(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6646584号
(P6646584)

(45)発行日　令和2年2月14日(2020.2.14)　(24)登録日　令和2年1月15日(2020.1.15)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/31	(2006.01)	C12N	15/31	ZNA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	
C07K 14/25	(2006.01)	C07K	14/25	
A61K 39/12	(2006.01)	A61K	39/12	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	

請求項の数 33　(全 131 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-546493 (P2016-546493)
(86)(22)出願日　平成27年1月26日(2015.1.26)
(65)公表番号　特表2017-509318 (P2017-509318A)
(43)公表日　平成29年4月6日(2017.4.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/012970
(87)国際公開番号　WO2015/113007
(87)国際公開日　平成27年7月30日(2015.7.30)
審査請求日　平成30年1月15日(2018.1.15)
(31)優先権主張番号　61/932,000
(32)優先日　平成26年1月27日(2014.1.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/049,325
(32)優先日　平成26年9月11日(2014.9.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　515238389
モレキュラー　テンプレーツ，インク．
ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＴＥＭＰＬＡＴＥＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ国　テキサス７８７２９　オースティン　アンバーグレンブルバード９３０１　スイート１００
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田　雅紀
(74)代理人　100102255
弁理士　小澤　誠次
(74)代理人　100096482
弁理士　東海　裕作
(74)代理人　100188352
弁理士　松田　一弘

最終頁に続く

(54)【発明の名称】哺乳動物への応用のための脱免疫化された志賀毒素Ａサブユニットエフェクターポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
志賀毒素エフェクター領域を含む脱免疫化されたポリペプチドであって、
（ｉ）前記志賀毒素エフェクター領域が、
配列番号１のアミノ酸残基７５～２５１、
配列番号１のアミノ酸残基１～２４１、
配列番号１のアミノ酸残基１～２５１、及び
配列番号１のアミノ酸残基１～２６１
から選択される野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性を有し、かつ
前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記志賀毒素エフェクター領域が：配列番号１の１～１５；配列番号１の２７～３７；配列番号１の３９～４８；配列番号１の５３～６６；配列番号１の９４～１１５；配列番号１の１４１～１５３；配列番号１の１７９～１９０；配列番号１の２０５；及び配列番号１の２４３～２５７からなる群から選択される前記志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも２つのエピトープ領域のそれぞれにおいて、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換を含み、
前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記アミノ酸の置換が：Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｔ９Ｖ、Ｋ１１Ａ、Ｋ１１Ｈ、Ｋ１１Ｓ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ３３Ｃ、Ｓ４３Ｎ、Ｓ４５Ｉ、Ｓ４５Ｖ、Ｓ４５Ｃ、Ｄ４７Ｍ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｎ４８Ｍ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｉ５７Ｆ、Ｉ

５７Ｍ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｄ５８Ｖ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６０Ｌ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｒ２４８Ａ、又はＲ２５１Ａのアミノ酸の置換を含むか；

（ii）前記志賀毒素エフェクター領域が、

配列番号２のアミノ酸残基７５～２５１、

配列番号２のアミノ酸残基１～２４１、

配列番号２のアミノ酸残基１～２５１、及び

配列番号２のアミノ酸残基１～２６１

から選択される野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性を有し、かつ

前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記志賀毒素エフェクター領域が：配列番号２の１～１５；配列番号２の２７～３７；配列番号２の３９～４８；配列番号２の５３～６６；配列番号２の９４～１１５；配列番号２の１４１～１５３；配列番号２の１７９～１９０；配列番号２の２０５；及び配列番号２の２４３～２５７からなる群から選択される前記志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも２つのエピトープ領域のそれぞれにおいて、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換を含み、

前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記アミノ酸の置換が：Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｔ９Ｖ、Ｋ１１Ａ、Ｋ１１Ｈ、Ｋ１１Ｓ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ３３Ｃ、Ｓ４３Ｎ、Ｔ４５Ｉ、Ｔ４５Ｖ、Ｔ４５Ｃ、Ｄ４７Ｍ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｎ４８Ｍ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｉ５７Ｆ、Ｉ５７Ｍ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｄ５８Ｖ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６０Ｌ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｒ２４８Ａ、又はＲ２５１Ａのアミノ酸の置換を含むか；あるいは

（iii）前記志賀毒素エフェクター領域が、

配列番号３のアミノ酸残基７５～２５１、

配列番号３のアミノ酸残基１～２４１、

配列番号３のアミノ酸残基１～２５１、及び

配列番号３のアミノ酸残基１～２６１

から選択される野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性を有し、かつ

前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記志賀毒素エフェクター領域が：配列番号３の３～１４；配列番号３の４２～４８；配列番号３の５３～６６；配列番号３の９４～１１５；配列番号３の１４０～１５６；配列番号３の１７９～１９１；配列番号３の２０４；及び配列番号３の２４０～２６０からなる群から選択される前記志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも２つのエピトープ領域のそれぞれにおいて、少なくとも１つのアミノ酸残基の置換を含み、

前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記アミノ酸の置換が：Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｓ９Ｖ、Ｋ１１Ａ、Ｋ１１Ｈ、Ｋ１１Ｓ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｎ４８Ｍ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｄ５８Ｖ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｔ１０９Ｖ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｒ２０４Ａ、Ｙ２４７Ａ、又はＲ２５０Ａのアミノ酸の置換を含み；

前記野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、前記志賀毒素エフェクター領域の抗原性及び／又は免疫原性が低減しており、かつ

前記志賀毒素エフェクター領域が、細胞内在化、細胞内の経路決定、触媒活性、及び細胞

毒性から選択される志賀毒素エフェクター機能を示すことができる、
前記脱免疫化されたポリペプチド。
【請求項２】
野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換が、
配列番号１のＫ１からＭ、及び配列番号１のＫ１１からＡ；
配列番号２のＫ１からＭ、及び配列番号２のＫ１１からＡ；
配列番号１のＤ９４からＡ、及び配列番号１のＳ９６からＩ；
配列番号２のＤ９４からＡ、及び配列番号２のＳ９６からＩ；
配列番号３のＤ９４からＡ、及び配列番号３のＳ９６からＩ；
配列番号１のＥ６０からＩ、及び配列番号１のＧ１１０からＡ；
配列番号２のＥ６０からＩ、及び配列番号２のＧ１１０からＡ；
配列番号１のＥ６０からＩ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号２のＥ６０からＩ、及び配列番号２のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＳ４５からＩ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；
配列番号２のＴ４５からＩ、及び配列番号２のＲ１８８からＡ；
配列番号１のＤ１８３からＡ、配列番号１のＤ１８４からＡ、及び配列番号１のＤ１８８からＡ；又は
配列番号２のＤ１８３からＡ、配列番号２のＤ１８４からＡ、及び配列番号２のＤ１８８からＡ
へのアミノ酸の置換を含む、請求項１に記載の脱免疫化されたポリペプチド。
【請求項３】
野生型志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列と比較して、アミノ酸の置換が、
配列番号１のＳ３３からＩ、配列番号１のＧ１１０からＡ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＳ４５からＩ、配列番号１のＧ１１０からＡ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＥ６０からＩ、配列番号１のＧ１１０からＡ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、及び配列番号１のＳ１８６からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、及び配列番号１のＧ１８７からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、及び配列番号１のＳ１８９からＡ；
配列番号１のＳ４５からＩ、配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＥ６０からＩ、配列番号１のＧ１１０からＡ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、配列番号１のＳ１８６からＡ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；
配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、配列番号１のＧ１８７からＡ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；
配列番号１のＳ３３からＩ、配列番号１のＳ４５からＩ、配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、及び配列番号１のＧ１４７からＡ；
配列番号１のＳ４５からＩ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、配列番号１のＤ１８３からＡ、配列番号１のＤ１８４からＡ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；
配列番号１のＳ４５からＩ、配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＥ６０からＩ、配

列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、配列番号１のＤ１８３からＡ、配列番号１のＤ１８４からＡ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；又は
配列番号１のＳ４５からＩ、配列番号１のＤ５８からＡ、配列番号１のＥ６０からＩ、配列番号１のＧ６２からＡ、配列番号１のＧ１１０からＡ、配列番号１のＧ１４７からＡ、配列番号１のＤ１８３からＡ、配列番号１のＤ１８４からＡ、及び配列番号１のＲ１８８からＡ；
へのアミノ酸の置換を含む、請求項１に記載の脱免疫化されたポリペプチド。

【請求項４】

志賀毒素エフェクター領域が、１０，０００ピコモル以下のＩＣ$_{50}$値でのリボソーム阻害活性、及び／又は有意なレベルの志賀毒素触媒活性を示す、請求項１～３のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド。

【請求項５】

志賀毒素エフェクター領域が、配列番号３３～３５、３７～４０及び４２～５２のいずれか１つで示されるポリペプチド配列を含む、又は配列番号３３～３５、３７～４０及び４２～５２のいずれか１つで示されるポリペプチド配列からなる、請求項１～４のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド。

【請求項６】

ａ）請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチドと、
ｂ）少なくとも１つの細胞外標的生体分子に特異的に結合することができる結合領域とを含むタンパク質。

【請求項７】

結合領域が、相補性決定領域３断片、拘束ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４ポリペプチド、シングルドメイン抗体断片、一本鎖可変断片、抗体可変断片、抗原結合断片、Ｆｄ断片、フィブロネクチンから得られる第１０フィブロネクチンIII型ドメイン、テネイシンIII型ドメイン、アンキリン反復モチーフドメイン、低密度リポタンパク質受容体由来Ａドメイン、リポカリン、Kunitzドメイン、プロテインＡ由来Ｚドメイン、ガンマ－Ｂ結晶由来ドメイン、ユビキチン由来ドメイン、Ｓａｃ７ｄ由来ポリペプチド、Ｆｙｎ由来ＳＨ２ドメイン、ミニタンパク質、Ｃ型レクチン様ドメイン足場、及び結合機能性を保持する前述のもののいずれかの遺伝子操作された任意の対応物からなる群から選択されるポリペプチドを含む、請求項６に記載のタンパク質。

【請求項８】

請求項６又は７に記載のタンパク質であって、結合領域の細胞外標的化生体分子と物理的に結合されている細胞に前記タンパク質を投与すると、前記細胞を死滅させることができる、前記タンパク質。

【請求項９】

請求項８に記載のタンパク質であって、メンバーが結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に結合されている第１の細胞集団、及びメンバーが前記結合領域のいかなる細胞外標的生体分子とも物理的に結合されていない第２の細胞集団に前記タンパク質を投与すると、前記第２の細胞集団のメンバーと比較して前記第１の細胞集団のメンバーに対する前記タンパク質の細胞毒性効果が少なくとも３倍大きい、前記タンパク質。

【請求項１０】

細胞又は第１の細胞集団が、細胞外標的生体分子又はその一部分を細胞の外部と結合させている共有結合性及び／又は非共有結合性分子間相互作用により前記細胞外標的生体分子に物理的に結合しているか、又は前記細胞外標的生体分子が、前記細胞又は前記第１の細胞集団により発現される不可欠膜タンパク質又は表在性膜タンパク質である、請求項９に記載のタンパク質。

【請求項１１】

１，０００ナノモル以下のＣＤ$_{50}$値での細胞毒性、及び／又は有意なレベルの志賀毒素細胞毒性を示す、請求項９又は１０に記載のタンパク質。

【請求項１２】

結合領域が、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ４０、ＣＤ７９、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＨＥＲ２／ｎｅｕ／ＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＢ２、前立腺特異的膜抗原、Ｃｒｉｐｔｏ、エンドグリン、線維芽細胞活性化タンパク質、Lewis－Ｙ、ＣＤ１９、ＣＤ２１、ＣＳ１／ＳＬＡＭＦ７、ＣＤ３３、ＣＤ５２、ｇｐＡ３３、ムチン、ＴＡＧ－７２、炭酸脱水酵素IX、葉酸結合タンパク質、ガングリオシドＧＤ２、ガングリオシドＧＤ３、ガングリオシドＧＭ２、ガングリオシドLewis－Ｙ２、ＶＥＧＦＲ、アルファＶベータ３、アルファ５ベータ１、ＥｒｂＢ１／ＥＧＦＲ、Ｅｒｂ３、ｃ－ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥｐｈＡ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＲＡＮＫＬ、テネイシン、ＣＤ６４、メソセリン、ＢＲＣＡ１、ＭＡＲＴ－１／メランＡ、ｇｐ１００、チロシナーゼ、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－１／２、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤＫ－４、ベーターカテニン、ＭＵＭ－１、カスパーゼ－８、ＫＩＡＡ０２０５、ＨＰＶＥ６、ＳＡＲＴ－１、ＰＲＡＭＥ、癌胎児抗原、前立腺特異的抗原、前立腺幹細胞抗原、ヒトアスパルチル（アスパラギニル）ベーターヒドロキシラーゼ、ＥｐｈＡ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ－３、ＭＵＣ１、チロシナーゼ関連抗原、ＨＰＶ－Ｅ７、エプスタイン・バーウイルス抗原、Ｂｃｒ－Ａｂｌ、アルファ－フェトプロテイン抗原、１７－Ａ１、膀胱腫瘍抗原、ＣＤ３８、ＣＤ１５、ＣＤ２３、ＣＤ５３、ＣＤ８８、ＣＤ１２９、ＣＤ１８３、ＣＤ１９１、ＣＤ１９３、ＣＤ２４４、ＣＤ２９４、ＣＤ３０５、Ｃ３ＡＲ、ＦｃｅＲＩａ、ガレクチン－９、ｍｒｐ－１４、Ｓｉｇｌｅｃ－８、Ｓｉｇｌｅｃ－１０、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ１３、ＣＤ４４、ＣＤ５４、ＣＤ６３、ＣＤ６９、ＣＤ１２３、ＴＬＲ４、ＩｇＥ、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ２０３ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ６８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１０５、ＣＤ１１５、Ｆ４／８０、ＩＬＴ－３、ガレクチン－３、ＣＤ１１ａ－ｃ、ＧＩＴＲＬ、MHCクラスII、ＣＤ２８４－ＴＬＲ４、ＣＤ１０７－Ｍａｃ３、ＣＤ１９５－ＣＣＲ５、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１６／３２、ＣＤ２８２－ＴＬＲ２、ＣＤ１１ｃ、及び前述のもののいずれかの任意の免疫原性断片からなる群から選択される細胞外標的生体分子と結合することができる、請求項６～１１のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項１３】

配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、若しくは配列番号５８で示されるポリペプチド配列を含む、又は配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、若しくは配列番号５８で示されるポリペプチド配列からなる、請求項６～１２のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項１４】

志賀毒素エフェクター領域が、志賀毒素ファミリーのメンバーの天然に存在するＡサブユニットと比較して前記志賀毒素エフェクター領域の酵素活性を変化させる変異を含み、前記変異が、少なくとも１つのアミノ酸残基欠失及び置換から選択される、請求項６～１３のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項１５】

変異が、志賀毒素エフェクター領域の細胞毒性を低減させる、請求項１４に記載のタンパク質。

【請求項１６】

ペプチド、タンパク質、検出促進剤、小分子の化学療法剤、及びポリヌクレオチドのいずれか１つから選択される追加の外因性物質に連結している、請求項６～１５のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項１７】

追加の外因性物質が、抗原を含むペプチド又はタンパク質である、請求項１６に記載のタンパク質。

【請求項１８】

ホモ多量体又はヘテロ多量体の形態である、請求項６～１７のいずれかに記載のタンパク質。

【請求項１９】

薬学的に許容される溶媒和物又は塩の形態である、請求項６～１８のいずれかに記載のタンパク質。
【請求項２０】
請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、又は請求項６～１９のいずれかに記載のタンパク質と、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤又は担体とを含む医薬組成物。
【請求項２１】
少なくとも１つの薬学的に許容される担体が、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、等張剤又は吸収遅延剤を含み、及び／或いは
医薬組成物が、水性若しくは非水性担体；界面活性剤；安定剤、保存剤、緩衝液、抗酸化剤、湿潤剤、若しくは乳化剤；及び／又は抗菌剤若しくは抗真菌剤；をさらに含む、請求項２０に記載の医薬組成物。
【請求項２２】
請求項６～１８のいずれかに記載のタンパク質と、検出促進剤とを含む診断用組成物。
【請求項２３】
請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、請求項６～１７のいずれかに記載のタンパク質、若しくはその補体、又は前述のもののいずれかの断片をコードすることができるポリヌクレオチド。
【請求項２４】
請求項２３に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項２５】
請求項２３に記載のポリヌクレオチド、又は請求項２４に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項２６】
細胞を殺滅する方法であって、前記細胞を、請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、請求項６～１９のいずれかに記載のタンパク質、又は請求項２０若しくは２１に記載の医薬組成物とインビトロで接触させるステップを含む、前記方法。
【請求項２７】
細胞を請求項１６又は１７に記載のタンパク質とインビトロで接触させるステップを含む、前記細胞内に物質を送達する方法であって、
前記細胞が細胞外標的生体分子と物理的に結合しており、
任意で、前記細胞が、細胞外標的生体分子又はその一部分を細胞の外部と結合させている共有結合性及び／又は非共有結合性分子間相互作用により細胞外標的生体分子に物理的に結合しているか、又は細胞外標的生体分子が、前記細胞により発現される不可欠膜タンパク質又は表在性膜タンパク質である、前記方法。
【請求項２８】
請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、若しくは請求項６～１９のいずれかに記載のタンパク質を含むか、又は
前記ポリペプチド若しくは前記タンパク質と、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤若しくは担体とを含む、
患者における疾患、障害又は状態の治療剤であって、前記疾患、障害又は状態が、結合領域により標的化される細胞によって特徴づけられる、前記治療剤。
【請求項２９】
疾患、障害又は状態が、がん、腫瘍、増殖異常、免疫障害及び微生物感染からなる群から選択される、請求項２８に記載の治療剤。
【請求項３０】
がんが、骨がん、乳がん、中枢／末梢神経系がん、胃腸がん、胚細胞がん、腺がん、頭頸部がん、血液がん、腎・尿路癌、肝がん、肺／胸膜がん、前立腺がん、肉腫、皮膚がん及び子宮がんからなる群から選択されるか、又は
免疫障害が、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、喘息、クローン病、糖尿病、移植片拒

