKYKIW MHVDAAWGGGLLMSRKHKWK LSGVERANSV TWNPHKMMGV PLQCSALLVREEGLMQNCNQ MHASYLFQQD KHYDLSYDTG DKALQCGRHVDVFKLWLMWR AKGTTGFEAH VDKCLELAEY LYNIIKNREGYEMVFDGKPQ HTNVCFWYIP PSLRTLEDNE ERMSRLSKVAPVIKARMMEY GTTMVSYQPL GDKVNFFRMV ISNPAATHQDIDFLIEEIER LGQDL(SEQ ID NO:6)。

[0120] o IGRP，包括可用于本公开的组合物的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT QN9QR9)：

[0121]

MDFLHRNGVLIIQHLQKDYRAYYTFLNFMSNVGDPRNIFFIYFPLCFQFNQTVGTKMIWVAVIGDWLNLIFKWILFG HRPYWWVQETQIYPNHSSPCLEQFPTTCETGPGSPSGHAMGASCVWYVMVTAALSHTVCGMDKFSITLHRLTWSFLW SVFWLIQISVCISRVFIATHFPHQVILGVIGGMLVAEAFEHTPGIQTASLGTYLKTNLFLFLFAVGFYLLLRVLNID LLWSVPIAKKWCANPDWIHIDTTPFAGLVRNLGVLFGLGFAINSEMFLLSCRGGNNYTLSFRLLCALTSLTILQLYH FLQIPTHEEHLFYVLSFCKSASIPLTVVAFIPYSVHMLMKQSGKKSQ(SEQ ID NO:7)。

[0122] • 在自身免疫性甲状腺疾病(包括桥本甲状腺炎和格雷夫斯氏病)中，主要的抗原包括甲状腺球蛋白(TG)、甲状腺过氧化物酶(TPO)和促甲状腺激素受体(TSHR)；其它抗原包括钠碘同向转运蛋白(symporter)(NIS)和巨蛋白(megalin)。在甲状腺相关眼病和皮肤病中，除了甲状腺自身抗原(包括TSHR)外，抗原是胰岛素样生长因子1受体。在甲状旁腺功能

减退中，主要的抗原是钙敏感性受体。

[0123] • 在阿狄森(Addison)氏病中，主要的抗原包括21-羟化酶、17-羟化酶、和P450侧链切割酶(P450scc)；其它抗原包括ACTH受体、P450c21和P450c17。

[0124] • 在卵巢功能早衰(premature ovarian failure)中，主要的抗原包括FSH受体和α-烯醇化酶。

[0125] • 在自身免疫性下垂体炎，或垂体自身免疫性疾病中，主要的抗原包括垂体配体特异性蛋白质因子(PGSF)1a和2；另一种抗原是2型碘化甲腺氨酸脱碘酶。

[0126] • 在多发性硬化中，主要的抗原包括髓鞘碱性蛋白(“MBP”)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(“MOG”)和髓磷脂蛋白脂质蛋白质(“PLP”)。

[0127] o MBP，包括可用于本公开的组合物的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT P02686)：

[0128]

MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKKRNLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNNGTSSQDTAVTDSKRTADPKNAW QDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGREDNTFKDRPSESDELQTIQEDSAATSESLDVMASQKRPSQRHGSKYLATAST MDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSLPQKSHGRTQDENPVVHFFKNIVTPR TPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPGFGYGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR(SEQ ID NO:8)。

[0129] o MOG，包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT Q16653)：

[0130]

MASLSRPSLPSCLCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHPIRALVGDEVELPCRISPGKNATGMEVGWYRPPFSRVV HLYRNGKDQDGDQAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRFSDEGGFTCFFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPG VLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQYRLRGKLRAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALIICYNWL HRRLAGQFLEELRNPF(SEQID NO:9)。

[0131] o PLP，包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT P60201)：

[0132]

MGLLECCARCLVGAPFASLVATGLCFFGVALFCGCGHEALTGTEKLIETYFSKNYQDYEYLINVIHAFQYVIYGTAS FFFLYGALLLAEGFYTTGAVRQIFGDYKTTICGKGLSATVTGGQKGRGSRGQHQAHSLERVCHCLGKWLGHPDKFVG ITYALTVVWLLVFACSAVPVYIYFNTWTTCQSIAFPSKTSASIGSLCADARMYGVLPWNAFPGKVCGSNLLSICKTA EFQMTFHLFIAAFVGAAATLVSLLTFMIAATYNFAVLKLMGRGTKF(SEQ ID NO:10)。

[0133] o在本公开的的组合物中用于治疗多发性硬化的肽/表位包括下列序列中的一些或全部，这些序列单独地在通式1的组合物中，与通式1的组合物的混合物一起，或在通式2的一种或多种组合物中融合：

[0134] ■MBP13-32:KYLATASTMDHARHGFLPRH(SEQ ID NO:11)；

[0135] ■MBP83-99:ENPWHFFKNIVTPRTP(SEQ ID NO:12)；

[0136] ■MBP111-129:LSRFSWGAEGQRPGFGYGG(SEQ ID NO:13)；

[0137] ■MBP146-170:QGTLSKIFKLGGRDSRSGSPMARR(SEQ ID NO:14)；

[0138] ■MOG1-20:GQFRVIGPRHPIRALVGDEV(SEQ ID NO:15)；

[0139] ■MOG35-55:MEVGWYRPPFSRWHLYRNGK(SEQ ID NO:16);和

[0140] ■PLP139-154:HCLGKWLGHPDKFVGI(SEQ ID NO:17)。

[0141] •在类风湿性关节炎中,主要抗原包括Ⅱ型胶原,免疫球蛋白结合蛋白,免疫球蛋白G的片段可结晶区域,双链DNA,以及在类风湿性关节炎的病理中牵涉的蛋白的天然和cirtullinated形式,包括纤维蛋白/纤维蛋白原,波形蛋白,胶原蛋白I和II,和α-烯醇化酶。

[0142] •在自体免疫胃炎(autoimmune gastritis)中,主要抗原是H+,K+-ATP酶。

[0143] •在恶性贫血(pernicious angemis)中,主要抗原是内在因子。

[0144] •在乳糜泻中,主要抗原是组织转谷氨酰胺酶和谷蛋白或谷蛋白样蛋白质的天然的和脱酰胺形式,如α-,γ-,和omega-麦醇溶蛋白,麦谷蛋白,大麦醇溶蛋白,黑麦碱和燕麦蛋白。本领域技术人员将理解,例如,乳糜泻的主要抗原是α-麦醇溶蛋白,α-麦醇溶蛋白在体内通过组织谷氨酰胺酶的脱酰胺而转变为更为免疫原性的,所述组织谷氨酰胺酶将α麦醇溶蛋白的谷氨酰胺转换为谷氨酸。因此,虽然α-麦醇溶蛋白是原本是外来食物抗原,一旦它在体内被修饰而变得更为免疫原性的,它可以表征为自身抗原。

[0145] •在白癜风中,主要的抗原是酪氨酸酶,和酪氨酸酶相关蛋白1和2。

[0146] oMART1,由T细胞1,Melan-A识别的黑色素瘤抗原,包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式,具有下列序列(UNIPROT Q16655):

[0147]

MPREDAHFIYGYPKKGHGHSYTTAEEAAGIGILTVILGVLLLIGCWYCRRRNGYRALMDKSLHVGTQCALTRRCPQEGFDHRDSKVSLQEKNCEPVVPNAPPAYEKLSAEQSPPPYSP(SEQ ID NO:18)。

[0148] o酪氨酸酶,包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式,具有下列序列(UNIPROT P14679):

[0149]

MLLAVLYCLLWSFQTSAGHFPRACVSSKNLMEKECCPPWSGDRSPCGQLSGRGSCQNILLSNAPLGPQFPFTGVDDRESWPSVFYNRTCQCSGNFMGFNCGNCKFGFWGPNCTERRLLVRRNIFDLSAPEKDKFFAYLTLAKHTISSDYVIPIGTYGQMKNGSTPMFNDINIYDLFVWMHYYVSMDALLGGSEIWRDIDFAHEAPAFLPWHRLFLLRWEQEIQKLTGDENFTIPYWDWRDAEKCDICTDEYMGGQHPTNPNLLSPASFFSSWQIVCSRLEEYNSHQSLCNGTPEGPLRRNPGNHDKSRTPRLPSSADVEFCLSLTQYESGSMDKAANFSFRNTLEGFASPLTGIADASQSSMHNALHIYMNGTMSQVQGSANDPIFLLHHAFVDSIFEQWLRRHRPLQEVYPEANAPIGHNRESYMVPFIPLYRNGDFFISSKDLGYDYSYLQDSDPDSFQDYIKSYLEQASRIWSWLLGAAMVGAVLTALLAGLVSLLCRHKRKQLPEEKQPLLMEKEDYHSLYQSHL(SEQ ID NO:19)。

[0150] o黑色素细胞蛋白PMEL,gp100,包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式,具有下列序列(UNIPROT P40967):

[0151]

MDLVLKRCLLHLAVIGALLAVGATKVPRNQDWLGVSRQLRTKAWNRQLYPEWTEAQRLDCWRGGQVSLKVSNDGPTLIGANASFSIALNFPGSQKVLPDGQVIWVNNTIINGSQVWGGQPVYPQETDDACIFPDGGPCPSGSWSQKRSFVYVWKTWGQYWQVLGGPVSGLSIGTGRAMLGTHTMEVTVYHRRGSRSYVPLAHSSSAFTITDQVPFSVSVSQLRALDGGNKHFLRNQPLTFALQLHDPSGYLAEADLSYTWDFGDSSGTLISRALVVTHTYLEPGPVTAQVVLQAAIPLTSCGSSPVPGTTDGHRPTAEAPNTTAGQVPTTEVVGTTPGQAPTAEPSGTTSVQVPTTEVISTAPVQMPTAESTGMTPEKVPVSEVM

GTTLAEMSTPEATGMTPAEVSIVVLSGTTAAQVTTTEWVETTARELPIPEPEGPDASSIMSTESITGSLGPLLDGTA TLRLVKRQVPLDCVLYRYGSFSVTLDIVQGIESAEILQAVPSGEGDAFELTVSCQGGLPKEACMEISSPGCQPPAQR LCQPVLPSPACQLVLHQILKGGSGTYCLNVSLADTNSLAVVSTQLIMPGQEAGLGQVPLIVGILLVLMAVVLASLIY RRRLMKQDFSVPQLPHSSSHWLRLPRIFCSCPIGENSPLLSGQQV(SEQ ID NO:20)。

[0152] • 在重症肌无力中,主要抗原是乙酰胆碱受体。

[0153] • 在寻常型天疱疮和变型中,主要抗原是桥粒芯蛋白(desmoglein)3、1和4;其它抗原包括天疱膜联蛋白、桥粒胶蛋白(desmocollin)、斑珠蛋白(plakoglobin)、斑周蛋白(perplakin)、桥粒斑蛋白(desmoplakin)、和乙酰胆碱受体。

[0154] • 在大疱性类天疱疮中,主要抗原包括BP180和BP230;其它抗原包括网蛋白(plectin)和层粘连蛋白5。

[0155] • 在杜林疱疹样皮炎(dermatitis herpetiformis Duhring)中,主要抗原包括肌内膜和组织转谷氨酰胺酶。

[0156] • 在获得性大疱性表皮松解(epidermolysis bullosa acquisita)中,主要抗原是胶原VII。

[0157] • 在系统性硬化病(systemic sclerosis)中,主要抗原包括基质金属蛋白质酶1和3、胶原特异性分子伴侣热休克蛋白47、微纤维蛋白-1、和PDGF受体;其它抗原包括Scl-70、U1RNP、Th/To、Ku、Jo1、NAG-2、着丝粒蛋白、拓扑异构酶I、核仁蛋白、RNA聚合酶I、II和III、PM-Slc、纤维蛋白、和B23。

[0158] • 在混合性结缔组织病中,主要抗原是U1snRNP。

[0159] • 在斯耶格伦(Sjogren)氏综合征中,主要抗原是核抗原SS-A和SS-B;其它抗原包括胞衬蛋白、多聚(ADP-核糖)聚合酶和拓扑异构酶,毒蕈碱受体,以及Fc-γ受体IIIb。

[0160] • 在系统性红斑狼疮中,主要抗原包括核蛋白,包括“Smith抗原”SS-A、高迁移率组框1(HMGB1)、核小体、组蛋白蛋白质和双链DNA(针对其的自身抗体是在疾病进程中产生的)。

[0161] • 在古德帕斯丘综合征(Goodpasture's syndrome)中,主要抗原包括肾小球基膜蛋白,包括胶原IV。

[0162] • 在风湿性心脏病中,主要抗原是心脏肌球蛋白。

[0163] • 在自身免疫性多内分泌腺综合征中,1型抗原包括芳香族L-氨基酸脱羧酶、组氨酸脱羧酶、半胱氨酸亚磺酸脱羧酶、色氨酸羟化酶、酪氨酸羟化酶、苯丙氨酸羟化酶、肝P450细胞色素P4501A2和2A6、SOX-9、SOX-10、钙感测受体蛋白、和1型干扰素干扰素α、β和omega。

[0164] • 在视神经脊髓炎(neuromyelitis optica)中,主要抗原是AQP4。

[0165] o水通道蛋白4,包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式,具有下列序列(UNIPROT P55087):

[0166]

MSDRPTARRWGKCGPLCTRENIMVAFKGVWTQAFWKAVTAEFLAMLIFVLLSLGSTINWGGTEKPLPVDMVLISLCF GLSIATMVQCFGHISGGHINPAVTVAMVCTRKISIAKSVFYIAAQCLGAIIGAGILYLVTPPSVVGGLGVTMVHGNL TAGHGLLVELIITFQLVFTIFASCDSKRTDVTGSIALAIGFSVAIGHLFAINYTGASMNPARSFGPAVIMGNWENHW IYWVGPIIGAVLAGGLYEYVFCPDVEFKRRFKEAFSKAAQQTKGSYMEVEDNRSQVETDDLILKPGVVHVIDVDRGE EKKGKDQSGEVLSSV(SEQ ID NO:21)。

[0167] • 在葡萄膜炎中，主要抗原包括视网膜S-抗原或“S-抑制蛋白”和感光器间受体视黄醇结合蛋白(interphotoreceptor retinold binding protein)(IRBP)或视黄醇结合蛋白3。

[0168] oS-抑制蛋白，包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT P10523)：

[0169]

MAASGKTSKS EPNHVIFKKI SRDKSVTIYL GNRDYIDHVS
QVQPVDGVVL VDPDLVKGKK VYVTLTCAFR YGQEDIDVIG
LTFRRDLYFS RVQVYPPVGA ASTPTKLQES LLKKLGSNTY
PFLLTFPDYL PCSVMLQPAP QDSGKSCGVD FEVKAFATDS
TDAEEDKIPK KSSVRLLIRK VQHAPLEMGP QPRAEAAWQF
FMSDKPLHLA VSLNKEIYFH GEPIPVTVTV TNNTEKTVKK
IKAFVEQVAN VVLYSSDYYV KPVAMEEAQE KVPPNSTLTK
TLTLLPLLAN NRERRGIALD GKIKHEDTNL ASSTIIKEGI
DRTVLGILVS YQIKVKLTVS GFLGELTSSE VATEVPFRLM

[0170]

HPQPEDPAKE SYQDANLVFE EFARHNLKDA GEAEEGKRDK
NDVDE(SEQ ID NO:22).

[0171] oIRBP，包括在本公开的组合物中有用的外源得到的形式，具有下列序列(UNIPROT P10745)：

[0172]

MMREWVLLMSVLLCGLAGPTHLFQPSLVLDMAKVLLDNYCFPENLLGMQEAIQQAIKSHEILSISDPQTLASVLTAG
VQSSLNDPRLVISYEPSTPEPPPQVPALTSLSEEELLAWLQRGLRHEVLEGNVGYLRVDSVPGQEVLSMMGEFLVAH
VWGNLMGTSALVLDLRHCTGGQVSGIPYIISYLHPGNTILHVDTIYNRPSNTTTEIWTLPQVLGERYGADKDVVVLT
SSQTRGVAEDIAHILKQMRRAIVVGERTGGGALDLRKLRIGESDFFFTVPVSRSLGPLGGGSQTWEGSGVLPCVGTP
AEQALEKALAILTLRSALPGVVHCLQEVLKDYYTLVDRVPTLLQHLASMDFSTVVSEEDLVTKLNAGLQAASEDPRL
LVRAIGPTETPSWPAPDAAAEDSPGVAPELPEDEAIRQALVDSVFQVSVLPGNVGYLRFDSFADASVLGVLAPYVLR
QVWEPLQDTEHLIMDLRHNPGGPSSAVPLLLSYFQGPEAGPVHLFTTYDRRTNITQEHFSHMELPGPRYSTQRGVYL
LTSHRTATAAEEFAFLMQSLGWATLVGEITAGNLLHTRTVPLLDTPEGSLALTVPVLTFIDNHGEAWLGGGVVPDAI
VLAEEALDKAQEVLEFHQSLGALVEGTGHLLEAHYARPEVVGQTSALLRAKLAQGAYRTAVDLESLASQLTADLQEV
SGDHRLLVFHSPGELVVEEAPPPPPAVPSPEELTYLIEALFKTEVLPGQLGYLRFDAMAELETVKAVGPQLVRLVWQ
QLVDTAALVIDLRYNPGSYSTAIPLLCSYFFEAEPRQHLYSVFDRATSKVTEVWTLPQVAGQRYGSHKDLYILMSHT
SGSAAEAFAHTMQDLQRATVIGEPTAGGALSVGIYQVGSSPLYASMPTQMAMSATTGKAWDLAGVEPDITVPMSEAL
SIAQDIVALRAKVPTVLQTAGKLVADNYASAELGAKMATKLSGLQSRYSRVTSEVALAEILGADLQMLSGDPHLKAA
HIPENAKDRIPGIVPMQIPSPEVFEELIKFSFHTNVLEDNIGYLRFDMFGDGELLTQVSRLLVEHIWKKIMHTDAMI
IDMRFNIGGPTSSIPILCSYFFDEGPPVLLDKIYSRPDDSVSELWTHAQVVGERYGSKKSMVILTSSVTAGTAEEFT
YIMKRLGRALVIGEVTSGGCQPPQTYHVDDTNLYLTIPTARSVGASDGSSWEGVGVTPHVVVPAEEALARAKEMLQH
NQLRVKRSPGLQDHL(SEQ ID NO:23)。

[0173] 一些实施方案中，抗原是可以形成不想要的免疫应答的外来抗原，如食物抗原，具体的抗原可以是：

[0174] • 来自花生:伴花生球蛋白(Ara h 1)、变应原II(Ara h 2)、花生凝集素、羽扇豆球蛋白(Ara h 6);

[0175] o伴花生球蛋白例如具有以UNIPROT Q6PSU6鉴定的序列

[0176] • 来自苹果:31kda主要变应原/疾病抗性蛋白同源物(Mal d 2)、脂质转运蛋白前体(Mal d 3)、主要变应原Mal d 1.03D(Mal d 1);

[0177] • 来自乳:α-乳清蛋白(ALA)、乳转铁蛋白;来自奇异果(kiwi):猕猴桃素(actinidin)(Act c 1,Act d 1)、植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂(phytocystatin)、奇异果甜蛋白(thaumatin)样蛋白(Act d 2)、kiwellin(Act d 5);

[0178] • 来自蛋清:卵类粘蛋白,卵白蛋白,卵转铁蛋白,和溶菌酶;

[0179] • 来自蛋黄:卵黄蛋白,apovitillin和vosvetin;

[0180] • 来自芥菜:2S白蛋白(Sin a 1)、11S球蛋白(Sin a 2)、脂质转运蛋白(Sina 3)、抑制蛋白(Sin a 4);

[0181] • 来自芹菜:抑制蛋白(Api g 4)、高分子量糖蛋白(Api g 5);

[0182] • 来自虾:Pen a 1变应原(Pen a 1)、变应原Pen m 2(Pen m 2)、原肌球蛋白快速同种型(fast isoform);

[0183] • 来自小麦和/或其它谷物:高分子量麦谷蛋白、低分子量麦谷蛋白、α-,γ-和omega麦醇溶蛋白、大麦醇溶蛋白、裸麦醇溶蛋白、和/或燕麦蛋白;

[0184] o在本公开的的组合物中用于治疗乳糜泻的肽/表位包括下列序列中的一些或全部,这些序列单独地在通式1的组合物中,与通式1的组合物的混合物一起,或在通式2的一种或多种组合物中融合:

[0185] ■DQ-2相关,α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的:

[0186] LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF(SEQ ID NO:24)

[0187] ■DQ-2相关,α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的:

[0188] LQLQPFPQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPF(SEQ ID NO:25)

[0189] ■DQ-8相关,α-麦醇溶蛋白:

[0190] QQYPSGQGSFQPSQQNPQ(SEQ ID NO:26)

[0191] ■DQ-8相关,omega麦醇溶蛋白(小麦,U5UA46):

[0192] QPFPQPEQPFPW(SEQ ID NO:27)

[0193] • 来自草莓:主要草莓变态反应Fra a 1-E(Fra a 1),和

[0194] • 来自香蕉:抑制蛋白(Mus xp 1)。

[0195] 在抗原是形成不想要的免疫应答的外来抗原的实施方案中,所述抗原例如动物,植物和环境抗原,具体的抗原可以是例如:猫,小鼠,狗,马,蜂,灰尘,树和黄花,包括来源于以下的下述蛋白质或肽:

[0196] • 杂草,(包括豚草变应原amb a,2,3,5,和6中,和Amb t 5;藜Chea 2和5;以及其它杂草变应原Par j 1,2,3,和Par o 1);

[0197] • 草(包括主要变应原Cyn d 1,7和12;Dac g 1,2和5;Hol I 1.01203;Lol p 1,2,3,5,和11;Mer a 1;Pha a 1;Poa p 1和5);

[0198] • 来自以下的花粉:豚草和其他杂草(包括皱叶酸模(curly dock),lambs quarter,藜(pigweed),车前草(plantain),羊酸模(sheep sorrel),和山艾树

(sagebrush)),草(包括Bermuda,Johnson,Kentucky,Orchard,Sweet vernal,和猫尾草(Timothy grass)),和树(包括梓树(catalpa),榆木(elm),胡桃木(hickory),橄榄(olive),pecan,美国梧桐(sycamore)和胡桃(walnut));

[0199] • 粉尘(包括来自物种屋尘螨(Dermatophagoides pteronyssinus)的主要变应原,如Der p 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,14,15,18,20,21,和23;来自物种粉尘螨(Dermatophagoides farina),如Der f 1,2,3,6,7,10,11,13,14,15,16,18,22,和24;来自热带无爪螨(Blomia tropicalis),如Blo t 1,2,3,4,5,6,10,11,12,13,19,和21;以及来自宇尘螨(Euroglyphus maynei)的变应原Eur m2,来自腐食酪螨(Tyrophagus putrescentiae)的Tyr p 13,和变应原Bla g1,2,和4;来自蟑螂的Per a 1,3,和7)。

[0200] • 宠物(包括猫,狗,啮齿类,和农场动物,主要的猫变应原包括Fel d 1至8,猫IgA,BLa g 2,和猫白蛋白;主要的狗变应原包括Can f 1至6,和狗白蛋白);

[0201] • 蜂蜇伤,包括主要变应原Api m 1至12;和

[0202] • 真菌,包括来源于以下物种的变应原:曲霉属(Aspergillus)和青霉属(Penicillium)的物种,以及物种链格孢属(Alternaria alternata),Davidiella tassiana,和红色毛癣菌(Trichophyton rubrum)。

[0203] 如本领域的技术人员可以理解,可以测试患者以鉴定已经产生不想要的免疫应答的抗原,并且蛋白质、肽等可以基于该抗原研发并且以X掺入本公开的组合物中。

[0204] 唾液酸化抗原,抗体,抗体片段

[0205] 以下是特异性靶向ASGPR的具有可以被去除以留下糖基化的唾液酸化的抗原,抗体,抗体片段的例子:卵泡刺激素(FSH),人绒毛膜促性腺激素(HCG),促黄体激素(LH),骨桥蛋白,促甲状腺激素(TSH),阿加糖酶α,阿加糖酶β(FABRAZYME®;Genzyme公司),红细胞生成素α和红细胞生成素β,促卵泡激素α(GONAL-F®;Merck/Serono)和促卵泡激素β(FOLLISTIM®;Schering-Plough),胰岛素生长因子结合蛋白6(IGFBP-6),促黄体激素α(LUVERIS® ;Merck/Serono),转化生长因子β1,抗凝血酶((ATryn®/TROMBATE-III®;Genzyme/Talecris Biotherapeutics),促甲状腺激素α(THYROGEN® ;Genzyme),来格司亭(lenograstim),沙格司亭(sargramostim)(LEUKINE®;Genzyme),白细胞介素-3,尿激酶原,淋巴毒素,C1酯酶抑制剂(Berinert®;CSL),IgG样抗体,干扰素β,凝血因子VIIa NOVOSEVEN®;Novo Nordisk),凝血因子VIII(莫罗凝血素α(moroctocog alfa)),凝血因子IX(诺那凝血素α(nonacog alfa))(BENEFIX®;Wyeth)和p55肿瘤坏死受体融合蛋白。(参见:Byrne et al.,Drug Discovery Today,Vol 12,No.7/8,pages 319-326,Apr.2007和Sola et al.,BioDrugs.2010;24(1):9-21)。以前已经高度糖基化并且可被去唾液酸化以用于肝细胞-ASGPR靶向的药学上相关的蛋白包括:干扰素α和γ,促黄体激素,Fv抗体片段,天冬酰胺酶,胆碱酯酶,达贝泊汀α(AraNESP®;Amgen),trombopoietin,瘦素,FSH,IFN-α2,血清白蛋白,和绒促卵泡素α。

[0206] 具有通常不在唾液酸处终止的聚糖的蛋白质,包括在细菌或酵母中产生的蛋白质(如精氨酸酶,一些胰岛素,和尿酸酶)不会适合于去唾液酸化。

[0207] 本领域的技术人员将理解,可公开获得的引用文献,如UNIPROT,公开了在大多数的(如果不是全部)感兴趣的抗原,抗体,抗体片段和配体上去唾液酸化的位点的存在和位

置。

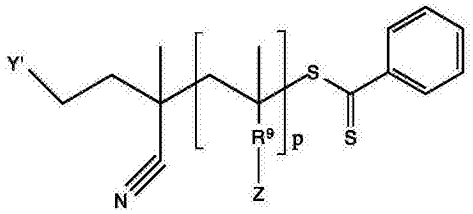
[0208] 抗体和肽配体

[0209] 在利用抗体，抗体片段或配体的实施方案中，这样的部分被选择为特异性结合靶定的循环蛋白质或肽或抗体，并导致循环靶向部分的肝摄取，可能作为靶向部分的加合物，最终导致循环靶向部分的清除和失活。例如，肝靶向因子VIII将结合并清除循环因子VIII抗体。用于鉴定此类部分的手段是本领域的技术人员所熟悉的。

[0210] 接头

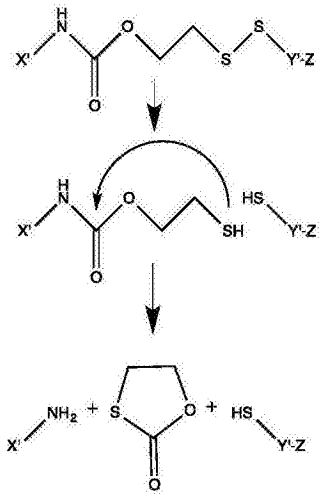
[0211] 本公开的组合物中所使用的接头(通式1的“Y”)可以包括N-羟基琥珀酸酰胺基(N-hydroxysuccinamidyl)接头，马来酰亚胺(malaemide)接头，乙烯基砜接头，吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接头，吡啶基二硫醇接头，正-硝基苯基碳酸酯接头，NHS-酯接头，和硝基苯氧基聚(乙二醇)酯接头，等等。

[0212] 以下是一组特定的接头通式Y’-CMP(其中Y’表示接头的剩余部分，且R^9和Z如定义)。更具体地，在包括通式Y’-CMP的接头的组中，R^9取代基为乙基乙酰胺基基团，甚至更具体地乙基乙酰胺基与N-乙酰半乳糖胺的C1缀合。

[0213] 

通式Y’-CMP

[0214] 含二硫醇(Dithiol)的接头，尤其是含有二硫烷基氨基甲酸乙酯(disulfanylethyl carbamate)的接头(命名中包括X的游离胺，或者命名为“二硫烷乙基酯(disulfanylethyl ester)”而不包括X的游离胺)在本组合物中是特别有利的，因为一旦在细胞内，其具有切割并释放抗原的原来形式的能力，例如，如下面所显示的(其中Y’表示接头的剩余部分，且X’和Z如上定义)。

[0215] 

[0216] 具体地，关于在以下通式Ya至Yp中显示的接头：

[0217] 左括号“(”表示X和Y之间的键；

[0218] 右或底部括号和“)”表示Y和Z之间的键；

[0219] n是整数，表示包括约1至100，特别是约8至90(例如，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，25，30，35，40，45，50，55，60，65 70，75，80，85，90或95)，更特别是约40至80(例如，39，40，43，45，46，48，50，52，53，55，57，60，62，65，66，68，70，73，75，78，80或81)个乙二醇基团的混合物，其中该混合物通常包含指定为n±10％的整数；

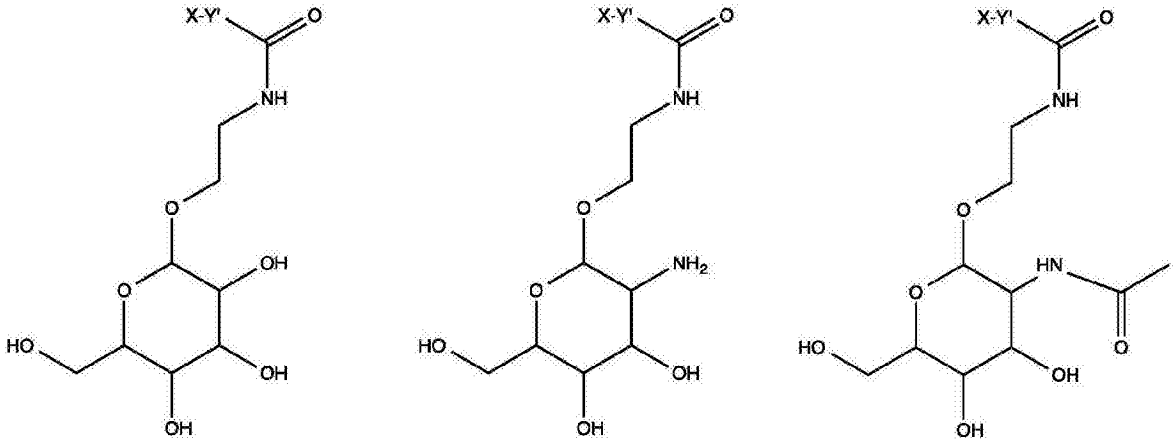
[0220] p是整数，表示包括约2至150，特别是约20至100(例如，18，19，20，25，30，35，40，45，50，55，60，65 70，75，80，85，90，95，100或105)，更特别是约30至40(例如，28，29，30，31，32，33，34，35，36，37，38，39，40，41，42，43或44)的混合物，其中该混合物通常包括指定为p±10％的整数；

[0221] q是整数表示包含从约1至44，特别是约3至20(例如，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，21或22)，并且更特别是约4至12个(例如，4，5，6，7，8，9，10，11，12或13)的混合物，其中该混合物通常包括指定为q±1 0％的整数；和

[0222] R^8是-CH_2-(“甲基”)或-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)-(“1-氰基-1-甲基-丙基”或“CMP”)。

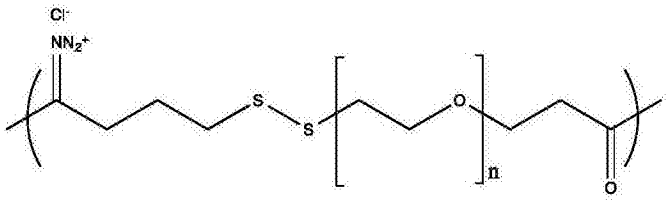
[0223] R^9为直接键或-CH_2-CH_2--NH-C(O)-(乙基乙酰胺基基团或“EtAcN”)，如在通式1的以下结构中所显示(其中显示EtAcN基团，将接头的其余部分称为Y')：

[0224]

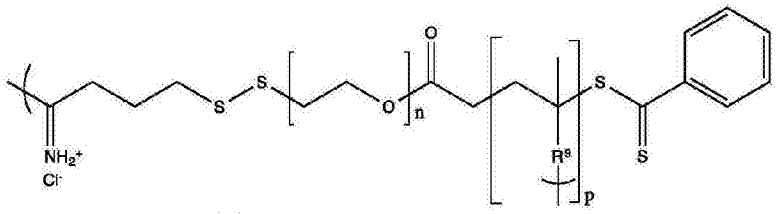


[0225] 并且Z为在C1级合的半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

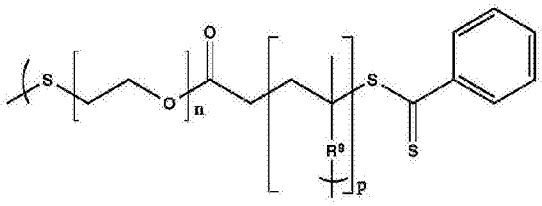
[0226]



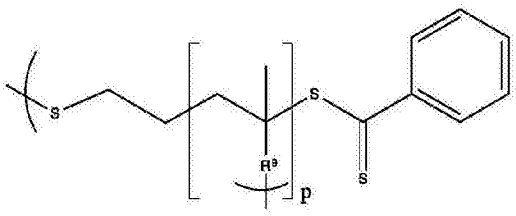
通式 Ya



通式Yb

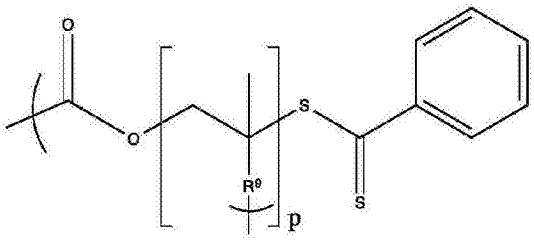


通式Yc

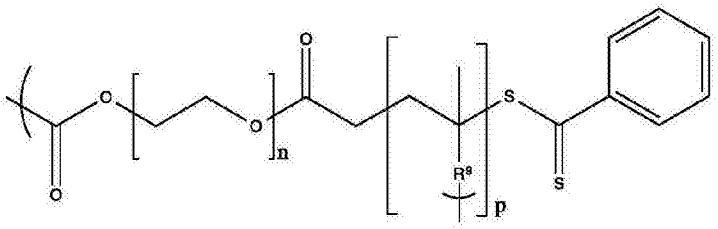


通式Yd

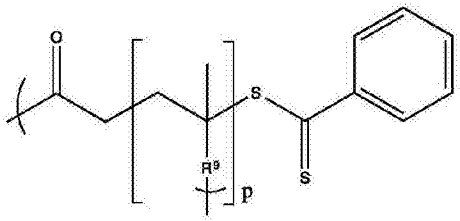
[0227]



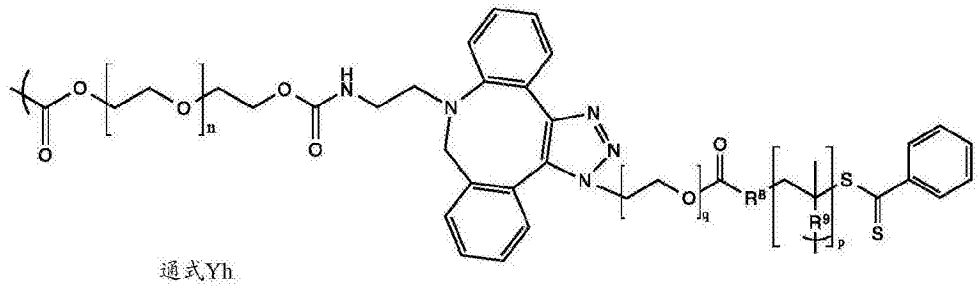
通式Ye



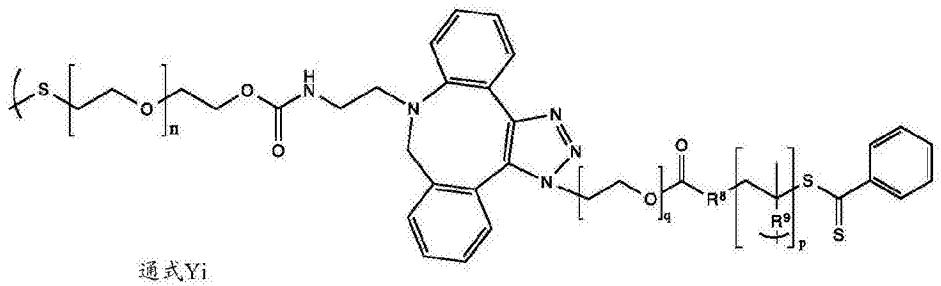
通式Yf



通式 Yg

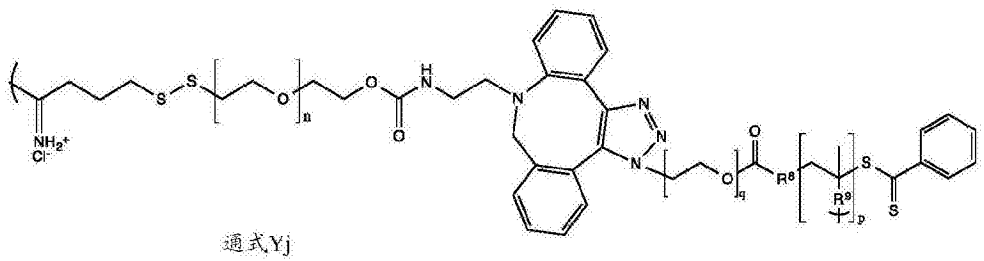


通式Yh

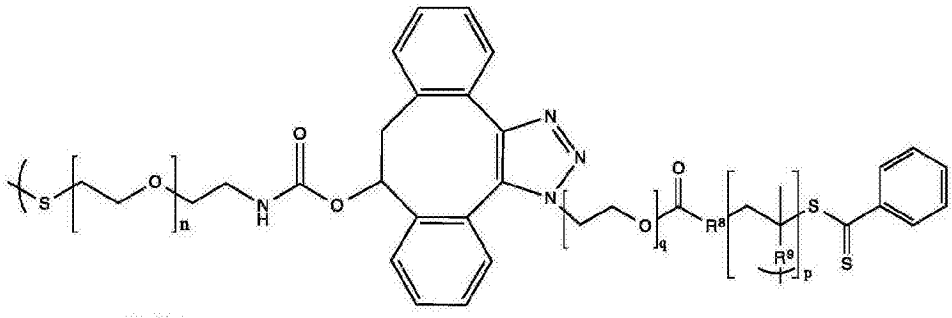


通式Yi

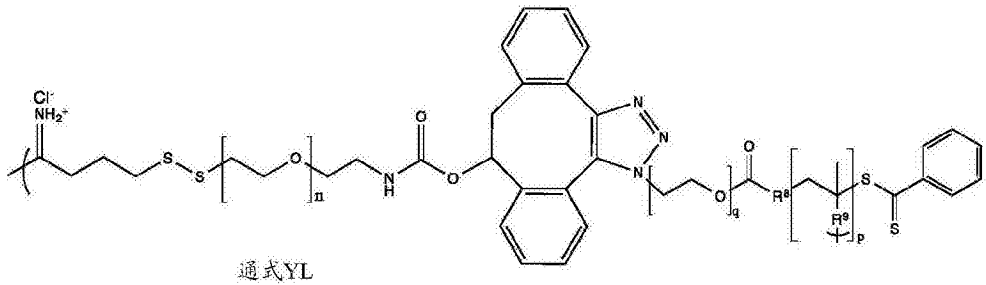
[0228]



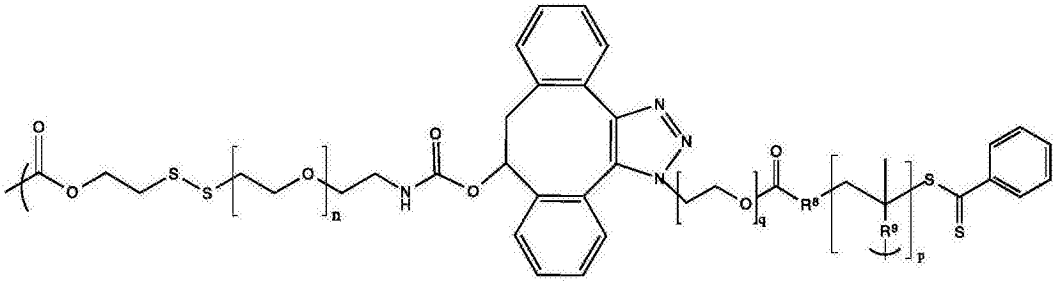
通式Yj



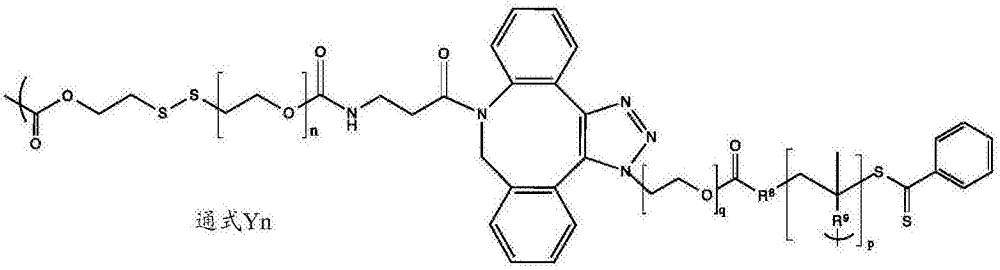
通式Yk



通式YL

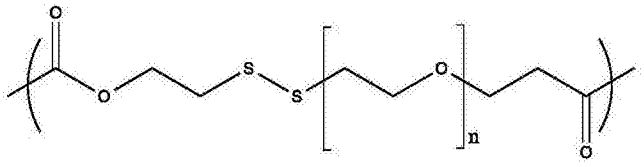
[0229] 

通式Ym



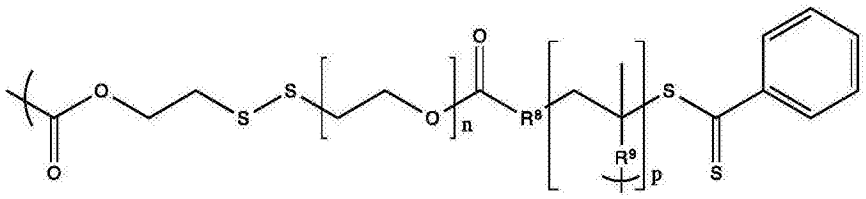
通式Yn

[0230] (通式Yn的接头可通过使Yn特别适合于缀合到疏水性抗原的某些前体合成。)



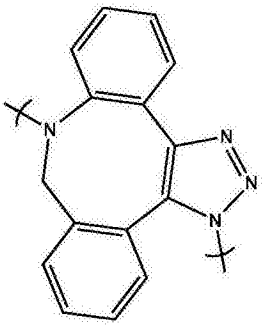
通式Yo

[0231]

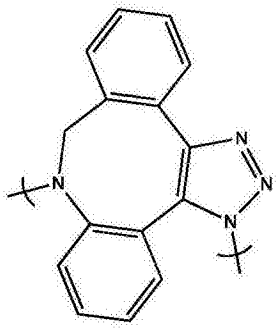


通式Yp

[0232] 上文以通式Yh至Yn所示的接头被合成为在不用分离的情况下使用的异构体。例如,通式Yh,Yi,Yj和Yn的接头将是8,9-二氢-1H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]azocin-8-基和8,9-二氢-3H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并(triazolo)[4,5-d]azocin-8基的混合物,它们的结构显示如下:

[0233] 

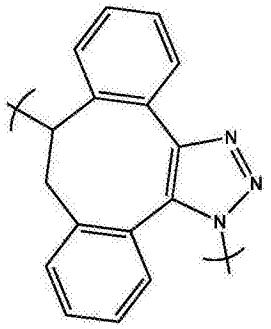
3H



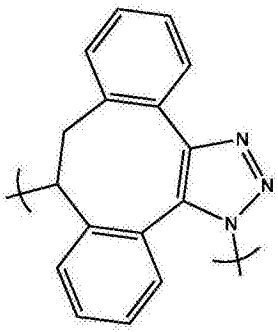
1H

[0234] 通式Yk,YL和Ym的接头将是8,9-二氢-1H-二苯并[3,4:7,8]环辛(cycloocta)[1,

2-d][1,2,3]三唑-8-基和8,9-二氢-1H-二苯并[3,4:7,8]环辛[1,2-d][1,2,3]三唑-9-基的混合物，它们的结构显示如下：

[0235] 

-8-yl



-9-yl

[0236] 这种异构体混合物的存在不损害使用这种接头的组合物的功能性。

[0237] 糖基化部分

[0238] 在本公开的组合物中采用的半乳糖基化部分用来将组合物靶向肝细胞(例如，特异性结合肝细胞)，并可以选自：半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。据报道，ASGPR亲和力可保留同时修饰半乳糖的C3/C4二醇锚(diolanchor)的任一侧(Mamidyala,Sreeman K.,et al.,J.Am.Chem.Soc.2012,134,1978-1981)，因此缀合的位点特别是在C1,C2和C6处。

[0239] 特别的半乳糖基化部分包括在C1或C6处缀合的半乳糖，在C2处缀合的半乳糖胺，和在C6处缀合的N-乙酰半乳糖胺。其他特别的半乳糖基化部分包括在C2处缀合的N-乙酰半乳糖胺，更具体地缀合至具有R^9取代基的接头，所述R^9取代基是CH_2。其他特别的半乳糖基化部分包括在C1处缀合的半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺，更具体地地缀合至具有R^9取代基的接头，所述R^9取代基是乙基乙酰胺基基团。

[0240] ASGPR靶向抗体

[0241] 在本公开的组合物中采用的ASGPR特异性抗体还用来将本公开的组合物靶向至肝细胞中，并且可以选自可商购的产品，如来自Abcam plc,Cambridge,UK的抗无唾液酸糖蛋白受体1抗体(ab42488)，来自Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Dallas,TX的ASGPR1/2(FL-291)(sc28977)。备选地，这样的抗体可以使用任意数量的已公开的序列，如Dom26h-196-61，单域抗ASGPR抗体来表达：

[0242]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSS(SEQ.ID.No:6)。

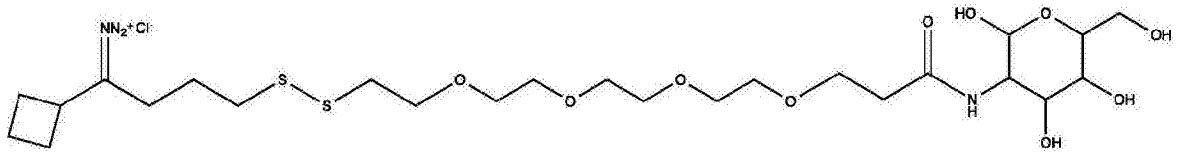
[0243] [Coulstock E,等人，“Liver-targeting of interferon-alpha with tissue-specific domain antibodies.”PLoS One.8(2):e57263和US 2013/0078216]，或具有保守取代的此种序列。以上引用的美国专利申请公开了用于递送某些治疗剂[包括干扰素(干扰素α2，干扰素α5，干扰素α6，或共有干扰素)，利巴韦林，Nexavar/索拉非尼，Erbitus/西妥昔单抗，Avastatin/贝伐单抗，赫赛汀/曲妥珠单抗]以用于治疗肝脏疾病的肝靶向分子如DOM26h-196-61。使用DOM26h-196-61或在US 2013/0078216中描述的另一种肝靶向分子的对应于通式2的组合物在其范围内不包括干扰素(干扰素α2，干扰素α5，干扰素α6，或共有干扰素)，利巴韦林，Nexavar/索拉非尼，Erbitus/西妥昔单抗，Avastatin/贝伐单抗和赫赛汀/曲妥珠单抗。

[0244] 使用本领域技术人员已知的各种方法可以发现特异性靶向ASGPR的抗体，抗体片段或肽的新序列。这些方法包括但不限于疫苗接种技术，杂交瘤技术，库展示技术(包括细菌和噬菌体平台)，内源全集筛选技术，定向进化和理性设计。

[0245] 命名法

[0246] 通式1的组合物可以使用LUPAC和惯用名的组合来命名。例如，对应于通式1的化合物，其中X是环丁基部分(对于说明性目的，代替抗原显示)，Y是通式Ya，m是1，n是4且Z是N-乙酰基半乳糖胺-2-基(N-acetylgalactos amin-2-yl)：

[0247]

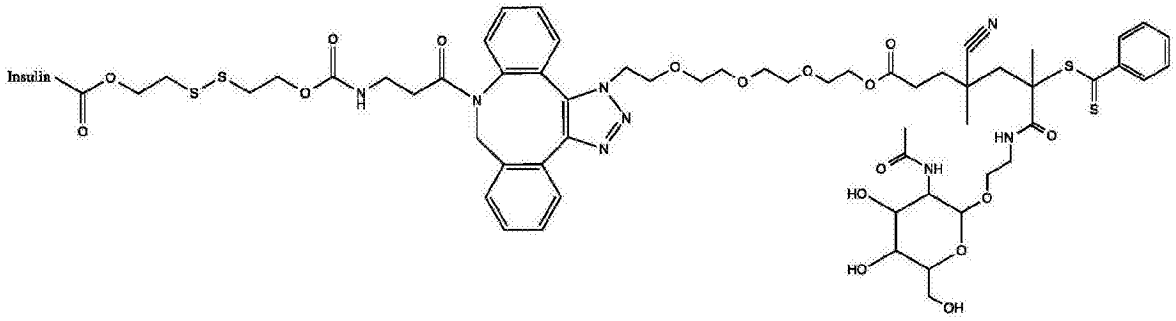


[0248] 可以命名为(Z)-(21-环丁基-1-氧代-1-(2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-4,7,10,13四氧杂-16,17-dithiahenicosan-21-亚基)triaz-1-yn-2-ium氯化物((Z)-(21-cyclobutyl-1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-ylidene)triaz-1-yn-2-ium chloride)，因此其中X为组织转谷氨酰胺酶的相应的本公开的组合物可以命名为(Z)-(21-(组织型转谷氨酰胺酶)-1-氧代-1-((2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-4,7,10,13-四氧杂-16,17-dithiahenicosan-21-亚基)triaz-1-yn-2-ium氯化物((Z)-(21-(tissue transglutaminase)-1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-ylidene)triaz-1-yn-2-ium chloride)。本公开的相应组合物，其中X'是转谷氨酰胺酶，m是2，n是4，且Z'为N-乙酰基半乳糖胺-2-基可以命名为(3Z)-((组织型转谷氨酰胺酶)-1,3-二基双(-1-氧代-1-(2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基)-4,7,10,13-四氧-16,17-dithiahenicosan-21-基-21-亚基))双(triaz-1-yn-2-ium)氯化物((3Z)-((tissue transgultaminase)-1,3-diylbis(1-oxo-1-((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetra hydro-2H-pyran-3-yl)amino)-4,7,10,13-tetraoxa-16,17-dithiahenicosan-21-yl-21-ylidene))bis(triaz-1-yn-2-ium)chloride)。

[0249] 为简化处理，通式1的组合物可使用备选的命名系统来命名，通过参考X并对应于通式1a至1p中的一个(如在反应方案示出)，之后是叙述变量m，n，p和/或q，R^8，R^9的整数和标识糖基化部分和缀合它的位置。根据此系统，其中X是卵清蛋白，m是2，n是4且Z是N-乙酰基半乳糖胺-2-基的通式1a的组合物可以被命名为“F1a-OVA-m_2-n_4-2NAcGAL”。

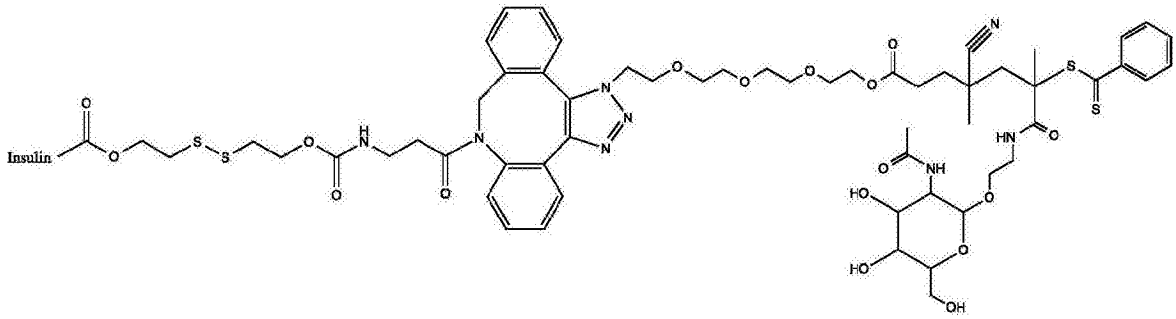
[0250] 相似地，以下的通式1的化合物

[0251]



[0252] 可以被命名为“2-((2-(((3-(3-(22-((3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16氰基16,18二甲基-13,19-二氧代-18-((苯基羰硫基(phenylcarbonothioyl)硫基))-3,6,9,12-四氧-20-azadocosyl)-3,9-二氢-8H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]azocin-8-基)-3-氧代丙基)氨基甲酰基)氧基)乙基)二硫基)乙基胰岛素羧化物(“2-((2-(((3-(3-(22-((3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-16-cyano-16,18-dimethyl-13,19-dioxo-18-((phenylcarbonothioyl)thio)-3,6,9,12-tetraoxa-20-azadocosyl)-3,9-dihydro-8H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)carbamoyl)oxy)ethyl)disulfanyl)ethyl insulin carboxylate)。异构体：

[0253]



[0254] 可以被命名为“2-((2-(((3-(1-(22-(3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-16氰基-16,18二甲基-13,19二氧代-18-((苯基羰硫基(phenylcarbonothioyl)硫基)-3,6,9,12-四氧-20-azadocosyl)-1,9-二氢-8H-二苯并[b,f][1,2,3]三唑并[4,5-d]azocin-8-基)-3-氧代丙基)氨基甲酰基)-氧基)乙基)二硫基)乙基胰岛素羧化物(2-((2-(((3-(1-(22-((3-acetamido-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-16-cyano-16,18-dimethyl-13,19-dioxo-18-((phenylcarbonothioyl)thio)-3,6,9,12-tetraoxa-20-azadocosyl)-1,9-dihydro-8H-dibenzo[b,f][1,2,3]triazolo[4,5-d]azocin-8-yl)-3-oxopropyl)carbamoyl)-oxy)ethyl)disulfanyl)ethyl insulin carboxylate)”(增加的粗体字突出显示用于鉴定正式名称之间的差异中的便利性)。利用适用于本公开的命名系统,两种异构体可以命名为“F1n-胰岛素m_1-n_1-p_1-q_4-CMP-EtAcN-1NAcGAL”,其中CMP表示R^8是1-氰基-1-甲基-丙基,EtAcN表示是R^9是乙基乙酰胺基,并且1NAcGAL表示“Z”是C1处缀合的N-乙酰半乳糖胺。命名Z之前的缩写EtAcN的缺少表明R^9为直接键。

[0255] 在通式2的组合物中,从左到右的的方向不应该被视为指定N至C方向,缺少相反的

具体指示。例如，通式2的化合物，其中m'为1，m"为0时，X是卵清蛋白，Y是Gly_3Ser和Z是抗ASGPR Dom26h-196-61，可命名为OVA-Gly_3Ser-DOM，并且阅读为覆盖以下两个：

[0256] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-C

[0257] 和

[0258] N-DOM-Gly_3Ser-OVA-C

[0259] 通式2的组合物，例如，其中m'为1，m"为0时，X是卵清蛋白，Y是Gly_3Ser，且Z是抗ASGPR Dom26h-196-61(具有通过额外的接头所附接的纯化的标记)可以命名如下：

[0260] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C

[0261] 或

[0262] N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C

[0263] 其中C'端Gly_3Ser-6xHis基团代表便于分离和纯化的氨基酸序列。

[0264] 通式2的组合物，其中m'为1，m"为1，每个X是因子VIII，每个Y是Gly_3Ser和Z是抗ASGPR Dom26h-196-61(具有通过额外的接头所附接的纯化的标记)可以命名为FVIII-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-FVIII-Gly_3Ser-6xHis，并涵盖以下两种：

[0265] N-FVIII-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-FVIII-Gly_3Ser-6xHis-C

[0266] 和

[0267] N-6xHis-Gly_3Ser-FVIII-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-FVIII-C。

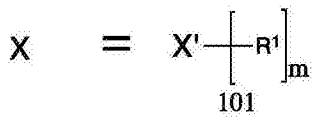
[0268] 通式2的组合物，其中m'是3，m"为0，1和3个X抗原，分别是α-麦醇溶蛋白"33-个聚体"，脱酰氨基(SEQ ID NO:25)，α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26)和Omega-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27)，每个Y是具有免疫蛋白体切割位点("IPC")的接头，且Z是抗ASGPR Dom26h-196-61，可以命名为：

[0269] α-麦醇溶蛋白"33聚体"脱酰氨基的-IPC-α-麦醇溶蛋白-IPC-Omega-麦醇溶蛋白-IPC-DOM。

[0270] <u>本公开的组合物的制备</u>

[0271] 通式1的组合物可例如通过调整Zhu，L.等，Bioconjugate Chem.2010中描述的方法来制备。下面还描述了通式1的某些组合物的合成，参照反应方案1至14。其它的合成方法对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0272] 通式101(下面)是X的备选的表示

[0273] 

[0274] 其中R^1是位于X的三维结构上的游离的表面氨基(-NH_2)或巯基(-SH)，以便对于缀合到接头是可接近的，并且X'表示X的其余部分，其不包括所鉴定的游离氨基[(在反应方案使用的X"表示排除游离巯基的X的其余部分]。取决于X的身份，将有至少一个(N-末端胺)，并可以是多个R^1基(主要来自赖氨酸残基或未参与二硫键键合的半胱氨酸残基)，如用m表示，其是从约1至100的整数，更通常的是1或约4至20个，且最通常的是1至约10个。

[0275] 在反应方案中使用的变量如以上所定义，并且另外包括以下内容，应理解为关于特定的反应方案或步骤，在缺少另外任何特定指示下，具有下列含义。

[0276] •R^2是OH或保护基团；

[0277] • R^3为OH，NH_2，NHAc，保护基或NH保护基团；

[0278] • R^4是OH或保护基团；

[0279] • R^5是OH或保护基团；

[0280] • R^6是OH或保护基团；

[0281] • Z’为在C1或C6处缀合的半乳糖，在C2处缀合的半乳糖胺，和在C6处缀合的N-乙酰半乳糖胺；

[0282] • R^8是$-CH_2-$或$-CH_2-CH_2-C(CH_3)(CN)--$；和

[0283] • R^9为直接键并且Z”是在C2处缀合的N-乙酰半乳糖胺；

[0284] • R^9为乙基乙酰胺基基团，且Z”是在C1处缀合的半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

[0285] 合成反应参数

[0286] 术语“溶剂”，“惰性有机溶剂”或“惰性溶剂”是指结合本文描述的反应条件下惰性的溶剂[包括，例如，苯，甲苯，乙腈，四氢呋喃(“THF”)，二甲基甲酰胺(“DMF”)，氯仿，亚甲基二氯(methylene chloride)(或二氯甲烷)，乙醚，甲醇，吡啶等]。除非有相反的规定，在本公开的反应中使用的溶剂是惰性有机溶剂。

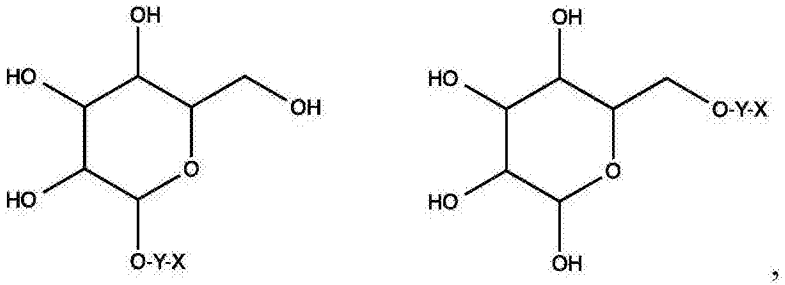
[0287] 术语“q.s”意指加入足以实现指示功能的量，例如，以使溶液达到所需的体积(即，100％)。

[0288] 根据需要，本文所述的化合物和中间体的分离和纯化可以通过任何合适的分离或纯化步骤进行，诸如例如过滤，萃取，结晶，柱层析，薄层层析或厚层层析，离心大小排阻层析法，高效液相层析法，重结晶，升华，快速蛋白液相层析，凝胶电泳，透析或这些方法的组合。合适的分开和分离方法的具体说明可以参考下文的实施例。然而，当然也可以使用其它等同的分开和分离方法。

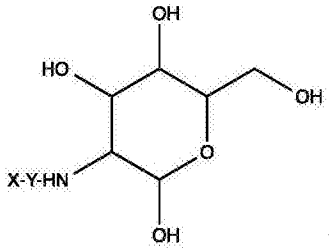
[0289] 除非另有规定(包括在实施例中)，所有反应是在标准大气压(约1个大气压)和环境(或室温)(约20℃)，在约pH 7.0-8.0下进行。

[0290] 反应产物的表征可通过常规手段，例如，质子和碳NMR，质谱，大小排阻层析法，红外光谱法，凝胶电泳进行。

[0291] 反应方案1显示了通式1的组合物的制备，其中Z可以是半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。在这方面，如上文所定义的，在反应方案1使用的Z’包括在C1和C6处缀合的半乳糖，并且对应于根据通式1的以下结构：

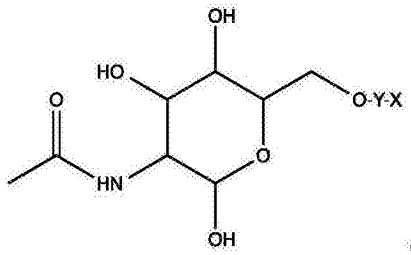
[0292] 

[0293] 在C2处缀合的半乳糖胺，并且对应于根据通式1的以下结构：

[0294] 

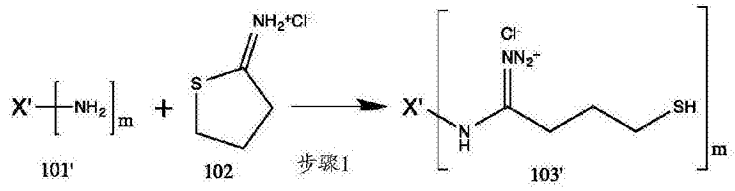
,

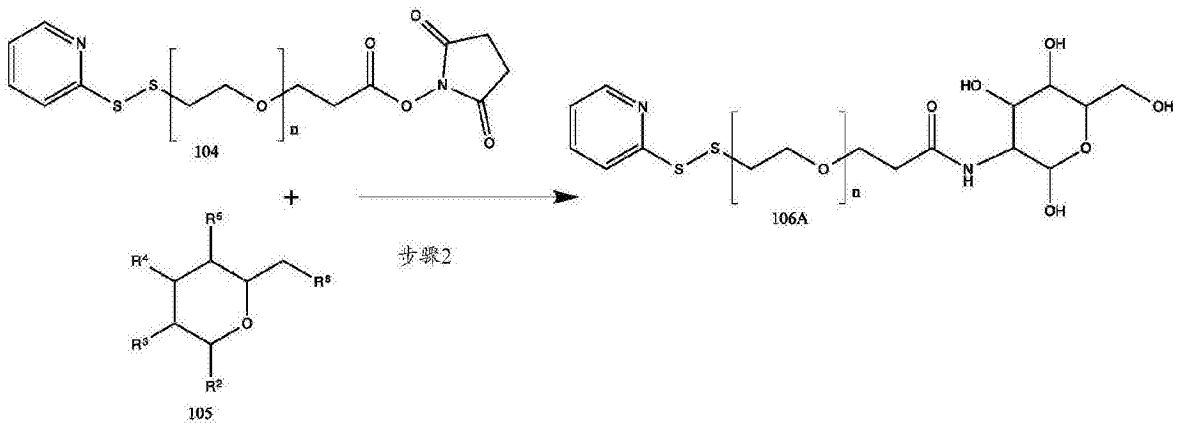
[0295] 和在C6处缀合的N-乙酰半乳糖胺,并且对应于根据通式1的以下结构:

[0296] 

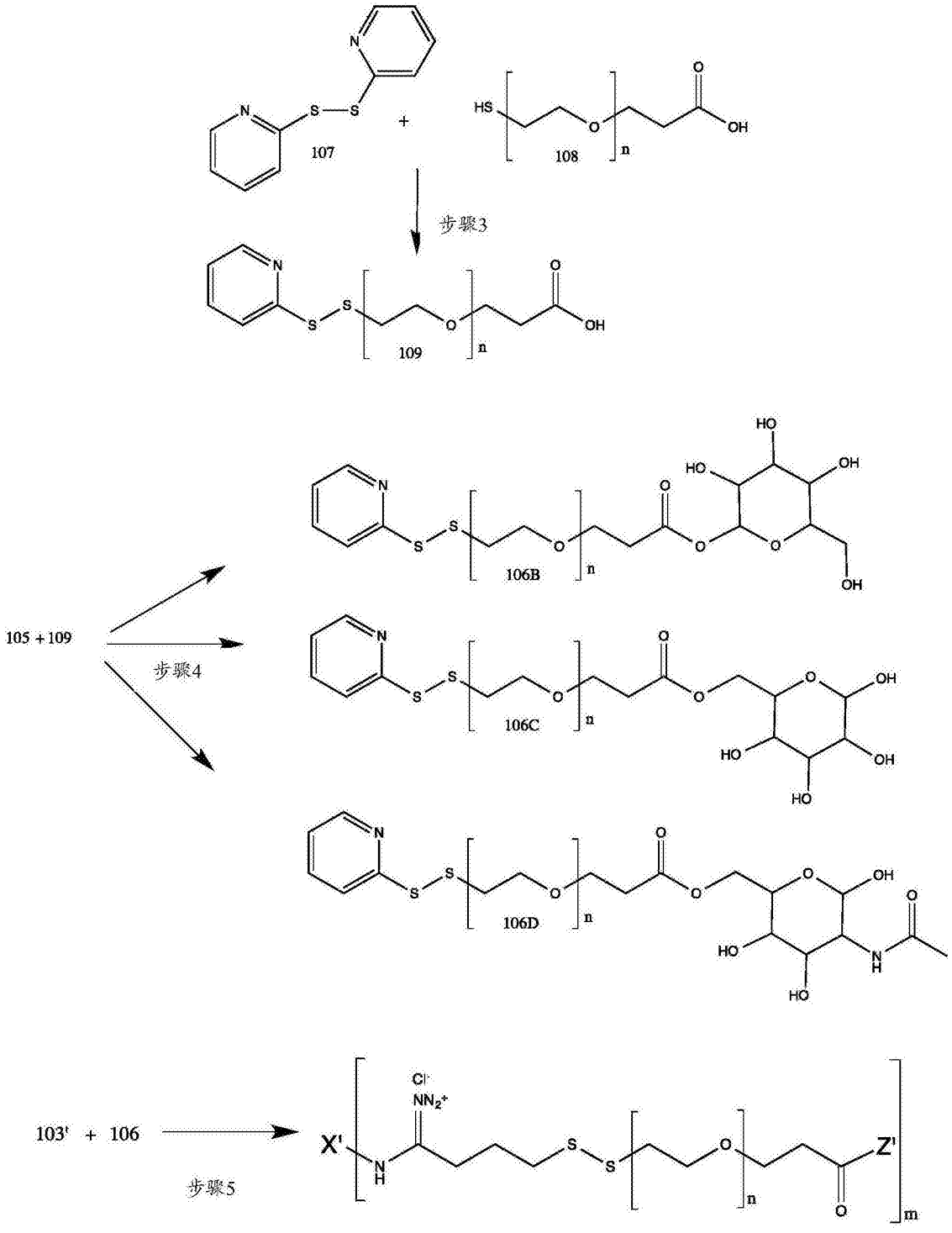
。

[0297] 反应方案1

[0298] 



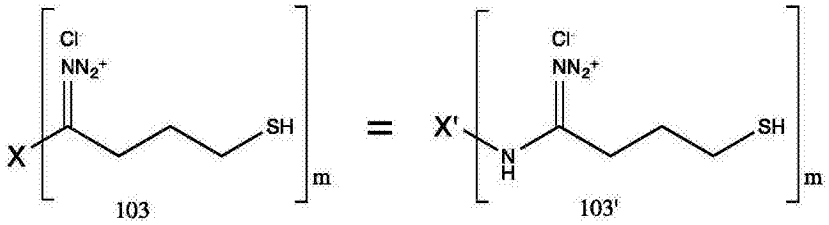
[0299]



通式1a

[0300] 如上文在反应方案1，步骤1中所示，可以如下在具有游离的表面氨基的抗原，抗体，抗体片段或配体(通式101')上产生巯基基团：与Traut试剂(通式102)在pH约8.0接触约1小时，得到通式103'，例如，通过离心大小排阻层析除去其中未反应的Traut试剂。如下所示的两种结构分别显示出了反应方案1，步骤1的产物，其显示出最初在X上发现的游离表面氨基(即通式103'，其中X'表示排除所识别的游离表面氨基的X的其余部分)和省略了游离表面氨基(即，通式103)。这使如X和通式101之间显示的区别平行。在随后的反应方案中紧

接着是转化。

[0301] 

[0302] 在反应方案1，步骤2中，吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(通式104)与半乳糖胺(通式105，其中R^3是NH_2，且R^2，R^4，R^5和R^6是OH)在搅拌的情况下，在约pH8接触约1小时，以得到通式106A的相应的吡啶基二硫醇聚(乙二醇)-糖，其无需进一步纯化即可使用。

[0303] 在反应方案1，步骤3中，4,4'-二硫代二吡啶(通式107)与巯基聚(乙二醇)丙酸(通式108)接触，得到相应的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)丙酸(通式109)。

[0304] 在反应方案1，步骤4中，通式109的酸与通式105的被保护的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺接触，得到通式106B，106C和106D的相应的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)的糖，其可以在脱保护后使用，在所述通式105中，R^2为OH，且R^3，R^4，R^5和R^6是保护基(“PG”)，或R^6为OH且R^2，R^3，R^4，R^5和R^6是PG，或其中R^6是N乙酰基和R^2，R^3，R^4和R^5是PG。

[0305] 在反应方案1，步骤5中，在步骤1的产物(通式103')的搅拌溶液中加入过量(对应于m的值)的步骤2或步骤4的产物(通式106，即106A，106B，106C或106D)约1小时，随后通过离心大小排阻层析去除任何游离的剩余反应物，以产生根据通式1，分别是通式1aA，通式1aB，通式1aC和通式1aD的相应的产物。

[0306] 对应于通式1a中的组合物可分别例如如下命名：

[0307] “F1aA-X'-m_m-n_n”或“F1a-X'-m_m-n_n-2NGAL”

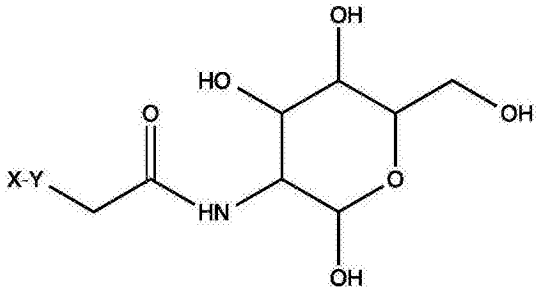
[0308] “F1aB-X'-m_m-n_n”或“F1a-X'-m_m-n_n-1GAL”

[0309] “F1aC-X'-m_m-n_n”或“F1a-X'-m_m-n_n-6GAL”

[0310] “F1aD-X'-m_m-n_n”或“F1a-X'-m_m-n_n-6NAcGAL”

[0311] 分别用于根据通式106A-D的中间体制备的产物。

[0312] 转向反应方案2-14，并且对于所用的命名法的目的，除非另有明确声明，Z”是指在C2上缀合的N-乙酰半乳糖胺：

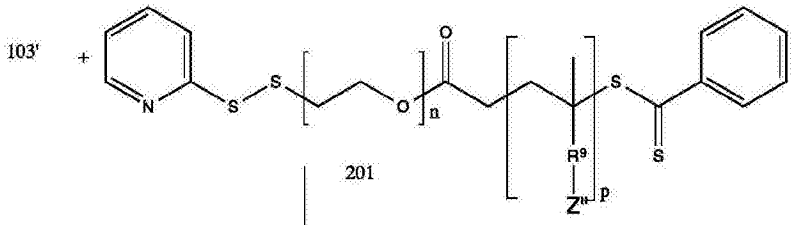
[0313] 

[0314] 或在C1上缀合的半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。应当指出的是，C1缀合的组合物在合成过程中需要被保护，例如通过用C3羟基环化胺来保护，并且在被保护的半乳糖胺掺入到接头的相邻部分后脱保护。

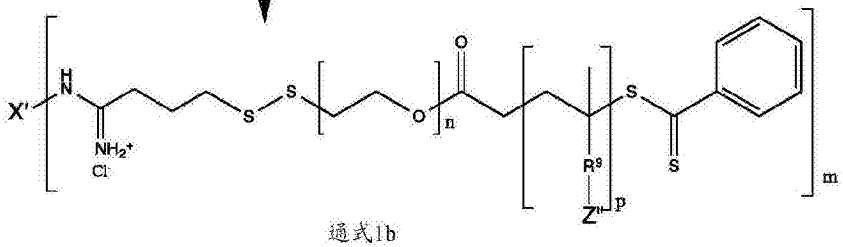
[0315] 通式201，401，501，601，701，803和1401的聚(半乳糖甲基丙烯酸酯)反应物可以通过甲基丙烯酸酯半乳糖来制备：例如，使半乳糖胺和甲基丙烯酸酐接触，接着在合适的溶剂中在偶氮二异丁腈(AIBN)的存在下，通过用相应RAFT试剂进行的可逆加成-断裂链转移

(reversible addition-fragmentation chain transfer)(RAFT)聚合，从冻融循环起始，然后在约60-80℃，优选70℃加热约5-8小时，优选约6小时。该聚合物可在低级链烷醇，优选甲醇中沉淀。

[0316] 反应方案2



[0317]

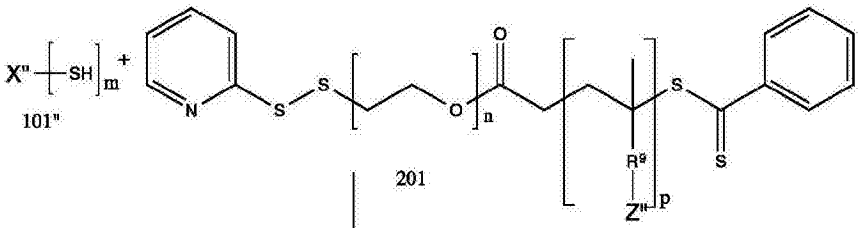


通式1b

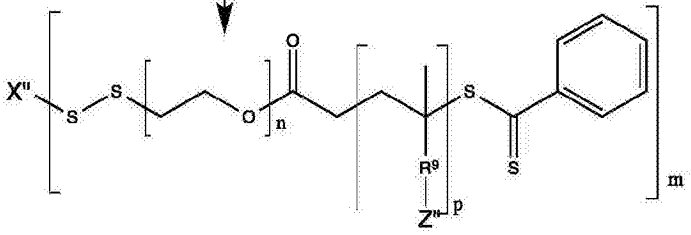
[0318] 如反应方案2所示，通过例如如反应方案1，步骤1所述制备的具有游离的表面硫醇的抗原，抗体，抗体片段或配体(通式103')与过量(对应于m值)的通式201的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接触约1小时，以产生根据通式1b的相应的产物。

[0319] 通式1b中的组合物可以命名如下，“F1b-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL”或“F1b-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z”。例如，在通式1b中的组合物中，X'是尿酸酶，m是1，n是4，p是4，并且Z”是在C2处缀合的N-乙酰半乳糖胺，此种组合物可命名为“F1b-尿酸酶-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL”或“30-(尿酸酶)-3,5,7,9-四甲基-12-氧代-1-苯基-thioxo-3,5,7,9-四((2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)氨基甲酰基)-13,16,19,22-四氧2,25,26-trithiatriacontan-30亚胺(iminium)(30-(uricase)-3,5,7,9-tetramethyl-12-oxo-1-phenyl-1-thioxo-3,5,7,9-tetrakis((2,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-3-yl)carbamoyl)-13,16,19,22-tetraoxa-2,25,26-trithiatriacontan-30-iminium)”。

[0320] 反应方案3



[0321]



通式1c

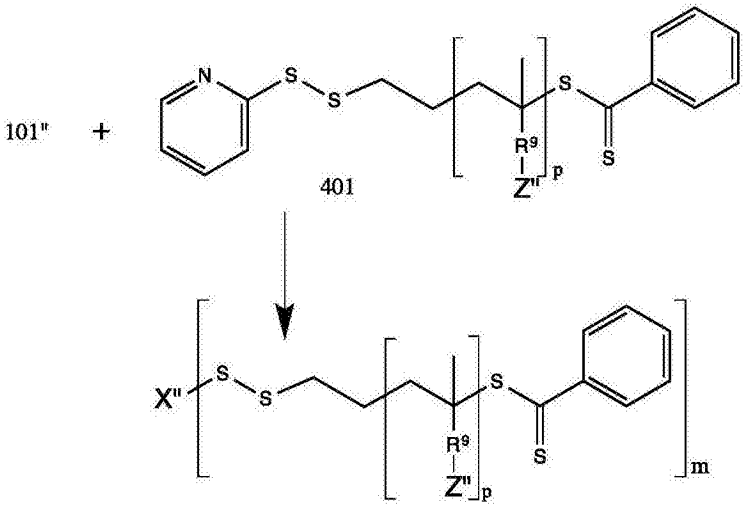
。

[0322] 如反应方案3所示，将具有天然的游离的表面硫醇(半胱氨酸)的抗原，抗体，抗体片段或配体[对应于通式101的通式101”，并且其中显示的“X”，如该术语将随后使用的，表示排除所识别的游离表面巯基的X]与过量(对应于m值)的通式201的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)接触，以产生根据通式1c的相应产物。

[0323] 对应于通式1c的组合物可被命名如下：

[0324] “F1c-X’-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL”or“F1c-X’-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z”。

[0325] 反应方案4

[0326] 

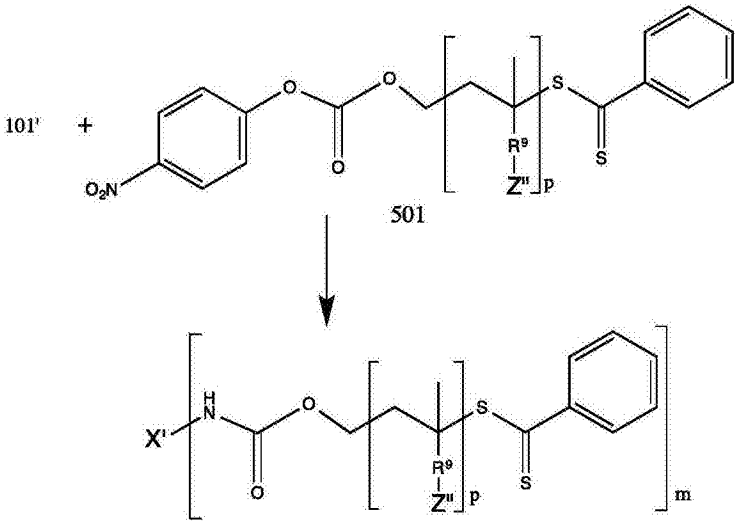
通式1d

[0327] 如反应方案4所示，将具有通式101”的天然的游离的表面硫醇的抗原，抗体，抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式401的吡啶基二硫醇接触，以产生根据通式1d的相应产物。

[0328] 对应于通式1d的组合物可被命名如下：

[0329] “F1d-X’-m_m-p_p-2NAcGAL”或“F1d-X’-m_m-p_p-EtAcN-Z”。

[0330] 反应方案5

[0331] 

通式1e

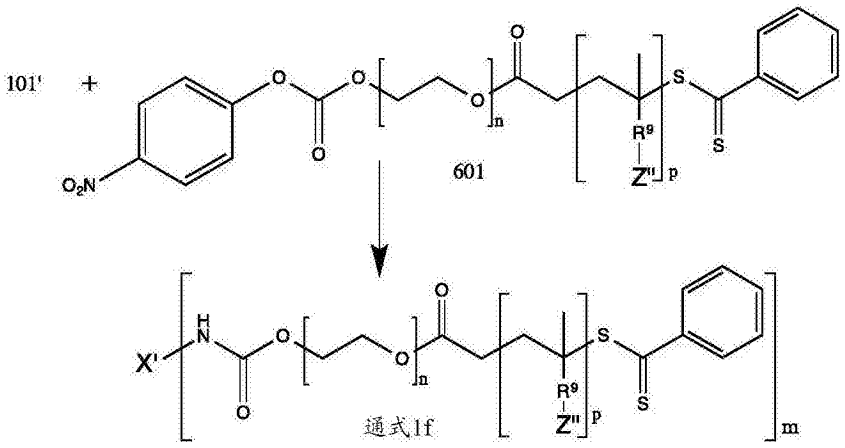
[0332] 如反应方案5所示，将具有通式101’的天然的游离的表面氨基的抗原，抗体，抗体

片段或配体与过量(对应于m值)的通式501的正硝基苯基碳酸酯接触,以产生根据通式1e的相应产物。

[0333] 对应于通式1e中的组合物可被命名如下:

[0334] "F1e-X'-m_m-p_p-2NAcGAL"或"F1e-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z"。

[0335] 反应方案6

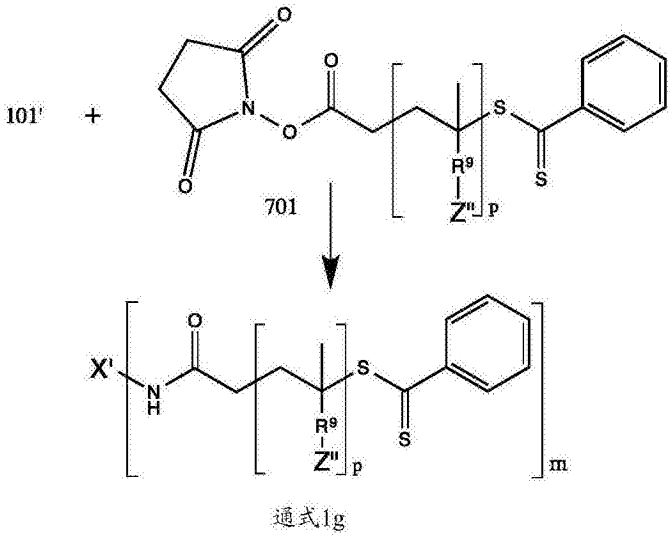
[0336] 

[0337] 如反应方案6所示,将具有通式101'的天然的游离的表面氨基的抗原,抗体,抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式601的正硝基苯基碳酸聚(乙二醇)酯接触,以产生根据通式1f的相应产物。

[0338] 对应于通式1f中的组合物可被命名如下:

[0339] "F1f-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL"或"F1f-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z"。

[0340] 反应方案7

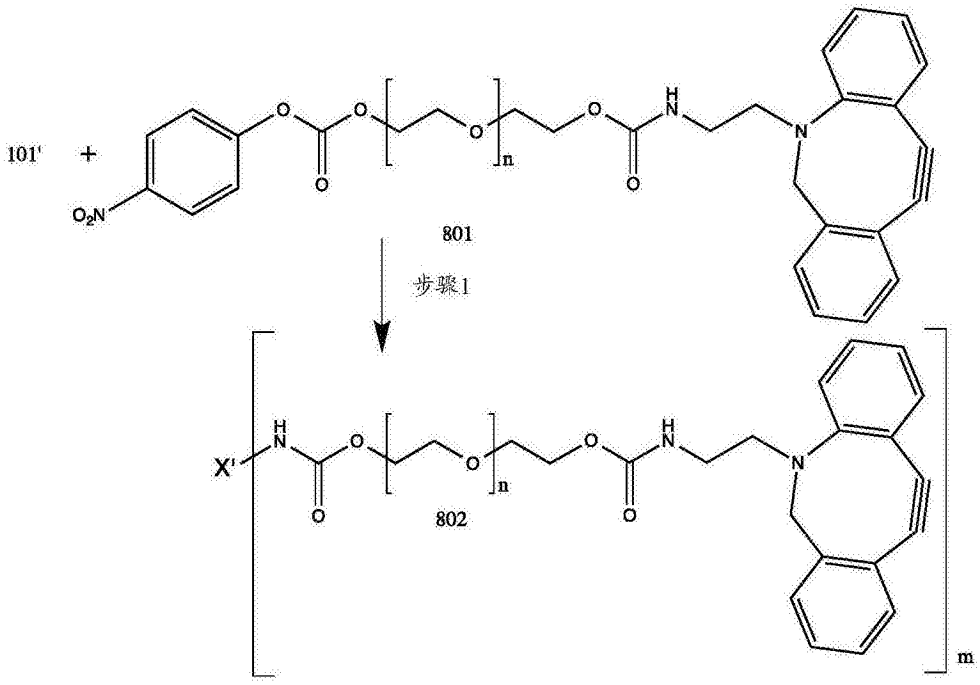
[0341] 

[0342] 如反应方案7所示,将具有通式101'的天然的游离的表面氨基的抗原,抗体,抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式701的NHS酯聚(乙二醇)酯接触,以产生根据通式1g的相应产物。

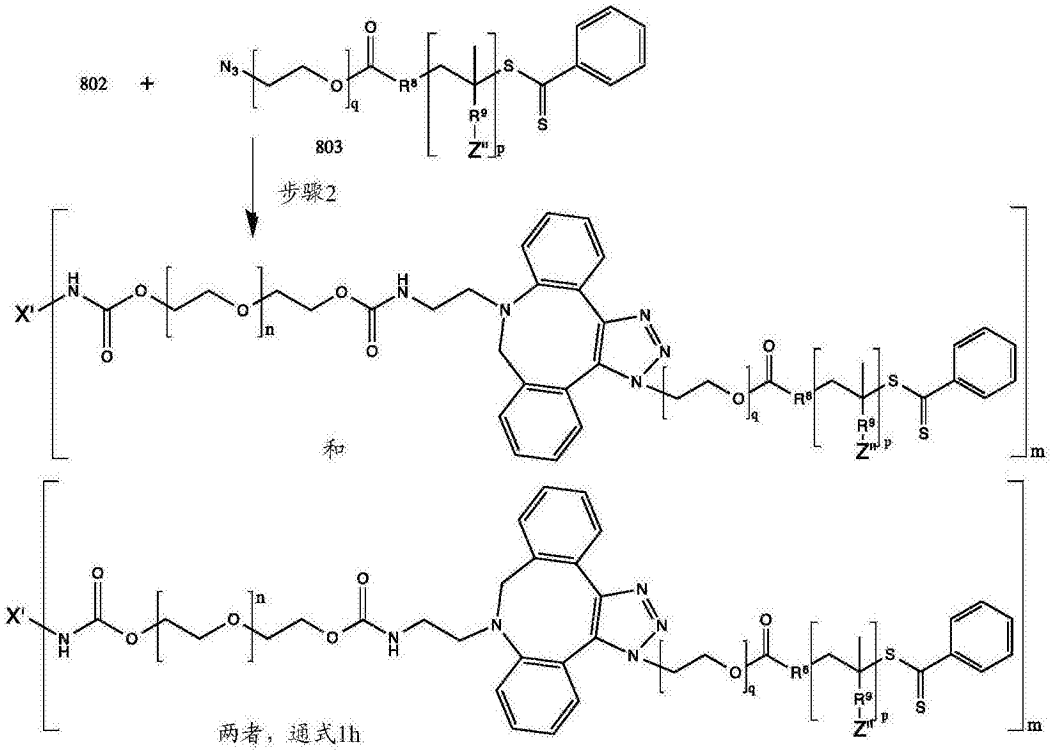
[0343] 对应于通式1g中的组合物可被命名如下:

[0344] "F1g-X'-m_m-p_p-2NAcGAL"或"F1g-X'-m_m-p_p-EtAcN-Z"。

[0345] 反应方案8



[0346]



[0347] 如反应方案8，步骤1所示，将具有通式101'的天然的游离的表面氨基的抗原，抗体，抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式801的用于Click化学的胺反应性接头接触，以产生根据通式802的相应产物。

[0348] 在反应方案8，步骤2中，然后将通式802的产物与等量(再次对应于m值)通式803的半乳糖(胺)(galactos(amine))聚合物接触，以产生根据通式1h的相应的异构体产物。上面显示的两种异构体是由通式803的叠氮化物与通式802的三键的非特异性环化导致。这种非特异性的环化发生在其中Y选自通式Yh到Yn的其它组合物的合成中，但不会在每种情况下

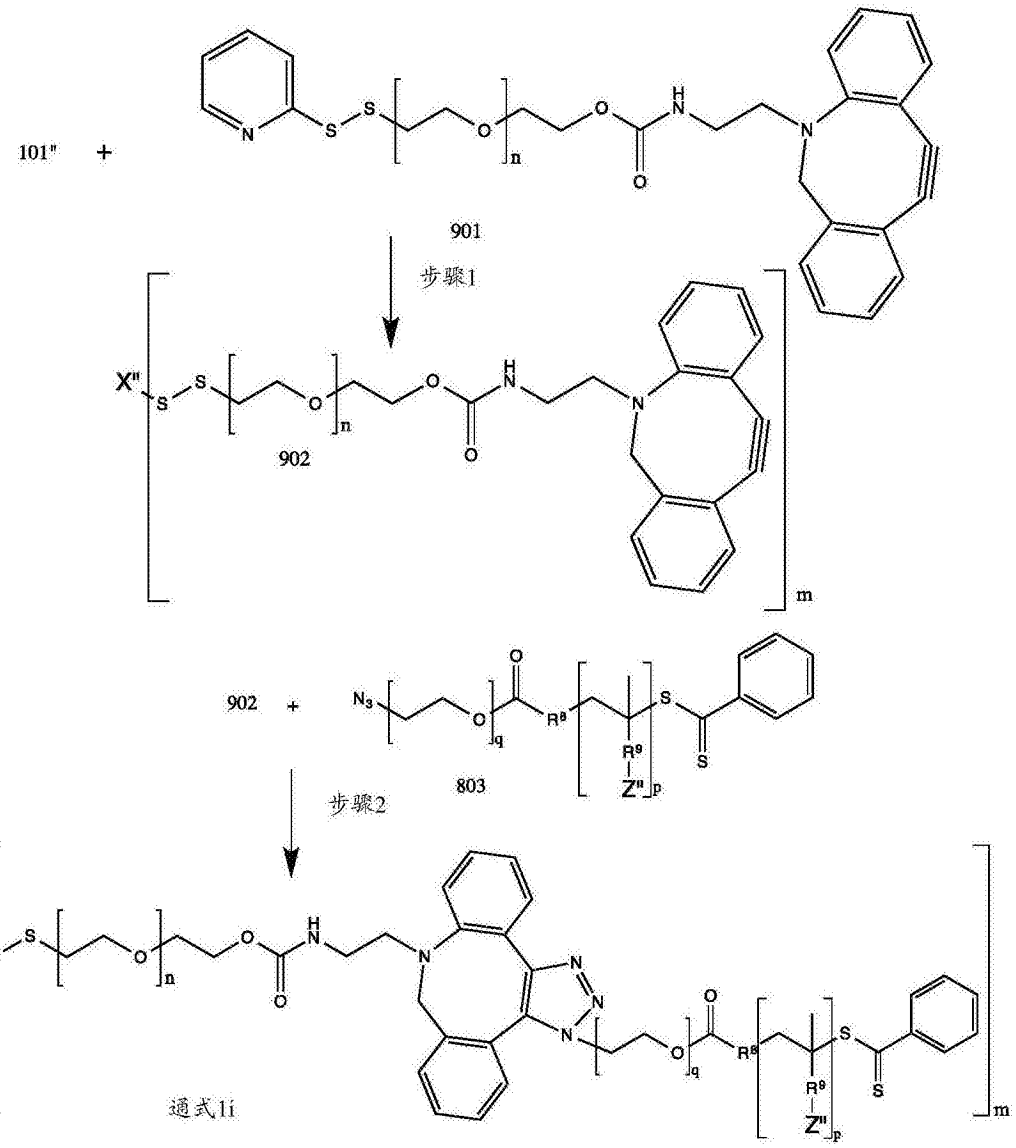
均进行说明。

[0349] 对应于通式1h中的组合物可被命名如下：

[0350] “F1h-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”或“F1h-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

[0351] 反应方案9

[0352]



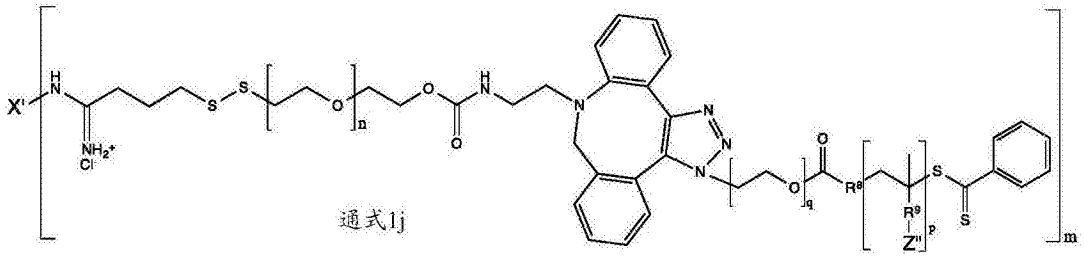
[0353] 如反应方案9，步骤1所示，将具有通式101’的天然的游离的表面硫醇的抗原，抗体，抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式901的用于Click化学的巯基反应性接头接触，以产生根据通式902”的相应产物。

[0354] 在反应方案9，步骤2中，然后将通式902”的产物与等量的(再次对应于m值)通式803的半乳糖(胺)聚合物接触，以产生根据通式1i的相应的异构体产物。

[0355] 对应于通式1i中的组合物可被命名如下：

[0356] “F1i-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”或“F1i-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

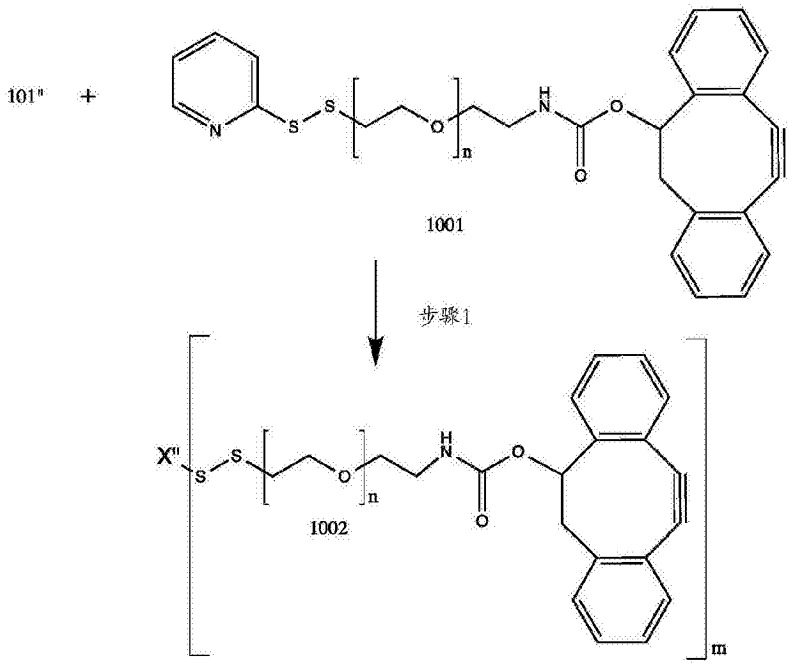
[0357] 通过遵循关于反应方案9描述的步骤，但用通式103’(用Traut试剂衍生化)的化合物替代起始材料101”获得了对应于通式1j的相应的异构体产物，显示如下。

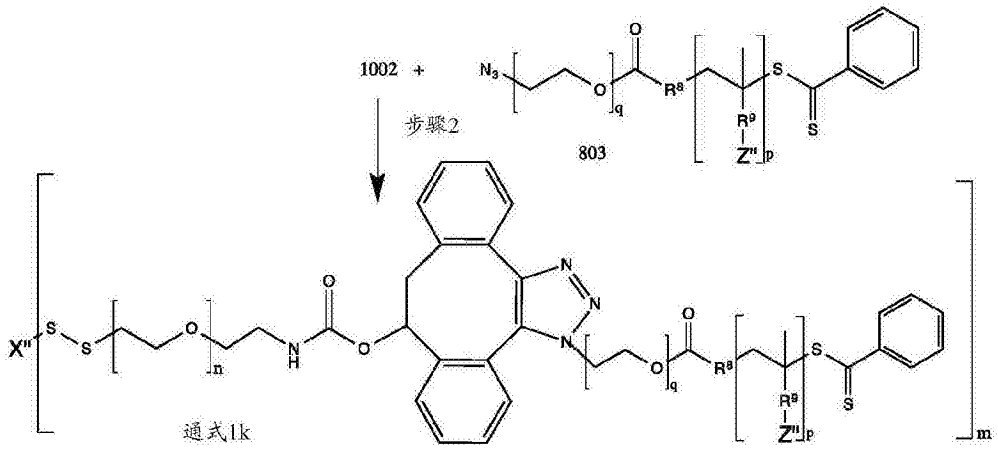
[0358] 

[0359] 对应于通式1j中的组合物可被命名如下：

[0360] “F1j-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”或“F1j-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”.