絶、移植片対宿主病、橋本甲状腺炎、溶血性尿毒症症候群、ＨＩＶ関連疾患、エリテマトーデス、多発性硬化症、多発動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ様関節炎、強皮症、敗血症性ショック、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎及び血管炎からなる群から選択される疾患と関連するものである、請求項２９に記載の治療剤。

【請求項３１】

がん、腫瘍、増殖異常、免疫障害、若しくは微生物感染の治療又は予防において使用するための、請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、又は請求項６～１９のいずれかに記載のタンパク質を含む組成物であって、前記がん、腫瘍、増殖異常、免疫障害、若しくは微生物感染が、結合領域により標的化される細胞によって特徴づけられる、前記組成物。

【請求項３２】

がん、腫瘍、増殖異常、免疫障害、又は微生物感染の治療又は予防のための医薬品の製造における、請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、請求項６～１９のいずれかに記載のタンパク質、請求項２０又は２１に記載の医薬組成物、請求項２２に記載の診断用組成物、請求項２３に記載のポリヌクレオチド、請求項２４に記載の発現ベクター、又は請求項２５に記載の宿主細胞の使用であって、前記がん、腫瘍、増殖異常、免疫障害、又は微生物感染が、結合領域により標的化される細胞によって特徴づけられる、前記使用。

【請求項３３】

請求項１～５のいずれかに記載の脱免疫化されたポリペプチド、請求項６～１９のいずれかに記載のタンパク質、請求項２０又は２１に記載の医薬組成物、請求項２２に記載の診断用組成物、請求項２３に記載のポリヌクレオチド、請求項２４に記載の発現ベクター、又は請求項２５に記載の宿主細胞と、さらなる試薬及び／又は医薬送達デバイスとを備えるキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、天然に存在する志賀毒素のＡサブユニットに由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは、関連免疫応答を低減させることが望ましい哺乳動物への投与に、単独で有用であり、又は分子、例えば治療薬、の成分として有用である。例えば、本発明のポリペプチドは、特異的細胞タイプの標的化殺滅のための特異的標的化分子、例えば免疫毒素及びリガンド－毒素融合体、の成分として使用されうる。本発明のタンパク質は、例えば、がん、腫瘍、免疫障害及び微生物感染を含む様々な疾患、障害及び状態の診断、予後予測及び処置のための治療薬及び診断薬の成分として、使用される。

【背景技術】

【０００２】

志賀毒素は、医学的応用のために該毒素の構造、特性及び生物活性の合理的改変による合成的エンジニアリングが施されてきた（例えば、米国特許第７７１３９１５号明細書、欧州特許第１０５１４８２号明細書、欧州特許第１７２７８２７明細書、欧州特許第１９４５６６０号明細書、米国特許出願公開第２００９／０１５６４１７号明細書Ａ１、欧州特許第２２２８３８３号明細書Ｂ１、欧州特許出願公開第２４０２３６７号明細書Ａ１、米国特許出願公開第２０１３／０１９６９２８号Ａ１、国際公開第２０１４１６４６８０号、国際公開第２０１４１６４６９３号、米国特許出願第６１／９５１，１１０号明細書、米国特許仮出願第６１／９５１，１２１号を参照されたい（これらの各々が参照により本書に組み込まれている））。志賀毒素Ａサブユニットは、切断型の場合又は他のタンパク質ドメインに融合されている場合でも、安定しており、酵素的に活性であり、細胞毒性である（Haddad J et al., J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)、Al-Jaufy A et al., Infect Immun 62: 956-60 (1994)、Al-Jaufy A et al., Infect Immun 63: 3073-8 (1995)、L

aPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)、Di R et al., Toxicon 57: 535-39 (2011))。これらの志賀毒素Aサブユニット由来ポリペプチドは、細胞標的療法用分子を創生するために化学的コンジュゲーション又は組換えタンパク質工学によって免疫グロブリンドメイン又は受容体リガンドに連結又は融合されることがある。そのような分子工学の１つの目的は、１）全身性投与後、生物体内の特異的細胞タイプ又は位置への毒素の送達及び２）真核生物細胞において効果がある強力な細胞毒性メカニズムを用いる特異的細胞への細胞毒性標的化の遂行という二重機能性を有するキメラ分子の設計である。

【０００３】

非ヒト源からの合成的エンジニアリングが施されたタンパク質を伴う治療応用の主な制限の１つは免疫原性である。抗原性及び／又は免疫原性は、分子がインビボ投与されたときにその分子の抗原エピトープが抗体及び／又は免疫応答を誘導できることに起因する。ほとんどの治療用タンパク質は、ＩｇＭのような低レベル、低親和性及び一過性の抗体の産生から高レベル、高親和性ＩｇＧ抗体まで多岐にわたる、何らかの免疫応答を誘導すると考えられている（Schellekens H, Clin Ther 24: 1720-30 (2002)、Schellekens H, Nat Rev Drug Discov 1: 457-62 (2002))。治療製品の望ましくない免疫原性は、有効性の低下、薬物動態の変化、全身性免疫及び過敏症反応、アナフィラキシー、及びアナフィラキシー様反応などの好ましくない結果をもたらすことがあった（Buttel I et al., Biologicals 39: 100-9 (2011))。例えば、患者における中和抗体又は抗薬物抗体の産生は、治療薬の反復投与又は慢性投与の長期有効性を制限しうる。

【０００４】

望ましくない免疫応答は、治療薬の有意な安全性及び／又は有効性の問題をもたらしうるので、治療用タンパク質を開発するにあたって抗原性及び／又は免疫原性を最小限に抑えることが望ましいことが多い。残念なことに、目下のところ、広範な実験及び臨床研究にもかかわらず、新規治療用タンパク質が免疫原性になる程度を患者への投与前に予測することは不可能である（Descotes J, Gouraud A, Expert Opin Drug Metab Toxicol 4: 1537-49 (2008))。この主な原因は、脊椎動物の適応免疫系による抗体産生メカニズムについての現在の理解の不足と、そのようなメカニズムの不均一性の両方である。例えば、おそらく、溶媒露出面積が大きい親水性のかさ高いアミノ酸露出のより高い尤度を除いて、一般的エピトープの決定的な構造的特徴は、抗原－抗体複合体の分析によって解明されていない。

【０００５】

これらの困難にもかかわらず、タンパク質の免疫原性を低減させるために様々な戦略が現在利用されている（例えば、Onda M et al., Proc Natl Acad Sci USA 105: 11311-6 (2008)、Vallera D et al., Mol Cancer Ther 9: 1872-83 (2010)を参照されたい）。タンパク質の免疫原性は、適応免疫系によって認識される可能性の高いエピトープを除去又は破壊することにより低減させることができる。エピトープ破壊又は除去は、変異、例えば切断、欠失、又はアミノ酸置換、又はヒト化によって果たすことができる（Nagata S, Pastan I, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009)、Baker M et al., Self Nonself 1: 314-22 (2010))。

【０００６】

治療用分子の脱免疫化については、親和性成熟のため高親和性抗体を産生する可能性が高いＢリンパ球（Ｂ細胞）抗原エピトープの同定及び破壊が優先されることが多い。抗原活性化後、Ｂ細胞は、形質細胞又は記憶細胞のいずれかに分化することができる。活性化されたＢ細胞はクラススイッチされて、低親和性ＩｇＭ及びＩｇＤ抗体の発現から、別々の抗原エピトープを認識する単一Ｉｇアイソタイプ、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＡ又はＩｇＤ、の発現へと変化する（Klein U et al., Nat Rev Immunol 8: 22-33 (2008))。単一のＩｇアイソタイプを発現する活性化されたＢ細胞は、特異的抗原エピトープに対して高い親和性を有する抗体を産生するＢ細胞について選択されうる。したがって、治療薬中のエピトープの破壊は、その治療薬が対象に投与されたとき、そのエピトープに特異的に結合

する高親和性抗体の産生はもちろん、そのエピトープを標的にする長寿命の記憶Ｂ細胞の形成も防止する。

【０００７】

現在、ポリペプチド中のＢ細胞エピトープを正確かつ包括的に予測するための標準技術はない（Sathish J et al., Nat Rev Drug Discov 12: 306-24 (2013)）。Ｂ細胞エピトープは、変異誘発と抗体、免疫処置、又は免疫グロブリンライブラリーのファージディスプレースクリーニングとの組合せを用いる様々な経験的方法によって同定することができる。推定Ｂ細胞エピトープは、所与のポリペプチド配列中の予測される直鎖状及び不連続エピトープをスキャンするコンピュータツールを使用して予測することができ、その後、前記エピトープは発現停止を企図して破壊されることもある（Larsen et al., Immunome Res 2: 2 (2006)、El-Manzalawy et al., J Mol Recognit 21: 243-55 (2008)、Sollner J et al., Immunome Res 4: 1 (2008)、Bryson C et al., BioDrugs 24: 1-8 (2010)、Yao B et al., PLoS One 8: e62249 (2013)）。これらのコンピュータによるＢ細胞エピトープ予測はあまり正確ではなく、それ故、実験に基づいて検証しなければならない（Nagata, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009)）。エピトープ破壊は、推定Ｂ細胞エピトープ内の荷電及び／又は芳香族残基をアラニン残基に変異させることによって試みられることが多い（Onda M et al., J Immunol 177: 8822-34 (2006)、Lui W et al., Proc Natl Acad Sci USA 109: 11782-7 (2012)、Yumura K et al., Protein Sci 22: 213-21 (2012)）。さらに、可能性のあるすべてのエピトープを正確にマッピングして破壊するが生物治療活性は維持するというのは、より大きいタンパク質の場合、困難な目標でありうる（Brauer F et al., Antimicrob Agents Chemother 57: 678-88 (2013)）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】米国特許第７７１３９１５号明細書
【特許文献２】欧州特許第１０５１４８２号明細書
【特許文献３】欧州特許第１７２７８２７明細書
【特許文献４】欧州特許第１９４５６６０号明細書
【特許文献５】米国特許出願公開第２００９／０１５６４１７号明細書Ａ１
【特許文献６】欧州特許第２２２８３８３号明細書Ｂ１
【特許文献７】欧州特許出願公開第２４０２３６７号明細書Ａ１
【特許文献８】米国特許出願公開第２０１３／０１９６９２８号Ａ１
【特許文献９】米国特許出願公開第２０１４／０２３１９８号明細書
【特許文献１０】米国特許出願公開第２０１４／０２３２３１号明細書
【特許文献１１】米国特許出願第６１／９５１，１１０号明細書
【特許文献１２】米国特許仮出願第６１／９５１，１２１号

【非特許文献】

【０００９】

【非特許文献１】Haddad J et al., J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)
【非特許文献２】Al-Jaufy A et al., Infect Immun 62: 956-60 (1994)
【非特許文献３】Al-Jaufy A et al., Infect Immun 63: 3073-8 (1995)
【非特許文献４】LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)
【非特許文献５】Di R et al., Toxicon 57: 535-39 (2011)
【非特許文献６】Schellekens H, Clin Ther 24: 1720-30 (2002)
【非特許文献７】Schellekens H, Nat Rev Drug Discov 1: 457-62 (2002)
【非特許文献８】Buttel I et al., Biologicals 39: 100-9 (2011)
【非特許文献９】Descotes J, Gouraud A, Expert Opin Drug Metab Toxicol 4: 1537-49 (2008)
【非特許文献１０】Onda M et al., Proc Natl Acad Sci USA 105: 11311-6 (2008)
【非特許文献１１】Vallera D et al., Mol Cancer Ther 9: 1872-83 (2010)

【非特許文献１２】Nagata S, Pastan I, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009)
【非特許文献１３】Baker M et al., Self Nonself 1: 314-22 (2010)
【非特許文献１４】Klein U et al., Nat Rev Immunol 8: 22-33 (2008)
【非特許文献１５】Sathish J et al., Nat Rev Drug Discov 12: 306-24 (2013)
【非特許文献１６】Larsen et al., Immunome Res 2: 2 (2006)
【非特許文献１７】El-Manzalawy et al., J Mol Recognit 21: 243-55 (2008)
【非特許文献１８】Sollner J et al., Immunome Res 4: 1 (2008)
【非特許文献１９】Bryson C et al., BioDrugs 24: 1-8 (2010)
【非特許文献２０】Yao B et al., PLoS One 8: e62249 (2013)
【非特許文献２１】Nagata, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009)
【非特許文献２２】Onda M et al., J Immunol 177: 8822-34 (2006)
【非特許文献２３】Lui W et al., Proc Natl Acad Sci USA 109: 11782-7 (2012)
【非特許文献２４】Yumura K et al., Protein Sci 22: 213-21 (2012)
【非特許文献２５】Brauer F et al., Antimicrob Agents Chemother 57: 678-88 (2013)

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１０】
志賀毒素は、エンジニアリングされて治療及び診断応用のための有用な製品になる見込みがあるが、それらの潜在的免疫原性は、医学的応用での利用の障害になりうる。志賀毒素は、ヒト免疫系にとって非常に異質である細菌タンパク質である。しかし、志賀毒素のＡサブユニット内の抗原性及び／又は免疫原性部位は、系統的にマッピングされていない。医学的応用のために十分な志賀毒素エフェクター機能を保持する、抗原性及び／又は免疫原性が低減された、改善された志賀毒素Ａサブユニット由来ポリペプチドを、例えば特異的細胞タイプへの細胞毒性の標的化送達に関わる様々な治療薬の成分として、有することは望ましいことであろう。
【課題を解決するための手段】
【００１１】
本発明は、哺乳動物における抗原性及び／又は免疫原性が低減された（本書では「脱免疫化された」と言う）志賀毒素エフェクターポリペプチドを提供する。加えて、本発明は、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを含む、細胞毒性タンパク質及び診断用タンパク質を提供する。志賀毒素Ａサブユニットに由来する脱免疫化されたポリペプチドを、特異的細胞外結合相互作用によって細胞標的化を媒介する１又は２以上のポリペプチドに連結させて、細胞内在化及び志賀毒素細胞毒性の細胞特異的標的化のための改善された治療薬のエンジニアリングを可能にすることができる。脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドと検出促進剤の連結は、特異的細胞タイプの存在を検出するための改善された診断用分子のエンジニアリングを可能にする。本発明のポリペプチドは、標的化細胞殺滅に、特異的細胞タイプへの外因性物質の送達に、診断情報の獲得に、並びにがん、免疫障害及び微生物感染を含む様々な疾患、障害及び状態の処置のための治療薬として使用される。
【００１２】
本発明のポリペプチドは、志賀毒素ファミリーの少なくとも１つのメンバーのＡサブユニットのアミノ酸配列に由来するポリペプチドを含む志賀毒素エフェクター領域であって、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能が保持されるような方法で変異によって少なくとも１つの予測Ｂ細胞エピトープが除去又は破壊された志賀毒素エフェクター領域を含む。
【００１３】
本発明のポリペプチドの特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーの少なくとも１つのメンバーのＡサブユニットのアミノ酸配列に由来するポリペプチドを含む志賀毒素エフェクター領域であって、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能が保持されるような方法での変異によって少なくとも１つの予測Ｂ細胞エピトープが除去又は破壊されており、い

かなるＢ細胞エピトープ破壊によっても異所性、ＭＨＣクラスＩ限定、Ｔ細胞エピトープが導入されていない志賀毒素エフェクター領域を含む。ＭＨＣクラスＩ限定、Ｔ細胞エピトープは公知であり、当業者はそのようなＴ細胞エピトープを予測することができる。異所性という用語は、脱免疫化される前のポリペプチド、すなわち、１又は２以上のＢ細胞エピトープが除去及び／又は破壊される前の親ポリペプチド、に自然に存在しないＭＨＣクラスＩ限定、Ｔ細胞エピトープを指す。

【００１４】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４～１１５；配列番号１又は配列番号２の１４１～１５３；配列番号３の１４０～１５６；配列番号１又は配列番号２の１７９～１９０；配列番号３の１７９～１９１；配列番号３の２０４；配列番号１又は配列番号２の２０５；及び配列番号３の２１０～２１８；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が志賀毒素エフェクター機能を示すことができる、ポリペプチドを提供する。

【００１５】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４～１１５；配列番号１又は配列番号２の１４１～１５３；配列番号３の１４０～１５６；配列番号１又は配列番号２の１７９～１９０；配列番号３の１７９～１９１；配列番号３の２０４；配列番号１又は配列番号２の２０５；及び配列番号３の２１０～２１８；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が有意なレベルの志賀毒素エフェクター機能を示すことができる、ポリペプチドを提供する。

【００１６】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４～１１５；配列番号１又は配列番号２の１４１～１５３；配列番号３の１４０～１５６；配列番号１又は配列番号２の１７９～１９０；配列番号３の１７９～１９１；配列番号３の２０４；配列番号１又は配列番号２の２０５；及び配列番号３の２１０～２１８；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域に志賀毒素エフェクター機能能力があり、破壊が、単一エピトープ領域の破壊でなく、配列番号１又は配列番号２のＳ９６Ｙ；配列番号１又は配列番号２のＹ１１４Ｓ；配列番号１又は配列番号２のＲ１７９Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ１７９Ｈ；配列番号１又は配列番号２のＬ１８５Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ１８８Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ２０５Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ１７９Ａ／Ｒ１８８Ａ；及び配列番号３のＡ１８８Ｖ；からなる群から選択されるアミノ酸残基置換のみからならない、ポリペプチドを提供する。

【００１７】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４～１１５；配列番号１又は配列番号２の１４１～１５３；配列番号３の１４０～１５６；配列番号１又は配列番号２の１７９～１９０；配列番号３の１７９～１９１；配列番号３の２０４；配列番号１又は配列番号２の２０５；及び配列番号３の２１０～２１８；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少な

くとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が有意なレベルの志賀毒素エフェクター機能を示すことができ、破壊が、単一エピトープ領域の破壊でなく、配列番号１又は配列番号２のＳ９６Ｙ；配列番号１又は配列番号２のＹ１１４Ｓ；配列番号１又は配列番号２のＲ１７９Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ１７９Ｈ；配列番号１又は配列番号２のＬ１８５Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ１８８Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ２０５Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ１７９Ａ／Ｒ１８８Ａ；及び配列番号３のＡ１８８Ｖ；からなる群から選択されるアミノ酸残基置換のみからならない、ポリペプチドを提供する。