[0361] 反应方案10

[0362] 

[0363] 

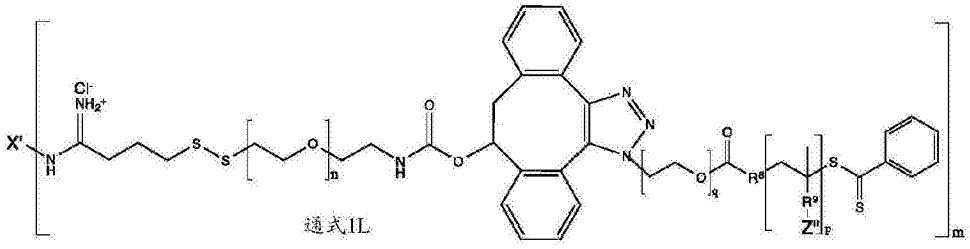
[0364] 如反应方案10，步骤1所示，将具有通式101”的天然的游离的表面硫醇的抗原，抗体，抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式1001的用于Click化学的硫醇反应性接头接触，以产生根据通式1002的相应产物。

[0365] 在反应方案10，步骤2中，然后将通式1002的产物与等量(再次对应于m值)通式803的半乳糖(胺)聚合物接触，以产生根据通式1k的相应的异构体产物。

[0366] 对应于通式1k中的组合物可被命名如下：

[0367] “F1k-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”或“F1k-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

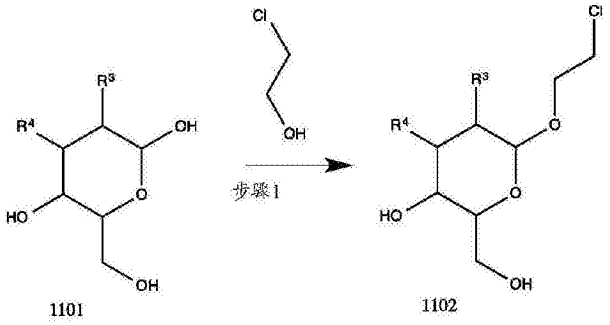
[0368] 通过遵循关于反应方案10描述的步骤，但用通式103’(用Traut试剂衍生化)的化合物替代起始材料101”获得了对应于通式1L的相应的异构体产物，显示如下。

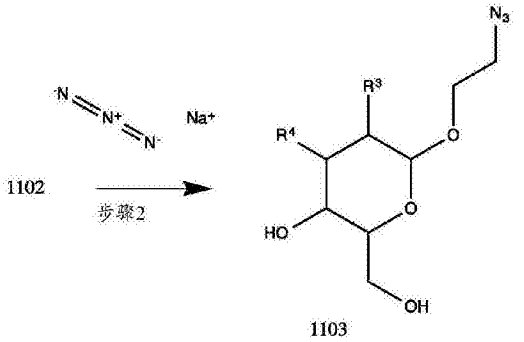
[0369] 

[0370] 对应于通式1L中的组合物可被命名如下：

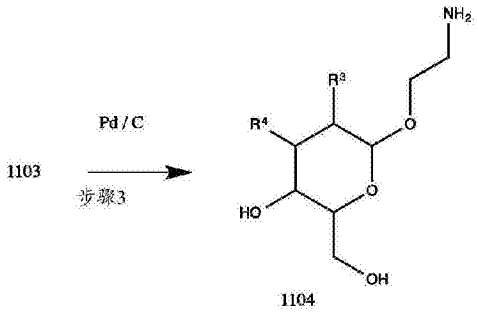
[0371] “F11-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL”或“F11-X’-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z”。

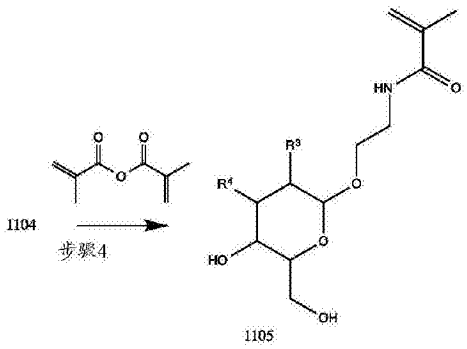
[0372] 反应方案11



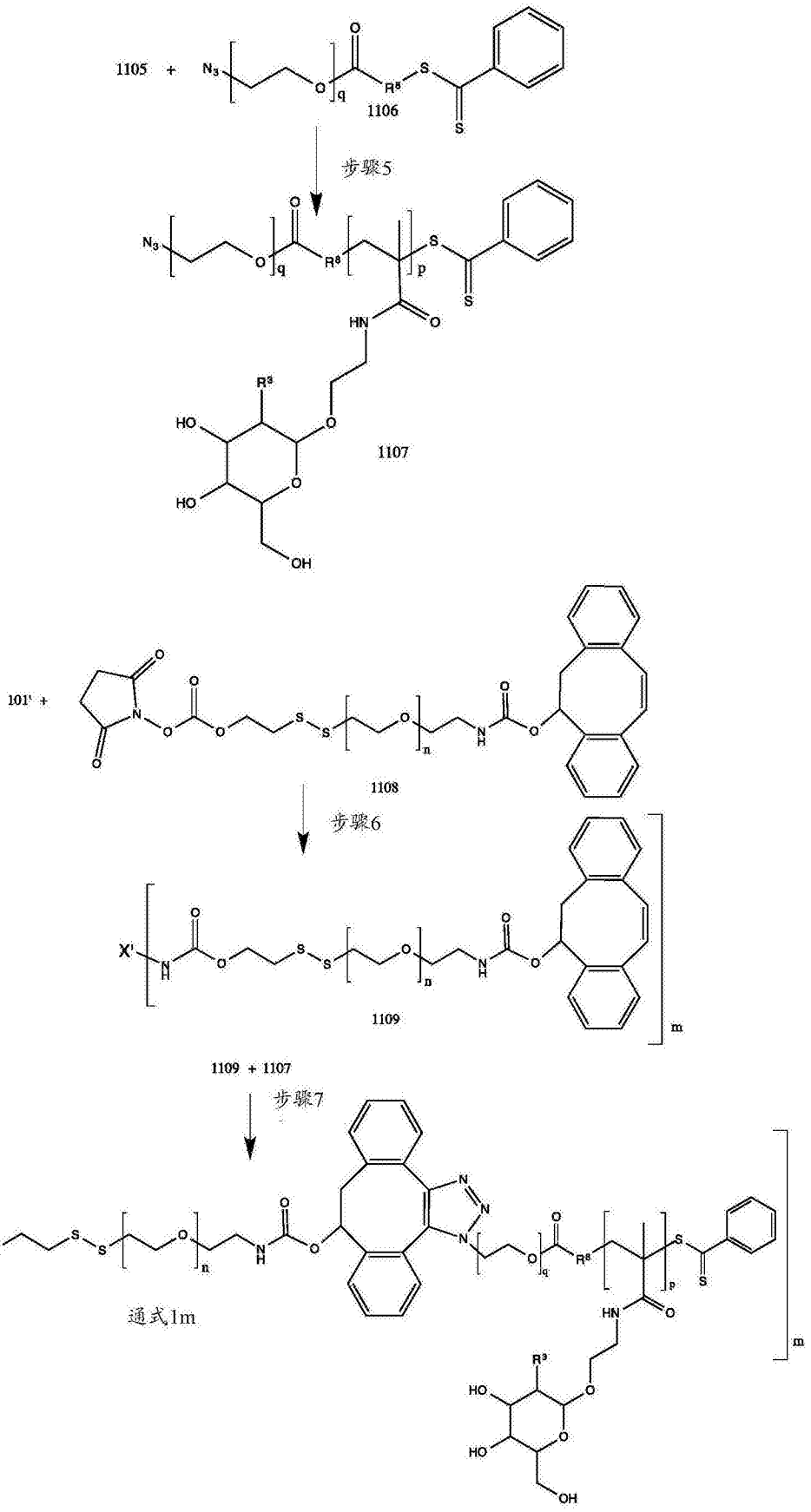


[0373]





[0374]



[0375] 如反应方案11，步骤1中所示，半乳糖、被保护的半乳糖胺或N-乙酰基-D-半乳糖胺(通式1101，其中分别地，R^3和R^4是OH，R^3是NH保护基(例如，其中同R^4一起被环化)，或R^3是

NHAc且R^4是OH)与2-氯乙-1-醇接触,随后冷却并逐滴添加乙酰氯。将溶液温热至室温,然后加热至70℃保持数小时。将乙醇加入到粗产物,将所得的溶液在碳的存在下搅拌,然后过滤,随后除去溶剂,以产生通式1102的相应的产物。

[0376] 如反应方案11,步骤2中所示,通式1102的产物加入到过量的叠氮化钠,并加热至90℃保持数小时,然后过滤,随后除去溶剂,以产生通式1103的相应的产物。

[0377] 如反应方案11,步骤3中所示,将通式1103的产物加入到钯碳(palladiumon carbon)和乙醇的溶液中,并在氢气(3atm)下搅拌数小时,然后过滤,随后除去溶剂,以产生通式1104的相应的产物。

[0378] 如反应方案11,步骤4中所示,将通式1104的产物加入到甲基丙烯酸酐(methacrylate anhydride)的溶液中。加入三乙胺,将反应搅拌2小时,然后除去溶剂并分离以产生通式1105的相应的产物。

[0379] 如反应方案11,步骤5中所示,将叠氮化物修饰的uRAFT剂(通式1106)加入到通式1105与偶氮二异丁腈的产物的溶液中,进行4次无-泵-解冻循环(free-pump-thaw cycle),然后在70℃搅拌。数小时后,通过加入低级链烷醇沉淀通式1107的相应的聚合物产物,随后除去溶剂。在R^3是NH保护基团(例如,同R^4一起被环化)时,保护基团在此点时被去除。

[0380] 如反应方案11,步骤6中所示,将具有通式101'的天然游离表面氨基的抗原,抗体,抗体片段或配体添加到pH 8.0的缓冲液中并在搅拌下与过量的(对应于m值)通式1108的二氧代吡咯烷接触。1小时后,除去未反应的通式1108,不经进一步纯化就可使用得到的通式1109的产物。

[0381] 如反应方案11,步骤7中所示,将通式1107的产物加入到pH 8.0的缓冲液中,向所述缓冲液加入通式1109的产物。搅拌2小时后,除去过量的通式1107,得到通式1m相应的异构体产物。

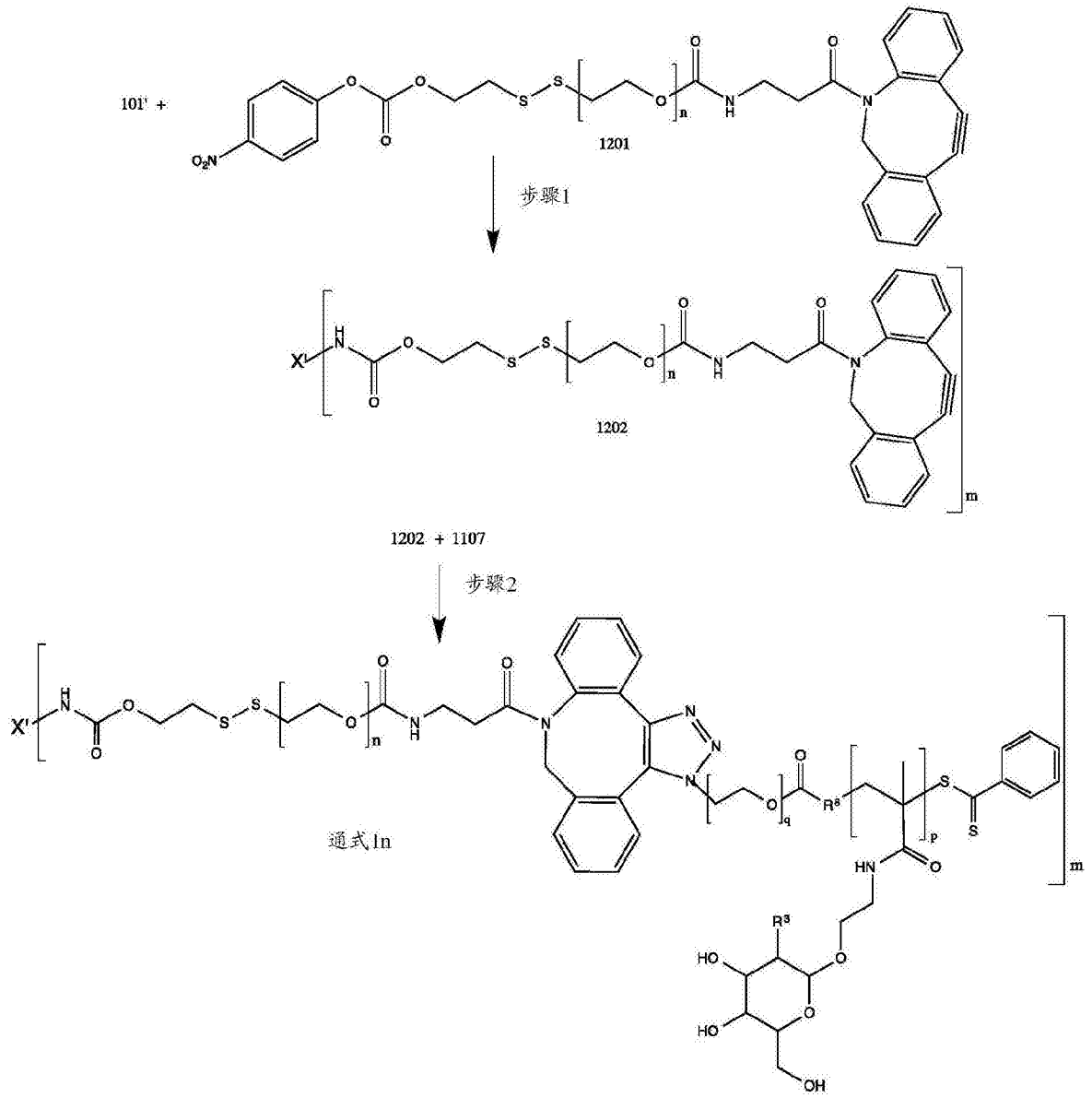
[0382] 通过在步骤5中将通式1105的产物替代为N-(2,4,5-三羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)甲基丙烯酰胺,并继续步骤6和7,获得通式1m的相应的异构体产物,其中Z"是在C2处缀合的N-乙酰半乳糖胺。

[0383] 对应于通式1m的组合物可被命名如下:

[0384] "F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z",其中Z"是1GAL,1NGAL或1NAcGAL,或"F1m-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL"。

[0385] 反应方案12

[0386]



[0387] 由于使用有机溶剂，反应方案12的合成方法特别适合于疏水性抗原，抗体，抗体片段和配体(例如，胰岛素)。

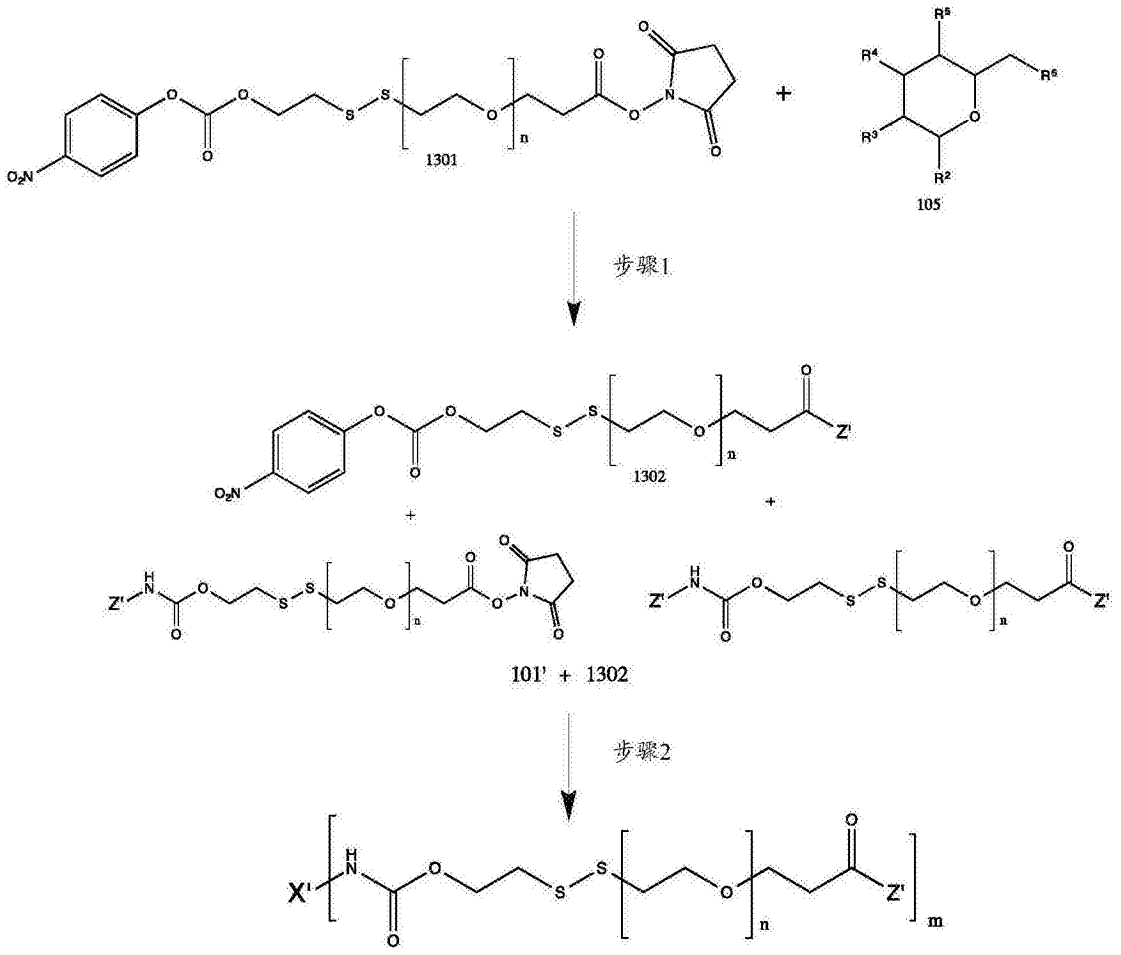
[0388] 如反应方案12，步骤1所示，将具有通式101'的天然的游离的表面氨基的抗原，抗体，抗体片段或配体溶解在含有三乙胺的有机溶剂(例如，DMF)中。向其中加入一定量(对应于m值)通式1201的化合物，之后搅拌，并加入叔丁基甲基醚。通式1202的相应的产物作为沉淀被回收。

[0389] 使通式1202的产物再悬浮在有机溶剂中，并且加入一定量的(对应于m值)通式1107(例如，参照反应方案11描述获得)，然后搅拌。通过加入二氯甲烷沉淀反应产物，然后过滤并除去溶剂。纯化(例如，再悬浮在PBS中，随后通过离心大小排阻层析产生通式1n的相应的异构体产物。

[0390] 可以如下命名对应于通式1n的组合物：

[0391] "F1n-X'-m_m-n_n-p_p-q_q-EtAcN-Z"，其中Z"是1GAL，1NGAL或1NAcGAL，或"F1m-X'-n_m-n_n-p_p-q_q-2NAcGAL"。

[0392] 反应方案13

[0393] 

[0394] 在反应方案13，步骤1中，使硝基苯氧基羰基-氧烷基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(通式1301)与半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺(通式105)接触，以得到通式1302的对应产物连同其他两个所示的产物，在进行下一步骤之前将所述另两种产物与期望的通式1302的硝基苯氧基羰基二硫醇-聚(乙二醇)羧乙基半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺分离。

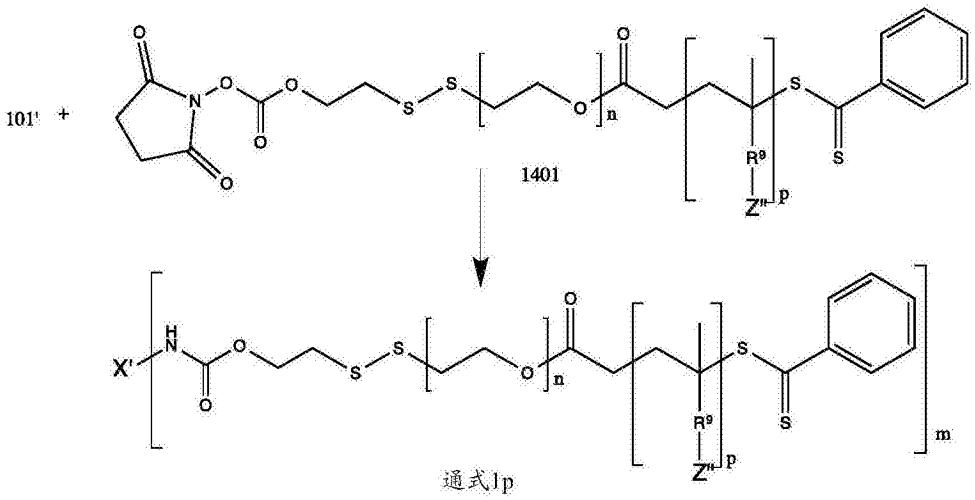
[0395] 如反应方案13，步骤2所示，可以通过通式101'的具有游离的表面氨基的抗原，抗体，抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式1302的产物接触，以产生根据通式1o的相应的产物。

[0396] 可以如下命名对应于通式1o的组合物：

[0397] “F1o-X'-m_m-n_n-Z'”。

[0398] 反应方案14

[0399]



[0400] 如反应方案14所示，使具有游离的表面氨基(通式101')的抗原，抗体，抗体片段或配体与过量(对应于m值)的通式1401的吡啶基-二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯的产物接触，以产生根据通式1p的相应的产物。

[0401] 可以如下命名对应于通式1p的组合物：

[0402] "F1p-X'-m_m-n_n-p_p-2NAcGAL"或"F1p-X'-m_m-n_n-p_p-EtAcN-Z"。

[0403] 融合蛋白的制备

[0404] 通式2的融合蛋白组合物可以通过本领域公认的方法使用市售的哺乳动物，细菌，酵母或昆虫细胞的表达载体和公开的，发现或改造的基因序列表达。编码X，Y和Z序列可以与标记序列一起被克隆到表达载体中，例如，克隆到哺乳动物表达载体pSecTag A中，其中该融合蛋白被插入到Igκ链分泌前导序列的C末端。可以使用多种其它克隆技术，包括定点诱变和QuikChange方案(Geiser，et al.)的变型，本领域技术人员已知这些克隆技术。通过使用聚乙烯亚胺和上述载体进行的瞬时转染，融合蛋白可在哺乳动物细胞中瞬时表达[例如，在人胚胎肾(HEK293)细胞或中国仓鼠卵巢(CHO)细胞]。转染的细胞在补充了例如，丙戊酸或DMSO的合适的培养基(例如，FreeStyle 293培养基，Life Technologies)中培养约7天，在这之后通过离心除去细胞，收集培养上清液并通过过滤灭菌。

[0405] 备选地，通过产生稳定转染的哺乳动物细胞系可以稳定地表达融合蛋白。此外，通过使用相容的培养基(如LB，2XYT，SOB，SOC TB和其他肉汤培养基)，补充剂(例如甘油，葡萄糖和其它补充剂)，和合适的生长和表达条件，表达载体可用于在细菌如大肠杆菌(Escherichia coli)，棒杆菌属(Corynebacterium)，或荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)中产生融合蛋白。在酵母中的表达系统可通常使用酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)或酵母属(genera Saccharomyces)，毕赤酵母属(Pichia)，克鲁维酵母属(Kluyveromyces)，耶氏酵母属(Yarrowia)的其他生物，和不太常用的生物如丝状真菌曲霉属(Aspergillus)，木霉属(Trichoderma)或嗜热毁丝霉C1(Myceliophthora thermophila)。昆虫表达系统可以利用杆状病毒感染的昆虫细胞或非裂解昆虫细胞表达，以实现高产量的蛋白质表达水平；最常用的昆虫细胞包括但不限于Sf9和Sf21(来自草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda))，Hi-5(来自粉纹夜蛾(Trichoplusia ni))以及Schneider 2和3(来自黑腹果蝇(Trichoplusia ni)。

[0406] 表达的融合蛋白产物可通过以下从培养物上清液纯化：亲和层析(例如，对于His-

标记的融合蛋白，使用HisTrap镍$^{2+}$Sepharose柱，GE Healthcare)，随后是其它层析精制步骤，例如大小排阻色谱法(例如，使用Superdex 75柱，GE Healthcare)或离子交换层析。例如，通过SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色和蛋白质印迹法(例如，用于His-标记的融合蛋白的抗6xHis标记蛋白质印迹)，可以验证蛋白质纯度。例如，使用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)可以测量在280nm的吸光度，使用Beer-Lambert定律可以确定蛋白质浓度。例如使用ExPASy ProtParam tool可以从蛋白质的氨基酸序列估计分子量和消光系数。例如，根据制造商的说明使用HEK-Blue TLR4报道细胞系(Invivogen)可以测量内毒素水平。

[0407] 去唾液酸化的抗原，抗体，抗体片段和配体的制备

[0408] 去唾液酸化的蛋白质可以通过本领域公认的方法使用市售的神经氨酸酶(也称为乙酰神经氨基水解酶(acetyl-neuraminylhydrolase)或唾液酸酶)或硫酸来制备。对于感兴趣的蛋白质的酶促去唾液酸化，蛋白质可以与神经氨酸酶在37℃下一起温育1小时，或必要时温育更长的时间。对于通过酸水解进行的化学去唾液酸化，可以使用0.025N硫酸于80℃处理感兴趣的蛋白质1小时，或必要时处理更长的时间。然后可以通过以下从反应混合物中纯化去唾液酸化的蛋白质：固定化的金属离子亲和层析(例如，使用HisTrap镍$^{2+}$Sepharose柱，GE Healthcare)，随后是大小排阻色谱法(例如，使用Superdex75柱，GE Healthcare)。例如，通过SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色和抗6xHis标记蛋白质印迹，可以验证蛋白质纯度。例如用市售试剂盒(例如Abcam，ProZyme，或Sigma)，在唾液酸含量的蛋白质印迹或比色定量中通过蛋白质唾液酸含量的基于凝集素的检测可以验证去唾液酸化。例如，使用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)可以测量在280nm的吸光度，使用Beer-Lambert定律可以确定去唾液酸化的蛋白质浓度。例如使用ExPASy ProtParam tool可以从蛋白质的氨基酸序列估计分子量和消光系数。例如，根据制造商的说明使用HEK-Blue TLR4报道细胞系(Invivogen)可以测量内毒素水平。

[0409] 具体的处理和最后的步骤

[0410] 通式103'的化合物与过量的(对应于m值)的通式106的化合物接触，得到通式1a的相应的产物。

[0411] 通式103'的化合物与过量的(对应于m值)的通式201的化合物接触，得到通式1b的相应的产物。

[0412] 通式802，902或1002的化合物与过量的(对应于m值)的通式803的化合物接触，分别得到通式1h，通式1i，通式1k的相应的产物。

[0413] 通式1109的化合物与过量的(对应于m值)的通式1107的化合物接触，得到通式1m的相应的产物，具体地其中n为约80，p为约30，q是约4，和m是抗原的函数，是约2至10。

[0414] 通式1202的化合物与过量的(对应于m值)的通式1107的化合物接触，得到通式1n的相应的产物，具体地其中n为约1，p为约30，q为约4，和m是抗原的函数，是约2至10。

[0415] 具体组合物

[0416] 通过非限制性示例，本公开的组合物，药物制剂，制备方法和用途优先的基团是通式1的取代基的以下的组合和排列(分别以优选的递增顺序的分成亚组)：

[0417] • X是移植接受者形成不想要的免疫应答的外来移植抗原；移植接受者形成不想要的免疫应答的外来抗原；移植接受者形成不想要的免疫应答的治疗性蛋白质；移植接受者形成不想要的免疫应答的自身抗原，或其致耐受性部分。

[0418] • X是选自以下的治疗性蛋白质，患者针对所述治疗性蛋白质形成不想要的免疫应答：阿巴他塞，阿昔单抗，阿达木单抗，腺苷脱氨酶，Ado-trastuzumab emtansine，阿加糖酶α，阿加糖酶β，Aldeslukin，阿糖脑苷酶，阿葡糖苷酶α，α-1-蛋白酶抑制剂，阿那白滞素，阿尼普酶（茴香酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物），抗凝血酶III，抗胸腺细胞球蛋白，Ateplase，贝伐单抗，比伐卢定，A型肉毒杆菌毒素，B型肉毒毒素，C1酯酶抑制剂，Canakinumab，羧肽酶G2（Glucarpidase和Voraxaze），Certolizumab pegol，西妥昔单抗，胶原酶，响尾蛇科免疫的Fab（Crotalidae immune Fab），达贝泊汀-α（Darbepoetin-α），Denosumab，地高辛免疫的Fab（Digoxin immune Fab），α链道酶（Dornase alfa），Eculizumab，依那西普，因子VIIa，因子VIII，因子IX，因子XI，凝血因子XIII，纤维蛋白原，非格司亭，Galsulfase，戈利木单抗，组氨瑞林醋酸酯（Histrelin acetate），透明质酸酶，Idursulphase，伊米苷酶，英夫利昔单抗，胰岛素［包括rHu胰岛素和牛胰岛素］，干扰素-α2a，干扰素α2b，干扰素-β1a，干扰素-β1b，干扰素-γ1b，Ipilimumab，L-精氨酸，L-天冬酰胺酶，L-methionase，乳糖酶，拉罗尼酶，来匹卢定/水蛭素，美卡舍明，Mecasermin rinfabate，Methoxy Ofatumumab，那他珠单抗，奥曲肽，奥普瑞白介素，胰淀粉酶，胰脂肪酶，木瓜蛋白酶，Peg-天冬酰胺酶，Peg-doxorubicin HCl，PEG红细胞生成素-β，培非司亭，聚乙二醇化干扰素-α2a，聚乙二醇化干扰素-α2b，pegloticase，培维索孟，苯丙氨酸氨裂解酶（PAL），蛋白C，拉布立酶（尿酸酶），Sacrosidase，鲑鱼降钙素，沙格司亭，链激酶，替奈普酶，特立帕肽，Tocilizumab（atlizumab），曲妥珠单抗，1型α-干扰素，Ustekinumab，vW因子。