【００１８】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１又は配列番号２の１～１５；配列番号３の３～１４；配列番号３の２６～３７；配列番号１又は配列番号２の２７～３７；配列番号１又は配列番号２の３９～４８；配列番号３の４２～４８；及び配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５３～６６；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が志賀毒素エフェクター機能を示すことができ、志賀毒素エフェクター領域が、破壊されたエピトープ領域と重複する該志賀毒素エフェクター領域が由来した志賀毒素Ａサブユニットの破壊されたエピトープ領域と重複するアミノ末端切断を含まない、ポリペプチドを提供する。

【００１９】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１又は配列番号２の１～１５；配列番号３の３～１４；配列番号３の２６～３７；配列番号１又は配列番号２の２７～３７；配列番号１又は配列番号２の３９～４８；配列番号３の４２～４８；及び配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５３～６６；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が有意なレベルの志賀毒素エフェクター機能を示すことができ、志賀毒素エフェクター領域が、破壊されたエピトープ領域と重複する該志賀毒素エフェクター領域が由来した志賀毒素Ａサブユニットの破壊されたエピトープ領域と重複するアミノ末端切断を含まない、ポリペプチドを提供する。

【００２０】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号１又は配列番号２の１～１５；配列番号３の３～１４；配列番号３の２６～３７；配列番号１又は配列番号２の２７～３７；配列番号１又は配列番号２の３９～４８；配列番号３の４２～４８；及び配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５３～６６；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が志賀毒素エフェクター機能を示すことができ、破壊が単一エピトープ領域の破壊ではなく、配列番号１又は配列番号２のアミノ酸残基置換Ｒ６３Ｗのみからならず、志賀毒素エフェクター領域が、破壊されたエピトープ領域と重複する該志賀毒素エフェクター領域が由来した志賀毒素Ａサブユニットの破壊されたエピトープ領域と重複するアミノ末端切断を含まない、ポリペプチドを提供する。

【００２１】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号３の２４０～２６０；配列番号１又は配列番号２の２４３～２５７；配列番号１又は配列番号２の２５４～２６８；配列番号３の２

６２～２７８；配列番号３の２８１～２９７；及び配列番号１又は配列番号２の２８５～２９３；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が志賀毒素エフェクター機能を示すことができ、志賀毒素エフェクター領域が、破壊されたエピトープ領域と重複する該志賀毒素エフェクター領域が由来した志賀毒素Ａサブユニットの破壊されたエピトープ領域と重複するカルボキシ末端切断を含まない、ポリペプチドを提供する。

【００２２】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、配列番号３の２４０～２６０；配列番号１又は配列番号２の２４３～２５７；配列番号１又は配列番号２の２５４～２６８；配列番号３の２６２～２７８；配列番号３の２８１～２９７；及び配列番号１又は配列番号２の２８５～２９３；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される志賀毒素Ａサブユニットアミノ酸配列の少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含み、志賀毒素エフェクター領域が志賀毒素エフェクター機能を示すことができ、破壊が、単一エピトープ領域の破壊でなく、配列番号１又は配列番号２のＲ２４８Ｈ；配列番号１又は配列番号２のＡ２５０Ｖ；配列番号１又は配列番号２のＲ２５１Ｈ；配列番号１又は配列番号２のＡ２５３Ｇ；配列番号１又は配列番号２のＳ２５４Ｔ；配列番号１又は配列番号２のＣ２６１Ａ；配列番号１又は配列番号２のＲ２８９Ｋ；配列番号１又は配列番号２のＲ２４８Ｈ及びＲ２５１Ｈ；配列番号１又は配列番号２のＡ２５３Ｇ及びＳ２５４Ｔ；配列番号１のＳ２４７～Ｍ２５２の欠失；配列番号３のＳ２４６Ｆ；配列番号３のＡ２８２Ｖ；配列番号３のＩ２９１Ｖ；並びに配列番号３のＳ２４６Ｆ／Ｉ２９１Ｖ；からなる群から選択されるアミノ酸残基置換のみからならず、志賀毒素エフェクター領域が、破壊されたエピトープ領域と重複する該志賀毒素エフェクター領域が由来した志賀毒素Ａサブユニットの破壊されたエピトープ領域と重複するカルボキシ末端切断を含まない、ポリペプチドを提供する。

【００２３】

特定のさらなる実施形態において、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、本書において提供するエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸の欠失を含むエピトープ破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドは、提供するエピトープ領域への少なくとも１つのアミノ酸の挿入を含むエピトープ破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、少なくとも１つの反転したアミノ酸が提供するエピトープ領域内にある、アミノ酸の反転又は他の再配列を含む破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、非標準アミノ酸又は側鎖が化学的に修飾されているアミノ酸への単一アミノ酸置換などのアミノ酸残基変異を含むエピトープ破壊を含む。

【００２４】

特定の実施形態において、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、本書において提供するエピトープ領域内のアミノ酸残基置換含むエピトープ破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｃ、Ｍ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｎ、Ｑ、Ｈ及びＫからなる群から選択されるアミノ酸への少なくとも１つの置換を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、ＤからＡへの、ＤからＧへの、ＤからＶへの、ＤからＬへの、ＤからＩへの、ＤからＦへの、ＤからＳへの、ＤからＱへの、ＥからＡへの、ＥからＧへの、ＥからＶへの、ＥからＬへの、ＥからＩへの、ＥからＦへの、ＥからＳへの、ＥからＱへの、ＥからＮへの、ＥからＤへの、ＥからＭへの、ＥからＲへの、ＧからＡへの、ＨからＡへの、ＨからＧへの、ＨからＶへの、ＨからＬへの、ＨからＩへの、ＨからＦへの、ＨからＭへの、ＫからＡへの、ＫからＧへの、ＫからＶへの、ＫからＬへの、ＫからＩへの、ＫからＭへの、ＫからＨへの、ＬからＡへの、ＬからＧへの、ＮからＡへの、ＮからＧへの、ＮからＶへの、ＮからＬへの、ＮからＩへの、ＮからＦへの、ＰからＡへの、ＰからＧへの、ＰからＦへの、ＲからＡへの、ＲからＧへの、

ＲからＶへの、ＲからＬへの、ＲからＩへの、ＲからＦへの、ＲからＭへの、ＲからＱへの、ＲからＳへの、ＲからＫへの、ＲからＨへの、ＳからＡへの、ＳからＧへの、ＳからＶへの、ＳからＬへの、ＳからＩへの、ＳからＦへの、ＳからＭへの、ＴからＡへの、ＴからＧへの、ＴからＶへの、ＴからＬへの、ＴからＩへの、ＴからＦへの、ＴからＭへの、ＴからＳへの、ＹからＡへの、ＹからＧへの、ＹからＶへの、ＹからＬへの、ＹからＩへの、ＹからＦへの、及びＹからＭへの置換からなる群から選択される置換を含む。

【００２５】

特定の実施形態において、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、エピトープ領域内のアミノ酸残基置換を含む破壊を含み、置換は、配列番号１又は配列番号２の１；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の８；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１；配列番号１又は配列番号２の３３；配列番号１又は配列番号２の４３；配列番号１又は配列番号２の４５；配列番号１又は配列番号２の４７；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４８；配列番号１又は配列番号２の４９；配列番号１又は配列番号２の５３；配列番号１又は配列番号２の５５；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５８；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５９；配列番号１又は配列番号２の６０；配列番号１又は配列番号２の６１；配列番号１又は配列番号２の６２；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９６；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１０９；配列番号１又は配列番号２の１１０；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１２；配列番号１、配列番号２又は配列番号３のＳＥ１４７；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１７９；配列番号１又は配列番号２の１８０；配列番号１又は配列番号２の１８１；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８３；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８４；配列番号１又は配列番号２の１８５；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８６；配列番号１又は配列番号２の１８７；配列番号１又は配列番号２の１８８；配列番号１又は配列番号２の１８９；配列番号３の２０４；配列番号１又は配列番号２の２０５；配列番号１又は配列番号２の２４７；配列番号３の２４７；配列番号１又は配列番号２の２４８；配列番号３の２５０；配列番号１又は配列番号２の２５１；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の２６４；配列番号１又は配列番号２の２６５；及び配列番号１又は配列番号２の２８６；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択される天然位置のアミノ酸で起こる。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、エピトープ領域内のアミノ酸残基置換を含むエピトープ破壊を含み、置換は、任意の非保存アミノ酸への置換であり、配列番号１又は配列番号２の１；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の８；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１；配列番号１又は配列番号２の３３；配列番号１又は配列番号２の４３；配列番号１又は配列番号２の４５；配列番号１又は配列番号２の４７；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４８；配列番号１又は配列番号２の４９；配列番号１又は配列番号２の５３；配列番号１又は配列番号２の５５；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５８；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５９；配列番号１又は配列番号２の６０；配列番号１又は配列番号２の６１；配列番号１又は配列番号２の６２；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９６；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１０９；配列番号１又は配列番号２の１１０；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１２；配列番号１、配列番号２又は配列番号３のＳＥ１４７；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１７９；配列番号１又は配列番号２の１８０；配列番号１又は配列番号２の１８１；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８３；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８４；配列番号１又は配列番号２の１８５；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８６；配列番号１又は配列番号２の１８７；配列番号１又は配列番号２の１８８；配列番号１又は配列番号２の１８９；配列番号３の２０４；配列番号１又は配列番号２の２０５；配列番号１又は配列番号２の２４７；配列番号３の２４７；配列番号１又は配列番号２の２４８；配列番号３の２５０

；配列番号１又は配列番号２の２５１；配列番号１、配列番号２又は配列番号３の２６４；配列番号１又は配列番号２の２６５；及び配列番号１又は配列番号２の２８６；からなる天然位置のアミノ酸残基の群から選択されるアミノ酸残基で起こる。非保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸の、１又は２以上の顕著に異なる生化学的特性を有する別のアミノ酸での置換、例えば、荷電アミノ酸から非荷電アミノ酸への、極性アミノ酸から疎水性アミノ酸への、及びかさ高いアミノ酸から小さいアミノ酸への置換などである。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、エピトープ領域内のアミノ酸残基置換を含むエピトープ破壊を含み、置換は、天然位置のアミノ酸残基で起こり、Ｋ１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｔ４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｋ１１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｓ３３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｓ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｔ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｄ４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｎ４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ及びＭへの、Ｌ４９のＡ又はＧへの、Ｄ５３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｒ５５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ５８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｐ５９のＡ、Ｇ及びＦへの、Ｅ６０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｅ６１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｇ６２のＡへの、Ｄ９４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ９６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｓ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｇ１１０のＡへの、Ｓ１１２のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１４７のＡへの、Ｒ１７９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｔ１８０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｔ１８１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｄ１８３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｄ１８４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ１８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１８７のＡへの、Ｒ１８８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ１８９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２０４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２０５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｙ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ２６４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｇ２６４のＡへの、並びにＴ２８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの置換からなる群から選択されるアミノ酸への置換である。

【００２６】

特定のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のアミノ酸７５～２５１に由来する、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。特定のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号１、配列番号２若しくは配列番号３のアミノ酸１～２５１及び／又は配列番号１、配列番号２若しくは配列番号３のアミノ酸１～２６１に由来する、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。特定のさらなる実施形態において、本発明のポリペプチドは、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のアミノ酸１～２４１に由来する、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。

【００２７】

特定の実施形態について、本発明のポリペプチドは、配列番号４～５２のいずれか１つを含む、又は配列番号４～５２のいずれか１つから本質的になる、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。

【００２８】

本発明の特定の実施形態は、１又は２以上の志賀毒素エフェクター機能、例えば細胞毒性活性、を示す脱免疫化された志賀毒素サブユニットＡ由来領域に連結された細胞標的化

のための結合領域を含むタンパク質を提供する。本発明のタンパク質は、本発明のポリペプチドを含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域と、少なくとも１つの細胞外標的生体分子に特異的に結合することができる１又は２以上のポリペプチドを含む結合領域とを含む。

【００２９】

本発明のタンパク質の特定の実施形態において、結合領域は、相補性決定領域３（ＣＤＲ３，complementary determining region 3）断片拘束ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４（ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４）ポリペプチド、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ，single-domain antibody）断片、ナノボディ、ラクダ科動物に由来する重鎖抗体ドメイン（V_HH断片）、軟骨魚類に由来する重鎖抗体ドメイン、免疫グロブリン新規抗原受容体（ＩｇＮＡＲ，immunoglobulin new antigen receptor）、V_{NAR}断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ，single-chain variable fragment）、抗体可変断片（Ｆｖ，variable fragment）、抗原結合断片（Ｆａｂ，antigen-binding fragment）、Ｆｄ断片、小モジュラー免疫医薬（ＳＭＩＰ，small modular immunopharmaceutical）ドメイン、フィブロネクションから得られる第１０フィブロネクチンIII型ドメイン（１０Ｆｎ３，fibronection-derived 10^{th} fibronectin type III domain）（例えばモノボディ）、テネイシンIII型ドメイン（例えばＴＮｆｎ３）、アンキリン反復モチーフドメイン（ＡＲＤ，ankyrin repeat motif domain）、低密度リポタンパク質受容体由来Ａドメイン（ＬＤＬＲのＡドメイン又はＬＤＬＲ－Ａ，low-density-lipoprotein-receptor-derived A-domain）、リポカリン（アンチカリン）、Kunitzドメイン、プロテインＡ由来Ｚドメイン、ガンマ－Ｂ結晶由来ドメイン（アフィリン）、ユビキチン由来ドメイン、Ｓａｃ７ｄ由来ポリペプチド、Ｆｙｎ由来ＳＨ２ドメイン（アフィチン）、ミニタンパク質、Ｃ型レクチン様ドメイン足場、エンジニアリングされた抗体模倣物、及び結合機能性を保持する前述のもののいずれかの遺伝子操作された任意の対応物からなる群から選択されるポリペプチドを含む。

【００３０】

本発明の特定の実施形態において、細胞毒性タンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に結合されている細胞に本発明の脱免疫化された細胞毒性タンパク質を投与すると、細胞毒性タンパク質は、細胞を死滅させることができる。

【００３１】

本発明の特定の実施形態において、細胞外標的生体分子の存在について異なる、細胞タイプの２集団に、本発明の脱免疫化された細胞毒性タンパク質を投与すると、細胞毒性タンパク質は、細胞毒性タンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に結合されていない細胞タイプとのCD_{50}の少なくとも３倍の、又はそれよりも低いCD_{50}で、細胞毒性タンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に結合されている細胞タイプを細胞死させることができる。

【００３２】

本発明のタンパク質の特定の実施形態において、結合領域は、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ４０、ＣＤ７９、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＨＥＲ２／ｎｅｕ／ＥｒｂＢ２、ＥＧＦＲ、ＥｐＣＡＭ、ＥｐｈＢ２、前立腺特異的膜抗原、Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤＣＰ１、エンドグリン、線維芽細胞活性化タンパク質、Lewis－Ｙ、ＣＤ１９、ＣＤ２１、ＣＳ１／ＳＬＡＭＦ７、ＣＤ３３、ＣＤ５２、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、ｇｐＡ３３、ムチン、ＴＡＧ－７２、炭酸脱水酵素IX、葉酸結合タンパク質、ガングリオシドＧＤ２、ガングリオシドＧＤ３、ガングリオシドＧＭ２、ガングリオシドLewis－Ｙ２、ＶＥＧＦＲ、アルファＶベータ３、アルファ５ベータ１、ＥｒｂＢ１／ＥＧＦＲ、Ｅｒｂ３、ｃ－ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥｐｈＡ３、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＲＡＮＫＬ、ＦＡＰ、テネイシン、ＣＤ６４、メソセリン、ＢＲＣＡ１、ＭＡＲＴ－１／メランＡ、ｇｐ１００、チロシナーゼ、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、ＧＡＧＥ－１／２、ＢＡＧＥ、ＲＡＧＥ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＣＤＫ－４、ベーターカテニン、ＭＵＭ－１、カスパーゼ－８、ＫＩＡＡ０２０５、ＨＰＶＥ６、ＳＡＲＴ－１、ＰＲＡＭＥ、癌胎児抗原、前立腺

特異的抗原、前立腺幹細胞抗原、ヒトアスパルチル（アスパラギニル）ベーターヒドロキシラーゼ、ＥｐｈＡ２、ＨＥＲ３／ＥｒｂＢ－３、ＭＵＣ１、ＭＡＲＴ－１／メランＡ、ｇｐ１００、チロシナーゼ関連抗原、ＨＰＶ－Ｅ７、エプスタイン・バーウイルス抗原、Ｂｃｒ－Ａｂｌ、アルファーフェトプロテイン抗原、１７－Ａ１、膀胱腫瘍抗原、ＣＤ３８、ＣＤ１５、ＣＤ２３、ＣＤ５２、ＣＤ５３、ＣＤ８８、ＣＤ１２９、ＣＤ１８３、ＣＤ１９１、ＣＤ１９３、ＣＤ２４４、ＣＤ２９４、ＣＤ３０５、Ｃ３ＡＲ、ＦｃｅＲＩａ、ガレクチン－９、ｍｒｐ－１４、ｓｉｇｌｅｃ－８、ｓｉｇｌｅｃ－１０、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ１３、ＣＤ４４、ＣＤ５４、ＣＤ６３、ＣＤ６９、ＣＤ１２３、ＣＤ１９３、ＴＬＲ４、ＦｃｅＲＩａ、ＩｇＥ、ＣＤ１０７ａ、ＣＤ２０３ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ３３、ＣＤ６４、ＣＤ６８、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１０５、ＣＤ１１５、Ｆ４／８０、ＩＬＴ－３、ガレクチン－３、ＣＤ１１ａ－ｃ、ＧＩＴＲＬ、ＭＨＣクラスＩＩ、ＣＤ２８４－ＴＬＲ４、ＣＤ１０７－Ｍａｃ３、ＣＤ１９５－ＣＣＲ５、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ１６／３２、ＣＤ２８２－ＴＬＲ２、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１２３、及び前述のもののいずれかの任意の免疫原性断片からなる群から選択される細胞外標的生体分子と結合するその能力によって設計又は選択される。

【００３３】

特定の実施形態において、本発明のタンパク質は、ＫＤＥＬファミリーのメンバーのカルボキシ末端小胞体残留／回収シグナルモチーフ（carboxy-terminal endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif）を含む。特定のさらなる実施形態において、本発明のタンパク質は、ＫＤＥＬ（配列番号：６０）、ＨＤＥＦ（配列番号：６１）、ＨＤＥＬ（配列番号：６２）、ＲＤＥＦ（配列番号：６３）、ＲＤＥＬ（配列番号：６４）、ＷＤＥＬ（配列番号：６５）、ＹＤＥＬ（配列番号：６６）、ＨＥＥＦ（配列番号：６７）、ＨＥＥＬ（配列番号：６８）、ＫＥＥＬ（配列番号：６９）、ＲＥＥＬ（配列番号：７０）、ＫＡＥＬ（配列番号：７１）、ＫＣＥＬ（配列番号：７２）、ＫＦＥＬ（配列番号：７３）、ＫＧＥＬ（配列番号：７４）、ＫＨＥＬ（配列番号：７５）、ＫＬＥＬ（配列番号：７６）、ＫＮＥＬ（配列番号：７７）、ＫＱＥＬ（配列番号：７８）、ＫＲＥＬ（配列番号：７９）、ＫＳＥＬ（配列番号：８０）、ＫＶＥＬ（配列番号：８１）、ＫＷＥＬ（配列番号：８２）、ＫＹＥＬ（配列番号：８３）、ＫＥＤＬ（配列番号：８４）、ＫＩＥＬ（配列番号：８５）、ＤＫＥＬ（配列番号：８６）、ＦＤＥＬ（配列番号：８７）、ＫＤＥＦ（配列番号：８８）、ＫＫＥＬ（配列番号：８９）、ＨＡＤＬ（配列番号：９０）、ＨＡＥＬ（配列番号：９１）、ＨＩＥＬ（配列番号：９２）、ＨＮＥＬ（配列番号：９３）、ＨＴＥＬ（配列番号：９４）、ＫＴＥＬ（配列番号：９５）、ＨＶＥＬ（配列番号：９６）、ＮＤＥＬ（配列番号：９７）、ＱＤＥＬ（配列番号：９８）、ＲＥＤＬ（配列番号：９９）、ＲＮＥＬ（配列番号：１００）、ＲＴＤＬ（配列番号：１０１）、ＲＴＥＬ（配列番号：１０２）、ＳＤＥＬ（配列番号：１０３）、ＴＤＥＬ（配列番号：１０４）及びＳＫＥＬ（配列番号：１０５）からなる群から選択される、カルボキシ末端小胞体残留／回収シグナルモチーフを含む。

【００３４】

特定の実施形態について、本発明のタンパク質は、結合領域及び脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含み、これらの領域は、結合領域が志賀毒素エフェクター領域のアミノ末端に隣接した位置にないようにタンパク質内で物理的に配向されている。

【００３５】

特定の実施形態について、本発明のタンパク質は、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のアミノ酸７５～２５１に由来する志賀毒素エフェクター領域を含む。特定のさらなる実施形態は、志賀毒素エフェクター領域が配列番号１、配列番号２若しくは配列番号３のアミノ酸１～２５１及び／又は配列番号１、配列番号２若しくは配列番号３のアミノ酸１～２６１に由来するタンパク質を提供する。特定の実施形態において、本発明のタンパク質は、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のアミノ酸１～２４１に由来する志賀毒素エフェクター領域を含む。

【００３６】
特定の実施形態について、本発明のタンパク質は、配列番号４～５２のいずれか１つを含む、又は配列番号４～５２のいずれか１つから本質的になる、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。
【００３７】
特定の実施形態について、本発明のタンパク質は、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８若しくは配列番号５９のアミノ酸を含む、又は配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号５８若しくは配列番号５９のアミノ酸から本質的になる。
【００３８】
特定の実施形態において、本発明のタンパク質は、志賀毒素ファミリーのメンバーの天然に存在するＡサブユニットと比較して志賀毒素エフェクター領域の酵素活性を変化させる変異をさらに含む、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含み、変異は、少なくとも１つのアミノ酸残基欠失又は置換、例えば、配列番号１、配列番号２又は配列番号３におけるＡ２３１Ｅ、Ｒ７５Ａ、Ｙ７７Ｓ、Ｙ１１４Ｓ、Ｅ１６７Ｄ、Ｒ１７０Ａ、Ｒ１７６Ｋ及び／又はＷ２０３Ａなどから選択される。特定のさらなる実施形態において、本発明のタンパク質は、触媒活性を低減させる又は除去するが少なくとも１つの他の志賀毒素エフェクター機能を保持する変異を含む。
【００３９】
本発明は、本発明のポリペプチド及び／又はタンパク質と、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤又は担体とを含む医薬組成物、並びに本書の中でさらに説明するような本発明の方法におけるそのようなタンパク質、又はそれを含む組成物の使用も提供する。
【００４０】
本発明のポリペプチド、タンパク質及び組成物の他に、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチド又は本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む本発明のタンパク質をコードすることができるポリヌクレオチド、並びに本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び本発明の発現ベクターを含む宿主細胞は、本発明の範囲内である。発現ベクターを含む宿主細胞は、例えば、本発明のポリペプチド及び／若しくはタンパク質又はそれらのポリペプチド成分若しくは断片を組換え発現によって産生する方法において、使用されることがある。
【００４１】
加えて、本発明は、細胞を選択的に殺滅する方法であって、細胞を、本発明のタンパク質、又は本発明のそのようなタンパク質を含む医薬組成物と接触させるステップを含む方法を提供する。特定の実施形態において、細胞を接触させるステップは、インビトロで行われる。特定の実施形態において、細胞を接触させるステップは、インビボで行われる。
【００４２】
本発明は、それを必要とする患者において疾患、障害及び／又は状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む組成物、ポリペプチド及び／若しくはそれを含むタンパク質、又は前述のもののいずれかを含む組成物（例えば医薬組成物）の治療有効量を投与するステップを含む方法をさらに提供する。特定の実施形態において、本発明のこの方法を用いて治療される疾患、障害又は状態は、がん、腫瘍、免疫障害及び微生物感染から選択される。この方法の特定の実施形態において、治療されるがんは、骨がん、乳がん、中枢／末梢神経系がん、胃腸がん、胚細胞がん、腺がん、頭頸部がん、血液がん、腎・尿路癌、肝がん、肺／胸膜がん、前立腺がん、肉腫、皮膚がん及び子宮がんからなる群から選択される。この方法の特定の実施形態において、治療される免疫障害は、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、喘息、クローン病、糖尿病、移植片拒絶、移植片対宿主病、橋本甲状腺炎、溶血性尿毒症症候群、ＨＩＶ関連疾患、エリテマトーデス、多発性硬化症、多発動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ様関節炎、強皮症、敗血症性ショック、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎及び血管炎からなる群から選択される疾患に関連した免疫障害である。

【００４３】
本発明の特定の実施形態には、がん、腫瘍、免疫障害又は微生物感染の治療又は予防のための、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む組成物、ポリペプチド及び／若しくはそれを含むタンパク質、又は前述のもののいずれかを含む組成物がある。本発明の特定の実施形態には、がん、腫瘍、免疫障害又は微生物感染の治療又は予防のための医薬品の製造における、本発明の組成物の使用がある。
【００４４】
本発明のタンパク質の特定の実施形態を用いて、本発明のタンパク質の細胞外標的生体分子と物理的に結合されている細胞に１又は２以上のさらなる外因性物質を送達することができる。加えて、本発明は、細胞の内部に外因性物質を送達する方法であって、細胞を本発明のタンパク質、医薬組成物及び／又は診断用組成物とインビトロ又はインビボのいずれかで接触させるステップを含む方法を提供する。本発明は、外因性物質を、それを必要とする患者の細胞の内部に送達する方法であって、患者に本発明のタンパク質を投与するステップを含み、標的細胞が本発明のタンパク質の細胞外標的生体分子と物理的に結合されている、方法をさらに提供する。
【００４５】
本発明の特定の実施形態には、疾患、障害又は状態の診断、予後予測又は特性評価における、本発明の化合物（例えばポリペプチド若しくはタンパク質）及び／又は本発明の組成物（例えば医薬組成物又は診断用組成物）の使用がある。
【００４６】
本発明の特定の実施形態には、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド、ポリペプチド及び／若しくはそれを含むタンパク質、又は前述のもののいずれかを含む組成物と、細胞タイプ、組織、器官、疾患、障害、状態又は患者についての診断に有用な情報などの情報の収集のための検出促進剤とを含む、診断用組成物がある。
【００４７】
本発明の特定の実施形態には、本発明のタンパク質及び／又は診断用組成物を使用して細胞を検出する方法であって、細胞を前記タンパク質及び／又は診断用組成物と接触させるステップと、前記タンパク質及び／又は診断用組成物の存在を検出するステップとを含む方法がある。特定の実施形態において、細胞を接触させるステップは、インビトロで行われる。特定の実施形態において、細胞を接触させるステップは、インビボで行われる。特定の実施形態において、細胞を検出するステップは、インビトロで行われる。特定の実施形態において、細胞を検出するステップは、インビボで行われる。
【００４８】
例えば、本発明の診断用組成物を使用して、検出促進剤を含む本発明のタンパク質を含む組成物を哺乳動物対象に投与し、次いで、本発明のタンパク質の存在をインビトロ又はインビボのいずれかで検出することにより、細胞をインビボで検出してもよい。収集される情報は、本発明のタンパク質の結合領域の細胞外標的と物理的に結合されている細胞の存在に関することもあり、又は疾患、障害若しくは状態の診断、予後予測、特性評価及び／若しくは治療に有用であることもある。本発明の特定の化合物（例えばポリペプチド及びタンパク質）、本発明の組成物（例えば医薬組成物及び診断用組成物）、及び本発明の方法を用いて、患者が、本発明の医薬組成物に応答する群に属するかどうかを判定してもよい。
【００４９】
本発明のポリペプチドの特定の実施形態を、哺乳動物の免疫治療及び／又はワクチン接種のために免疫原として又は免疫原の成分として利用してもよい。
【００５０】
本発明の特定の実施形態には、本発明の組成物を備え、使用説明書、さらなる試薬及び／又は医薬品送達デバイスを備えていてもよいキットがある。
【００５１】
本発明のこれら及び他の特徴、態様及び利点は、以下の説明、添付の特許請求の範囲、

及び付属の図に関連してよりよく理解されることになる。本発明の上述の要素を個々に組み合わせて又は自由に除去して本発明の他の実施形態を、以降にそのような組合せ又は除去に反対するいかなる記述もなければ、作製することができるだろう。

【図面の簡単な説明】

【００５２】

【図１】例示的な脱免疫化されたポリペプチド及び細胞毒性タンパク質の一般的な配置を示す図である。

【図２】脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域におけるＤ５８Ａ置換は、ｐＡｂ２によって認識されるエピトープを変性条件下で効果的に破壊し、志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドの抗原性を低下させたことを示す図である。

【図３】脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域の多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントという状況におけるＤ５８Ａ置換は、ｐＡｂ２によって認識されるエピトープを変性条件下で効果的に破壊し、志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドの抗原性を低下させたことを示す図である。

【図４】脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域の多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントは、ｐＡｂ２及びｍＡｂ１によって認識されるエピトープを変性条件下で破壊したことを示す図である。これらの多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントは、親の野生型志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドと比較して低下した抗原性を有する。

【図５】脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域の多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントは、ｐＡｂ２及び／又はｍＡｂ１によって認識されるエピトープを変性条件下で効果的に破壊したことを示す図である。これらの多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントは、親の野生型志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドと比較して低下した抗原性を有する。

【図６】多重的なエピトープ領域の破壊を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、ネイティブのタンパク質フォールディング条件下で、ｍＡｂ１によって認識されるエピトープの極めて有効な破壊をもたらしたことを示す図である。この多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントは、親の野生型志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドと比較して低下した抗原性を有していた。

【図７】多重的なエピトープ領域の破壊を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、哺乳動物の免疫系によるインビボでの抗体応答の低下をもたらしたことを示す図である。この多重的なエピトープ領域の破壊を有するバリアントは、親の野生型志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドと比較して低下した免疫原性を有していた。

【発明を実施するための形態】

【００５３】

例証となる非限定的実施形態、及び付属の図への参照を用いて、以降、本発明をより詳細に説明する。しかし、本発明は多くの異なる形態で実施されることがあり、本発明を、下に示す実施形態に限定されるとみなすべきではない。むしろ、これらの実施形態は、本開示が行き届いたものになるように、また本発明の範囲を当業者に知らせるために提供するものである。

【００５４】

本発明をより容易に理解できるように、特定の用語を下で定義する。さらなる定義は、発明の詳細な説明の中で見つけることができる。

【００５５】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いる場合、用語「１つの（a）」、「１つの（an）」及び「その（the）」は、文脈による別段の明白な指図がない限り、単数及び複数両方の指示対象を含む。

【００５６】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において用いる場合、２つの種、Ａ及びＢ、に言及するときの用語「及び／又は」は、Ａ及びＢの少なくとも一方を意味する。本明細書及び

添付の特許請求の範囲において用いる場合、２つより多くの種、例えばＡ、Ｂ及びＣ、に言及するときの用語「及び／又は」は、Ａ、Ｂ若しくはＣの少なくとも１つ、又はＡ、Ｂ若しくはＣのいずれかの組合せ（この場合は各々の種に単数の可能性又は複数の可能性がある）の少なくとも１つを意味する。

【００５７】

本明細書全体を通して、語「含む（comprise）」、又は「含む（comprises）」若しくは「含むこと（comprising）」などの語尾変化形は、述べられている整数（若しくは成分）又は整数（若しくは成分）群の包含を暗示するが、他のいかなる整数（若しくは成分）又は整数（若しくは成分）群の除外も暗示しないと解されるものとする。

【００５８】

本明細書を通して、用語「含む（including）」は、「含むがこれらに限定されない（including but not limited to）」を意味するために用いる。「含む（including）」及び「含むがこれらに限定されない（including but not limited to）」は、同義で用いる。

【００５９】

用語「アミノ酸残基」又は「アミノ酸」は、タンパク質、ポリペプチド又はペプチドに組み込まれているアミノ酸への言及を含む。用語「ポリペプチド」は、アミノ酸又はアミノ酸残基の任意の重合体を含む。用語「ポリペプチド配列」は、ポリペプチドを物理的に含む一連のアミノ酸又はアミノ酸残基を指す。「タンパク質」は、１本又は２本以上のポリペプチド鎖を含む高分子である。「ペプチド」は、合計１５～２０アミノ酸残基より小さいサイズの小さいポリペプチドである。用語「アミノ酸配列」は、その長さに依存してペプチド又はポリペプチドを物理的に含む一連のアミノ酸又はアミノ酸残基を指す。別段の指示がない限り、本書において開示するポリペプチド及びタンパク質配列は、アミノ末端からカルボキシ末端へのそれらの順序を表すように左から右に記載している。

【００６０】

用語「アミノ酸」、「アミノ酸残基」、「アミノ酸配列」又は「ポリペプチド配列」は、天然に存在するアミノ酸を含み、別段の制限がない限り、天然に存在するアミノ酸と同様に機能することができる公知の天然アミノ酸アナログ、例えば、セレノシステイン、ピロールリジン、Ｎ－ホルミルメチオニン、ガンマ－カルボキシグルタメート、ヒドロキシプロリン、ハイプシン、ピログルタミン酸及びセレノメチオニンも含む。本書において言及するアミノ酸は、表Ａ中の以下のような簡略表記名によって記載している：

【００６１】

【表１】

表A.アミノ酸命名法

名称	3文字	1文字
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸又はアスパルテート	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸又はグルタメート	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【００６２】

ポリペプチドに関しての句「保存的置換」は、ポリペプチド全体の機能及び構造を実質的に改変しない、ポリペプチドのアミノ酸組成の変化を指す（Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W. H. Freeman and Company, New York (2nd ed., 1992)を参照されたい）。

【００６３】

本書において用いる場合、用語「発現された」、「発現すること」又は「～発現する」及びその文法上の異形は、ポリヌクレオチド又は核酸のポリペプチド又はタンパク質への翻訳を指す。発現されたポリペプチド又はタンパク質は、細胞内に残存し、細胞表面膜の成分になることもあり、又は細胞外空間に分泌されることもある。

【００６４】

本書において用いる場合、記号「α」は、記号の後に続く生体分子と結合することができる免疫グロブリン型結合領域の簡略表記である。記号「α」は、記号の後に続く生体分子と結合するその能力に基づく免疫グロブリン型結合領域の機能的特徴を指すために用いている。

【００６５】

記号「：：」は、物理的に互いに結合して連続するポリペプチドを形成する前又はした後のポリペプチド領域を意味する。

【００６６】

本明細書において用いる場合、２つのアミノ酸残基置換間に位置する記号「／」は、「

／」の両側の又は同じ分子に含まれるアミノ酸残基置換を意味する。

【００６７】

本発明では、句「～に由来する」は、ポリペプチド領域が、タンパク質中で元来見つけられるアミノ酸配列であって、元の配列と比較して全機能及び構造が実質的に保存されるような付加、欠失、短縮化又は他の改変を今や含むこともあるアミノ酸配列を含むことを意味する。

【００６８】

本発明では、用語「エフェクター」は、因子の動員及び／又はアロステリック効果をもたらす、細胞毒性、生体シグナル伝達、酵素的触媒、細胞内経路指定及び／又は分子間結合などの、生物活性を提供することを意味する。