[0419] o尤其，其中X是阿昔单抗，阿达木单抗，阿加糖酶α，阿加糖酶β，Aldeslukin，阿葡糖苷酶α，因子VIII，因子IX，英夫利昔单抗，L-天冬酰胺酶，拉罗尼酶（Laronidase），那他珠单抗，奥曲肽，苯丙氨酸氨裂解酶（PAL），或拉布立酶（尿酸酶）。

[0420] ■特别地，其中X是因子VIII和IX，尿酸酶，PAL或天冬酰胺酶。

[0421] • X是自身抗原多肽，其选自用于治疗1型糖尿病，儿科多发性硬化症，幼年型类风湿关节炎，乳糜泻，或普秃。

[0422] o尤其，其中X是自身抗原多肽，其选自用于治疗新发1型糖尿病，儿科多发性硬化症，幼年型类风湿关节炎或乳糜泻。

[0423] • X是外来抗原，患者针对其形成不想要的免疫应答

[0424] o来自花生，包括伴花生球蛋白（Ara h 1）

[0425] o来自小麦，包括天然α-麦醇溶蛋白“33聚体”（SEQ ID NO:24）、脱酰胺基化的α-麦醇溶蛋白“33聚体”（SEQ ID NO:25），α-麦醇溶蛋白（SEQ ID NO:26）和Omega-麦醇溶蛋白（SEQ ID NO:27）。

[0426] o来自猫，包括Fel d 1A（UNIPROT P30438）和猫白蛋白（UNIPROT P49064）。

[0427] o来自狗，包括Can f 1（UNIPROT O18873）和狗白蛋白（UN IPROT P49822）。

[0428] • X是外来移植抗原，移植接受者针对其形成不想要的免疫应答，例如人类白细胞抗原蛋白。

[0429] • X是特异性结合循环蛋白质或肽或者抗体的抗体，抗体片段或配体，所述循环蛋白质或肽或者抗体产生了移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫疾病，和/或变态反应。

[0430] o尤其，其中X结合内源性循环蛋白质或肽或抗体。

[0431] • Y是接头，其选自通式Ya，通式Yb，通式Yh，通式Yi，通式Yk，通式Ym，通式Yn，通式Yo和通式Yp。

[0432] o尤其，其中n为8至90±10％，p为20至100±10％，且q为3至20±3。

[0433] • 尤其，其中n为40至80±10％，p为30至40±10％，q是4至12±3。

[0434] o尤其，其中Y为通式Ya，通式Yb，通式Ym或通式Yn。

[0435] • 特别，其中n为8至90±10％，p为20至100±10％和q是3至20±3。

[0436] • 更特别地，其中n是40至80±10％，p为30至40±10％，q是4

[0437] 至12±3。

[0438] • 特别，其中其中Z通过乙基乙酰胺基团缀合至Y。

[0439] • 更特别，其中Z在其C1处缀合至Y。

[0440] o更特别，其中R^8是CMP。

[0441] • 更特别，其中R^8是CMP。

[0442] • 特别，其中R^8是CMP。

[0443] • Z是半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

[0444] • 尤其，其中Z是在C1，C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0445] • 特别，其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0446] • 更特别，其中Z是C1处缀合的N-乙酰半乳糖胺。

[0447] 上述组和亚组的每个单独是优选的，并且可以组合以描述公开的进一步优选的方面，例如但不作为限制，如下：

[0448] • X是自身抗原多肽，其选自用于治疗1型糖尿病，儿科多发性硬化症，幼年型类风湿关节炎，乳糜泻，或普秃。

[0449] o具体地，其中X是自身抗原多肽，其选自用于治疗新发作1型糖尿病，儿科多发性硬化症或乳糜泻。

[0450] ■特别地，其中Y是接头，其选自通式Ya，通式Yb，通式Yh，通式Yi，通式Yk，通式Ym，通式Yn，通式Yo和通式Yp。

[0451] • 具体地，其中n为8至90±10％，p为20至100±10％，且q为3至20±3。

[0452] • 具体地，其中n为40至80±10％，p为30至40±10％，q是4至12±3。

[0453] • 尤其，其中Y为通式Ya，通式Yb，通式Ym或通式Yn。

[0454] • 具体地，其中n为8至90±10％，p为20至100±10％和q是3至20±3。

[0455] • 更具体地，其中n是40至80±10％，p为30至40±10％，q是4至12±3。

[0456] • 甚至更具体地，其中Z通过乙基乙酰胺基团缀合至Y。

[0457] • 更具体地，其中Z通过乙基乙酰胺基团缀合至Y。

[0458] • 具体地，其中Z通过乙基乙酰胺基团缀合至Y。

[0459] • 尤其，其中Z是半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

[0460] • 尤其，其中Z是在C1，C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0461] • 具体地，其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0462] • 甚至更具体地，其中Z是C1处缀合的N-乙酰半乳糖胺。

[0463] • 尤其，其中Z是半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

[0464] • 尤其，其中Z是在C1，C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0465] • 具体地，其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0466] • 更具体地，其中Z是C1处缀合的N-乙酰半乳糖胺。

[0467] o尤其，其中Y是接头，其选自通式Ya，通式Yb，通式Yh，通式Yi，通

[0468] 式Yk，通式Ym，通式Yn，通式Yo和通式Yp。

[0469] • 具体地，其中n为8至90±10％，p为20至100±10％，且q为3至20±3。

[0470] • 更具体地，其中n为40至80±10％，p为30至40±10％，q是4至12±3。

[0471] • 尤其，其中Y为通式Ya，通式Yb，通式Ym或通式Yn。

[0472] • 更具体地，其中n为8至90±10％，p为20至100±10％和q是3至20±3。

[0473] • 更具体地，其中n是40至80±10％，p为30至40±10％，q是4至12±3。

[0474] • 具体地，其中其中Z通过乙基乙酰胺基团缀合至Y。

[0475] • 尤其，其中Z是半乳糖，半乳糖胺或N-乙酰半乳糖胺。

[0476] • 尤其，其中Z是在C1，C2或C6处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0477] • 更具体地，其中Z是在C1或C2处缀合的半乳糖或N-乙酰半乳糖胺。

[0478] • 更优选，其中Z是C1处缀合的N-乙酰半乳糖胺。

[0479] • m是从约1至100的整数。

[0480] • m是1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，25，30，35，40，45，50，55，60，65 70，75，80，85，90，95，100或110。

[0481] • 具体地m是约1至20。

[0482] • m为1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，21或22。

[0483] • 更具体地，m是约10.

[0484] • m是9，10或11。

[0485] • n是表示包括从约1至100的混合物的整数

[0486] on是1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，22，25，30，34，35，37，40，41，45，50，54，55，59，60，65，70，75，80，82，83，85，88，90，95，99，100，105或110。

[0487] ■具体地，n是约8至90。

[0488] ■具体地，n是8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，22，25，30，34，35，37，40，41，45，50，54，55，59，60，65，70，75，80，82，83，85，88，90，95或99。

[0489] • 更具体地，n是约40至80。

[0490] • 更具体地，n是37，40，41，45，50，54，55，59，60，65，70，75，80，82，83或88。

[0491] on代表包括以下范围的混合物：1-4，2-4，2-6，3-8，7-13，6-14，15-25，26-30，42-50，46-57，60-82，85-90，90-110和107-113.

[0492] • 具体地，n代表包括以下范围的混合物：7-13，6-14，15-25，26-30，42-50，46-57，60-82，85-90和82-99。

[0493] • 更具体地，n代表包括以下范围的混合物：36-44，42-50，46-57，60-82和75-85。

[0494] op是整数，代表包括从约2至150的整数。

[0495] ■p是2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，25，30，35，40，45，50，55，60，65 70，75，80，85，90，95，100，110，120，130，140，150，160或165。

[0496] • 具体地，其中n是代表包括从约1至100的混合物的整数。

[0497] • 具体地，n是1，2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20，22，25，

30,34,35,37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83,85,88,90,95,99,100,105或110。

[0498] o更具体地,其中n是约8至90。

[0499] o更具体地,n是8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,25,30,34,35,37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83,85,88,90,95或99,

[0500] ■甚至更具体地,其中n是约40至80。

[0501] ■甚至更具体地,n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0502] • 更具体地,p是18,19,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65 70,75,80,85,90,95,100或110。

[0503] ■更具体地,其中n是代表包括从约1至100的混合物的整数。

[0504] ■具体地,n是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,25,30,34,35,37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83,85,88,90,95,99,100,105或110。

[0505] • 更具体地,其中n是约8至90。

[0506] • 更具体地,n是8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,25,30,34,35,37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83,85,88,90,95或99。

[0507] o甚至更具体地,其中n是约40至80。

[0508] o甚至更具体地,n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0509] o甚至更具体地,p是27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,或44。

[0510] ■具体地,其中n是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,25,30,34,35,37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83,85,88,90,95,99,100,105或110。

[0511] • 更具体地,其中n是约8至90。

[0512] • 更具体地,n是8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,22,25,30,34,35,37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83,85,88,90,95或99。

[0513] o甚至更具体地,其中n是约40至80。

[0514] o甚至更具体地,n是37,40,41,45,50,54,55,59,60,65,70,75,80,82,83或88。

[0515] ■q是代表包括从约1至44的混合物的整数。

[0516] ■q是1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,25,30,35,40,44或48。

[0517] 通过非限制性实例,本公开的组合物,药物制剂,制备方法和用途优选的具体组是通式2的取代基的以下的组合和排列(分别以优选的递增顺序分成亚组):

[0518] • X是选自以下的治疗性蛋白质,移植接受者针对其形成不想要的免疫应答:阿巴他塞(Abatacept),阿昔单抗,阿达木单抗,腺苷脱氨酶,Ado-trastuzumab emtansine,阿加糖酶α,阿加糖酶β,Aldeslukin,阿糖脑苷酶(Alglucerase),阿葡糖苷酶α,α-1-蛋白酶抑制剂,阿那白滞素(Anakinra),阿尼普酶(茴香酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物),抗凝血酶III,抗胸腺细胞球蛋白,Ateplase,贝伐单抗,比伐卢定,A型肉毒杆菌毒素,B型肉毒毒素,C1酯酶抑制剂,Canakinumab,羧肽酶G2(Glucarpidase和Voraxaze),Certolizumab pegol,

西妥昔单抗，胶原酶，响尾蛇科免疫的Fab(Crotalidae immune Fab)，达贝泊汀-α(Darbepoetin-α)，Denosumab，地高辛免疫的Fab(Digoxin immune Fab)，α链道酶(Dornase alfa)，Eculizumab，依那西普，因子VIIa，因子VIII，因子IX，因子XI，凝血因子XIII，纤维蛋白原，非格司亭，Galsulfase，戈利木单抗，组氨瑞林醋酸酯(Histrelin acetate)，透明质酸酶，Idursulphase，伊米苷酶，英夫利昔单抗，胰岛素，干扰素-α2a，干扰素α2b，干扰素-β1a，干扰素-β1b，干扰素-γ1b，Ipilimumab，L-精氨酸，L-天冬酰胺酶，L-methionase，乳糖酶，拉罗尼酶(Laronidase)，来匹卢定/水蛭素，美卡舍明，Mecasermin rinfabate，Methoxy Ofatumumab，那他珠单抗，奥曲肽，奥普瑞白介素，胰淀粉酶，胰脂肪酶，木瓜蛋白酶，Peg-天冬酰胺酶，Peg-doxorubicin HCl，PEG红细胞生成素-β(PEG-epoetin-β)，培非司亭，聚乙二醇化干扰素-α2a，聚乙二醇化干扰素-α2b，pegloticase，培维索孟，苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)，蛋白C，拉布立酶(尿酸酶)，Sacrosidase，鲑鱼降钙素，沙格司亭，链激酶，替奈普酶，特立帕肽，Tocilizumab(atlizumab)，曲妥珠单抗，1型α-干扰素，Ustekinumab，vW因子；条件是当m'+m"等于1，并且Z是DOM 26h-196-61或如US 2013/0078216中描述的其他肝靶向分子时，干扰素(干扰素α2，干扰素α5，干扰素α6，或共有干扰素)，利巴韦林，Nexavar/索拉非尼，Erbitus/西妥昔单抗，Avastatin/贝伐单抗，和Herceptin/曲妥珠单抗被排除在通式2的范围外。

[0519] • 具体地，其中X是阿昔单抗，阿达木单抗，阿加糖酶α，阿加糖酶β，Aldeslukin，阿葡糖苷酶α，因子VIII，因子IX，英夫利昔单抗，L-天冬酰胺酶，拉罗尼酶(Laronidase)，那他珠单抗，奥曲肽，苯丙氨酸氨裂解酶(PAL)，或拉布立酶(尿酸酶)。

[0520] • 具体地，其中X是因子VIII和IX，尿酸酶，PAL或天冬酰胺酶。

[0521] • X是自身抗原多肽，其选自用于治疗1型糖尿病，儿科多发性硬化症，幼年型类风湿关节炎，乳糜泻，或普秃。

[0522] o具体地，其中X是自身抗原多肽，其选自用于治疗新发1型糖尿病，儿科多发性硬化症，或乳糜泻。

[0523] • X是外来抗原，患者针对其发生不想要的免疫应答

[0524] • 来自花生，包括伴花生球蛋白(Ara h 1)

[0525] • 来自小麦，天然α-麦醇溶蛋白"33聚体"(SEQ ID NO:24)、脱酰胺基的α-麦醇溶蛋白"33聚体"(SEQ ID NO:25)，α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26)和Omega-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27)。

[0526] • 来自猫，包括Fel d 1A(UNIPROT P30438)和猫白蛋白(UNIPROT P49064)。

[0527] • 来自狗，包括Can f 1(UNIPROT 018873)和狗白蛋白(UN IPROT P49822)。

[0528] • X是外来移植抗原，移植接受者针对其形成不想要的免疫应答，例如人类白细胞抗原蛋白。

[0529] • X是特异性结合循环蛋白质或肽或者抗体的抗体，抗体片段或配体，所述循环蛋白质或肽或者抗体产生了移植排斥，针对治疗剂的免疫应答，自身免疫疾病，和/或变态反应。

[0530] • 具体地，其中X结合内源性循环蛋白质或肽或抗体。

[0531] • Y是Gly_3Ser.

[0532] • Z是抗ASGPR Dom26h-196-61或保守性取代。

[0533] • m'+m"等于1或2,且X是全长蛋白质,包括蛋白质治疗剂。

[0534] • m'+m"等于1或2,其中m'是1且m"是0或1。

[0535] • m'+m"等于2至约10,其中X是已知与特定自身免疫性疾病相关的或用于治疗遗传多样性的靶群体的一组自身抗原肽(表位)。

[0536] om'+m"等于约4至7,其中自身免疫性疾病是多发性硬化症,且X独立地选自: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)和PLP139-154(SEQ ID NO:17)。

[0537] • m'+m"等于7且X分别是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)和PLP139-154(SEQ ID NO:17)。

[0538] 与以上关于通式1的讨论一样,通式2的每个上述组和亚组各自是优选的,并且可以组合以描述本公开的进一步优选方面。

[0539] 效用,测试和施用

[0540] 一般效用

[0541] 本公开的组合物可用于多种应用,如本领域技术人员将理解,包括移植排斥,针对治疗剂的免疫应答,自身免疫性疾病,以及食物变态反应的治疗。

[0542] 在优选的实施方案中,本公开的组合物用于调节,特别是下调,抗原特异性的不期望的免疫应答。

[0543] 本公开的组合物用于结合并清除循环的特定的不想要的蛋白质,包括在患者中内源性产生的抗体(即,不是施用于患者的外源抗体),肽等,其引起自身免疫和相关病理学,变态反应,炎性免疫应答和过敏反应。

[0544] 在本公开中,使抗原靶向肝以通过抗原呈递细胞呈递,从而特异性下调免疫系统或用于清除不需要的循环蛋白质。这与以前的肝靶向的用途,如US 2013/0078216中所述的用途不同,其中肝靶向分子例如DOM26h-196-61的目的是递送治疗剂以治疗肝疾病,例如纤维化,肝炎,肝硬化和肝癌。

[0545] 本公开提供了治疗针对自身抗原和外来抗原的不想要的免疫应答的组合物和方法,所述自身抗原和外来抗原包括但不限于:移植接受者形成不想要的免疫应答(例如,移植排斥)的外来移植抗原,患者形成不想要的免疫应答(例如,变态反应或超敏反应)的外来抗原,患者形成不想要的免疫应答(例如,超敏反应和/或降低治疗活性)的治疗剂,患者形成不想要的免疫应答(例如,自身免疫疾病)的自身抗原。

[0546] 可以使用本文提供的方法和组合物治疗的自身免疫性疾病状态,包括但不限于:急性播散性脑脊髓炎(Acute Disseminated Encephalomyelitis (ADEM));急性过敏性间质肾炎(Acute interstital allergic nephritis((药物过敏)));急性坏死性出血性白质脑炎(Acute necrotizing hemorrhagic leukoencephalitis);阿狄森氏病(Addison's Disease);斑秃(Alopecia areata);普秃;强直性脊柱炎;青少年关节炎(Arthritis, juvenile);关节炎,银屑性(Arthritis,psoriatic);类风湿性关节炎(Arthritis, rheumatoid);特应性皮炎;自身免疫性再生障碍性贫血;自身免疫性胃炎;自身免疫性肝炎;自身免疫性垂体炎;自身免疫性卵巢炎;自身免疫性睾丸炎;自体免疫多内分泌综合征1

型(Autoimmune polyendocrine syndrome type 1);自体免疫多内分泌综合征2型);自身免疫性甲状腺炎;白塞氏病(Behcet's disease);闭塞性细支气管炎;大疱性类天疱疮;乳糜泻;丘-斯综合征(Churg-Strauss syndrome);慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病;瘢痕性类天疱疮;克罗恩病(Crohn's disease);柯萨奇心肌炎(Coxsackie myocarditis);杜林疱疹样皮炎(Dermatitisherpetiformis Duhring);糖尿病(1型);结节性红斑;获得性大疱性表皮松解症(Epidermolysis bullosa acquisita),巨细胞动脉炎(颞动脉炎);巨细胞心肌炎;肺出血肾炎综合征(Goodpasture's syndrome);格雷夫斯病(Graves'disease);格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome);桥本氏脑炎(Hashimoto'sencephalitis);桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis);IgG4相关硬化疾病;(IgG4-related sclerosing disease);兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome);混合性结缔组织病;Mucha-Habermann病(Mucha-Habermann disease);多发性硬化症;重症肌无力;视神经炎;视神经脊髓炎;寻常性天疱疮和变型;Pernicious angemis;垂体自身免疫性疾病;多发性肌炎;心包切开术后综合征(Postpericardiotomy syndrome);卵巢早衰;原发性胆汁性肝硬化(Primary Biliary Cirrhosis);原发性硬化性胆管炎;银屑病;风湿性心脏病;干燥综合征(Sjogren's syndrome);系统性红斑狼疮;系统性硬化症;溃疡性结肠炎;未分化结缔组织病(UCTD);葡萄膜炎;白癜风;和韦氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0547] 可以使用本文提供的方法和组合物治疗的一组具体的自身免疫性疾病状态包括但不限于:急性坏死性出血性白质脑炎;阿狄森氏病(Addison's Disease);关节炎,银屑性;类风湿性关节炎;自身免疫性再生障碍性贫血;自身免疫性垂体炎;自身免疫性胃炎;自体免疫多内分泌综合征1型;大疱性类天疱疮;乳糜泻;柯萨奇心肌炎;杜林疱疹性皮炎;糖尿病(1型);获得性大疱性表皮松解松解症;巨细胞心肌炎;肺出血肾炎综合征;格雷夫斯病;桥本氏甲状腺炎;混合性结缔组织病;多发性硬化症;重症肌无力;视神经脊髓炎;Pernicious angemis;寻常性天疱疮和变型;垂体自身免疫性疾病;卵巢早衰;风湿性心脏病;系统性硬化症;干燥综合征;系统性红斑狼疮;和白癜风。

[0548] 在利用形成不想要的免疫应答的抗原,如食物抗原的实施方案中,可以提供用于针对例如:花生,苹果,奶,蛋清,蛋黄,芥菜,芹菜,虾,小麦(和其他谷物),草莓和香蕉的反应的治疗。

[0549] 本领域的技术人员将理解,可以测试患者,以鉴定已经形成不想要的免疫应答的外来抗原,并且可以基于该抗原开发本公开的组合物。

[0550] 测试

[0551] 在确立本公开的组合物和方法的效用中,最初应该确定对肝脏中的抗原呈递细胞的结合(特别是对肝细胞和特别地ASGPR的结合)的特异性。这可以例如通过在本公开的组合物中采用标记(如荧光标记藻红蛋白("PE"))来完成。将该组合物施用于合适的实验对象。将对照,例如,未缀合的PE或载体(盐水)施用于其他组的受试者。允许该组合物和对照循环1至5小时的时段,在此之后,收获受试者的脾脏和肝脏并测量荧光。可以随后确定其中发现荧光的特定细胞。当以这种方式测试时,本公开的组合物与未缀合的PE或载体相比显示在肝脏的抗原呈递细胞的浓度的更高的水平。

[0552] 通过以下可以测试免疫调节的效率:与施用单独的抗原或仅载体相比,测量响应掺入已知抗原,如卵清蛋白("OVA")的本公开的组合物的施用的OT-I $CD8^+$细胞(移植入宿

主小鼠)的增殖。当以这种方式测试时,与单独的抗原或载体相比,本公开的组合物显示出增加的OT1细胞增殖,表明增加的$CD8^+$T细胞交叉引发(cross-priming)。为了区分被扩充为功能性效应器表型的T细胞与被扩充并删除的T细胞,可以针对消耗的分子标志[如程序性死亡1(PD-1),FasL等],以及作为细胞凋亡并因此删除标志的膜联蛋白V对增殖的OT-I $CD8^+$T细胞进行表型分析。还可以评估OT-I $CD8^+$T细胞对与佐剂一起的抗原攻击的应答性,以表明对该抗原的功能性非应答性和因此免疫耐受性。为此,将本公开的组合物施用到宿主小鼠后,紧接着进行抗原攻击,分析细胞的炎性标记。当以这种方式测试时,本公开的组合物表现出非常低(例如,背景)的针对OVA的炎性OT-I $CD8^+$T细胞应答的水平,从而表明免疫耐受。

[0553] 可以通过以下测试体液免疫应答:与施用单独的抗原或仅载体相比,施用掺入已知抗原,如OVA的本公开的组合物,并且测量所得的抗体的水平。当以这种方式测试时,本公开的组合物显示非常低(例如,背景)水平的响应其施用和载体施用的抗体形成,响应抗原施用的抗体形成的水平显著更高。

[0554] 可以测试针对抗原的耐受化的效率,如上文就体液免疫应答而言的,其中,用本公开的组合物治疗后数周,通过仅施用抗原攻击一组受试者,随后测量针对抗原的抗体的水平。当以这种方式测试时,相比于未经预处理的组,在用这种组合物预处理的组中,本公开的组合物显示响应用抗原攻击的低水平的抗体形成。

[0555] 疾病聚焦(Disease-focused)实验模型是本领域技术人员公知的,并包括自身免疫和耐受性的NOD(或非肥胖型糖尿病)小鼠模型和用于人类炎性脱髓鞘疾病,多发性硬化的EAE(实验性自身免疫性脑脊髓炎)模型。具体地,NOD小鼠发展成自发性自身免疫糖尿病(类似于在人类中的1a型糖尿病)。NOD小鼠的组用测试化合物或阴性对照处理,接着测量血糖。成功的治疗对应于治疗人类糖尿病的可能性或治疗其他自身免疫性疾病的方法的机制证据。(参见例如Anderson and Bluestone,Annu.Rev.Immunol.2005;23:447-85)。

[0556] 施用

[0557] 本公开的组合物以治疗有效剂量,例如,足以提供先前所描述的疾病状态的治疗的剂量施用。本公开的化合物或其药学上可接受的盐可以通过用于发挥类似效用的药剂的任何接受的施用模式施用。

[0558] 虽然对于本公开的化合物还没有优化人剂量水平,这些最初可以从施用于小鼠的约10μg至100μg的剂量外推。通常,个体的人剂量为约0.01至2.0mg/kg体重,优选约0.1至1.5mg/kg体重,最优选约0.3至1.0mg/kg体重。治疗可以在某一天或数天时段内施用,并且可以以数天,1或数周,或1或数月的时间间隔重复。施用可以是单次剂量(例如,作为推注),或者初始推注接着在一段时间,例如1至7天中连续输注完整剂量的剩余部分。施用的活性化合物的量当然取决于以下的任一种或全部:被治疗的受试者和疾病状态,痛苦的严重性,施用的方案和时间安排以及开处方医生的判断。还应当理解的是,施用量将取决于抗原,抗体,抗体片段或配体的分子量,以及接头的大小。

[0559] 本公开的组合物可单独施用或与其它药学上可接受的赋形剂组合施用。虽然考虑施用的所有典型途径,但目前优选的是提供适合于注射的液体剂型。制剂通常将包含常规药物载体或赋形剂和本公开的组合物或其药学上可接受的盐。此外,这些组合物可包括其它的药剂,药物,载体等,包括但不限于对应于在本公开的组合物中使用的抗原(X)的治疗

性蛋白质，肽，抗体或抗体样分子，和可以充当免疫调节剂，更具体地可以具有对B细胞的抑制作用的其它活性剂，包括抗叶酸剂，免疫抑制剂，细胞抑制剂(cyostatics)，有丝分裂抑制剂和抗代谢物，或它们的组合。

[0560] 一般来说，取决于预期的施用模式，药学上可接受的组合物将含有按重量计约0.1％至95％，优选约0.5％至50％的本公开的组合物，其余部分是合适的药物赋形剂，载体等。可以制备含有0.005％至95％范围内的活性成分的剂型或组合物，由无毒性载体构成平衡。

[0561] 例如，通过本公开的活性成分(例如，冻干粉末)和任选的药物佐剂在载体中的溶解、分散等，从而形成溶液或悬浮液，可以制备液体的药学上可施用的组合物，所述载体如例如，水(注射用水)，盐水，右旋糖水溶液，甘油，二醇，乙醇等(不包括半乳糖)。如果需要的话，待施用的药物组合物也可以含有少量的无毒辅助物质，如润湿剂，乳化剂，稳定剂，增溶剂，pH缓冲剂等，例如乙酸钠，柠檬酸钠，环糊精衍生物，脱水山梨醇单月桂酸酯(sorbitanmonolaurate)，三乙醇胺醋酸酯和油酸三乙醇胺等，渗透剂(osmolyte)，氨基酸，糖和碳水化合物，蛋白质，聚合物，盐，表面活性剂，螯合剂，抗氧化剂，防腐剂，和特异性配体。对于本领域技术人员，制备这类剂型的实际方法是已知的，或将是显而易见的；例如，参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,Pharmaceutical Press,22nd Edition,2012。待施用的组合物或制剂，在任何情况下，含有效治疗所治疗的受试者的症状的量的活性化合物的量。

实施例

[0562] 以下实施例用于更充分地描述使用上述公开的方式，以及给出考虑用于实施本公开的多个方面的最佳模式。应当理解，这些实施例绝不用于限制本公开的真实范围，而是用于说明性的目的而呈现。本文引用的所有参考文献通过提及完整并入。

[0563] 实施例1

[0564] F1aA-OVA-m_4-n_{80}(或F1a-OVA-m_4-n_{80}-2NGAL)

[0565] 1A.通式103'，其中X'是OVA，且m是4

[0566] 在无内毒素的管中，将OVA(5.0mg，0.00012mmol)加入到100μl含5mM EDTA的pH 8.0PBS中并搅拌。分别将1mg的Traut试剂溶解于100μl pH 7.0PBS中，并将如此得到的16μl(0.00119mmol)Traut试剂溶液在持续搅拌下加至OVA的搅拌的溶液中。1小时后，使用离心大小排阻柱除去过量的Traut试剂，以得到通式103'的相应产物。

[0567] 1B.通式106A，其中n是80

[0568] 在无内毒素的管中，在搅拌的情况下将半乳糖胺(10.0mg，0.04638mmol)溶解在100μl含5mM EDTA的pH8.0的PBS中。在溶解在100μl pH7.0的PBS中的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(通式104，其中n为80)(16.23mg，0.00464mmol)中加入半乳糖胺的搅拌溶液。1小时后，所得吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-N-乙酰半乳糖胺(通式106A)无需进一步纯化即可使用。

[0569] 1C.通式1aA，其中X'是OVA，m为4，n为80(和Z'为C2半乳糖胺)

[0570] 将在实施例1A中制备的通式103'的纯化的OVA-Traut缀合物直接加入到在实施例1B中制备的通式106A的搅拌产物中。1小时后，将反应混合物通过离心大小排阻柱纯化得到

的通式1a的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。(参照图5)。

[0571] 1D.通式103'的其它化合物

[0572] 通过遵循实施例1A中所述的方案并用以下替代OVA:

[0573] • 阿昔单抗,

[0574] • 阿达木单抗,

[0575] • 阿加糖酶α,

[0576] • 阿加糖酶β,

[0577] • Aldeslukin,

[0578] • 阿葡糖苷酶α,

[0579] • 因子VIII,

[0580] • 因子IX,

[0581] • L-天冬酰胺酶,

[0582] • 拉罗尼酶(Laronidase)

[0583] • 奥曲肽,

[0584] • 苯丙氨酸氨裂合酶,

[0585] • 拉布立酶,

[0586] • 胰岛素(SEQ ID NO:5),

[0587] • GAD-65(SEQ ID NO:6),

[0588] • IGRP(SEQ ID NO:7)

[0589] • MBP(SEQ ID NO:8),

[0590] • MOG(SEQ ID NO:9),

[0591] • PLP(SEQ ID NO:10),

[0592] • MBP13-32(SEQ ID NO:11),

[0593] • MBP83-99(SEQ ID NO:12),

[0594] • MBP111-129(SEQ ID NO:13),

[0595] • MBP146-170(SEQ ID NO:14),

[0596] • MOG1-20(SEQ ID NO:15),

[0597] • MOG35-55(SEQ ID NO:16),

[0598] • PLP139-154(SEQ ID NO:17),

[0599] • MART1(SEQ ID NO:18),

[0600] • 酪氨酸酶(SEQ ID NO:19),

[0601] • PMEL(SEQ ID NO:20),

[0602] • 水通道蛋白4(水通道蛋白4)(SEQ ID NO:21),

[0603] • S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22),

[0604] • IRBP(SEQ ID NO:23),

[0605] • 伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6),

[0606] • α-麦醇溶蛋白"33聚体"天然的(SEQ ID NO:24),

[0607] • α-麦醇溶蛋白"33聚体",脱酰氨基的(SEQ ID NO:25),

[0608] • α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26),

[0609] • Omega麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27)，

[0610] • Fel d 1A(UNIPROT P30438)，

[0611] • 猫白蛋白(UNIPROT P49064)，

[0612] • Can f 1(UNIPROT O18873)，

[0613] • 狗白蛋白(UNIPROT P49822)，和

[0614] • RhCE实例(UNIPROT P18577)，

[0615] 得到通式103'的以下的相应化合物，其中：

[0616] • X是阿昔单抗，且m是10，

[0617] • X是阿达木单抗，且m是11，

[0618] • X是阿加糖酶α，且m是14，

[0619] • X是阿加糖酶β，且m是14，

[0620] • X是Aldeslukin，且m是6，

[0621] • X是阿葡糖苷酶α，m是13，

[0622] • X为因子VIII，且m是100，

[0623] • X是因子IX，且m是18，

[0624] • X是L-天冬酰胺酶，且m是5，

[0625] • X是拉罗尼酶，且m是7，

[0626] • X是奥曲肽，且m是1，

[0627] • X是苯丙氨酸氨裂解酶，且m是12，

[0628] • X是拉布立酶，且m是12，

[0629] • X是胰岛素(SEQ ID NO:5)，且m是2，

[0630] • X是GAD-65(SEQ ID NO:6)，且m是8，

[0631] • X是IGRP(SEQ ID NO:7)，且m是7，

[0632] • X是MBP(SEQ ID NO:8)，且m是6，

[0633] • X是MOG(SEQ ID NO:9)，且m是5，

[0634] • X是PLP(SEQ ID NO:10)，且m是8，

[0635] • X是MBP13-32(SEQ ID NO:11)，且m是1，

[0636] • X是MBP83-99(SEQ ID NO:12)，且m是1，

[0637] • X是MBP111-129(SEQ ID NO:13)，且m是1，

[0638] • X是MBP146-170(SEQ ID NO:14)，且m是2，

[0639] • X是MOG1-20(SEQ ID NO:15)，且m是1，

[0640] • X是MOG35-55(SEQ ID NO:16)，且m是2，

[0641] • X是PLP139-154(SEQ ID NO:17)，且m是3，

[0642] • X是MART1(SEQ ID NO:18)，且m是4，

[0643] • X是酪氨酸酶(SEQ ID NO:19)，且m是8，

[0644] • X是PMEL(SEQ ID NO:20)，且m是5，

[0645] • X是水通道蛋白4(SEQ ID NO:21)，且m是4，

[0646] • X是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22)，且m是12，

[0647] • X是IRBP(SEQ ID NO:23)，且m是21，

[0648] • X是伴花生球蛋白，且m是21，

[0649] • X是α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的(SEQ ID NO:24)，且m是1，