【００６９】

本発明の目的に関して、志賀毒素のエフェクター機能は、志賀毒素のＡサブユニットに由来するポリペプチド領域によって付与された生物活性である。志賀毒素のエフェクター機能の非限定的な例としては、細胞の内在化、細胞内の経路決定、触媒活性、及び細胞毒性が挙げられる。志賀毒素の触媒活性の非限定的な例としては、リボソーム不活性化、タンパク質合成阻害、Ｎ－グリコシダーゼ活性、ポリヌクレオチド：アデノシングリコシダーゼ活性、ＲＮＡアーゼ活性、及びＤＮＡアーゼ活性が挙げられる。ＲＩＰは、核酸、ポリヌクレオシド、ポリヌクレオチド、ｒＲＮＡ、ｓｓＤＮＡ、ｄｓＤＮＡ、ｍＲＮＡ（及びポリＡ）、及びウイルス核酸を脱プリン化することができる（Barbieri L et al., Biochem J 286: 1-4 (1992)、Barbieri L et al., Nature 372: 624 (1994)、Ling J et al., FEBS Lett 345: 143-6 (1994)、Barbieri L et al., Biochem J 319: 507-13 (1996)、Roncuzzi L, Gasperi-Campani A, FEBS Lett 392: 16-20 (1996)、Stirpe F et al., FEBS Lett 382: 309-12 (1996)、Barbieri L et al., Nucleic Acids Res 25: 518-22 (1997)、Wang P, Tumer N, Nucleic Acids Res 27: 1900-5 (1999)、Barbieri L et al., Biochim Biophys Acta 1480: 258-66 (2000)、Barbieri L et al., J Biochem 128: 883-9 (2000)、Bagga S et al., J Biol Chem 278: 4813-20 (2003)、Picard D et al., J Biol Chem 280: 20069-75 (2005)）。いくつかのＲＩＰは、抗ウイルス活性及びスーパーオキシドジスムターゼ活性を示す（Erice A et al., Antimicrob Agents Chemother 37: 835-8 (1993)、Au T et al., FEBS Lett 471: 169-72 (2000)、Parikh B, Tumer N, Mini Rev Med Chem 4: 523-43 (2004)、Sharma N et al., Plant Physiol 134: 171-81 (2004)）。志賀毒素の触媒活性は、インビトロとインビボの両方で観察されている。志賀毒素のエフェクター活性に関するアッセイは、例えば、タンパク質合成阻害活性、脱プリン活性、細胞成長の阻害、細胞毒性、スーパーコイルＤＮＡの弛緩活性、及び／又はヌクレアーゼ活性などの様々な活性を測定することができる。

【００７０】

細胞毒性タンパク質の細胞毒性活性に関して、用語「選択的細胞毒性」は、標的細胞タイプの細胞殺滅の優先性を明らかにするための標的細胞集団と非標的バイスタンダー細胞集団間の相対細胞毒性レベルを指し、この相対細胞毒性レベルを標的細胞タイプの半最大細胞毒性濃度（CD_{50}）の非標的細胞タイプのCD_{50}に対する比として表現することができる。

【００７１】

本書において用いる場合、志賀毒素エフェクター機能の保持は、再現性のある適切な定量的アッセイによって測定して、野生型志賀毒素エフェクターポリペプチド対照に匹敵する志賀毒素機能活性レベルを指す。リボソーム阻害について、志賀毒素エフェクター機能の保持は、１０，０００ｐＭ以下のIC_{50}を示すことになる。標的陽性細胞殺滅アッセイにおける細胞毒性について、志賀毒素エフェクター機能の保持は、適切な細胞外標的生体分子の細胞タイプ及びその発現に依存して、１，０００ｎＭ以下のCD_{50}を示すことになる。

【００７２】

本書で用いる場合、「脱免疫化された」は、哺乳動物への投与後の抗原性及び／又は免

疫原性の低減を意味する。これは、１又は２以上新規エピトープの導入にかかわらず抗原性及び／又は免疫原性の低減全般を含む。

【００７３】

序論

本発明は、免疫原性が低減された、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来する改善されたポリペプチドを提供する。これらの改善された志賀毒素エフェクターポリペプチドは、様々な組成物、例えば、細胞毒性治療薬、治療送達剤、診断分子及び免疫処置物質に利用されうる。

【００７４】

治療薬の成分として志賀毒素を使用することの魅力にもかかわらず、細菌毒素は哺乳動物にとって免疫原性である傾向がある。タンパク質療法において望ましくない免疫原性は、有効性の低下、予測不能な薬物動態、並びに投薬量及び反復投与を制限する望ましくない免疫応答をもたらした。望ましくない免疫応答の回避を助長するための、免疫原性が低減された、脱免疫化された志賀毒素由来ポリペプチドを含む分子が必要とされているが、志賀毒素エフェクター機能を維持しつつ内部のＢ細胞エピトープをうまく同定し、除去するための予測可能な方法は存在しない。

【００７５】

切断によって除去されうる抗原性及び／又は免疫原性エピトープもあるが、志賀毒素ポリペプチドのエフェクタードメイン、例えばその酵素性ドメイン、内でエピトープを発現停止させ、その上、所望の志賀毒素エフェクター機能、例えば、強力なリボソーム阻害、及び細胞内経路指定の指示を保持することは難題である。これらの内部エピトープを変異及び／又は化学的修飾によって消失させることができるが、志賀毒素エフェクター機能を保存しつつそれを行うことは難題である。機能的に制約された残基及び構造を維持しなければならず、特定の位置は、タンパク質構造、安定性及び／又は機能に影響せずに特定のアミノ酸置換を許容しないので、タンパク質機能を保存しつつタンパク質内のアミノ酸置換により抗原性部位を破壊することは、かなり難題である（Cantor J et al., Methods in Enzymology 502: Ch. 12 pp. 291-301 (2012)を参照されたい）。

【００７６】

志賀毒素由来ポリペプチド領域に関する広範な経験的実験を行って本発明に到達した。実施例においてより詳細に説明するように、予測Ｂ細胞エピトープにおいてアミノ酸置換を生じさせ、結果として得たポリペプチドを所望の志賀毒素エフェクター機能について試験した。各エピトープの抗原性及び／又は免疫原性は、もたらされるアミノ酸置換によって低減又は除去されると予想され、そしてまたその低減又は除去が、少なくとも１つのエピトープ破壊がもたらされた一切の組成物の抗原性及び／又は免疫原性全体を低減させる。志賀毒素機能を維持しつつ免疫原性が低減されたと確認された、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドは、緑膿菌外毒素（Pseudomonas exotoxin）Ａなどの遠縁細菌タンパク質の脱免疫化の試みにもかかわらず、演繹的に予測できなかった。

【００７７】

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドは、特異的細胞タイプの標的化殺滅、並びにがん、免疫障害及び微生物感染を含む様々な疾患の処置のために組換え免疫毒素及びリガンド－毒素融合体の成分として使用されうる。加えて、本発明のポリペプチドは、診断情報収集のために検出促進剤などの外因性物質の正確な送達のための細胞タイプ特異的内在化分子の成分として使用されうる。さらに、本発明のポリペプチドは、志賀毒素に対する免疫応答を惹起するが特異的エピトープに対する抗体生成を回避するように設計された免疫処置物質において、独立して、又は志賀ホロ毒素の成分として、使用されうる。

【００７８】

Ｉ．本発明の志賀毒素エフェクターポリペプチド及びタンパク質の一般構造

本発明は、細胞内在化、細胞内経路指定、触媒活性及び細胞毒性などの、志賀毒素エフェクター機能性を保持するが免疫原性が低減された志賀毒素エフェクター領域を含む、様

々なポリペプチドを提供する。本発明のポリペプチドは、本書に記載する少なくとも１つのエピトープ領域の破壊を含む志賀毒素エフェクター領域を含む。本発明のタンパク質は、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域と、少なくとも１つの細胞外標的生体分子に特異的に結合することができる１又は２以上のポリペプチドを含む結合領域とを含む。

【００７９】

タンパク質毒素の志賀毒素ファミリーは、構造的に及び機能的に関連している様々な天然に存在する毒素、例えば、志賀毒素、志賀様毒素１及び志賀様毒素２で構成されている（Johannes L, Romer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)）。志賀毒素ファミリーのメンバーは、同じ全体構造及び作用メカニズムを共有する（Engedal, N et al., Microbial Biotech 4: 32-46 (2011)）。例えば、Ｓｔｘ、ＳＬＴ－１及びＳＬＴ－２は、無細胞系において区別できない酵素活性を提示する（Head S et al., J Biol Chem 266: 3617-21 (1991)、Tesh V et al., Infect Immun 61: 3392-402 (1993)、Brigotti M et al., Toxicon 35:1431-1437 (1997)）。

【００８０】

Ａ．脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド

本発明では、句「志賀毒素エフェクター領域」は、少なくとも１つの志賀毒素機能を示すことができる、志賀毒素ファミリーのメンバーの志賀毒素Ａサブユニットに由来するポリペプチド領域を指す。志賀毒素機能は、例えば、細胞侵入、脂質膜変形、細胞内経路指定の指示、分解の回避、触媒不活性化リボソーム、細胞毒性の遂行、及び細胞分裂停止作用の遂行を含む。

【００８１】

本書において用いる場合、「有意な」志賀毒素エフェクター機能の保持は、再現性のある適切な定量的アッセイによって測定して、野生型志賀毒素エフェクターポリペプチド対照に匹敵する志賀毒素エフェクター機能活性レベルを指す。インビトロリボソーム阻害について、有意な志賀毒素エフェクター機能は、リボソーム源（例えば、細菌、古細菌又は真核生物（藻類、真菌、植物若しくは動物））に依存して３００ｐＭ以下のＩＣ$_{50}$を示すことになる。これは、触媒不活性ＳＬＴ－１Ａ　１－２５１二重変異体（Ｙ７７Ｓ、Ｅ１６７Ｄ）についての１００，０００ｐＭの近似的ＩＣ$_{50}$と比較して有意に大きい阻害である。実験室細胞培養での標的陽性細胞殺滅アッセイにおける毒性について、有意な志賀毒素エフェクター機能は、適切な細胞外標的生体分子の細胞株及びその発現に依存して、１００、５０又は３０ｎＭ以下のＣＤ$_{50}$を示すことになる。これは、細胞標的化結合領域のないＳＬＴ－１Ａ（細胞株に依存して１００～１０，０００ｎＭのＣＤ$_{50}$を有する）と比較して、適切な標的細胞株に対する有意に大きい細胞毒性である。

【００８２】

いくつかの試料については、正確な曲線フィッティングに必要なデータ点を収集することができないため、ＩＣ$_{50}$又はＣＤ$_{50}$のいずれかについての正確な値を得ることができないこともあるだろう。有意な志賀毒素エフェクター機能活性を判定するとき、不正確なＩＣ$_{50}$及び／又はＣＤ$_{50}$を考慮すべきでない。例えば実施例において説明するアッセイなどの例示的志賀毒素エフェクター機能アッセイからのデータの分析に関して説明するような曲線への正確なフィッティングに不十分なデータは、実際の志賀毒素エフェクター機能の代表とみなすべきではない。例えば、理論的には、５０％より高いリボソーム阻害又は細胞死が所与の試料の濃度系列でそれぞれ起こらない場合、ＩＣ$_{50}$もＣＤ$_{50}$も判定できない。

【００８３】

志賀毒素エフェクター機能の活性を検出できないことは、細胞侵入、細胞内経路指定及び／又は酵素活性の欠如ではなく、不適切な発現、ポリペプチドフォールディング及び／又はポリペプチド安定性が原因であることもある。志賀毒素エフェクター機能についてのアッセイは、本発明のポリペプチドをさほど必要とせずに有意な量の志賀毒素エフェクター機能活性を測定することができるだろう。エフェクター機能が低い又はないことの根本原因を経験的に判定してタンパク質発現又は安定性と関係づける程度に、当業者は、当技

術分野において公知のタンパク質化学及び分子工学技術を用いてそのような因子を補償することができることがあり、その結果、志賀毒素機能性エフェクター活性が回復され、測定されることもある。例として、不適切な細胞ベースの発現は、様々な発現対照配列を使用することによって補償されることがあり、不適切なポリペプチドフォールディング及び／又は安定性は、末端配列の安定化から恩恵を受けることがあり、又はタンパク質の三次元構造を安定させる非エフェクター領域の補償変異から恩恵を受けることなどがある。個々の志賀毒素機能についての新規アッセイが利用できるようになれば、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドは、例えば、野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドの活性の１０００倍～１００倍以下の範囲内であるもの、あるいは機能性ノックアウト志賀毒素エフェクターポリペプチドと比較して３倍～３０倍又は３１倍以上の活性を示すものなどの、志賀毒素エフェクター機能の任意のレベルについて分析することができるだろう。

【００８４】

特定の志賀毒素エフェクター機能、例えば、細胞内経路指定機能は、容易に測定できない。現在、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドが細胞毒性であることができないことが、不適切な細胞内経路指定に起因するかどうかを識別するための通例の定量的アッセイはないが、試験が利用できれば、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを、適切な野生型志賀毒素エフェクター領域と比較して任意の有意な細胞内経路指定レベルについて分析することができるだろう。

【００８５】

志賀毒素エフェクターポリペプチドの細胞毒性が野生型と比較して低減されたとしても、実際には、弱毒化された、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを使用する応用は、野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドを使用するもの以上に有効であることがあることに留意されたい。なぜなら、例えばより多い投薬量又はより多くの反復投与を可能にすることなどによる、抗原性及び／又は免疫原性の低減が、細胞毒性の低減を相殺しうるからである。野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドは非常に強力であり、たった１分子が細胞質に達することで、又はおそらく４０分子が内在化されることで殺滅することができる。脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドは、志賀毒素エフェクター機能、例えば細胞内経路指定又は細胞毒性などが野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドと比較してかなり低減されていたとしても、標的化細胞殺滅及び／又は特異的細胞検出を伴う実際の応用に十分な作用強度を依然として有することがある。

【００８６】

志賀毒素ファミリーは、志賀赤痢菌（S. dysenteriae）血清型１から単離された真性志賀毒素（Ｓｔｘ，Shiga toxin）、腸管出血性大腸菌（E. coli）の血清型から単離された志賀様毒素１（ＳＬＴ１，Shiga-like toxin 1、又はＳｔｘ１、又はＳＬＴ－１、又はＳｌｔ－Ｉ）バリアント、及び腸管出血性大腸菌の血清型から単離された志賀様毒素２（ＳＬＴ２，Shiga-like toxin 2、又はＳｔｘ２、又はＳＬＴ－２）バリアントを包含する。ＳＬＴ１は、１残基しかＳｔｘと異ならず、両方ともベロ細胞毒素又はベロ毒素（ＶＴ，Verotoxin）と言われている（O'Brien, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)）。ＳＬＴ１及びＳＬＴ２バリアントは、アミノ酸配列レベルでは互いに約５３～６０％しか類似していないが、志賀毒素ファミリーのメンバーに共通の酵素活性メカニズム及び細胞毒性メカニズムを共有する（Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)）。３９種を超える様々な志賀毒素、例えば、被定義サブタイプＳｔｘ１ａ、Ｓｔｘ１ｃ、Ｓｔｘ１ｄ及びＳｔｘ２ａ～ｇが記載されている（Scheutz F et al., J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)）。志賀毒素ファミリーのメンバーは、志賀毒素をコードする遺伝子が遺伝子水平伝播によって細菌種間で伝播しうるので、本来、いずれの細菌種にも限定されない（Strauch E et al., Infect Immun 69: 7588-95 (2001)、Zhaxybayeva O, Doolittle W, Curr Biol 21: R242-6 (2011)）。種間伝播の一例として、志賀毒素は、患者から単離されたアシネトバクター・ヘモリティカス（A. haemolyticus）の株において発見された（Grotiuz G et al., J Clin Microbiol 44: 3838-41 (2006)）。志賀毒素をコードす

るポリヌクレオチドが新たな亜種又は種に侵入すると、志賀毒素アミノ酸配列は、志賀毒素ファミリーのメンバーに共通の細胞毒性メカニズムをなお維持しながら、遺伝的浮遊及び／又は選択圧に起因してわずかな配列多様性を発生させることが可能であると推測される（例えば、Scheutz, J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)を参照されたい）。

【００８７】

本発明のポリペプチドは、哺乳動物への投与後の該ポリペプチドの抗原性及び／又は免疫原性を低減させるために少なくとも１つの推定エピトープ領域が破壊されている、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来する志賀毒素エフェクター領域を含む。用語「破壊された」又は「破壊」は、エピトープ領域に関して本書で用いる場合、エピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸の欠失、反転されたアミノ酸の少なくとも１つがエピトープ領域にある２つ又は３つ以上のアミノ酸の反転、エピトープ領域への少なくとも１つのアミノ酸の挿入、及びエピトープ領域における少なくとも１つのアミノ酸の変異を指す。変異によるエピトープ領域破壊は、非標準アミノ酸及び／又は非天然アミノ酸でのアミノ酸置換を含む。あるいは、エピトープ領域は、エピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸を隠蔽する共有結合で連結された化学構造の付加によるアミノ酸の修飾を含む変異によって破壊されることもある。例えばＰＥＧ化（Zhang C et al., BioDrugs 26: 209-15 (2012) を参照されたい）及び小分子アジュバント（Flower D, Expert Opin Drug Discov 7: 807-17 (2012)）を参照されたい。

【００８８】

特定のエピトープ領域及び破壊は、配列表で提供するネイティブ志賀毒素Ａサブユニットの特異的アミノ酸位置に参照することによって本書において示すが、天然に存在する志賀毒素Ａサブユニットが、約２２のアミノ酸のシグナル配列を含有する前駆形態（これらは、成熟志賀毒素Ａサブユニットを産生するために除去されるものであり、当業者には認識可能である）を含みうることを特筆しておく。さらに、特定のエピトープ領域破壊は、特異的アミノ酸（例えば、セリン残基についてはＳ）であって、ネイティブ志賀毒素Ａサブユニット内の特異的位置（例えば、アミノ末端からの３３位のセリン残基についてはＳ３３）に自然に存在する前記アミノ酸、続いて、論じている特定の変異で残基を置換したアミノ酸（例えば、Ｓ３３Ｉは、アミノ末端からのアミノ酸残基３３におけるセリンのイソロイシンでのアミノ酸置換を表す）への言及によって本書において示す。

【００８９】

本発明の特定の実施形態は、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来するアミノ酸配列を含む志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドであって、志賀毒素エフェクター領域が、本書において提供する少なくとも１つのエピトープ領域（表１、２又は３を参照されたい）の破壊を含む、ポリペプチドを提供する。特定の実施形態において、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、配列番号１又は配列番号２の１～１５、配列番号３の３～１４、配列番号３の２６～３７、配列番号１又は配列番号２の２７～３７、配列番号１又は配列番号２の３９～４８、配列番号３の４２～４８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５３～６６、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４～１１５、配列番号１又は配列番号２の１４１～１５３、配列番号３の１４０～１５６、配列番号１又は配列番号２の１７９～１９０、配列番号３の１７９～１９１、配列番号３の２０４、配列番号１又は配列番号２の２０５、配列番号３の２１０～２１８、配列番号３の２４０～２５８、配列番号１又は配列番号２の２４３～２５７、配列番号１又は配列番号２の２５４～２６８、配列番号３の２６２～２７８、配列番号３の２８１～２９７、及び配列番号１又は配列番号２の２８５～２９３からなる天然位置のアミノ酸の群から選択されるアミノ酸配列又は保存された志賀毒素エフェクターポリペプチド及び／若しくは非ネイティブ志賀毒素エフェクターポリペプチド配列内の同等の位置のアミノ酸配列の少なくとも１つの破壊を含む完全長志賀毒素Ａサブユニット（例えば、ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）、ＳｔｘＡ（配列番号２）若しくはＳＬＴ－２Ａ（配列番号３））を含む又はそのような完全長志賀毒素Ａサブユニットから本質的になることがある。

【００９０】
特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む又は切断型志賀毒素Ａサブユニットから本質的になることがある。志賀毒素Ａサブユニットの切断は、毒素エフェクター触媒活性及び細胞毒性に影響を及ぼすことなくエピトープ領域全体の欠失をもたらすこともある。有意な酵素活性を示す最小志賀毒素Ａサブユニット断片は、ＳｔｘＡの残基７５～２４７で構成されているポリペプチドである（Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)）。アミノ酸１～２５１へのＳＬＴ－１Ａ、ＳｔｘＡ又はＳＬＴ－２Ａのカルボキシ末端の切断は、２つの予測Ｂ細胞エピトープ領域、２つの予測ＣＤ４陽性（ＣＤ４＋，CD4 positive）Ｔ細胞エピトープ、及び予測不連続Ｂ細胞エピトープを除去する。７５～２９３へのＳＬＴ－１Ａ、ＳｔｘＡ又はＳＬＴ－２Ａのアミノ末端の切断は、少なくとも３つの予測Ｂ細胞エピトープ領域及び３つの予測ＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープを除去する。７５～２５１へのＳＬＴ－１Ａ、ＳｔｘＡ又はＳＬＴ－２Ａのアミノ末端とカルボキシ末端両方の切断は、少なくとも５つの予測Ｂ細胞エピトープ領域、４つの予測ＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープ、及び１つの予測不連続Ｂ細胞エピトープを除去する。

【００９１】
特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、提供するエピトープ領域に少なくとも１つの変異、例えば、欠失、挿入、反転若しくは置換がある完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になることもある。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、エピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸の欠失を含む破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、エピトープ領域内への少なくとも１つのアミノ酸の挿入を含む破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、少なくとも１つの反転したアミノ酸がエピトープ領域内にある、アミノ酸の反転を含む破壊を含む。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、非標準アミノ酸又は側鎖が化学的に修飾されているアミノ酸へのアミノ酸置換などの変異を含む破壊を含む。単一アミノ酸置換の非常に多くの例を実施例において提供する。

【００９２】
特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、ネイティブ配列と比較して、Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｃ、Ｍ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｎ、Ｑ、Ｈ及びＫからなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸置換を含む１又は２以上の変異を有する完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になることもある。特定のさらなる実施形態において、ポリペプチドは、ネイティブ配列と比較して単一の変異を有する完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になることがあり、この場合の置換は、ＤからＡへの、ＤからＧへの、ＤからＶへの、ＤからＬへの、ＤからＩへの、ＤからＦへの、ＤからＳへの、ＤからＱへの、ＥからＡへの、ＥからＧへの、ＥからＶへの、ＥからＬへの、ＥからＩへの、ＥからＦへの、ＥからＳへの、ＥからＱへの、ＥからＮへの、ＥからＤへの、ＥからＭへの、ＥからＲへの、ＧからＡへの、ＨからＡへの、ＨからＧへの、ＨからＶへの、ＨからＬへの、ＨからＩへの、ＨからＦへの、ＨからＭへの、ＫからＡへの、ＫからＧへの、ＫからＶへの、ＫからＬへの、ＫからＩへの、ＫからＭへの、ＫからＨへの、ＬからＡへの、ＬからＧへの、ＮからＡへの、ＮからＧへの、ＮからＶへの、ＮからＬへの、ＮからＩへの、ＮからＦへの、ＰからＡへの、ＰからＧへの、ＰからＦへの、ＲからＡへの、ＲからＧへの、ＲからＶへの、ＲからＬへの、ＲからＩへの、ＲからＦへの、ＲからＭへの、ＲからＱへの、ＲからＳへの、ＲからＫへの、ＲからＨへの、ＳからＡへの、ＳからＧへの、ＳからＶへの、ＳからＬへの、ＳからＩへの、ＳからＦへの、ＳからＭへの、ＴからＡへの、ＴからＧへの、ＴからＶへの、ＴからＬへの、ＴからＩへの、ＴからＦへの、ＴからＭへの、ＴからＳへの、ＹからＡへの、ＹからＧへの、ＹからＶへの、ＹからＬへの、ＹからＩへの、ＹからＦへの、及びＹからＭへの置換からなる群から選択される。

【００９３】
特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、ネイティブアミノ酸残基配列と比較してエピトープ領域内に少なくとも１つのアミノ酸置換を含む１つ若しくは２つ以上の変異を有する完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含み、又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になり、この場合の少なくとも１つの置換は、配列番号１又は配列番号２の１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１、配列番号１又は配列番号２の３３、配列番号１又は配列番号２の４３、配列番号１又は配列番号２の４５、配列番号１又は配列番号２の４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４８、配列番号１又は配列番号２の４９、配列番号１又は配列番号２の５３、配列番号１又は配列番号２の５５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５９、配列番号１又は配列番号２の６０、配列番号１又は配列番号２の６１、配列番号１又は配列番号２の６２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９６、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１０９、配列番号１又は配列番号２の１１０、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のＳＥ１４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１７９、配列番号１又は配列番号２の１８０、配列番号１又は配列番号２の１８１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８３、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８４、配列番号１又は配列番号２の１８５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８６、配列番号１又は配列番号２の１８７、配列番号１又は配列番号２の１８８、配列番号１又は配列番号２の１８９、配列番号３の２０４、配列番号１又は配列番号２の２０５、配列番号１又は配列番号２の２４７、配列番号３の２４７、配列番号１又は配列番号２の２４８、配列番号３の２５０、配列番号１又は配列番号２の２５１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の２６４、配列番号１又は配列番号２の２６５、及び配列番号１又は配列番号２の２８６からなる群から選択される天然位置のアミノ酸基で起こる。

【００９４】
特定のさらなる実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、エピトープ領域内に少なくとも１つの置換を有する完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含み、又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になり、この場合の少なくとも１つの置換は、以下の天然位置：配列番号１又は配列番号２の１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１、配列番号１又は配列番号２の３３、配列番号１又は配列番号２の４３、配列番号１又は配列番号２の４５、配列番号１又は配列番号２の４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４８、配列番号１又は配列番号２の４９、配列番号１又は配列番号２の５３、配列番号１又は配列番号２の５５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５９、配列番号１又は配列番号２の６０、配列番号１又は配列番号２の６１、配列番号１又は配列番号２の６２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９６、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１０９、配列番号１又は配列番号２の１１０、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のＳＥ１４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１７９、配列番号１又は配列番号２の１８０、配列番号１又は配列番号２の１８１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８３、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８４、配列番号１又は配列番号２の１８５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８６、配列番号１又は配列番号２の１８７、配列番号１又は配列番号２の１８８、配列番号１又は配列番号２の１８９、配列番号３の２０４、配列番号１又は配列番号２の２０５、配列番号１又は配列番号２の２４７、配列番号３の２４７、配列番号１又は配列番号２の２４８、配列番号３の２５０、配列番号１又

は配列番号２の２５１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の２６４、配列番号１又は配列番号２の２６５、及び配列番号１又は配列番号２の２８６の１つに位置する天然に存在するアミノ酸に対する非保存的アミノ酸への置換（例えば、下記の表Ｂを参照されたい）である。

【００９５】

特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、Ｋ１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｔ４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｋ１１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｓ３３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｓ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｔ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｄ４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｎ４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ及びＭへの、Ｌ４９のＡ又はＧへの、Ｄ５３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｒ５５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ５８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｐ５９のＡ、Ｇ及びＦへの、Ｅ６０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｅ６１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｇ６２のＡへの、Ｄ９４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ９６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｓ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｇ１１０のＡへの、Ｓ１１２のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１４７のＡへの、Ｒ１７９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｔ１８０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｔ１８１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｄ１８３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｄ１８４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ１８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１８７のＡへの、Ｒ１８８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ１８９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２０４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２０５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｙ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ２６４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｇ２６４のＡへの、並びにＴ２８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの置換からなる群から選択される、少なくとも１つのアミノ酸置換を有する完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む、又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になる。

【００９６】

特定のさらなる実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、以下のアミノ酸置換：Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ８Ｖ、Ｔ９Ｉ、Ｓ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｋ１１Ｈ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ４７Ｇ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｌ４９Ａ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｐ５９Ｆ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｔ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｒ１７９Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｙ２４７Ａ、Ｒ２４８Ａ、Ｒ２５０Ａ、Ｒ２５１Ａ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｔ２８６Ａ及び／又はＴ２８６Ｉの少なくとも１つを有する完全長若しくは切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む、又はそのような志賀毒素Ａサブユニットから本質的になる。これらのエピトープ破壊性置換を組み合わせて、１エピトープ領域当たり複数の置換を有する及び／又は複数のエピトープ領域が破壊されているが、志賀毒素エフェクター機能をなお保持している、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを形成してもよい。例えば、天然位置の残基Ｋ１、Ｔ４、Ｓ８、Ｔ８、Ｔ９、Ｓ９、Ｋ１１、Ｋ１１、Ｓ３３、Ｓ４５、Ｔ４５、Ｄ４７、Ｎ４８、

Ｌ４９、Ｄ５３、Ｒ５５、Ｄ５８、Ｐ５９、Ｅ６０、Ｅ６１、Ｇ６２、Ｄ９４、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９、Ｔ１０９、Ｇ１１０、Ｓ１１２、Ｇ１４７、Ｒ１７９、Ｔ１８０、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３、Ｄ１８４、Ｌ１８５、Ｓ１８６、Ｓ１８６、Ｇ１８７、Ｒ１８８、Ｓ１８９、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５、Ｓ２４７、Ｙ２４７、Ｒ２４８、Ｒ２５０、Ｒ２５１、Ｄ２６４、Ｇ２６４、Ｔ２８６及び／又はＴ２８６での置換を、可能な場合には、天然位置の残基Ｋ１、Ｔ４、Ｓ８、Ｔ８、Ｔ９、Ｓ９、Ｋ１１、Ｋ１１、Ｓ３３、Ｓ４５、Ｔ４５、Ｄ４７、Ｎ４８、Ｌ４９、Ｄ５３、Ｒ５５、Ｄ５８、Ｐ５９、Ｅ６０、Ｅ６１、Ｇ６２、Ｄ９４、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９、Ｔ１０９、Ｇ１１０、Ｓ１１２、Ｇ１４７、Ｒ１７９、Ｔ１８０、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３、Ｄ１８４、Ｌ１８５、Ｓ１８６、Ｓ１８６、Ｇ１８７、Ｒ１８８、Ｓ１８９、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５、Ｓ２４７、Ｙ２４７、Ｒ２４８、Ｒ２５０、Ｒ２５１、Ｄ２６４、Ｇ２６４、Ｔ２８６及び／又はＴ２８６での置換と組み合わせて、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを生成してもよい。

【００９７】

他の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、完全長志賀毒素Ａサブユニットより短い切断型志賀毒素Ａサブユニットを含む、又はそのような切断型志賀毒素Ａサブユニットから本質的になる。志賀様毒素１Ａサブユニット切断物は、触媒活性であり、インビトロでリボソームを触媒的に不活性化することができ、細胞内で発現されたとき細胞毒性である（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。十分な酵素活性を示す最小志賀毒素Ａサブユニット断片は、Ｓｌｔ１Ａの残基１～２３９で構成されているポリペプチドである（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。実質的な触媒活性を保持すると報告されている志賀毒素Ａサブユニットの最小断片はＳｔｘＡの残基７５～２４７であった（Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)）が、真核生物細胞内で新規に発現されたＳｔｘＡ切断物は、サイトゾルに達するために、及びリボソームの触媒的不活性化を発揮するために、残基２４０までしか必要としない（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。

【００９８】

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、一般に完全長Ａサブユニットより小さいが、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、アミノ酸位置７７～２３９のポリペプチド領域（ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）若しくはＳｔｘＡ（配列番号２））、又は志賀毒素ファミリーのメンバーの他のＡサブユニット内の同等の領域（例えば（配列番号３）の７７～２３８）を維持することが好ましい。例えば、本発明の特定の実施形態において、ＳＬＴ－１Ａに由来する志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、配列番号１の７５～２５１、配列番号１の１～２４１、配列番号１の１～２５１、又は配列番号１のアミノ酸１～２６１を含む又はそのようなアミノ酸から本質的になることがある。同様に、ＳｔｘＡに由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、配列番号２の７５～２５１、配列番号２の１～２４１、配列番号２の１～２５１、又は配列番号２のアミノ酸１～２６１を含む又はそのようなアミノ酸から本質的になることがある。加えて、ＳＬＴ－２に由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、配列番号３の７５～２５１、配列番号３の１～２４１、配列番号３の１～２５１、又は配列番号３のアミノ酸１～２６１を含む又はそのようなアミノ酸から本質的になることがある。

【００９９】

本発明は、志賀毒素エフェクター領域が、天然に存在する志賀毒素Ａサブユニットと、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０又は

４１以上だけ又はまでのアミノ酸残基が異なる（しかし、少なくとも８５％、９０％、９５％、９９％又は９９％を超えるアミノ酸配列同一性を保持するだけしか異ならない）、本発明のポリペプチドのバリアントをさらに提供する。したがって、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来する本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、元の配列からの付加、欠失、切断又は他の改変を含むことがあるが、ただし、天然に存在する志賀毒素Ａサブユニットとの少なくとも８５％、９０％、９５％、９９％又は９９％を超えるアミノ酸配列同一性が維持されること、及び実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されていることを条件とする。

【０１００】

したがって、特定の実施形態において、志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、天然に存在する志賀毒素Ａサブユニット、例えばＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）、ＳｔｘＡ（配列番号２）及び／又はＳＬＴ－２Ａ（配列番号３）との少なくとも５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、９９．５％又は９９．７％の全配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、又はそのようなアミノ酸配列から本質的になる。

【０１０１】

志賀毒素Ａサブユニットの完全長バージョン又は切断型バージョンは、１又は２以上の変異（例えば、置換、欠失、挿入又は反転）を含んでいてもよいが、ただし、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されていることを条件とする。本発明の特定の実施形態において、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、周知の宿主形質転換、トランスフェクション、感染若しくは導入方法、又は志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドと連結された細胞標的化結合領域により媒介される内在化、いずれかによって、細胞への侵入後に細胞毒性を保持するのに十分な、天然に存在する志賀毒素Ａサブユニットとの配列同一性を有することが好ましい。志賀毒素Ａサブユニットにおける酵素活性及び／又は細胞毒性のために最も肝要な残基は、特に次の残基位置：アスパラギン－７５、チロシン－７７、グルタメート－１６７、アルギニン－１７０及びアルギニン－１７６にマッピングされている（Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)）。本発明の実施形態のいずれか１つにおいて、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、細胞毒性活性に概して必要とされる１又は２以上の保存されたアミノ酸位置、例えば、ＳｔｘＡ若しくはＳＬＴ－１Ａにおける位置７７、１６７、１７０及び１７６に見られるもの、又は志賀毒素ファミリーの他のメンバーにおける同等の保存された位置を、必然的にではないが好ましくは、維持しうる。細胞死、例えばその細胞毒性、を引き起こす本発明の細胞毒性タンパク質の能力を、当技術分野において周知の多数のアッセイのいずれか１又は２以上を用いて測定してもよい。

【０１０２】

Ｂ．脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むタンパク質

本発明のタンパク質は、細胞外標的生体分子特異的結合領域に連結された本発明のポリペプチドを含む、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。本発明のタンパク質の結合領域は、細胞外標的生体分子に選択的かつ特異的に結合することができる１又は２以上のポリペプチドを含む。結合領域は、１又は２以上の様々なポリペプチド部分、例えば、合成リガンドであるか自然に存在するリガンドであるかにかかわらず、リガンド、及びそれらの誘導体；免疫グロブリン由来ドメイン；免疫グロブリンドメインの代替物として合成によりエンジニアリングされた足場などを含むことがある。

【０１０３】

リガンド、モノクローナル抗体、エンジニアリングされた抗体誘導体、抗体のエンジニアリングされた代替物などの、特異的細胞タイプへのポリペプチドの、それらの結合特性

による標的化に有用である非常に多くの結合領域が、当技術分野において公知である。

【０１０４】

１つの特異的な、しかし非限定的な態様によると、本発明のタンパク質の結合領域は、天然に存在するリガンド、又は細胞外標的生体分子、一般に細胞表面受容体、との結合機能性を保持するリガンドの誘導体を含む。例えば、当技術分野において公知の様々なサイトカイン、成長因子及びホルモンを使用して、コグネートサイトカイン受容体、成長因子受容体又はホルモン受容体を発現する特異的細胞タイプの細胞表面に細胞毒性タンパク質を標的化することができる。リガンドの特定の非限定的な例（別名をカッコ内に示す）は、Ｂ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ，B-cell activating factor、ＡＰＲＩＬ）、コロニー刺激因子（ＣＳＦ，colony stimulating factor）、表皮成長因子（ＥＧＦ，epidermal growth factor）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ，fibroblast growth factor）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ，vascular endothelial growth factor）、インスリン様増殖因子（ＩＧＦ，insulin-like growth factor）、インターフェロン、インターロイキン（例えばＩＬ－２、ＩＬ－６及びＩＬ－２３）、神経成長因子（ＮＧＦ，nerve growth factor）、血小板由来増殖因子（ＴＧＦ，platelet derived growth factor）、及び腫瘍壊死因子（ＴＮＦ，tumor necrosis factor）を含む。

【０１０５】

特定の他の実施形態によると、結合領域は、細胞外標的生体分子に結合することができる合成リガンドを含む。１つの非限定的な例は、細胞毒性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４，cytotoxic T-lymphocyte antigen 4）に対するアンタゴニストである。