[0650] • X是α-麦醇溶蛋白“33聚体”，脱酰氨基的(SEQ ID NO:25)，且m是1，

[0651] • X是α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26)，且m是1，

[0652] • X是Omega麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27)，且m是1，

[0653] • X是Fel d 1，且m是4，

[0654] • X是猫白蛋白，且m是16，

[0655] • X是Can f 1，且m是6，

[0656] • X是狗白蛋白，且m是23，和

[0657] • X是RhCE实例，且m是10。

[0658] 1E.通式1aA的其他化合物

[0659] 通过按照实施例1C中描述的方案并替代通式103’的化合物，例如如实施例1D中获得的化合物，得到通式1aA的下列相应化合物：

[0660] • F1aA-阿昔单抗-m_{10}-n_{80}，

[0661] • F1aA-阿达木单抗-m_{11}-n_{80}，

[0662] • F1aA-阿加糖酶α-m_{14}-n_{80}，

[0663] • F1aA-阿加糖酶β-m_{14}-n_{80}，

[0664] • F1aA-Aldeslukin-m_{6}-n_{80}，

[0665] • F1aA-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{80}，

[0666] • F1aA-因子VIII-m_{100}-n_{80}，

[0667] • F1aA-因子IX-m_{18}-n_{80}，

[0668] • F1aA-L-天冬酰胺酶-m_{5}-n_{80}，

[0669] • F1aA-拉罗尼酶-m_{7}-n_{80}，

[0670] • F1aA-奥曲肽-m_{1}-n_{80}，

[0671] • F1aA-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{80}，

[0672] • F1aA-拉布立酶-m_{12}-n_{80}，

[0673] • F1aA-胰岛素-m_{2}-n_{80}，

[0674] • F1aA-GAD-65-m_{8}-n_{80}，

[0675] • F1aA-IGRP-m_{7}-n_{80}，

[0676] • F1aA-MBP-m_{6}-n_{80}，

[0677] • F1aA-MOG-m_{5}-n_{80}，

[0678] • F1aA-PLP-m_{8}-n_{80}，

[0679] • F1aA-MBP13-32-m_{1}-n_{80}，

[0680] • F1aA-MBP83-99-m_{1}-n_{80}，

[0681] • F1aA-MBP111-129-m_{1}-n_{80}，

[0682] • F1aA-MBP146-170-m_{2}-n_{80}，

[0683] • F1aA-MOG1-20-m_{1}-n_{80}，

[0684] • F1aA-MOG35-55-m_{2}-n_{80}，

[0685] • F1aA-PLP139-154-m_{3}-n_{80}，

[0686] • F1aA-MART1-m_4-n_{80},

[0687] • F1aA-酪氨酸酶-m_8-n_{80},

[0688] • F1aA-PMEL-m_5-n_{80},

[0689] • F1aA-水通道蛋白4-m_4-n_{80},

[0690] • F1aA-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{80},

[0691] • F1aA-IRBP-m_{21}-n_{80},

[0692] • F1aA-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{80},

[0693] • F1aA-α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的-m_1-n_{80},

[0694] • F1aA-α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的-m_1-n_{80},

[0695] • F1aA-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{80},

[0696] • F1aA-Omega-麦醇溶蛋白-m_1-n_{80},

[0697] • F1aA-Fel d 1-m_4-n_{80},

[0698] • F1aA-猫白蛋白-m_{16}-n_{80},

[0699] • F1aA-Can f 1-m_6-n_{80},

[0700] • F1aA-狗白蛋白-m_{23}-n_{80},and

[0701] • F1aA-RhCE-m_{10}-n_{80}。

[0702] 1F.通式106A的其他化合物

[0703] 通过按照实施例1B中描述的方案并将吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(通式104,其中n是80)取代为以下:

[0704] • 通式104,其中n是12,

[0705] • 通式104,其中n是33,

[0706] • 通式104,其中n是40,

[0707] • 通式104,其中n是43,

[0708] • 通式104,其中n是50,

[0709] • 通式104,其中n是60,

[0710] • 通式104,其中n是75,且

[0711] • 通式104,其中n是80,

[0712] 得到通式106A的以下的相应化合物,其中:

[0713] • n是12,

[0714] • n是33,

[0715] • n是40,

[0716] • n是43,

[0717] • n是50,

[0718] • n是60,

[0719] • n是75,且

[0720] • n是84,

[0721] 1G.通式1aA的其他化合物

[0722] 按照实施例1E所述方案,并将通式106A的化合物取代为在实施例1F中得到的化合物,得到通式1aA的的相应化合物,其中n是12,33,40,43,50,60,75,和84,如:

[0723] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{12},

[0724] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{33},

[0725] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{40},

[0726] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{43},

[0727] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{50},

[0728] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{60},

[0729] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{75},和

[0730] • F1aA-胰岛素-m_2-n_{84}。

[0731] 实施例2

[0732] F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL

[0733] 2A.通式103',其中X'是卵清蛋白,且m是1

[0734] 在无内毒素的管中,将OVA(6.5mg,0.000155mmol)加入到200μl含5mMEDTA的pH 8.0PBS中并搅拌。分别将1mg的Traut试剂溶解于100μl pH 7.0的PBS中,并将由此得到的43μl(0.00310mmol)Traut试剂溶液在持续搅拌下加至OVA的搅拌的溶液中。1小时后,使用离心大小排阻柱除去未反应的Traut试剂,以提供通式103'的产物。

[0735] 2B.通式1b,其中X'是卵清蛋白,m是1,n是4,p是34,R^9是直接键,并且Z"是2NAcGAL

[0736] 在微离心管中,将聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-(吡啶基二硫化物)(通式201)(20.0mg,0.0020mmol)溶于50μl含5mM EDTA的pH8.0PBS中。对这加入来自实施例2A的经纯化的OVA-Traut产物,随后搅拌1小时。将反应混合物通过离心大小排阻柱纯化得到的通式1b的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。(参照图5)。

[0737] 2C.通式1b的其他化合物

[0738] 通过按照实施例2B中描述的方案并替代通式103'的化合物,例如如实施例1D中获得的化合物,得到通式1b的下列相应化合物:

[0739] • F1b-阿昔单抗-m_{10}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0740] • F1b-阿达木单抗-m_{11}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0741] • F1b-阿加糖酶α-m_{14}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0742] • F1b-阿加糖酶β-m_{14}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0743] • F1b-Aldeslukin-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0744] • F1b-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0745] • F1b-因子VIII-m_{100}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0746] • F1b-因子IX-m_{18}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0747] • F1b-L-天冬酰胺酶-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0748] • F1b-拉罗尼酶-m_7-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0749] • F1b-奥曲肽-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0750] • F1b-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0751] • F1b-拉布立酶-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0752] • F1b-胰岛素-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0753] • F1b-GAD-65-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0754] • F1b-IGRP-m_7-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0755] • F1b-MBP-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0756] • F1b-MOG-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0757] • F1b-PLP-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0758] • F1b-MBP13-32-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0759] • F1b-MBP83-99-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0760] • F1b-MBP111-129-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0761] • F1b-MBP146-170-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0762] • F1b-MOG1-20-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0763] • F1b-MOG35-55-m_2-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0764] • F1b-PLP139-154-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0765] • F1b-MART1-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0766] • F1b-酪氨酸酶-m_8-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0767] • F1b-PMEL-m_5-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0768] • F1b-水通道蛋白4-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0769] • F1b-S-抑制蛋白-m_{12}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0770] • F1b-IRBP-m_{21}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0771] • F1b-伴花生球蛋白-m_{21}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0772] • F1b-Α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0773] • F1b-Α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0774] • F1b-Α-麦醇溶蛋白-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0775] • F1b-Ω麦醇溶蛋白-m_1-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0776] • F1b-Fel d 1-m_4-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0777] • F1b-猫白蛋白-m_{16}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0778] • F1b-Can f 1-m_6-n_4-p_{34}-2NAcGAL,

[0779] • F1b-狗白蛋白-m_{23}-n_4-p_{34}-2NAcGAL,和

[0780] • F1b-RhCE-m_{10}-n_4-p_{34}-2NAcGAL。

[0781] 实施例3

[0782] F1f-OVA-m_1-n_4-p_{33}-2NAcGAL

[0783] 3A.通式1f,其中X'是卵清蛋白,m是1,n是4,p是33,R^9是直接键,并且Z”是2NAcGAL

[0784] 在无内毒素的管中,将OVA(4.0mg,0.0000952381mmol)加入到0.1mlpH7.4PBS中并搅拌。分别将通式601的聚(N-乙酰半乳糖胺)-对-硝基苯基碳酸盐(poly-(n-Acetylgalactosamine)-p-nitrophenyol carbonate)(其中n是4,p是33)(33.0mg,0.002380952mmol)加入到100μl的pH7.5PBS中,涡旋直至溶解。将两种溶液混合,混合物剧烈搅拌1小时。然后收集该混合物并对pH 7.4的PBS透析3天(30kDa的分子量截留),提供通式1f的产物。

[0785] 实施例4

[0786] F1g-PVA-m_1-p_{90}-2NAcGAL

[0787] 4A.通式1g,其中X'是卵清蛋白,且m是1,p是90,R^9是直接键,并且Z”是2NAcGAL3A

[0788] 在无内毒素的管中,将OVA(5.0mg,0.000119048mmol)加入到0.2ml pH7.4PBS并搅

拌。向搅拌的溶液中加入溶解在0.4ml pH 7.4的PBS中的75mg(0.00297619mmol)的聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-NHS(通式701)。允许混合物搅拌2小时。然后收集该混合物并对pH 7.4的PBS透析3天(30kDa的分子量截留),提供通式1g的产物。

[0789] 实施例5

[0790] F1h-OVA-m_2-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL

[0791] 5A.通式802',其中X'是卵清蛋白,m是2,n是45

[0792] 在无内毒素的管中,将OVA(3.0mg,0.0000714286mmol)加入到150μl含5mM EDTA的pH 8.0PBS中并搅拌。将溶于DMF的二苯并环辛炔-PEG-对硝基苯基碳酸酯)(Dibenzocyclooctyne-PEG-(p-nitrophenyl carbonate))(式801)(5.265mg,0.002142857mmol)加入到OVA溶液,并搅拌1小时。使用离心大小排阻柱去除过量的二苯并环辛炔-PEG-(对硝基苯基碳酸酯),提供通式802'的产物。

[0793] 5B.通式1h,其中X'是卵清蛋白,m是2,n是45,P是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键并且Z"是2NAcGAL

[0794] 将聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3(通式803,其中p是55,q是4,且Z"是N-乙酰半乳糖胺)(33mg,0.002142857mmol)溶解在100μl的pH 7.4PBS中,并且在搅拌的情况下加入到实施例5A的产物中。1小时后,通过离心大小排阻层析纯化所得的通式1h产物。

[0795] 实施例6

[0796] F1j-OVA-m_{10}-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL

[0797] 6A.通式103',其中X'是卵清蛋白,且m是10

[0798] 在无内毒素的管中,将OVA(5.0mg,0.00019mmol)加入到150μl含5mMEDTA的pH 8.0PBS中并搅拌。分别将1mg Taut试剂溶解在100μl pH7.0PBS中,并将由此得到的16μl(0.00119mmol)Traut试剂溶液在持续搅拌下加至OVA的搅拌的溶液中。1小时后,使用离心大小排阻柱除去未反应的Traut试剂,以提供通式103'的产物。

[0799] 6B.通式902",其中X'是卵清蛋白,m为10且n是45

[0800] 将二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物)(通式901,其中n为45)(6.0mg,0.00238mmol)溶解于DMF中,将所得溶液加入到实施例6A得到的OVA溶液,并搅拌1小时。使用离心大小排阻层析除去过量的二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物),提供通式902"的产物。

[0801] 6C.通式1j,其中X'是卵清蛋白,m是10,n是45,P是55,q是4,R^8是CH_2,R^9是直接键并且Z"是2NAcGAL6C。

[0802] 聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3(通式803,其中p是55,q是4和Z"是N-乙酰半乳糖胺)(36mg,0.00238mmol)溶于150μl的pH 7.4PBS中,并加入到实施例6B的产物同时搅拌。1小时后,通过离心大小排阻层析纯化得到的通式1j的产物。表征(UHPLC SEC,凝胶电泳)证实产物的身份。

[0803] 实施例7

[0804] F1L-OVA-m_2-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL

[0805] 7A.通式1002,其中X'是卵清蛋白,m是2,n是80

[0806] 将二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物)(通式1001,其中n为80)(9.0mg,0.00238mmol)溶解于DMF中,将所得溶液加入到经纯化的通式103'的OVA溶液(其中X'是卵

清蛋白，且m是2)中，例如如实施例6A中所述制备，并搅拌1小时。使用离心大小排阻层析除去过量的二苯并环辛炔-PEG-(吡啶基二硫化物)，提供通式1002的产物。

[0807] 7B.通式1L，其中X'是卵清蛋白，m是2，n是80，P是55，q是4，R^8是CH_2，R^9是直接键并且Z"是2NAcGAL

[0808] 聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3(通式803，其中p是55，q是4和Z"是N-乙酰半乳糖胺)(36mg，0.00238mmol)溶于150μl的pH 7.4PBS中，并加入到实施例7A的产物中，同时搅拌。1小时后，通过离心大小排阻层析纯化得到的通式1L的产物(除去过量的聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)-N3)。表征(UHPLC SEC，凝胶电泳)证实产物的身份。

[0809] 实施例8

[0810] 聚(半乳糖胺甲基丙烯酸酯)聚合物的制备

[0811] 8A.半乳糖胺甲基丙烯酸酯

[0812] 对搅拌的半乳糖胺盐酸盐(galactosamine hydrochloride)(2.15g，10.0mmol)加入到0.5M甲醇钠(22ml，11.0mmol)中。30分钟后，加入甲基丙烯酸酐(14.694克，11.0mmol)，并继续搅拌4小时。通过旋转蒸发(rotovap)将所得到的半乳糖胺甲基丙烯酸酯装载到硅胶上并使用DCM:甲醇(85:15)经由柱层析法纯化。

[0813] 8B.通式201，其中n是4，p为30

[0814] 在Schlenk烧瓶中，将半乳糖甲基丙烯酸酯(600mg，2.43mmol)，2-(2-(2-(2-(吡啶-2-基二硫烷基)乙氧基)乙氧基)乙氧基)2-(苯基碳硫基)硫代)乙酸乙酯(2-(2-(2-(2-(pyridin-2-yldisulfanyl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl2-((phenylcarbonothioyl)thio)acetate)(44.8mg，0.081mmol)和AIBN(3.174089069mg，0.016mmol)加入到1.5ml DMF中。将反应混合物进行4个冻融循环，然后在70℃搅拌6小时。于12ml甲醇中沉淀通式201的所希望的聚合物产物，并在减压下除去过量的溶剂。

[0815] 实施例9

[0816] F1aA-PE-m_3-n_{80}的制备

[0817] 9A.通式103'，其中X'是藻红蛋白

[0818] 在无内毒素的管中，将藻红蛋白("PE")(购自Pierce)(200μl，0.000004mmol)加入到50μl含5mM EDTA的pH 8.0PBS中并搅拌。分别将1mg Traut试剂溶解在100μl pH7.0的PBS中，并将由此得到的2μl(0.00013mmol)的Traut试剂溶液加至PE的搅拌的溶液中并继续搅拌。1小时后，使用离心大小排阻柱除去过量的Traut试剂，以提供通式103'的产物。

[0819] 9B.通式106A，其中n是80

[0820] 在无内毒素的管中，在搅拌下将半乳糖胺(7.0mg，0.03246mmol)溶解在100μl的含5mM EDTA的pH8.0PBS中。将溶解在50μl pH7.0的PBS中的吡啶基二硫醇-聚(乙二醇)-NHS酯(通式104，其中n为80)(16.23mg，0.00464mmol)加入到半乳糖胺的搅拌溶液中。1小时后，所得的通式106A的产物不需要进一步纯化即可使用。

[0821] 9C.通式1a，其中X'是藻红蛋白，m为3，n为80和Z'是半乳糖胺

[0822] 将在实施例9A中制备的经纯化的PE-Traut缀合物直接加入到在实施例9B制备的通式106A的搅拌产物中。1小时后，通过将反应混合物通过离心大小排阻柱纯化得到的通式1a的产物。表征(UHPLC SEC，凝胶电泳)证实产物的身份。

[0823] 实施例10

[0824] OVA-DOM

[0825] 10A.表达载体的制备

[0826] 哺乳动物细胞表达载体pSecTag A从Life Technologies购买。以用于在人细胞中表达蛋白质的经密码子优化的序列从供应商Genscript购买编码抗ASGPR域抗体Dom26h-196-61(在此称为"DOM")的基因。按照QuikChange方案(Geiser,et al.)的变型通过定点诱变,将编码OVA,DOM,柔性接头Gly_3Ser和6xHis标记的序列克隆到哺乳动物表达载体pSecTag A中,在Igκ链分泌前导序列的C末端。

[0827] 10B.表达和纯化通式2,其中m'为1,m"为0时,X是卵清蛋白,Y是Gly_3Ser,Z是抗ASGPR Dom26h-196-61

[0828] 用例如如实施例10A中所述制备的改良的pSecTag载体,使用聚乙烯亚胺瞬时转染HEK293细胞。转染的细胞在补充有丙戊酸的FreeStyle 293培养基(Life Technologies)中培养7天,在这之后,通过离心除去细胞,并收集培养物上清液并过滤灭菌。通过使用HisTrapNi^{2+}Sepharose柱(GE Healthcare)进行的固定化金属离子亲和层析,之后使用Superdex 75柱(GE Healthcare)进行的大小排阻层析,从培养物上清液中纯化通式2的OVA/DOM融合蛋白,其具有以下通用结构:

[0829] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C

[0830] 和下面的氨基酸序列:

[0831]

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSV
NVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTN
GIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILE
LPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSS
SANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP
GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSGGGSHHHHHH(SEQ ID NO:28)。

[0832] 通过SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色和抗6xHis标记蛋白质印迹验证蛋白质纯度。使用Beer-Lambert定律测定蛋白质浓度,对此使用NanoDrop2000(Thermo Scientific)测量在280nm的吸光度,使用ExPASy的ProtParam tool从蛋白质的氨基酸序列估计分子量(57.3kDa)和消光系数(57,090$M^{-1}cm^{-1}$)。例如,根据制造商的说明使用HEK-Blue TLR4报道细胞系(Invivogen)测量内毒素水平。

[0833] 10C.通式2的其他组合物

[0834] 通过按照实施例10A和10B所述的方案,并相应地替代pSecTag载体,得到通式2的以下融合蛋白:

[0835] N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C

[0836] 具有下列氨基酸序列:

[0837]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYC
PIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYA

EERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLW
EKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINF
EKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAG
REVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH(SEQ ID NO:29)；和

[0838] N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C

[0839] 具有下列氨基酸序列：

[0840]

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSV
NVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTN
GIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILE
LPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSS
SANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP
GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFEKYAMAWVRQAPGKGLEWVSRISARGVTTYYADSVKGRFTISRD
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHKRHEHTRFDSWGQGTLVTVSSGGGSGSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANEN
IFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSVNVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLAS
RLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVF
KGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILELPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLES
IINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSSSANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEI
NEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSPGGGSHHHHHH(SEQ ID NO:30)。

[0841] 10D.通式2的其他组合物

[0842] 通过按照实施例10A和10B所述的方案并且将Gly_3Ser替代成具有免疫蛋白体切割位点(“IPC”)的接头的载体，并且将OVA替代为以下各项的载体：

[0843] MBP13-32(SEQ ID NO:11)，

[0844] MBP83-99(SEQ ID NO:12)，

[0845] MBP111-129(SEQ ID NO:13)，

[0846] MBP146-170(SEQ ID NO:14)，

[0847] MOG1-20(SEQ ID NO:15)，

[0848] MOG35-55(SEQ ID NO:16)，和

[0849] PLP139-154(SEQ ID NO:17)，

[0850] 或以下的载体

[0851] α-麦醇溶蛋白“33聚体”，脱酰氨基的(SEQ ID NO:25)

[0852] α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26)，和

[0853] Omega-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27)，

[0854] 得到通式2的以下融合蛋白：

[0855] • MBP13-32-IPC-MBP83-99-IPC-MBP111-129-IPC-MBP146-170-IPC-MOG1-20-IPC-MOG35-55-IPC-PLP139-154-IPC-DOM，和

[0856] • α-麦醇溶蛋白“33聚体”，脱酰氨基的-IPC-α-麦醇溶蛋白-IPC-Omega麦醇溶蛋白-IPC-DOM。

[0857] 实施例11

[0858] 去唾液酸化的OVA

[0859] 11A.表达载体的制备

[0860] 哺乳动物细胞表达载体pSecTag A从Life Technologies购买。按照QuikChange方案(Geiser,et al.)的变型通过定点诱变,将编码OVA,柔性接头Gly_3Ser和6xHis标记的序列克隆到pSecTag A中,在Igκ链分泌前导序列的C末端。

[0861] 11B.OVA的表达和纯化

[0862] 用例如如实施例10A中所述制备的改良的pSecTag载体,使用聚乙烯亚胺瞬时转染HEK293细胞。转染的细胞在补充有丙戊酸的FreeStyle 293培养基(Life Technologies)中培养7天,在这之后,通过离心除去细胞,并收集培养物上清液并过滤灭菌。通过使用$HisTrapNi^{2+}$Sepharose柱(GE Healthcare)进行的固定化金属离子亲和层析,之后使用Superdex 75柱进行的大小排阻层析,从培养物上清液中纯化OVA蛋白,其具有以下结构:

[0863] N'-OVA Gly_3Ser 6xHis-C'

[0864] 和下面的氨基酸序列:

[0865]

GSIGAASMEFCFDVFKELKVHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTRTQINKVVRFDKLPGFGDSIEAQCGTSV
NVHSSLRDILNQITKPNDVYSFSLASRLYAEERYPILPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTN
GIIRNVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDEDTQAMPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILE
LPFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTSSNVMEERKIKVYLPRMKMEEKYNLTSVLMAMGITDVFSS
SANLSGISSAESLKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRADHPFLFCIKHIATNAVLFFGRCVSP
GGGSHHHHHH(SEQ ID NO:31)。

[0866] 通过SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色和抗6xHis标记蛋白质印迹验证蛋白质纯度。使用Beer-Lambert定律测定蛋白质浓度,对此使用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)测量在280nm的吸光度,使用ExPASy的ProtParam tool从蛋白质的氨基酸序列估计分子量(43.8kDa)和消光系数(31,525$M^{-1}cm^{-1}$)。

[0867] 11C.去唾液酸化

[0868] OVA通过与神经氨酸酶在37℃(New England Biolabs)一起温育1小时而去唾液酸化。通过固定化金属离子亲和层析(例如使用$HisTrapNi^{2+}$Sepharose柱,GE Healthcare),之后进行大小排阻层析(例如,使用Superdex 75柱,GE Healthcare),从反应混合物中纯化去唾液酸化的OVA。

[0869] 通过SDS-PAGE凝胶的考马斯亮蓝染色和抗6xHis标记蛋白质印迹验证蛋白质纯度。去唾液酸化是通过在蛋白质印迹(Vector Biolabs)中的蛋白质唾液酸含量的基于Sambucus nigra凝集素检测和通过唾液酸介导的荧光测定法(ProZyme)验证的。如去唾液酸化前以上对蛋白质所述,使用Beer-Lambert定律,测定去唾液酸化的蛋白质浓度。根据制造商的说明使用HEK-Blue TLR4报道细胞系(Invivogen)测量内毒素水平。

[0870] 实施例12

[0871] 肝分布

[0872] 12A.例如,如实施例9所述制备$FlaA-PE-m_3-n_{80}$。制备了在无菌盐水中的30μg/100μl溶液以用于注射。

[0873] 将$FlaA-PE-m_3-n_{80}$溶液(30μg)经由尾静脉注射施用至三组C57black 6小鼠之一,

每组3只。其他两组小鼠接收在100μl盐水或盐水载体中的等体积的藻红蛋白。施用后三小时，收集这些动物的肝和脾，并且在这些器官中的细胞荧光的水平通过流式细胞术确定以作为细胞PE含量的指示。

[0874] 如图1所示，与接收PE溶液的动物相比，来自用F1aA-PE-m_3-n_{80}处理的小鼠的肝中的窦内皮细胞(LSECs)，肝细胞，肝巨噬细胞(KC)，和其他抗原呈递细胞(APC)显示荧光的至少三倍的增加。在三组收获的脾细胞中没有发现荧光可检测的差异。这些结果证实，F1aA-PE-m_3-n_{80}具有用于结合肝脏中的抗原呈递细胞的足够的特异性。

[0875] 12B.通过按照实施例12A中描述的方案并且用以下化合物替换F1aA-PE-m_3-n_{80}：F1b-PE-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL，F1f-PE-m_3-n_4-p_{33}-2NAcGAL，F1g-PE-m_3-p_{90}-2NAcGAL，F1h-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL，F1j-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL，F1L-PE-m_3-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL，F1m-PE-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，F1m-PE-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH，F1n-PE-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc和F1n-PE-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH(例如如参考实施例9所述通过分别替代实施例2B,3,4,5B,6B,7B,19G,19L,20B和20F中的X制备)，证实化合物F1aA-PE-m_3-n_{80}与以下化合物F1b-PE-m_3-n_4-p_{34}-2NAcGAL，F1f-PE-m_3-n_4-p_{33}-2NAcGAL，F1g-PE-m_3-p_{90}-2NAcGAL，F1h-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL，F1j-PE-m_3-n_{45}-p_{55}-q_4-2NAcGAL，F1L-PE-m_3-n_{80}-p_{55}-q_4-2NAcGAL，F1m-PE-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，F1m-PE-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH，F1n-PE-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc和F1n-PE-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH具有用于结合肝脏中的抗原呈递细胞的足够的特异性。

[0876] 实施例13

[0877] 抗原特异性$CD8^+$OT1T细胞的增殖

[0878] 13A.将例如如实施例1中所述合成的F1aA-OVA-m_4-n_{80}制备为用于注射的10μg/100μl盐水溶液。在第0天，将10^6个OT-1T细胞荧光标记并经尾静脉注射过继转移到3组45.2小鼠(每组5只)中。次日(即1天)，将10μg的F1aA-OVA-m_4-n_{80}，OVA或盐水经尾静脉注射施用于3组小鼠中的每一组。第6天，将动物处死并通过荧光激活细胞分选测定脾增殖OT-1细胞的%。

[0879] 本研究的结果(参照图2)表明，在用F1aA-OVA-m_4-n_{80}(图2中的“Gal-OVA”)处理的小鼠中增殖的OTI T细胞的百分比显著大于用OVA或盐水(图2中的“天然”)处理的小鼠脾脏中增殖的OTI细胞的百分比。OTI细胞增殖的增加表明相对于其它疗法，用F1aA-OVA-m_4-n_{80}处理的动物中增加的CD8+T细胞的交叉引发。与来自实施例12的结果一致，这些结果表明，F1aA-OVA-m_4-n_{80}将抗原靶向肝脏的能力使在肝脏中通过抗原呈递细胞将OVA呈递至OVA特异性OTI T细胞增加。

[0880] 13B.为了区分被扩充成功能性效应器表型的T细胞与被扩充并删除的T细胞，可以针对作为细胞凋亡并因此删除的标志的膜联蛋白V，以及消耗标记程序性死亡1(PD-1)分析增殖的OTI CD8+T细胞。如图3所示，F1aA-OVA-m_4-n_{80}(图3中的“Gal-OVA”)比可溶性OVA诱导高得多的数目的膜联蛋白-V^+和$PD\text{-}1^+$增殖OTI $CD8^+$T细胞。

[0881] 13C.通过按照以下实施例13A和13B所述的方案，用通式1的化合物(例如如实施例3A,4A,5B,6C,7B和19G中所述获得的化合物)替代F1aA-OVA-m_4-n_8，显示来自实施例3A,4A,5B,6C,7B和19G的化合物诱导的膜联蛋白-V^+和$PD\text{-}1^+$增殖OTI $CD8^+$T细胞的数目比可溶性OVA高得多。

[0882] 13D.通过按照实施例13A和13B所述的方案，分别用例如如实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F中所述获得的通式1和2的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，并用对应于X(或X'或X")的抗原替代OVA，显示来自实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F的化合物诱导的膜联蛋白-V^+和PD-1^+增殖OTI $CD8^+$T细胞的数目比可溶性抗原X高得多。

[0883] 实施例14

[0884] F1aA-OVA-m_4-n_8不诱导OVA特异性抗体应答

[0885] 14A.为了评估对F1aA-OVA-m_4-n_8的体液免疫应答，我们通过每周静脉内注射F1aA-OVA-m_4-n_8或OVA来处理小鼠，然后测量OVA-特异性抗体在血液中的水平。在实验的第0天，第7和14天，对小鼠经静脉内注射施用含以下之一的100μl盐水：1)6μg OVA；2.)6μg F1aA-OVA-m_4-n_8；3.)30μg OVA；4.)30μg F1aA-OVA-m_4-n_8，或5)仅盐水。每组包含5只小鼠。第19天，将小鼠通过颊穿刺放血，并通过ELISA测定在各小鼠的血液OVA特异性抗体的效价。这项研究的结果表明，虽然用6和30μg OVA处理小鼠增加了OVA特异性抗体效价，但用6和30μg F1aA-OVA-m_4-n_8(图4中的"Gal-OVA")处理的小鼠具有类似于用盐水处理的小鼠(即经载体处理的动物)的血液效价(图4)。例如用6和30μg OVA处理的小鼠分别具有3.5和2.5的平均抗体效价；然而，用6和30μg OVA处理的小鼠分别具有0.75和0.25的平均抗体效价。

[0886] 14B.通过遵循实施例14A描述的方案并且用例如实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G中所述获得的通式1的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，显示用来自实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G的化合物处理的小鼠具有的OVA特异性抗体效价与用盐水处理的小鼠类似。

[0887] 通过按照以下实施例14A所述的方案并且分别用如例如实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F中所述获得的通式1和2的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，并用对应于于X(X'或X")的抗原替代OVA，显示用来自实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F的化合物处理的小鼠具有的OVA特异性抗体效价与用盐水处理的小鼠类似。