【０１０６】

１つの特異的な、しかし非限定的な態様によると、結合領域は、免疫グロブリン型結合領域を含むことがある。本書において用いる場合の用語「免疫グロブリン型結合領域」は、抗原又はエピトープなどの１又は２以上の標的生体分子に結合することができるポリペプチド領域を指す。結合領域は、標的と結合するそれらの能力によって定義されることもある。免疫グロブリン型結合領域は、一般に、抗体又は抗体様構造に由来するが、他の源からの代替足場がこの用語の範囲内で考えられる。

【０１０７】

免疫グロブリン（Ｉｇ）タンパク質は、Ｉｇドメインとして公知の構造ドメインを有する。Ｉｇドメインは、長さが約７０～１１０アミノ酸残基の範囲であり、典型的に７～９本の逆平行ベータ鎖が、サンドイッチ様構造を形成する２つのベータシートになるように並んでいる、特徴的なＩｇフォールドを有する、Ｉｇフォールドは、前記サンドイッチの内面で疎水性アミノ酸相互作用及び前記サンドイッチ内のシステイン残基間の高度に保存されたジスルフィド結合によって安定化される。Ｉｇドメインは、可変的なもの（ＩｇＶ又はＩセット）であることもあり、定常的なもの（ＩｇＣ又はＣセット）であることもあり、又は中間のもの（ＩｇＩ又はＩセット）であることもある。一部のＩｇドメインは、抗体の、それらのエピトープへの結合の特異性にとって重要である、相補性決定領域（ＣＤＲ，complementarity determining region）と会合していることがある。Ｉｇ様ドメインは、非免疫グロブリンタンパク質においても見つけられ、それに基づいてタンパク質のＩｇスーパーファミリーのメンバーとして分類される。HUGO遺伝子命名法委員会（ＨＧＮＣ，HUGO Gene Nomenclature Committee）は、Ｉｇ様ドメイン含有ファミリーのメンバーのリストを提供している。

【０１０８】

免疫グロブリン型結合領域は、アミノ酸配列が、例えば分子工学によって又はライブラリースクリーニングによる選択によって、ネイティブ抗体のアミノ酸配列又は非免疫グロブリンタンパク質のＩｇ様ドメインのアミノ酸配列から変更された、抗体又はその抗原結合断片のポリペプチド配列である。免疫グロブリン型結合領域の産生における組換えＤＮＡ技術及びインビトロライブラリースクリーニングの妥当性のため、抗体を再設計して、より小さいサイズ、細胞侵入又は他の治療上の改善などの所望の特性を得ることができる。可能なバリエーションは多く、１つだけのアミノ酸の変化から、例えば可変領域の、完

全再設計まで様々でありうる。典型的に、抗原結合特性を向上させるように、可変領域の安定性を向上させるように、又は免疫原性応答の可能性を低下させるように、可変領域に変更を加えることになる。

【０１０９】

本発明の成分として企図される非常に多くの免疫グロブリン型結合領域がある。特定の実施形態において、免疫グロブリン型結合領域は、細胞外標的生体分子に結合することができる抗体パラトープなどの、免疫グロブリン結合領域に由来する。特定の他の実施形態において、免疫グロブリン型結合領域は、いずれの免疫グロブリンドメインにも由来しないが、細胞外標的生体分子との高親和性結合をもたらすことによって免疫グロブリン結合領域のように機能する、エンジニアリングされたポリペプチドを含む。このエンジニアリングされたポリペプチドは、本書に記載の免疫グロブリンからの相補性決定領域を含む、又はそのような相補鎖決定領域から本質的になる、ポリペプチド足場を含んでいてもよい。

【０１１０】

特異的細胞タイプへのポリペプチドの、それらの高親和性結合特性による標的化に有用である、非常に多くの結合領域が、先行技術にもある。特定の実施形態において、本発明の結合領域は、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）ドメイン、ナノボディ、ラクダ化動物に由来する重鎖抗体ドメイン（V_HＨ断片）、二価ナノボディ、軟骨魚類に由来する重鎖抗体ドメイン、免疫グロブリン新規抗原受容体（ＩｇＮＡＲ）、V_{NAR}断片、一本鎖可変（ｓｃＦｖ）断片、多量体化ｓｃＦｖ断片（ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ）、二重特異性タンデムｓｃＦｖ断片、ジスルフィド安定化抗体可変（Ｆｖ）断片、V_L、V_H、C_L及びC_H1ドメインからなるジスルフィド安定化抗体結合（Ｆａｂ）断片、二価Ｆ（ａｂ’）２断片、重鎖及びC_H1ドメインからなるＦｄ断片、一本鎖Ｆｖ－C_H3ミニボディ、二重特異性ミニボディ、二量体C_H2ドメイン断片（C_H2D）、Ｆｃ抗原結合ドメイン（Ｆｃａｂ）、単離された相補性決定領域３（ＣＤＲ３）断片、拘束フレームワーク領域３，ＣＤＲ３，フレームワーク領域４（ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４）ポリペプチド、小モジュラー免疫医薬（ＳＭＩＰ）ドメイン、並びにそのパラトープ及び結合機能を保持する前述のものの任意の遺伝子操作された対応物を含む群から選択される（Saerens D et al., Curr.Opin.Pharmacol 8: 600-8 (2008)、Dimitrov D, MAbs 1: 26-8 (2009)、Weiner L, Cell 148: 1081-4 (2012)、Ahmad Z et al., Clin Dev Immunol 2012 : 980250 (2012)を参照されたい）。

【０１１１】

特定の他の実施形態に従って、結合領域は、免疫グロブリンドメインのエンジニアリングされた代替足場であって、標的生体分子の高親和性及び特異的結合などの類似の機能特性を示し、より大きい安定性又は免疫原性の低減などの特性向上のエンジニアリングを可能にする、代替足場を含む。本発明のタンパク質の特定の実施形態について、結合領域は、エンジニアリングされた、第１０フィブロネクチンIII型（１０Ｆｎ３）ドメイン（モノボディ、AdNectins（商標）、又はAdNexins（商標））、エンジニアリングされた、テネイシン由来、テネイシンIII型ドメイン（Centryns（商標））、エンジニアリングされた、アンキリン反復モチーフ含有ポリペプチド（DARPins（商標））、エンジニアリングされた、低密度リポタンパク質受容体由来、Ａドメイン（ＬＤＬＲ－Ａ）（Avimers（商標））、リポカリン（アンチカリン）、エンジニアリングされた、プロテアーゼ阻害剤由来、Kunitzドメイン、エンジニアリングされた、プロテインＡ由来、Ｚドメイン（Affibodies（商標））、エンジニアリングされた、ガンマ－Ｂ結晶由来足場又はエンジニアリングされた、ユビキチン由来足場（アフィリン）、Ｓａｃ７ｄ由来ポリペプチド（Nanoffitins（登録商標）又はアフィチン）、エンジニアリングされた、Ｆｙｎ由来、ＳＨ２ドメイン（Fynomers（登録商標））、ミニタンパク質、Ｃ型レクチン様ドメイン足場、エンジニアリングされた抗体模倣体、及びその結合機能性を保持する前述のものの任意の遺伝子操作された対応物を含む群から選択される（Worn A, Pluckthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001)、Xu L et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002)、Wikman M et al., Protein

Eng Des Sel 17: 455-62 (2004)、Binz H et al., Nat Biotechnol 23: 1257-68 (2005)、Hey T et al., Trends Biotechnol 23 :514-522 (2005)、Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol 23: 1126-36 (2005)、Gill D, Damle N, Curr Opin Biotech 17: 653-8 (2006)、Koide A, Koide S, Methods Mol Biol 352: 95-109 (2007)、Byla P et al., J Biol Chem 285: 12096 (2010)、Zoller F et al., Molecules 16: 2467-85 (2011))。

【０１１２】

上記結合領域のいずれを本発明の成分として使用してもよいが、ただし、その結合領域成分が、細胞外標的生体分子に対して、１リットル当たり10^{-5}～10^{-12}モル、好ましくは２００ナノモル（ｎＭ）未満の解離定数を有することを条件とする。

【０１１３】

細胞外標的生体分子

本発明のタンパク質の結合領域は、細胞外標的生体分子と特異的に結合することができる、好ましくは、がん細胞、腫瘍細胞、形質細胞、感染細胞、又は細胞内病原体を内部に持つ宿主細胞などの、目的の細胞タイプの表面に物理的に結合されている、ポリペプチド領域を含む。

【０１１４】

用語「標的生体分子」は、結合領域によって結合されてタンパク質を生物体内の特定の細胞タイプ又は位置に標的化することができる生体分子、一般にはタンパク質、又はグリコシル化などの翻訳後修飾によって修飾されたタンパク質を指す。細胞外標的生体分子は、未修飾ポリペプチド、生化学的官能基の付加によって修飾されたポリペプチド、及び糖脂質を含む、様々なエピトープを含みうる（例えば、米国特許第５，０９１，１７８号明細書、欧州特許第２４３１７４３号明細書を参照されたい）。細胞外標的生体分子は、本発明のタンパク質に内因的に内在化される、又は本発明のタンパク質との相互作用によって容易に内在化させられることが望ましい。

【０１１５】

本発明では、標的生体分子の修飾に関して用語「細胞外」は、その構造の少なくとも一部分が細胞外環境に曝露された生体分子を指す。細胞外標的生体分子は、細胞膜成分、膜貫通タンパク質、細胞膜に係留されている生体分子、細胞表面に結合されている生体分子及び分泌された生体分子を含む。

【０１１６】

本発明に関して、標的生体分子を記述するために使用するときの句「物理的に結合されている」は、標的生体分子又はその一部分を細胞の外部と結合させる、共有結合性及び／又は非共有結合性両方の分子間相互作用、例えば、単一の相互作用各々のエネルギーがおおよそ約１～５キロカロリーである、標的生体分子と細胞との複数の非共有結合性相互作用（例えば、静電結合、水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水力など）を意味する。全ての不可欠膜タンパク質は、細胞膜と物理的に結合されている状態で見出すことができる。例えば、細胞外標的生体分子は、膜貫通領域、脂質アンカー、糖脂質アンカーを含むことがあり、及び／又は前述のもののいずれか１つを含む因子と（例えば、非特異的疎水性相互作用及び／又は脂質結合相互作用によって）非共有結合的に会合していることもある。

【０１１７】

本発明のタンパク質の結合領域は、例えば、それらの標的生体分子の細胞特異的発現、及び／又は特異的細胞タイプに対するそれらの標的生体分子の物理的局在などの、非常に多くの基準に基づいて設計又は選択されうる。例えば、本発明の特定のタンパク質は、１つの細胞タイプのみによって排他的に発現される細胞方面標的を細胞表面と結合させることができる結合ドメインを含む。このことによって、細胞外標的生体分子を発現しない「バイスタンダー」細胞タイプを超える高い優先性（少なくとも３倍の細胞毒性効果）での特異的細胞タイプの標的化細胞殺滅が可能になる。あるいは、結合領域の標的生体分子の発現は、該細胞外標的生体分子が、標的にされることにならないほど少ない量で発現される、又は標的にされることにならない少量で細胞タイプと物理的に結合される場合には、

１つの細胞タイプに対して非排他的でありうる。このことによって、有意な量の細胞外標的生体分子を発現しない又は有意な量の細胞外標的生体分子と物理的に結合されていない「バイスタンダー」細胞タイプを超える高い優先性（少なくとも３倍の細胞毒性効果）での特異的細胞タイプの標的化細胞殺滅も可能になる。本発明の細胞毒性タンパク質を使用して、細胞の態様な条件、例えば、エクスビボ条件、インビトロ培養される条件、又はインビボ条件下で、標的細胞（多細胞生物体内のそれらの天然位置にある生体内原位置の細胞を含む）を殺滅することができる。

【０１１８】

本発明のタンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子は、がん細胞、免疫細胞、及び細胞内病原体、例えばウイルス、細菌、真菌、プリオン又は原生動物に感染した細胞上にバイオマーカーを不釣り合いなほど多く又は排他的に含みうる。

【０１１９】

脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域

本発明のタンパク質の特定の実施形態では、１又は２以上のアミノ酸残基を変異、挿入又は欠失させて、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域の酵素活性を増加させることができる。例えば、Ｓｔｘ１Ａの残基位置アラニン－２３１をグルタメートに変異させることによってそのインビトロ酵素活性が増加された（Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)）。

【０１２０】

本発明のタンパク質の特定の実施形態では、１又は２以上のアミノ酸残基を変異又は欠失させて、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域の触媒活性及び／又は細胞毒性活性を低減させる又は除去することができる。志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットの触媒及び／又は細胞毒性活性を変異又は切断によって減少させても又は削除してもよいが、ただし、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されることを条件とする。チロシン－７７、グルタメート－１６７、アルギニン－１７０、チロシン－１１４及びトリプトファン－２０３と標識されている位置は、Ｓｔｘ、Ｓｔｘ１及びＳｔｘ２の触媒活性にとって重要であることが証明されている（(Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988)、Deresiewicz R et al., Biochemistry 31: 3272-80 (1992)、Deresiewicz R et al., Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993)、Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993)、Cao C et al., Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994)、Suhan, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)）。グルタメート－１６７とアルギニン－１７０の両方を変異させることによって、無細胞リボソーム不活性化アッセイにおいてＳｌｔ－Ｉ　Ａ１の酵素活性が除去された（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。小胞体におけるＳｌｔ－Ｉ　Ａ１の新規発現を用いる別のアプローチでは、グルタメート－１６７とアルギニン－１７０の両方を変異させることによって、又はＳＬｔ－Ｉ　Ａ１を切断して残基１－２３９にすることによって、発現レベルでＳｌｔ－Ｉ　Ａ１断片細胞毒性が除去された（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。

【０１２１】

本発明のタンパク質は、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを各々が含み、該ペプチドは、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能を保持するが、細胞毒性親分子から、酵素活性にとって重要な１又は２以上の成分を変異させることによって非細胞毒性機能、例えば、細胞分裂停止の遂行、外因性物質の送達及び／又は細胞タイプの検出のために細胞毒性が減少又は消失されたタンパク質へと、エンジニアリングされていることがある。この一般構造は、本発明のポリペプチドを本書に記載するような様々な応用のために任意の数の多様な組成物、例えば結合領域及び／又は検出促進剤に連結させることができる点で、モジュラーである。

【０１２２】

分子の免疫原性（抗体及び／又は細胞媒介免疫応答を誘導する能力）は、脊索動物などの生きている生物への投与後にその分子に対する何らかの免疫応答（抗体及び／又は細胞

媒介免疫応答）を観察することによってアッセイすることができる。投与された分子を特異的に標的にする抗体の量及び形成などの特定の免疫応答を経時的に測定することができる。投与された分子に特異的に結合する抗体の存在は、１）投与された分子を認識した１つ若しくは２つ以上の抗体の存在、及び／又は２）投与された分子を認識する１つ若しくは２つ以上の抗体の新規形成の誘導を示す。

【０１２３】

既に形成されていた抗分子抗体の存在は、投与前の血清をその抗分子抗体の存在について調査することによって判定することができる。新規抗「投与分子」抗体形成の誘導は、投与後の血清を生成された抗分子抗体の量について経時的にモニターすることによって判定することができる。

【０１２４】

分子（例えば志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド）の投与後に脊索動物において誘導される抗体の量は、投与前の抗分子抗体の量と投与後の抗分子抗体の量とを比較することによって判定することができる。投与後に脊索動物において誘導される抗「投与分子」抗体の量は、一般的な免疫原性を示すとともに、様々な脊索動物において様々な免疫応答を誘導する、例えば、投与後の抗分子抗体産生の増加及び多様化、免疫細胞媒免疫応答、分子中和活性、過敏症反応、アナフィラキシー、アナフィラキシー様反応並びに他の免疫応答を誘導する、分子の能力を示す。

【０１２５】

別のより免疫原性が高い分子などの基準点なしで免疫原性が弱い分子を計測することは困難でありうる。２つの分子（例えば、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドと脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド）の相対免疫原性は、各分子を異なる生物に個々に投与した後、各分子それぞれに対して産生される抗分子抗体の相対差を観察することによって評定することができる。新規抗「投与分子」抗体形成の相対誘導は、投与後の血清において各分子それぞれに対して経時的に生成される抗分子抗体の量についての相対差を測定することによって判定することができる。

【０１２６】

異なる分子（例えば、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド）で処置された脊索動物、例えばマウス、において誘導される抗体の量は、標準的なＥＬＩＳＡベースのアッセイで測定することができ、異なる分子の相対免疫原性を比較するために使用することができる。

【０１２７】

ＫＤＥＬファミリーのメンバーの小胞体残留／回収シグナルモチーフ

本発明では、句「小胞体残留／回収シグナルモチーフ」、ＫＤＥＬ型シグナルモチーフ、又はシグナルモチーフは、真核生物細胞内でＫＤＥＬ受容体による小胞体へのタンパク質の細胞内局在を促進するように機能することができるＫＤＥＬファミリーの任意のメンバーを指す。

【０１２８】

カルボキシ末端リジンーアスパラギンーグルタメートーロイシン（ＫＤＥＬ（「ＫＤＥＬ」は配列番号：６０として開示））配列は、真核生物細胞内の可溶性タンパク質のカノニカル小胞体残留及び回収シグナルモチーフであり、ＫＤＥＬ受容体によって認識される（Capitani M, Sallese M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009)を参照されたい）。シグナルモチーフのＫＤＥＬファミリーは、多くのＫＤＥＬ様モチーフ、例えば、ＨＤＥＬ（配列番号：６２）、ＲＤＥＬ（配列番号：６４）、ＷＤＥＬ（配列番号：６５）、ＹＤＥＬ（配列番号：６６）、ＨＥＥＬ（配列番号：６８）、ＫＥＥＬ（配列番号：６９）、ＲＥＥＬ（配列番号：７０）、ＫＦＥＬ（配列番号：７３）、ＫＩＥＬ（配列番号：８５）、ＤＫＥＬ（配列番号：８６）、ＫＫＥＬ（配列番号：８９）、ＨＮＥＬ（配列番号：９３）、ＨＴＥＬ（配列番号：９４）、ＫＴＥＬ（配列番号：９５）及びＨＶＥＬ（配列番号：９６）を含み、これらの全てが、系統発生学上の複数の界にわたって小胞体の内腔の常在物であることが公知であるタンパク質のカルボキシ末端において見出される（Munro S, P

elham H, Cell 48: 899-907 (1987)、Raykhel I et al., J Cell Biol 179: 1193-204 (2007))。ＫＤＥＬシグナルモチーフファミリーは、合成構築物を使用して証明された少なくとも４６のポリペプチドバリアントを含む（Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007))。さらなるＫＤＥＬシグナルモチーフは、ＡＬＥＤＥＬ（配列番号：１０６）、ＨＡＥＤＥＬ（配列番号：１０７）、ＨＬＥＤＥＬ（配列番号：１０８）、ＫＬＥＤＥＬ（配列番号：１０９）、ＩＲＳＤＥＬ（配列番号：１１０）、ＥＲＳＴＥＬ（配列番号：１１１）、及びＲＰＳＴＥＬ（配列番号：１１２）を含む（Alanen H et al., J Mol Biol 409: 291-7 (2011))。ＫＤＥＬシグナルモチーフを表す一般化コンセンサスモチーフは、［ＫＲＨＱＳＡ］－［ＤＥＮＱ］－Ｅ－Ｌと記載されている（Hulo N et al., Nucleic Acids Res 34: D227-30 (2006))。