[0888] 实施例15

[0889] F1aA-OVA-m_4-n_8消耗OVA特异性抗体

[0890] 15A.我们用经静脉内注射20μg溶解于100μl盐水的F1aA-OVA-m_4-n_8处理具有不同的OVA抗体血液效价的小鼠(每只小鼠有0至4.5的效价)。在第0，5，7，12和14天对小鼠经静脉内注射F1aA-OVA-m_4-n_8(将F1aA-OVA-m_4-n_8注射标记为"Gal-OVA"并显示为图5的x轴上的绿色箭头)。为了确定F1aA-OVA-m_4-n_8消耗血清OVA特异性抗体的能力，在-1天将小鼠放血以建立起始抗体效价，然后在第2，6，9，13，和16天每次注射F1aA-OVA-m_4-n_8进行随后的放血。通过ELISA确定每只小鼠的抗体效价。本研究结果表明F1aA-OVA-m_4-n_8能够消耗小鼠中的血清抗体水平。例如，第一次F1aA-OVA-m_4-n_8注射后一天(即，第2天)，具有阳性OVA抗体效价的小鼠经历血清抗体水平的5至100倍的降低(图5)。我们的结果表明，尽管在19天的实验过程中，对于某些小鼠，抗体效价确实增加，但效价水平从没有达到在-1天测定的初始抗体效价，并且随后的F1aA-OVA-m_4-n_8剂量有效地减少在抗体效价中这些短暂的增加。这些结果表明，F1aA-OVA-m_4-n_8具有结合血清OVA特异性抗体的特异性和消耗OVA特异性血清抗体所需的动力学。

[0891] 15B.通过按照实施例15A描述的方案并且用如例如实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G中所述获得的通式1的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，显示来自实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G的化合物具有结合血清OVA特异性抗体的特异性和消耗OVA特异性血清抗体所需的动力学。

[0892] 15C.通过按照实施例15A所述的方案，并且用如例如实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F中所述获得的通式1和2的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，并用对应于X(X'或X")的抗原替代OVA，显示来自实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F的化合物具有结合血清X特异性抗体的特异性和消耗X特异性血清抗体所需的动力学。

[0893] 实施例16

[0894] OT-1攻击至耐受模型

[0895] 16A.使用已建立的OTI攻击至耐受模型(Liu,Iyoda,et al.,2002)，证明了F1aA-OVA-m_4-n_8(mGal-OVA)，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}(pGal-OVA)，和N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(Dom-OVA)防止针对疫苗介导的抗原攻击的后续的免疫应答的能力，甚至用涉及非常强的细菌衍生的佐剂(即脂多糖)的攻击。为了耐受化，在OTI $CD8^+$($CD45.2^+$)T细胞过继转移到$CD45.1^+$小鼠(每组n＝5只小鼠)后1和6天，静脉内施用在100μl盐水中的233nmol F1aA-OVA-m_4-n_8，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}，N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C或可溶性OVA。又过了9天以允许转移的T细胞的可能消耗，然后用以脂多糖(LPS)(50ng)为佐剂的OVA(10μg)通过皮内注射攻击受体小鼠。在攻击后4天引流淋巴结的表征允许确定是否消耗实际发生。

[0896] 16B.与用LPS的抗原攻击之前用未修饰的OVA处理的小鼠相比，F1aA-OVA-m_4-n_8，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}，或N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C的静脉内施用导致OTI $CD8^+$T细胞群在引流淋巴结中的显著减少，表明缺失耐受(deletional tolerance)。例如，图6显示来自用F1aA-OVA-m_4-n_8(mGal-OVA)，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}(pGal-OVA)，或N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C(Dom-OVA)处理的小鼠的引流淋巴结比用OVA处理的小鼠含有少超过9倍的OTI $CD8^+$T细胞，和比未接受抗原的静脉内注射的攻击对照小鼠少超过43倍的OTI $CD8^+$T细胞；在脾细胞中的应答是相似的。这些结果表明，F1aA-OVA-m_4-n_8(mGal-OVA)，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}(pGal-OVA)，和N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C降低在具有佐剂的OVA攻击后的OVA特异性免疫应答。

[0897] 16C.通过按照实施例16A和B描述的方案并且用如例如实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G中所述获得的通式1的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，F1b-OVA-ml-n_4-p_{34}和N-DOM Gly_3Ser OVA Gly_3Ser 6xHis-C，显示来自实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G的化合物降低在具有佐剂的OVA攻击后的OVA特异性免疫应答。

[0898] 16D.通过按照实施例16A和B所述的方案，并且用如例如实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F中所述获得的通式1和2的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}，and N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C，并用对应于X(X'或X")的抗原替代OVA，显示来自实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F的化合物降低在具有佐剂的抗原X攻击后的抗原X特异性免疫应答。

[0899] 实施例17

[0900] 药代动力学

[0901] 17A.根据制造商的说明用IRDye 800CW(LI-COR Biosciences)标记OVA以及融合蛋白N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C和N-OVA-Gly_3Ser-DOM-Gly_3Ser-6xHis-C(例如，如实施例10中所述制备)。使用Zeba脱盐柱(Thermo Scientific)去除未反应的染料。将每剂量在100μlPBS中50μg的经标记的蛋白质经静脉内或s.c.施用到C57BL/6小鼠(每组5只小鼠)中。在注射后的时间＝0，0.25，0.5，1，2，4，8，24，48，和96小时，将血液样品从尾尖收集

到涂布了肝素的毛细管中。样品在4℃储存，避光，直到分析。

[0902] 在分析当天，离心血液样品以除去细胞成分。将血浆转移到新的毛细管中并使用Odyssey红外成像系统(Odyssey Infrared Imaging System)(LI-COR Biosciences)扫描。信号在800nm通道获得。使用图像处理程序ImageJ(US National Institutes of Health)，每个样品近似为宽度2的线，并且将沿线的平均强度测定为在该时间点的循环蛋白质的量的相对度量。

[0903] 在图8中的OVA以及融合蛋白DOM-OVA和OVA-DOM的荧光信号(相对于在时间＝0的荧光标准化)对时间，以及双指数衰减的形式的曲线拟合表明ASGPR靶向性OVA融合蛋白比未修饰的OVA从循环中更迅速地清除。

[0904] 17B.通过按照实施例17A中描述的方案并且用无唾液酸因子VIII和因子VIII分别取代N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C融合蛋白和OVA，显示无唾液酸因子VIII比未修饰的因子VIII从循环中迅速得多地清除。

[0905] 实施例18

[0906] 生物分布

[0907] 18A.根据制造商的说明用Alexa Fluor 647(Life Technologies)标记OVA以及N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C融合蛋白(例如，如实施例10中所述制备)。使用Zeba脱盐柱(Thermo Scientific)去除未反应的染料。将每剂量在100μl PBS中50μg的经标记的蛋白质经静脉内或s.c.施用到C57BL/6小鼠(每组5只小鼠)中。注射后两小时，通过CO_2窒息使小鼠安乐死。使用IVIS光谱成像系统(IVIS Spectrum imaging system)(Caliper Life Sciences)对血液，心脏，肠，肾，肝，肺，胃，脾，和剩余躯体成像。使用Living Image软件(Caliper Life Sciences)获取数据并分析。制备肝和脾的单细胞悬浮液，并用在具有0.1％(w/v)BSA的PBS中的荧光缀合的针对MHC II，CD1d，CD3，CD4，CD8α，CD11b，CD11c，CD14，CD19，CD45，CD123，和/或Lin的的抗体染色。使用LSR II流式细胞仪和FACS Diva软件(BD Biosciences)分析样品。

[0908] 显示针对每种器官和每种蛋白质的荧光信号密度(光子/重量)的直方图表明，与用未经修饰的OVA处理的那些动物相比，在注射了N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C融合蛋白的动物中，在肝脏中存在最强的荧光信号。

[0909] 显示N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C和OVA阳性细胞百分比的直方图表明，与用未经修饰的OVA处理的那些动物相比，注射了N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C融合蛋白的动物具有显著更高的阳性肝细胞百分比。

[0910] 18B.通过按照实施例18A中描述的方案并且用无唾液酸因子VIII和因子VIII分别替代N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C融合蛋白和OVA，显示与用未经修饰的因子VIII处理的那些动物相比，注射了无唾液酸因子VIII的动物具有显著更高的阳性肝细胞百分比。

[0911] 18C.通过按照实施例18A中描述的方案并且用如例如实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G中所述获得的通式1的化合物替代N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C融合蛋白，显示与用OVA处理的那些动物相比，注射了来自实施例3A，4A，5B，6C，7B和19G的化合物的动物具有显著更高的阳性肝细胞百分比。

[0912] 18D.通过按照以下实施例18A和B所述的方案并且分别用如例如实施例1E，1G，2C，

10D，19I，19L，20B，20D和20F中所述获得的通式1和2的化合物替代F1aA-OVA-m_4-n_8，F1b-OVA-m_1-n_4-p_{34}，和N-DOM-Gly_3Ser-OVA-Gly_3Ser-6xHis-C，并用对应于X(X'或X")的抗原替代OVA，显示与用抗原X处理的那些动物相比，注射了来自实施例1E，1G，2C，10D，19I，19L，20B，20D和20F的化合物的动物具有显著更高的阳性肝细胞百分比。

[0913] 实施例19

[0914] F1m-OVA-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc

[0915] 19A.通式1102，其中R^3是NHAc，且R^4是OH

[0916] 在室温下将N-乙酰基-D-半乳糖胺(通式1101，其中R^3是NHAC，且R^4是OH)(5克，22.6mmol)加入到氯乙醇的搅拌溶液(200ml)中。将该溶液冷却至4℃，并且将乙酰氯滴加到该溶液中。将溶液升温至室温，然后加热至70℃。4小时后，在减压下除去未反应的氯乙醇。100ml乙醇加入到粗产物，将所得的溶液在碳的存在下进行搅拌2小时。将100ml乙醇加入到粗产物，将所得的溶液在碳的存在下搅拌2小时。将溶液过滤，并在减压下除去溶剂。使用相应的通式1102的产物N-(2-(2-氯乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺，无需进一步纯化。

[0917] 19B.通式1103，其中R^3是NHAc，且R^4是OH

[0918] 在实施例19A中制备的N-(2-(2-氯乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺(2克，7.4mmol)加入到DMF(100ml)和叠氮化钠溶液(4克，61.5mmol)的搅拌溶液中。将该溶液加热到90℃，保持12小时，然后过滤。减压除去残留的溶剂，并通过快速层析法(在二氯甲烷中的10％MeOH)纯化粗产物，得到相应的通式1103的产物N-(2-(2-叠氮基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺。

[0919] 19C.通式1104，其中R^3是NHAc，且R^4是OH

[0920] 在实施例19B中制备的N-(2-(2-叠氮基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺(2g，6.9mmol)加入到钯碳和乙醇(50ml)的溶液中。在氢气(3个大气压)下搅拌该溶液4小时。过滤所得的溶液并在减压下除去残留的溶剂，得到通式1104的相应产物中N-(2-(2-氨基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺，其无需进一步纯化而使用。

[0921] 19D.通式1105，其中R^3是NHAc，且R^4是OH

[0922] 将实施例19C中制备的N-(2-(2-氨基乙氧基)-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-3-基)乙酰胺(1.0g，3.78mmol)加入到在DMF(50ml)中的甲基丙烯酸酐(0.583克，3.78mmol)的溶液中。然后将三乙胺加入到该溶液中，在室温下在搅拌下反应2小时。2小时后，减压下除去过量的溶剂，并且通过快速层析法分离通式1105的相应的产物N-(2-((3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙基)甲基丙烯酰胺。

[0923] 19E.通式1107，其中p是30，q是4，R^3是NHAC，R^4为OH且R^8是CMP

[0924] 将经叠氮化物修饰的通式1106(其中q为4)的uRAFT剂(28mg)加入到在DMF中的实施例19D制备的N-(2-((3-乙酰氨基-4,5-二羟基-6-(羟甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙基)甲基丙烯酰胺(579mg，10.74mmol)和偶氮二异丁腈(2.2mg，0.0116mmol)。将反应混合物进行4次无-泵-解冻循环，然后在70℃搅拌。12小时后，通过加入甲醇从反应混合物沉淀通式1107的聚合物产物，其中p是30和q是4。从固体弃去溶剂并收集固体，通过减压除去残余的溶剂。

[0925] 19F.通式1109,其中X'是OVA,m是2,n是80

[0926] 卵清蛋白(5mg,0.00012mmol)加入到100μl的磷酸钠缓冲液(pH 8.0)并搅拌。对此溶液加入5mg通式1108的化合物,其中n是80。1小时后,通过离心大小排阻层析从溶液中除去通式1108的未反应的化合物。所得的含有通式1109的相应产物的缓冲溶液无需进一步纯化即用于下一反应。

[0927] 19G.通式1m,其中X'是OVA,m是2,n是80,P是30,q是4,R^3是NHAC和R^8是CMP

[0928] 将实施例19F制得的溶液加入100μl的磷酸钠缓冲液(pH 8.0),其中含有10mg在实施例19E制得的通式1107的产物。将反应搅拌2小时,然后经由离心大小排阻层析除去过量的通式1107,得到溶液中的通式1m的相应的异构体产物,其无需进一步纯化即可用于生物研究中。标题化合物的名称中R^3取代基显示为2NHAc。

[0929] 19H.通式1109的其他化合物

[0930] 通过按照实施例19F中所述的方案并且并用以下各项替代OVA:

[0931] • 阿昔单抗,

[0932] • 阿达木单抗,

[0933] • 阿加糖酶α,

[0934] • 阿加糖酶β,

[0935] • Aldeslukin,

[0936] • 阿葡糖苷酶α,

[0937] • 因子VIII,

[0938] • 因子IX,

[0939] • L-天冬酰胺酶,

[0940] • 拉罗尼酶,

[0941] • 奥曲肽,

[0942] • 苯丙氨酸氨裂解酶,

[0943] • 拉布立酶,

[0944] • 胰岛素(SEQ ID NO:5),

[0945] • GAD-65(SEQ ID NO:6),

[0946] • IGRP(SEQ ID NO:7)

[0947] • MBP(SEQ ID NO:8),

[0948] • MOG(SEQ ID NO:9),

[0949] • PLP(SEQ ID NO:10),

[0950] • MBP13-32(SEQ ID NO:11),

[0951] • MBP83-99(SEQ ID NO:12),

[0952] • MBP111-129(SEQ ID NO:13),

[0953] • MBP146-170(SEQ ID NO:14),

[0954] • MOG1-20(SEQ ID NO:15),

[0955] • MOG35-55(SEQ ID NO:16),

[0956] • PLP139-154(SEQ ID NO:17),

[0957] • MART1(SEQ ID NO:18),

[0958] • 酪氨酸酶(SEQ ID NO:19),

[0959] • PMEL(SEQ ID NO:20),

[0960] • 水通道蛋白4(SEQ ID NO:21),

[0961] • S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22),

[0962] • IRBP(SEQ ID NO:23),

[0963] • 伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6),

[0964] • α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的(SEQ ID NO:24),

[0965] • α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的(SEQ ID NO:25),

[0966] • α-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26),

[0967] • Omega麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27),

[0968] • Fel d 1A(UNIPROT P30438),

[0969] • 猫白蛋白(UNIPROT P49064),

[0970] • Can f 1(UNIPROT O18873),

[0971] • 狗白蛋白(UNIPROT P49822),和

[0972] • RhCE实例(UNIPROT P18577),

[0973] 得到通式1109,其中n是80的下列相应化合物:

[0974] • X是阿昔单抗,并且m是10,

[0975] • X是阿达木单抗,并且m是11,

[0976] • X是阿加糖酶α,并且m是14,

[0977] • X是阿加糖酶β,并且m是14,

[0978] • X是Aldeslukin,并且m是6,

[0979] • X是阿葡糖苷酶α,并且m是13,

[0980] • X是因子VIII,并且m是100,

[0981] • X是因子IX,并且m是18,

[0982] • X是L-天冬酰胺酶,并且m是5,

[0983] • X是拉罗尼酶,并且m是7,

[0984] • X是奥曲肽,并且m是1,

[0985] • X是苯丙氨酸氨裂解酶,并且m是12,

[0986] • X是拉布立酶,并且m是12,

[0987] • X是胰岛素(SEQ ID NO:5),并且m是2,

[0988] • X是GAD-65(SEQ ID NO:6),并且m是8,

[0989] • X是IGRP(SEQ ID NO:7),并且m是7,

[0990] • X是MBP(SEQ ID NO:8),并且m是6,

[0991] • X是MOG(SEQ ID NO:9),并且m是5,

[0992] • X是PLP(SEQ ID NO:10),并且m是8,

[0993] • X是MBP13-32(SEQ ID NO:11),并且m是1,

[0994] • X是MBP83-99(SEQ ID NO:12),并且m是1,

[0995] • X是MBP111-129(SEQ ID NO:13),并且m是1,

[0996] • X是MBP146-170(SEQ ID NO:14),并且m是2,

[0997] • X是MOG1-20(SEQ ID NO:15),并且m是1,

[0998] • X是MOG35-55(SEQ ID NO:16),并且m是2,

[0999] • X是PLP139-154(SEQ ID NO:17),并且m是3,

[1000] • X是MART1(SEQ ID NO:18),并且m是4,

[1001] • X是酪氨酸酶(SEQ ID NO:19),并且m是8,

[1002] • X是PMEL(SEQ ID NO:20),并且m是5,

[1003] • X是水通道蛋白4(SEQ ID NO:21),并且m是4,

[1004] • X是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22),并且m是12,

[1005] • X是IRBP(SEQ ID NO:23),并且m是21,

[1006] • X是伴花生球蛋白,并且m是21,

[1007] • X是A-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的(SEQ ID NO:24),并且m是1,

[1008] • X是A-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的(SEQ ID NO:25),并且m是1,

[1009] • X是A-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26),并且m是1,

[1010] • X是Ω麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27),并且m是1,

[1011] • X是Fel d 1,并且m是4,

[1012] • X是猫白蛋白,并且m是16,

[1013] • X是Can f 1,并且m是6,

[1014] • X是狗白蛋白,并且m是23,和

[1015] • X是RhCE实例,并且m是10。

[1016] 19I.通式1m的其他化合物

[1017] 通过按照实施例19G中描述的方案,并且替代通式1109的化合物,例如如实施例19H得到的化合物,得到通式1m的以下相应化合物:

[1018] • F1m-阿昔单抗-m_{10}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1019] • F1m-阿达木单抗-m_{11}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1020] • F1m-阿加糖酶α-m_{14}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1021] • F1m-阿加糖酶β-m_{14}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1022] • F1m-Aldeslukin-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1023] • F1m-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1024] • F1m-因子VIII-m_{100}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1025] • F1m-因子IX-m_{18}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1026] • F1m-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1027] • F1m-拉罗尼酶-m_7-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1028] • F1m-奥曲肽-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1029] • F1m-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1030] • F1m-拉布立酶-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1031] • F1m-胰岛素-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1032] • F1m-GAD-65-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1033] • F1m-IGRP-m_7-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1034] • F1m-MBP-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1035] • F1m-MOG-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1036] • F1m-PLP-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1037] • F1m-MBP13-32-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1038] • F1m-MBP83-99-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1039] • F1m-MBP111-129-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1040] • F1m-MBP146-170-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1041] • F1m-MOG1-20-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1042] • F1m-MOG35-55-m_2-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1043] • F1m-PLP139-154-m_3-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1044] • F1m-MART1-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1045] • F1m-酪氨酸酶-m_8-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1046] • F1m-PMEL-m_5-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1047] • F1m-水通道蛋白4-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1048] • F1m-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1049] • F1m-IRBP-m_{21}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1050] • F1m-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1051] • F1m-α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1052] • F1m-α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1053] • F1m-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1054] • F1m-Ω麦醇溶蛋白-m_1-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1055] • F1m-Fel d 1-m_4-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1056] • F1m-猫白蛋白-m_{16}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1057] • F1m-Can f 1-m_6-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1058] • F1m-狗白蛋白-m_{23}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,and

[1059] • F1m-RhCE-m_{10}-n_{80}-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc.

[1060] 19J.通式1107,其中其中p是30,q是8,R^3是OH,R^4为OH且R^8是CMP

[1061] 通过按照实施例19A描述的方案,并且用半乳糖替代N-乙酰基-D-半乳糖胺基-D-半乳糖胺,并且按照直到实施例19E描述的方案,除了使用通式1106(其中q是8)的经叠氮化物修饰的uRAFT剂外,得到通式1107的化合物,其中p是30,q是8,R^3是OH,R^4为OH且R^8是CMP。

[1062] 19K.通式1109,其中n是62,并且其中X’和m如在实施例19H中

[1063] 通过按照实施例19F中所述的方案,将OVA替代为如实施例19H中所描述的化合物,并利用通式1108的化合物,其中n是62,得到通式1109的相应化合物,其中n是62。

[1064] 19L.通式1m的其他化合物

[1065] 通过遵循实施例19G中描述的方案,并且将通式1107的化合物替代为实施例19J中得到的化合物,并且将通式1109的化合物替代为实施例19K中得到的化合物,得到通式1m的下列相应化合物:

[1066] • F1m-阿昔单抗-m_{10}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1067] • F1m-阿达木单抗-m_{11}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1068] • F1m-阿加糖酶α-m_{14}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1069] • F1m-阿加糖酶β-m_{14}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1070] • F1m-Aldeslukin-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1071] • F1m-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1072] • F1m-因子VIII-m_{100}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1073] • F1m-因子IX-m_{18}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1074] • F1m-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1075] • F1m-拉罗尼酶-m_7-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1076] • F1m-奥曲肽-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1077] • F1m-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1078] • F1m-拉布立酶-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1079] • F1m-胰岛素-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1080] • F1m-GAD-65-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1081] • F1m-IGRP-m_7-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1082] • F1m-MBP-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1083] • F1m-MOG-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1084] • F1m-PLP-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1085] • F1m-MBP13-32-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1086] • F1m-MBP83-99-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1087] • F1m-MBP111-129-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1088] • F1m-MBP146-170-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1089] • F1m-MOG1-20-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1090] • F1m-MOG35-55-m_2-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1091] • F1m-PLP139-154-m_3-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1092] • F1m-MART1-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1093] • F1m-酪氨酸酶-m_8-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1094] • F1m-PMEL-m_5-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1095] • F1m-水通道蛋白4-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1096] • F1m-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1097] • F1m-IRBP-m_{21}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1098] • F1m-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1099] • F1m-α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1100] • F1m-α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1101] • F1m-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1102] • F1m-Ω麦醇溶蛋白-m_1-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1103] • F1m-Fel d 1-m_4-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1104] • F1m-猫白蛋白-m_{16}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1105] • F1m-Can f 1-m_6-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1106] • F1m-狗白蛋白-m_{23}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,and

[1107] • F1m-RhCE-m_{10}-n_{62}-p_{30}-q_8-CMP-2OH.

[1108] 实施例20

[1109] F1n-胰岛素-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc

[1110] 20A.通式1202,其中X'是胰岛素,m是2且n是1

[1111] 将重组人胰岛素(5mg)加到100μl含有10μl三乙胺的DMF中并搅拌直至胰岛素成为可溶的。向该溶液中加入10mg(0.0161mmol)通式1201的接头前体,其中n是1(从???获得),将反应物搅拌。1小时后,加入1.3ml叔甲基醚以分离通式1202的相应的产物,将其回收为沉淀物。在减压下除去残留的DMF和叔丁基甲基醚。通过液相层析法,质谱法和聚丙烯酰胺凝胶电泳表征证实了产物的身份。通式1202的经修饰的胰岛素产物无需进一步纯化即可使用。

[1112] 20B.通式1n,其中X'是胰岛素,m是2,n是1,p是30,q是4和R^8是CMP

[1113] 将实施例20A得到的通式1202的产物再悬浮于100μl DMF中。加入在实施例19E得到的通式1107的聚合物产物(10mg),将反应物搅拌1小时。1小时后,通过加入二氯甲烷(1.3ml)沉淀反应产物。过滤产物并在减压下除去残留的溶剂。然后在500μl PBS中重悬浮粗产物,并通过离心大小排阻层析除去低分子量组分以得到通式1n的相应的异构体产物。通过液相层析法,质谱法和聚丙烯酰胺盖尔电泳表征证实了产物的身份。通过液相层析法,质谱法和聚丙烯酰胺凝胶电泳表征证实了产物的身份。通式1202的经修饰的胰岛素产物无需进一步纯化即可使用。

[1114] 20C.通式1202的其他化合物

[1115] 通过遵循实施例19F中描述的方案,并将OVA胰岛素替代为以下:

[1116] • 阿昔单抗,

[1117] • 阿达木单抗,

[1118] • 阿加糖酶α,

[1119] • 阿加糖酶β,

[1120] • Aldeslukin,

[1121] • 阿葡糖苷酶α,

[1122] • 因子VIII,

[1123] • 因子IX,

[1124] • L-天冬酰胺酶,

[1125] • 拉罗尼酶,

[1126] • 奥曲肽,

[1127] • 苯丙氨酸氨裂解酶,

[1128] • 拉布立酶,

[1129] • GAD-65(SEQ ID NO:6),

[1130] • IGRP(SEQ ID NO:7)

[1131] • MBP(SEQ ID NO:8),

[1132] • MOG(SEQ ID NO:9),

[1133] • PLP(SEQ ID NO:10),

[1134] • MBP13-32(SEQ ID NO:11),

[1135] • MBP83-99(SEQ ID NO:12),

[1136] • MBP111-129(SEQ ID NO:13),

[1137] • MBP146-170(SEQ ID NO:14),

[1138] • MOG1-20(SEQ ID NO:15),

[1139] • MOG35-55(SEQ ID NO:16),

[1140] • PLP139-154(SEQ ID NO:17),

[1141] • MART1(SEQ ID NO:18),

[1142] • 酪氨酸酶(SEQ ID NO:19),

[1143] • PMEL(SEQ ID NO:20),

[1144] • 水通道蛋白4(SEQ ID NO:21),

[1145] • S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22),

[1146] • IRBP(SEQ ID NO:23),

[1147] • 伴花生球蛋白(UNIPROT Q6PSU6),

[1148] • A-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的(SEQ ID NO:24),

[1149] • A-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的(SEQ ID NO:25),

[1150] • A-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26),

[1151] • Ω麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27),

[1152] • Fel d 1A(UNIPROT P30438),

[1153] • 猫白蛋白(UNIPROT P49064),

[1154] • Can f 1(UNIPROT O18873),

[1155] • 狗白蛋白(UNIPROT P49822),和

[1156] • RhCE实例(UNIPROT P18577),

[1157] 得到通式1202下列相应化合物,其中n是1:

[1158] • X是阿昔单抗,并且m是10,

[1159] • X是阿达木单抗,并且m是11,

[1160] • X是阿加糖酶α,并且m是14,

[1161] • X是阿加糖酶β,并且m是14,

[1162] • X是Aldeslukin,并且m是6,

[1163] • X是阿葡糖苷酶α,并且m是13,

[1164] • X是因子VIII,并且m是100,

[1165] • X是因子IX,并且m是18,

[1166] • X是L-天冬酰胺酶,并且m是5,

[1167] • X是拉罗尼酶,并且m是7,

[1168] • X是奥曲肽,并且m是1,

[1169] • X是苯丙氨酸氨裂解酶,并且m是12,

[1170] • X是拉布立酶,并且m是12,

[1171] • X是GAD-65(SEQ ID NO:6),并且m是8,

[1172] • X是IGRP(SEQ ID NO:7),并且m是7,

[1173] • X是MBP(SEQ ID NO:8),并且m是6,

[1174] • X是MOG(SEQ ID NO:9),并且m是5,

[1175] • X是PLP(SEQ ID NO:10),并且m是8,

[1176] • X是MBP13-32(SEQ ID NO:11),并且m是1,

[1177] • X是MBP83-99(SEQ ID NO:12),并且m是1,

[1178] • X是MBP111-129(SEQ ID NO:13),并且m是1,

[1179] • X是MBP146-170(SEQ ID NO:14),并且m是2,

[1180] • X是MOG1-20(SEQ ID NO:15),并且m是1,

[1181] • X是MOG35-55(SEQ ID NO:16),并且m是2,

[1182] • X是PLP139-154(SEQ ID NO:17),并且m是3,

[1183] • X是MART1(SEQ ID NO:18),并且m是4,

[1184] • X是酪氨酸酶(SEQ ID NO:19),并且m是8,

[1185] • X是PMEL(SEQ ID NO:20),并且m是5,

[1186] • X是水通道蛋白4(SEQ ID NO:21),并且m是4,

[1187] • X是S-抑制蛋白(SEQ ID NO:22),并且m是12,

[1188] • X是IRBP(SEQ ID NO:23),并且m是21,

[1189] • X是伴花生球蛋白,并且m是21,

[1190] • X是A-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的(SEQ ID NO:24),并且m是1,

[1191] • X是A-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的(SEQ ID NO:25),并

[1192] 且m是1,

[1193] • X是A-麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:26),并且m是1,

[1194] • X是Ω麦醇溶蛋白(SEQ ID NO:27),并且m是1,

[1195] • X是Fel d 1,并且m是4,

[1196] • X是猫白蛋白,并且m是16,

[1197] • X是Can f 1,并且m是6,

[1198] • X是狗白蛋白,并且m是23,和

[1199] • X是RhCE实例,并且m是10。

[1200] 20D.通式1n的其他化合物

[1201] 通过按照在实施例B中描述的步骤,并且替代例如如实施例20C所得的通式1202的化合物,得到通式1m的以下相应化合物:

[1202] • F1n-阿昔单抗-m_{10}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1203] • F1n-阿达木单抗-m_{11}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1204] • F1n-阿加糖酶α-m_{14}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1205] • F1n-阿加糖酶β-m_{14}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1206] • F1n-Aldeslukin-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1207] • F1n-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1208] • F1n-因子VIII-m_{100}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1209] • F1n-因子IX-m_{18}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1210] • F1n-L-天冬酰胺酶-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1211] • F1n-拉罗尼酶-m_7-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1212] • F1n-奥曲肽-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc,

[1213] • F1n-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1214] • F1n-拉布立酶-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1215] • F1n-GAD-65-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1216] • F1n-IGRP-m_7-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1217] • F1n-MBP-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1218] • F1n-MOG-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1219] • F1n-PLP-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1220] • F1n-MBP13-32-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1221] • F1n-MBP83-99-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1222] • F1n-MBP111-129-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1223] • F1n-MBP146-170-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1224] • F1n-MOG1-20-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1225] • F1n-MOG35-55-m_2-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1226] • F1n-PLP139-154-m_3-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1227] • F1n-MART1-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1228] • F1n-酪氨酸酶-m_8-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1229] • F1n-PMEL-m_5-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1230] • F1n-水通道蛋白4-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1231] • F1n-S-抑制蛋白-m_{12}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1232] • F1n-IRBP-m_{21}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1233] • F1n-伴花生球蛋白-m_{21}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1234] • F1n-α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1235] • F1n-α-麦醇溶蛋白“33聚体”，脱酰氨基的-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1236] • F1n-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1237] • F1n-Ω麦醇溶蛋白-m_1-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1238] • F1n-Fel d 1-m_4-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1239] • F1n-猫白蛋白-m_{16}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1240] • F1n-Can f 1-m_6-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，

[1241] • F1n-狗白蛋白-m_{23}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc，和

[1242] • F1n-RhCE-m_{10}-n_1-p_{30}-q_4-CMP-2NHAc。

[1243] 20E.通式1202，其中n是33，并且其中X’和m是如在实施例20C中

[1244] 通过按照实施例19F中描述的方案，并且将胰岛素替代为实施例20C中描述的化合物并使用通式1201的化合物，其中n是33，得到通式1202的相应化合物，其中n是33。

[1245] 20F.通式1n的其他化合物

[1246] 通过按照实施例20B中描述的方案，将通式1107的化合物替代为在实施例19J中得到的化合物，并且将通式1202的化合物替代为在实施例20E中得到的化合物，得到通式1n下列相应化合物：

[1247] • F1n-阿昔单抗-m_{10}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH，

[1248] • F1n-阿达木单抗-m_{11}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH，

[1249] • F1n-阿加糖酶α-m_{14}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1250] • F1n-阿加糖酶β-m_{14}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1251] • F1n-Aldeslukin-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1252] • F1n-阿葡糖苷酶α-m_{13}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1253] • F1n-因子VIII-m_{100}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1254] • F1n-因子IX-m_{18}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1255] • F1n-L-天冬酰胺酶-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1256] • F1n-拉罗尼酶-m_7-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1257] • F1n-奥曲肽-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1258] • F1n-苯丙氨酸氨裂解酶-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1259] • F1n-拉布立酶-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1260] • F1n-GAD-65-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1261] • F1n-IGRP-m_7-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1262] • F1n-MBP-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1263] • F1n-MOG-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1264] • F1n-PLP-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1265] • F1n-MBP13-32-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1266] • F1n-MBP83-99-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1267] • F1n-MBP111-129-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1268] • F1n-MBP146-170-m_2-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1269] • F1n-MOG1-20-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1270] • F1n-MOG35-55-m_2-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1271] • F1n-PLP139-154-m_3-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1272] • F1n-MART1-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1273] • F1n-酪氨酸酶-m_8-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1274] • F1n-PMEL-m_5-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1275] • F1n-水通道蛋白4-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1276] • F1n-S-抑制蛋白-m_{12}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1277] • F1n-IRBP-m_{21}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1278] • F1n-伴花生球蛋白-m_{21}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1279] • F1n-α-麦醇溶蛋白“33聚体”天然的-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1280] • F1n-α-麦醇溶蛋白“33聚体”,脱酰氨基的-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1281] • F1n-α-麦醇溶蛋白-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1282] • F1n-Ω麦醇溶蛋白-m_1-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1283] • F1n-Fel d 1-m_4-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1284] • F1n-猫白蛋白-m_{16}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1285] • F1n-Can f 1-m_6-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,

[1286] • F1n-狗白蛋白-m_{23}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH,和

[1287] • F1n-RhCE-m_{10}-n_{33}-p_{30}-q_8-CMP-2OH。

[1288] 实施例21

[1289] 从循环中清除OVA特异性抗体

[1290] 为诱导产生用于后续消耗的OVA特异性抗体，对C57BL/6小鼠静脉内注射多达五剂的10μg OVA，直到如通过ELISA测定的，抗OVA IgG抗体在血浆中效价达到3(图9A)。通过将收集到EDTA包被的试管中的血液在2000×g下在室温下离心10分钟制备血浆样品，并储存于-20℃直至分析。将滴度定义为具有可检测的抗OVA IgG的血浆的最大倍稀释的log 10。这里，以10-，50-，100-，500-，1,000-，5,000-，10,000-，和50,000-倍的稀释度测定血浆样品，产生0，1，1.7，2，2.7，3，3.7，4，和4.7的潜在效价测量。对在五剂的10μgOVA后效价在3以下的小鼠，给予两剂额外的以10μg CpG-B为佐剂的10μgOVA以提高抗-OVA IgG的产生，从而增加可用于消耗的循环抗OVA IgG抗体的量(图9B)。

[1291] 为了评估肝细胞ASGPR靶向OVA对于抗OVA抗体清除的功效，对具有循环抗OVA IgG的小鼠静脉内注射盐水或含有摩尔当量的DOM和OVA，DOM-OVA，或OVA-DOM的盐水。具体地，如图9所示，用摩尔当量的10，50，100，或200μg的OVA处理小鼠。在相对于处理注射时间的时间t＝-1天，+3小时，1天，+7天，收集血液样品，以通过血浆的ELISA分析评估抗OVA IgG在循环中的量。预期抗OVA IgG抗体从循环中的清除将减少抗-OVA IgG在血浆中的量，并因此降低通过ELISA测定的血浆抗OVA IgG的效价。在仅用OVA免疫和用DOM-OVA或OVA-DOM处理的小鼠中，抗OVA IgG的效价分别减少了多达3或2，表示循环抗OVA IgG的量降低1000-或100-倍，这比使用盐水或DOM和OVA的对照处理有效多达50倍(图9A)。在用伴有佐剂CpG-B的OVA免疫的小鼠中，没有观察到循环抗OVA IgG的清除(图9B)。

[1292] 实施例22

[1293] NOD小鼠

[1294] 非肥胖糖尿病(NOD)小鼠易受自身免疫性糖尿病的自发发作，其是对多种胰腺自身抗原的自身免疫应答的结果。糖尿病在NOD小鼠中由于胰岛炎而形成，所述胰岛炎的特征在于各种白细胞对胰岛的渗透。

[1295] 为了评价治疗糖尿病的功效，从6周龄开始，将NOD小鼠分为对照或测试组，并且用测试组合物(10μg)或无活性的对照如盐水通过每周静脉内注射处理。注射持续连续18周。

[1296] 每周测定小鼠的血糖浓度。在实验过程中保持低于300mg/ml的血液葡萄糖浓度的小鼠被视为非糖尿病。另外，在研究结束时，收获小鼠的胰腺，并且通过免疫组织化学确定将在胰腺中的T细胞浸润作为对胰岛的评估。通过与用盐水处理和发展为糖尿病的小鼠相比，自身抗原特异性CD8T细胞的消耗评估耐受诱导。自身抗原特异性CD8T细胞的存在是通过ELISpot测定法测定的。

[1297] 当如上所述进行测试，通式1和2的组合物，其中X是胰岛素，如F1m-胰岛素-m2-n1-p30-q4-2NAcGAL，显示用于治疗糖尿病的功效。

[1298] 尽管本公开已参考其具体的实施方案进行描述，本领域技术人员应当理解可以进行多种改变，并且在不背离本公开的真实精神和范围的前提下替代等同方案。此外，可以进行许多修改以使特定情况，材料，物质组成，方法，方法步骤或步骤适应本公开的目标，精神和范围。所有这些修改意在位于所附权利要求书的范围之内。以上引用的所有专利和出版物都通过引用并入本文。

序列表

<110> 洛桑聚合联合学院（ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE）
阿诺基昂股份公司(ANOKION SA)

<120> 靶向糖的治疗剂

<130> 2968.10US02

<150> 61/942,942
<151> 2014-02-21

<160> 31

[0001]
<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> His tag

<400> 1

His His His His His His
1 5

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> Gly3Ser

<400> 2

Gly Gly Gly Ser

1

[0002]

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<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

20

<210> 4

<210> 22

<211> PRT

<212> 智人

<213>

<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
20

[0003]

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

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

[0004]

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

<210> 6

<211> 585

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

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

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

[0005]

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

[0006]

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
290 295 300

Asp Glu Arg Gly Lys Met Ile Pro Ser Asp Leu Glu Arg Arg Ile Leu
305 310 315 320

[0007]

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
385 390 395 400

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

[0008]

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
465 470 475 480

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

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

[0009]

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

<212> PRT

<213> 智人

<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

[0010]

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

[0011]

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

[0012]

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> 智人

<400> 8

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

[0013]

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

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

[0014]

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

[0015]

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

<210> 9

<211> 247

<212> PRT

<213> 智人

<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

[0016]

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

[0017]

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

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

<211> 277

<212> PRT

<213> 智人

<400> 10

[0018]

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

[0019]

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

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

[0020]

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> 智人

<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> 智人

[0021]

<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> 智人

<400> 13

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

1 5 10 15

Tyr Gly Gly

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

[0022] 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

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Gly Gln Phe Arg Val Ile Gly Pro Arg His Pro Ile Arg Ala Leu Val

1 5 10 15

Gly Asp Glu Val
20

<210> 16
<211> 20
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

[0023] Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Pro Pro Phe Ser Arg Trp His Leu Tyr
1 5 10 15

Arg Asn Gly Lys
20

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe Val Gly Ile

1 5 10 15

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

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

[0024]

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

<210> 19
<211> 529
[0025] <212> PRT
<213> 智人

<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
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

[0026]

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

[0027]

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

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

[0028]

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

[0029]

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

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

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

[0030]

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

[0031]

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

[0032]

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

[0033]

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

[0034]

Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Gly Glu Gly Asp Ala Phe Glu Leu
500 505 510

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

[0035]

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

<212> PRT

<213> 智人

<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

[0036]

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

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

[0037]

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

[0038]

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

<210> 22

<211> 405

<212> PRT

<213> 智人

<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

[0039]

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

[0040]

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
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

[0041]

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

[0042]

Asn Asp Val Asp Glu
405

<210> 23

<211> 1247

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

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

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

[0043]

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

[0044]

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

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

[0045]

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

[0046]

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

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

[0047]

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

[0048]

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

Trp Gln Gln Leu Val Asp Thr Ala Ala Leu Val Ile Asp Leu Arg Tyr
770 775 780

[0049]

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

[0050]

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
1010 1015 1020

[0051]

Val Phe Glu Glu Leu Ile Lys Phe Ser Phe His Thr Asn Val Leu
1025 1030 1035

Glu Asp Asn Ile Gly Tyr Leu Arg Phe Asp Met Phe Gly Asp Gly
1040 1045 1050

Glu Leu Leu Thr Gln Val Ser Arg Leu Leu Val Glu His Ile Trp
1055 1060 1065

Lys Lys Ile Met His Thr Asp Ala Met Ile Ile Asp Met Arg Phe
1070 1075 1080

Asn Ile Gly Gly Pro Thr Ser Ser Ile Pro Ile Leu Cys Ser Tyr
1085 1090 1095

Phe Phe Asp Glu Gly Pro Pro Val Leu Leu Asp Lys Ile Tyr Ser
1100 1105 1110

Arg Pro Asp Asp Ser Val Ser Glu Leu Trp Thr His Ala Gln Val
1115 1120 1125

Val Gly Glu Arg Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Met Val Ile Leu Thr
1130 1135 1140

[0052]

Ser Ser Val Thr Ala Gly Thr Ala Glu Glu Phe Thr Tyr Ile Met
1145 1150 1155

Lys Arg Leu Gly Arg Ala Leu Val Ile Gly Glu Val Thr Ser Gly
1160 1165 1170

Gly Cys Gln Pro Pro Gln Thr Tyr His Val Asp Asp Thr Asn Leu
1175 1180 1185

Tyr Leu Thr Ile Pro Thr Ala Arg Ser Val Gly Ala Ser Asp Gly

1190 1195 1200

Ser Ser Trp Glu Gly Val Gly Val Thr Pro His Val Val Val Pro
1205 1210 1215

Ala Glu Glu Ala Leu Ala Arg Ala Lys Glu Met Leu Gln His Asn
1220 1225 1230

Gln Leu Arg Val Lys Arg Ser Pro Gly Leu Gln Asp His Leu
1235 1240 1245

[0053]

<210> 24

<211> 33

<212> PRT

<213> 小麦 (Triticum aestivum)

<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

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α-麦醇溶蛋白-33-个碱基，脱酰氨基的

<400> 25

[0054]

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

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> 小麦（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

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 小麦 (Triticum aestivum)

[0055]

<400> 27

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

<210> 28
<211> 519
<212> PRT
<213> 智人

<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

[0056]

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

[0057]

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
225 230 235 240

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

[0058]

Val Phe Ser Ser Ser Ala Asn Leu Ser Gly Ile Ser Ser Ala Glu Ser
305 310 315 320

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
385 390 395 400

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

[0059]

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 His His His His His His

515

<210> 29

<211> 519

<212> PRT

<213> 人工序列

[0060]

<220>

<223> 融合蛋白

<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

[0061]

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

His His Ala Asn Glu Asn Ile Phe Tyr Cys Pro Ile Ala Ile Met Ser
145 150 155 160

Ala Leu Ala Met Val Tyr Leu Gly Ala Lys Asp Ser Thr Arg Thr Gln
165 170 175

Ile Asn Lys Val Val Arg Phe Asp Lys Leu Pro Gly Phe Gly Asp Ser
180 185 190

Ile Glu Ala Gln Cys Gly Thr Ser Val Asn Val His Ser Ser Leu Arg
195 200 205

Asp Ile Leu Asn Gln Ile Thr Lys Pro Asn Asp Val Tyr Ser Phe Ser
210 215 220

[0062]

Leu Ala Ser Arg Leu Tyr Ala Glu Glu Arg Tyr Pro Ile Leu Pro Glu
225 230 235 240

Tyr Leu Gln Cys Val Lys Glu Leu Tyr Arg Gly Gly Leu Glu Pro Ile
245 250 255

Asn Phe Gln Thr Ala Ala Asp Gln Ala Arg Glu Leu Ile Asn Ser Trp
260 265 270

Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg Asn Val Leu Gln Pro Ser

275 280 285

Ser Val Asp Ser Gln Thr Ala Met Val Leu Val Asn Ala Ile Val Phe
290 295 300

Lys Gly Leu Trp Glu Lys Ala Phe Lys Asp Glu Asp Thr Gln Ala Met
305 310 315 320

Pro Phe Arg Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Pro Val Gln Met Met Tyr
325 330 335

[0063]

Gln Ile Gly Leu Phe Arg Val Ala Ser Met Ala Ser Glu Lys Met Lys
340 345 350

Ile Leu Glu Leu Pro Phe Ala Ser Gly Thr Met Ser Met Leu Val Leu
355 360 365

Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu Ser Ile Ile Asn
370 375 380

Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asn Val Met Glu Glu Arg
385 390 395 400

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

[0064]

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

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合蛋白

<400> 30

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

[0065]

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

[0066]

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

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
225 230 235 240

Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu Glu
245 250 255

[0067]

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

305 310 315 320

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

[0068]

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

[0069]

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

His Ser Ser Leu Arg Asp Ile Leu Asn Gln Ile Thr Lys Pro Asn Asp
595 600 605

[0070]

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

[0071]

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
835 840 845

[0072]

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

<212> PRT

<213> 智人

<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

[0073]

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

[0074]

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

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
225 230 235 240

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

[0075]

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
305 310 315 320

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

[0076]

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

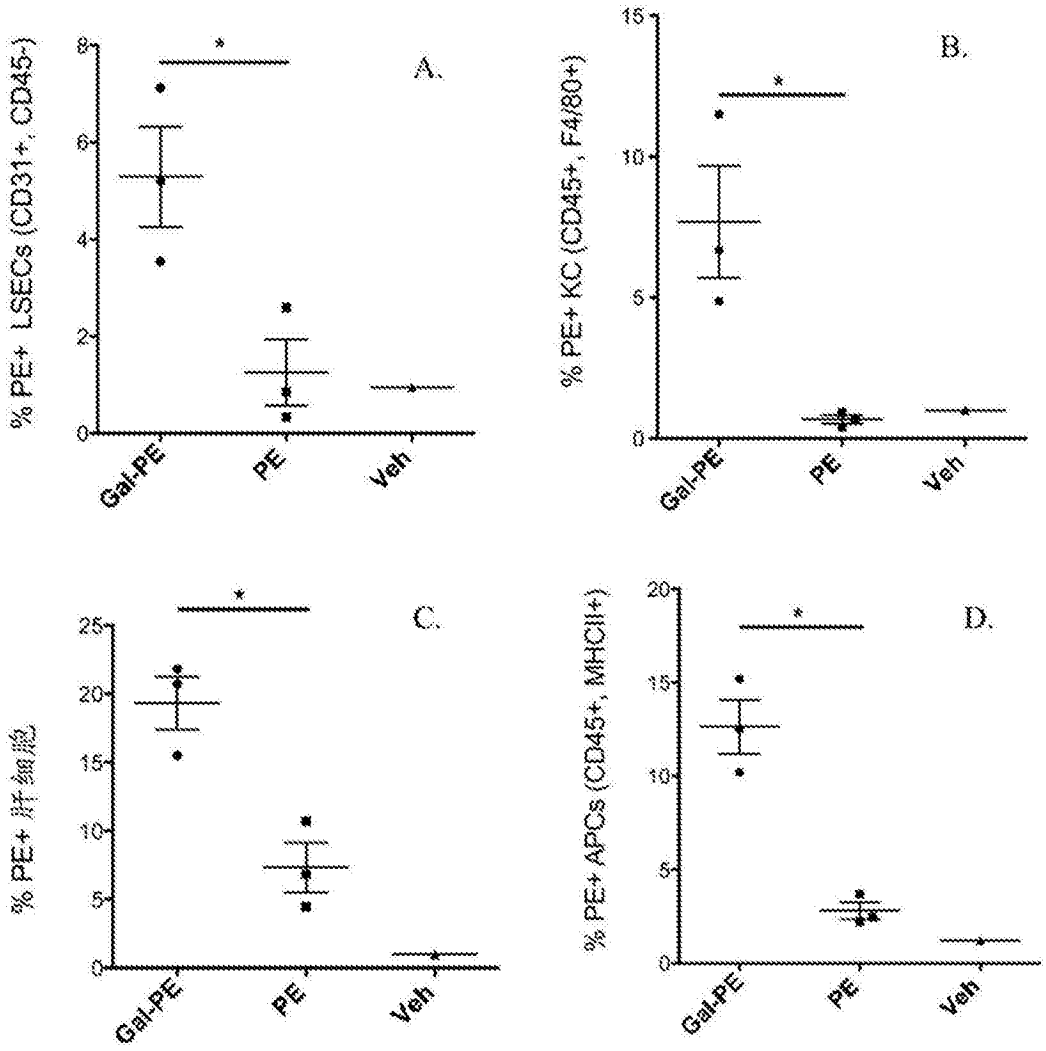

A.
% PE+ LSECs (CD31+, CD45-)
Gal-PE
PE
Veh
B.
% PE+ KC (CD45+, F4/80+)
C.
% PE+ 肝细胞
D.
% PE+ APCs (CD45+, MHCII+)

图1

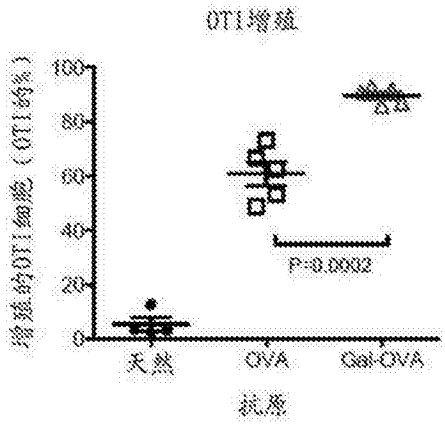

OT1增殖
增殖的OT1细胞（OT1的%）
P=0.0002
天然
OVA
Gal-OVA
抗原

图2

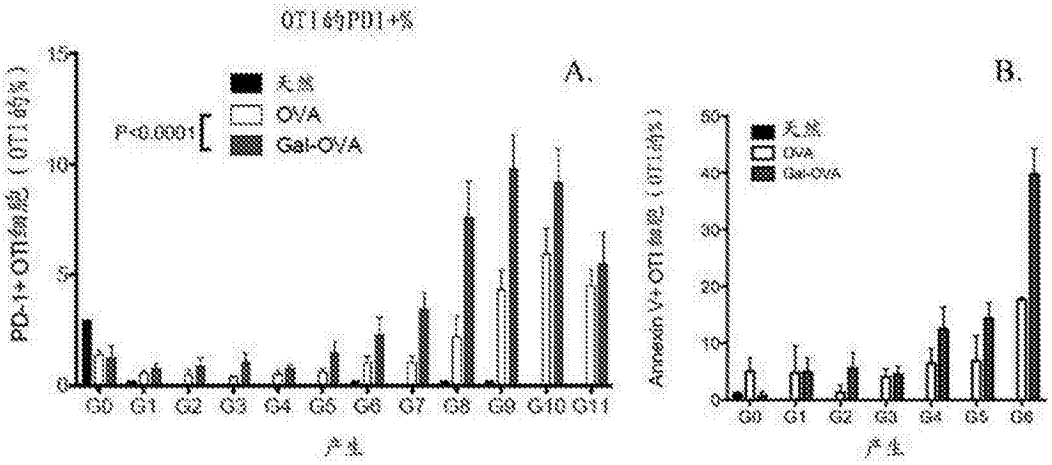

OT1的PD1+%
A.
B.
天然
OVA
Gal-OVA
P<0.0001
PD-1+OT1细胞（OT1的%）
Annexin V+OT1细胞（OT1的%）
G0 G1 G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11
产生

图3

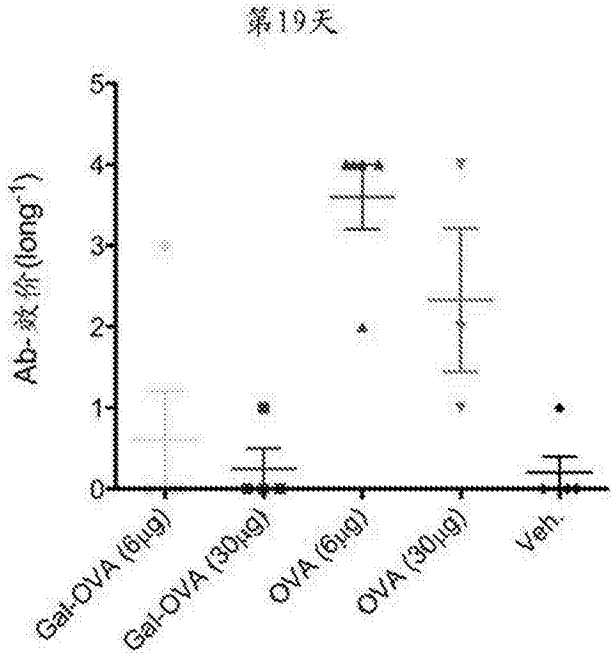

第19天
Ab-效价(log-1)
Gal-OVA (6μg)
Gal-OVA (30μg)
OVA (6μg)
OVA (30μg)
Veh.

图4

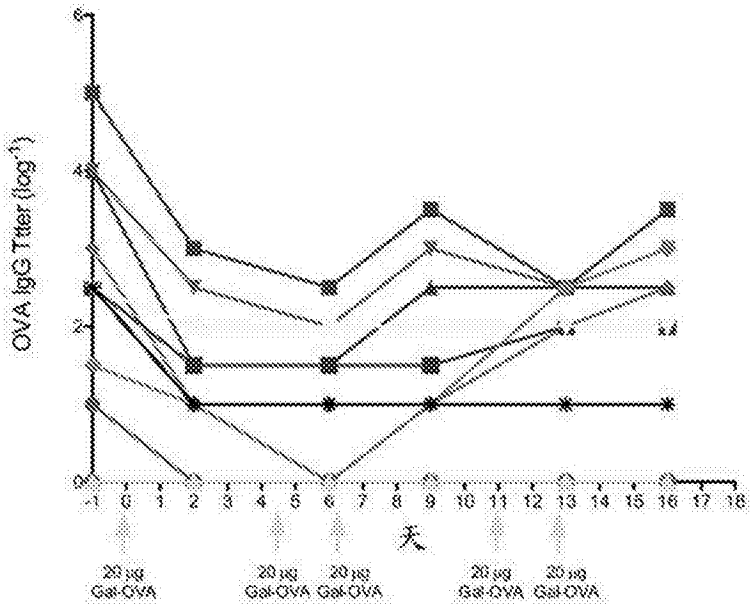

OVA IgG Titer (log^{-1})
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
天
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA
20 μg Gal-OVA

图5

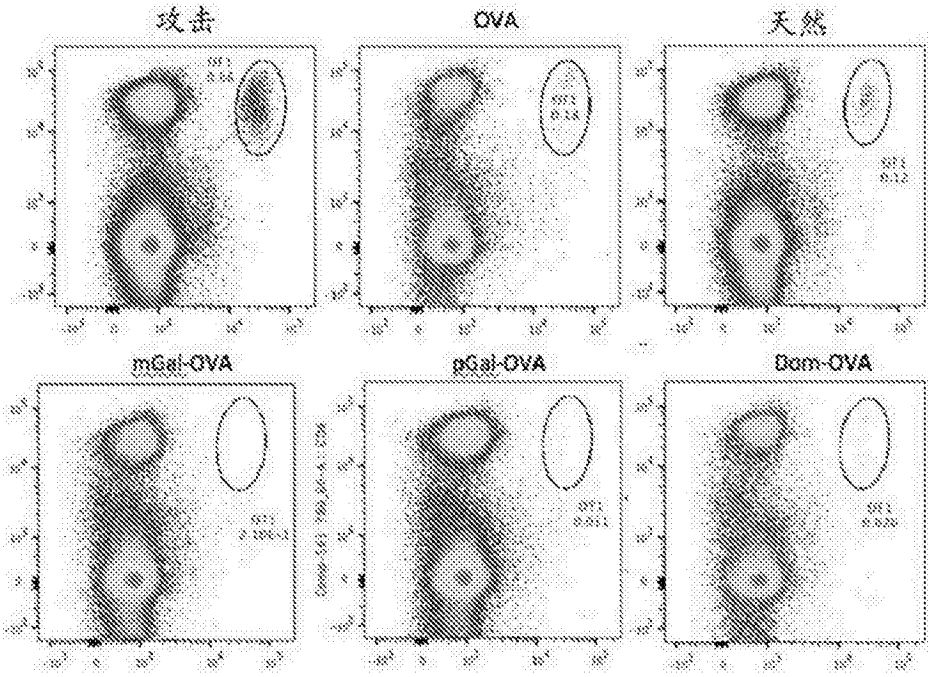

攻击
OVA
天然
mGal-OVA
pGal-OVA
Dam-OVA

图6

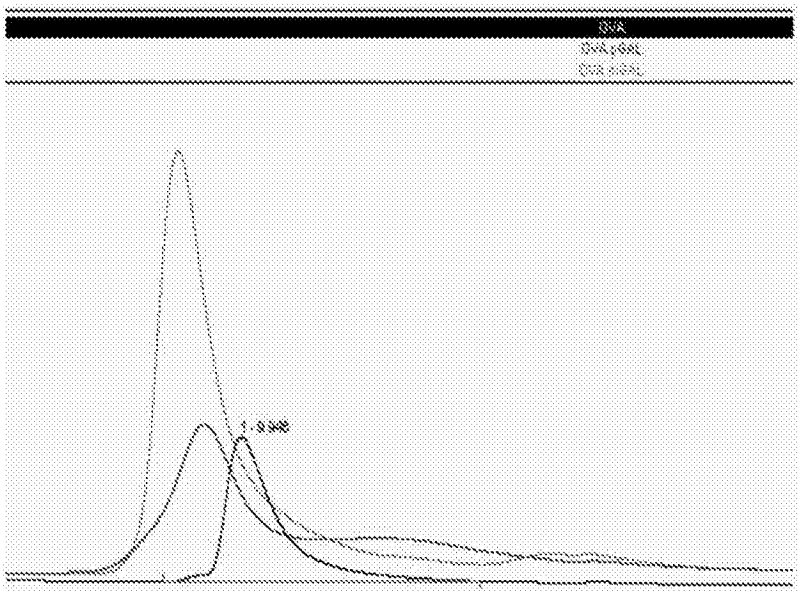


图7A

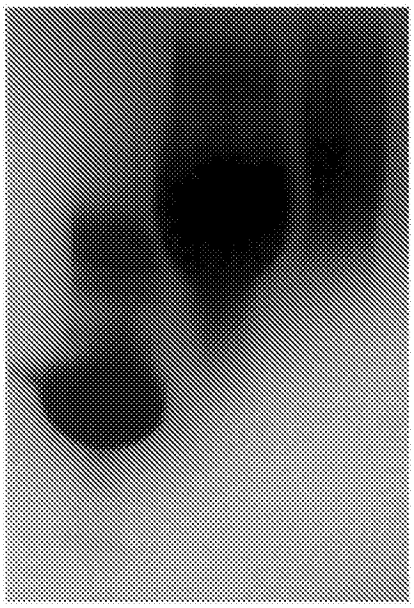


图7B

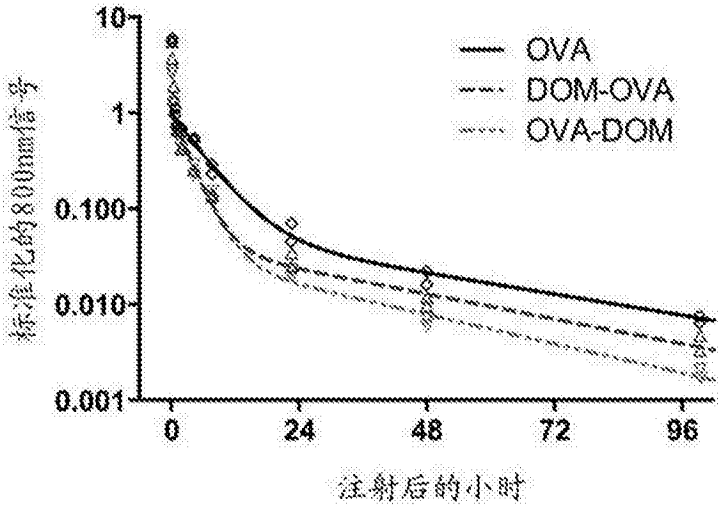

10
1
0.100
0.010
0.001
标准化的800nm信号
0
24
48
72
96
注射后的小时
OVA
DOM-OVA
OVA-DOM

图8

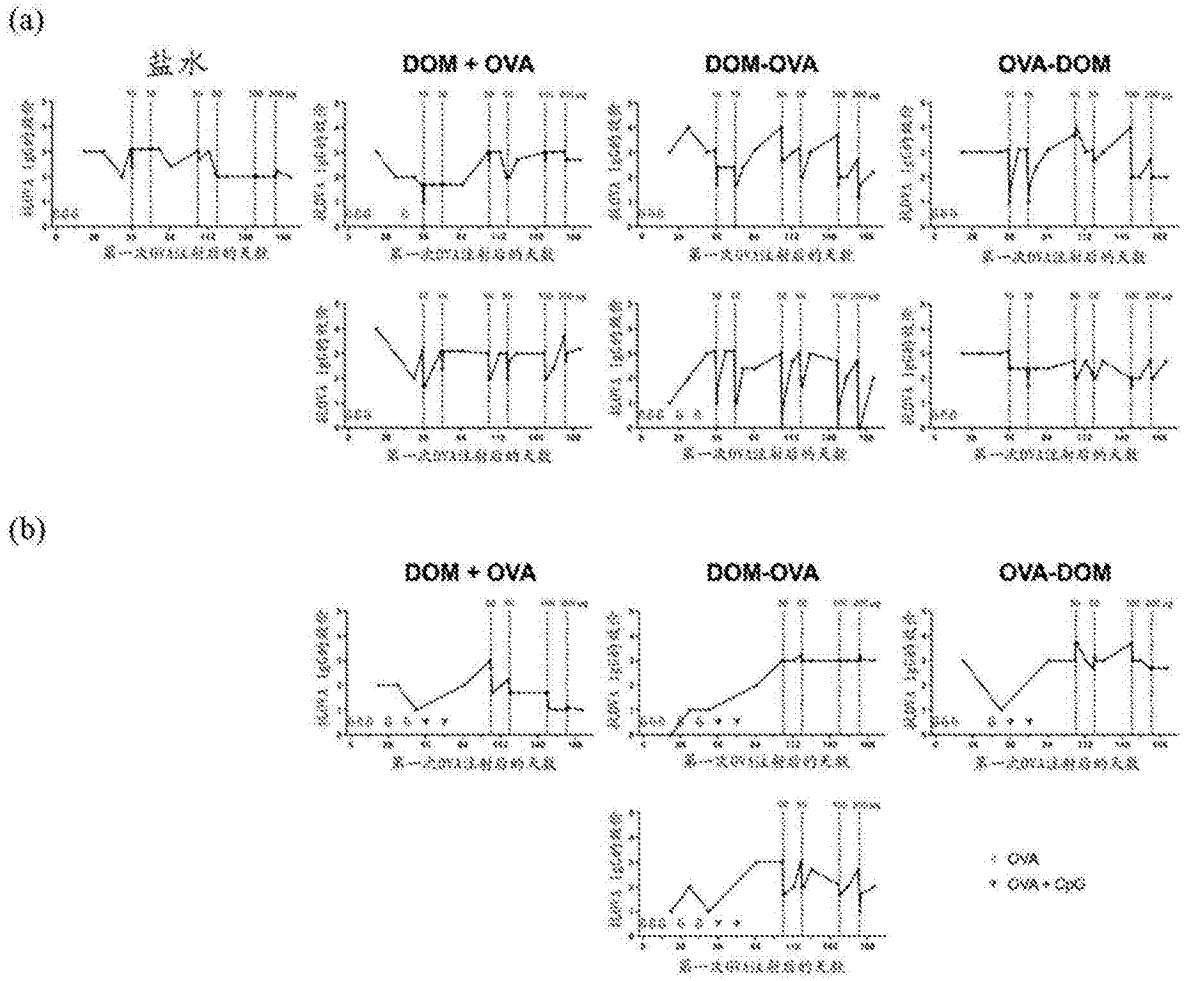


图9