【０１２９】

ＫＤＥＬファミリーシグナルモチーフを含有するタンパク質は、Golgi複合体全体にわたって分布しているＫＤＥＬ受容体によって結合され、小胞体の内腔への放出のために微小管依存性メカニズムによって小胞体に輸送される（Griffiths G et al., J Cell Biol 127: 1557-74 (1994)、Miesenbock G, Rothman J, J Cell Biol 129: 309-19 (1995))。ＫＤＥＬ受容体は、Golgi複合体と小胞体間で動的に循環する（Jackson M et al., EMBO J 9: 3153-62 (1990)、Schutze M et al., EMBO J 13: 1696-1705 (1994))。

【０１３０】

本発明では、ＫＤＥＬファミリーのメンバーは、真核生物細胞内でＫＤＥＬ受容体による小胞体へのタンパク質の細胞内局在を促進するように機能することができる合成シグナルモチーフを含む。言い換えると、ＫＤＥＬファミリーの一部のメンバーは、自然界に存在しないことがあり、しかし自然界で観察される必要もなく、当技術分野において公知の方法を用いて構築され、実験により検証されており、又は構築され、実験により検証されうる。例えば、Raykhel I et al., J Cell Biol 179: 1193-204（2007）を参照されたい。

【０１３１】

本発明のタンパク質の特定の実施形態の成分として、ＫＤＥＬ型シグナルモチーフは、タンパク質中でカルボキシ末端上に存在するように物理的に位置し、配向され、又は配置される。

【０１３２】

本発明では、志賀毒素エフェクター領域及び結合領域について、互いとの関連でも、タンパク質全体のＮ末端及びＣ末端との関連でも、特定の順序も配向も決められていない（例えば図１を参照されたい）。本発明のタンパク質中の結合領域と志賀毒素エフェクター領域は、１又は２以上の介在ポリペプチド配列によって、例えば、当技術分野において周知の１又は２以上のリンカーで、互いに直接連結されていることもあり、及び／又は互に適切に連結されていることもある。本発明のタンパク質は、ＫＤＥＬ（配列番号：６０）などの、カルボキシ末端内質残留／回収シグナルモチーフをさらに含んでいてもよい。

【０１３３】

本発明のタンパク質の一般構造は、様々な多様な結合領域を同一の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域とともに使用して、様々な細胞外標的生体分子の多様な標的化をもたらし、かくして細胞毒性、細胞分裂停止、及び／又は様々な多様な細胞タイプへの内因性物質送達の標的化をもたらす点で、モジュラーである。不適切な細胞内経路指定のため、Ｔ細胞エピトープ提示をもたらさず、及び／又は細胞毒性でない、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、細胞に外因性物質を送達するために依然として有用でありうる。

【０１３４】

II. 本発明のポリペプチド成分及び／又はそれらの小成分を結合する連結

本発明の個々のポリペプチド及び／又はタンパク質成分、例えば、結合領域及び（細胞毒性であることもあり、並びに／又は触媒活性及び／若しくは細胞毒性を改変、低減若しくは除去する１つ若しくは２つ以上の変異を内部に持つこともある）志賀毒素エフェクター領域を当技術分野において周知の及び／又は本書に記載する１又は２以上のリンカーによって互いに適切に連結させることができる。結合領域の個々のポリペプチド小成分、例えば、重鎖可変領域（V_H）、軽鎖可変領域（V_L）、ＣＤＲ、及び／又はＡＢＲ領域を、当技術分野において周知の及び／又は本書に記載する１又は２以上のリンカーによって互いに適切に連結させることができる（例えば、Weisser N, Hall J, Biotechnol Adv 27: 502-20 (2009)、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。本発明のタンパク質成分、例えば、多鎖結合領域は、当技術分野において周知の１又は２以上のリンカーによって互いに又は本発明の他のポリペプチド成分と安定的に連結させることができる。本発明のペプチド成分、例えば、ＫＤＥＬファミリー小胞体残留／回収シグナルモチーフは、当技術分野において周知の１又は２以上のリンカー、例えばタンパク質性リンカー、によって本発明の別の成分に安定的に連結させることができる。

【０１３５】

好適なリンカーは、一般に、いずれのリンカーも他の成分も用いずに個々に生産されたポリペプチド成分と非常に類似した三次元構造での、本発明の各ポリペプチド成分のフォールディングを可能にするものである。好適なリンカーは、単一のアミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、及び上述のもののいずれかを欠くリンカー、例えば、分岐状であるか環状であるかにかかわらず様々な非タンパク質性炭素鎖を含む（例えば、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)）。

【０１３６】

好適なリンカーは、タンパク質性であることがあり、１又は２以上のアミノ酸、ペプチド及び／又はポリペプチドを含むことがある。タンパク質性リンカーは、組換え融合タンパク質及び化学的に連結されたコンジュゲートの両方に好適である。タンパク質性リンカーは、例えば約５～約３０、又は約６～約２５アミノ酸残基などの、約２～約５０アミノ酸残基を概して有する。選択されるリンカーの長さは、例えば、所望の特性、又はリンカーを選択している特性などの、様々な因子に依存することとなる（例えば、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。

【０１３７】

好適なリンカーは、例えば化学的リンカーなどの、非タンパク質性のものであることもある（例えば、Dosio F et al., Toxins 3: 848-83 (2011)、Feld J et al., Oncotarget 4: 397-412 (2013)を参照されたい）。免疫グロブリン由来ポリペプチドを異種ポリペプチドに結合させるために一般に使用されるリンカーなどの、当技術分野において公知の様々な非タンパク質性リンカーを使用して、結合領域を、志賀毒素エフェクター領域に連結させることができる。例えば、ポリペプチドリンカーは、それらのアミノ酸残基及び炭水化物部分の官能性側鎖、例えば、カルボキシ、アミノ、アミン、スルフヒドリル、カルボン酸、カルボニル、ヒドロキシル及び／又は環式環基などを用いて連結させることができる。例えば、ジスルフィド結合及びチオエーテル結合を用いて、２つ又は３つ以上のポリペプチドを連結させてもよい（例えば、Fitzgerald D et al., Bioconjugate Chem 1: 264-8 (1990)、Pasqualucci L et al., Haematologica 80: 546-56 (1995)を参照されたい）。加えて、非天然アミノ酸残基を他の官能性側鎖、例えばケトン基と併用してもよい（例えば、Sun S et al., Chembiochem Jul 18 (2014)、Tian F et al., Proc Natl Acad Sci USA 111: 1766-71 (2014)を参照されたい）。非タンパク質性化学的リンカーの例は、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）－アミノベンゾエート、Ｓ－（Ｎ－スクシンイミジル)チオアセテート（ＳＡＴＡ, S-(N-succinimidyl) thioacetate）、Ｎ-スクシンイミジル－オキシカルボニル－ｃｕ－メチル－ａ－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ＳＭＰＴ, N-succinimidyl-oxycarbonyl-cu-methyl-a-(2-pyridyldithio) toluene）、Ｎ-スクシンイミジル４－（２－ピリジルジチオ）－ペンタノアート（ＳＰＰ, N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)-pentanoate）、スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル

）シクロヘキサンカルボキシレート（ＳＭＣＣ又はＭＣＣ，succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane carboxylate）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）－アミノベンゾエート、４－スクシンイミジル－オキシカルボニル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン、スルホスクシンイミジル－６－（α－メチル－α－（ピリジルジチオール）－トルアミド）ヘキサノエート、Ｎ－スクシンイミジル－３－（－２－ピリジルジチオ）－プロピオネート（ＳＰＤＰ，N-succinimidyl-3-(-2-pyridyldithio)-proprionate）、スクシンイミジル６（３（－（－２－ピリジルジチオ）－プロピオンアミド）ヘキサノエート、スルホスクシンイミジル ６（３（－（－２－ピリジルジチオ）－プロピオンアミド）ヘキサノエート、マレイミドカプロイル（ＭＣ，maleimidocaproyl）、マレイミドカプロイル－バリン－シトルリン－Ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ，maleimidocaproyl-valine-citrulline-p-aminobenzyloxycarbonyl）、３－マレイミド安息香酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ，3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester）、アルファ－アルキル誘導体、スルホＮＨＳ－ＡＴＭＢＡ（スルホスクシンイミジルＮ－［３－（アセチルチオ）－３－メチルブチリル－ベーターアラニン］）、スルホジクロロフェノール、２－イミノチオラン、３－（２－ピリジルジチオ）－プロピオニルヒドラジド、エルマン試薬、ジクロロトリアジン酸、及びＳ－（２－チオピリジル）－Ｌ－システインを含むが、これらに限定されない（例えば、Thorpe P et al., Eur J Biochem 147: 197-206 (1985)、Thorpe P et al., Cancer Res 47: 5924-31 (1987)、Thorpe P et al., Cancer Res 48: 6396-403 (1988)、Grossbard M et al., Blood 79: 576-85 (1992)、Lui C et al., Proc Natl Acad Sci USA 93: 8618-23 (1996)、Doronina S et al., Nat Biotechnol 21: 778-84 (2003)、Feld J et al., Oncotarget 4: 397-412 (2013)を参照されたい）。

【０１３８】

タンパク質性であるか非タンパク性であるかにかかわらず、好適なリンカーは、例えば、プロテアーゼ感受性、環境酸化還元電位感受性、ｐＨ感受性、酸切断性、光切断性及び／又は熱感受性リンカーを含みうる（例えば、Dosio F et al., Toxins 3: 848-83 (2011)、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)、Feld J et al., Oncotarget 4: 397-412 (2013)を参照されたい）。

【０１３９】

タンパク質性リンカーを本発明の組換え融合タンパク質への組み込みに選択してもよい。本発明の組換え融合タンパク質のためのリンカーは、約２～５０アミノ酸残基、好ましくは約５～３０アミノ酸残基を概して含む（Argos P, J Mol Biol 211: 943-58 (1990)、Williamson M, Biochem J 297: 240-60 (1994)、George R, Heringa J, Protein Eng 15: 871-9 (2002)、Kreitman R, AAPS J 8: E532-51 (2006)）。一般に、タンパク質性リンカーは、例えばトレオニン、プロリン、グルタミン、グリシン及びアラニンなどの、極性、非荷電及び／又は荷電残基を有するアミノ酸残基の大部分を含む（例えば、Huston J et al.Proc Natl Acad Sci U.S.A.85: 5879-83 (1988)、Pastan I et al., Annu Rev Med 58: 221-37 (2007)、Li J et al., Cell Immunol 118: 85-99 (1989)、Cumber A et al.Bioconj Chem 3: 397-401 (1992)、Friedman P et al., Cancer Res 53: 334-9 (1993)、Whitlow M et al., Protein Engineering 6: 989-95 (1993)、Siegall C et al., J Immunol 152: 2377-84 (1994)、Newton et al.Biochemistry 35: 545-53 (1996)、Ladurner et al.J Mol Biol 273: 330-7 (1997)、Kreitman R et al., Leuk Lymphoma 52: 82-6 (2011)、米国特許第４，８９４，４４３号明細書を参照されたい）。タンパク質性リンカーの非限定的な例は、アラニン－セリン－グリシン－グリシン－プロリン－グルタメート（ＡＳＧＧＰＥ（配列番号：１１３））、バリン－メチオニン（ＶＭ）、アラニン－メチオニン（ＡＭ）、ＡＭ（$G_{2-4}S)_x$ＡＭ（この場合、Ｇはグリシンであり、Ｓはセリンであり、ｘは１～１０の整数である）（配列番号：１１４）を含む。

【０１４０】

タンパク質性リンカーを所望の特性に基づいて選択することができる。当業者は、特異

的特徴を念頭に置いて、例えば、融合分子のフォールディング、安定性、発現、可溶性、薬物動態特性、薬力学的特性、及び／又は融合構築物に関連して同じドメイン単独での活性と比較した融合ドメインの活性のうちの１又は２以上を最適化するように、タンパク質性を選択することができる。例えば、タンパク質性リンカーは、可動性、剛性及び／又は切断性に基づいて選択されることもある（例えば、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。当業者は、リンカーを選択する際にデータベース及びリンカー設計ソフトウェアツールを利用することができる。特定のリンカーが、発現を最適化するために選択されることもある（例えば、Turner D et al., J Immunl Methods 205: 43-54 (1997)を参照されたい）。ホモ多量体を形成するために同一のポリペプチド若しくはタンパク質間の又はヘテロ多量体を形成するために異なるポリペプチド若しくはタンパク質間の分子間相互負作用を促進するために、特定のリンカーが選択されることもある。例えば、本発明のタンパク質のポリペプチド成分間の所望の非共有結合性相互作用、例えば、二量体及び他のより高次の多量体の形成に関連した相互作用などを可能にする、タンパク質性リンカーを選択されることもある（例えば、米国特許第４，９４６，７７８号明細書を参照されたい）。

【０１４１】

可動性タンパク質性リンカーは、多くの場合、１２アミノ酸残基長より長く、小さい非極性アミノ酸残基、極性アミノ酸残基及び／又は親水性アミノ酸残基、例えばグリシン、セリン及びトレオニンなどに富んでいる（例えば、Bird R et al., Science 242: 423-6 (1988)、Friedman P et al., Cancer Res 53: 334-9 (1993)、Siegall C et al., J Immunol 152: 2377-84 (1994)を参照されたい）。可動性タンパク質性リンカーは、成分間の空間的離隔を増すように選択されることもあり、及び／又は成分間の分子間相互作用を可能にするように選択されることもある。例えば、様々な「ＧＳ」リンカーが当業者に公知であり、複数のグリシン及び／又は１つ若しくは２つ以上のセリンで構成され、例えば（$Ｇ_{x}Ｓ)_{n}$（配列番号：１１５）、（$Ｓ_{x}Ｇ)_{n}$（配列番号：１１６）、（$(ＧＧＧＧＳ)_{n}$（配列番号：１１７）及び（$Ｇ)_{n}$（配列番号：１１８）（この場合、ｘは１～６であり、ｎは１～３０である）などの反復単位で構成されることもある（例えば、国際公開第９６／０６６４１号パンフレットを参照されたい）。可動性タンパク質性リンカーの非限定的な例は、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号：１１９）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号：１２０）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号：１２１）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号：１２２）、ＥＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＥＦ（配列番号：１２３）、ＳＲＳＳＧ（配列番号：１２４）、及びＳＧＳＳＣ（配列番号：１２５）を含む。

【０１４２】

剛性タンパク質性リンカーは、多くの場合、堅いアルファヘリックス構造であり、プロリン残基及び／又は１つ若しくは２つ以上の戦略的に配置されたプロリンに富んでいる（例えば、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。剛性リンカーは、連結された成分間の分子間相互作用を防止するために選択されることがある。

【０１４３】

好適なリンカーは、成分のインビボ分離、例えば、切断及び／又は環境特異的不安定性に起因する成分のインビボ分離などを可能にするように、選択されうる（例えば、Dosio F et al., Toxins 3: 848-83 (2011)、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。インビボ切断性タンパク質性リンカーは、タンパク質プロセッシングによって結合解除することができる、及び／又は環境を、多くの場合、生物体内の若しくは特定の細胞タイプの内部の特異的部位の環境を、削減することができる（例えば、Doronina S et al., Bioconjug Chem 17: 144-24 (2006)、Erickson H et al., Cancer Res 66: 4426-33 (2006)を参照されたい）。インビボ切断性タンパク質性リンカーは、１又は２以上のシステイン対によって形成されるプロテアーゼ感受性モチーフ及び／又

はジスルフィド結合を含むことが多い（例えば、Pietersz G et al., Cancer Res 48: 4469-76 (1998)、The J et al., J Immunol Methods 110: 101-9 (1998)を参照されたい；Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。インビボ切断性タンパク質性リンカーは、生物体内の特定の位置、細胞内の区画、のみに存在する及び／又は特定の生理若しくは病的条件下でのみ活性になるプロテアーゼ（例えば、異常に高レベルのプロテアーゼ、特定の疾患部位で過剰発現されるプロテアーゼ、及び病原性微生物によって特異的に発現されるプロテアーゼなど）に対して感受性であるように設計することができる。例えば、細胞内のみに存在するプロテアーゼ、特異的細胞タイプ内にのみ存在するプロテアーゼ、及びがん若しくは炎症のような病的条件下でのみ存在するプロテアーゼ、例えば、Ｒ－ｘ－ｘ－Ｒモチーフ及びＡＭＧＲＳＧＧＧＣＡＧＮＲＶＧＳＳＬＳＣＧＧＬＮＬＱＡＭ（配列番号：１２６）などによって切断されるタンパク質性リンカーは、当技術分野において公知である。

【０１４４】

本発明のタンパク質の特定の実施形態では、標的細胞内に存在するプロテアーゼによる切断をもたらすために１又は２以上のプロテアーゼ感受性部位を含むリンカーを使用することがある。本発明のタンパク質の特定の実施形態では、脊椎動物生物への投与後の望ましくない毒性を低減させるために切断性でないリンカーを使用することもある。

【０１４５】

好適なリンカーは、タンパク質性であるか非タンパク性であるかにかかわらず、例えば、プロテアーゼ感受性、環境酸化還元電位感受性、ｐＨ感受性、酸切断性、光切断性及び／又は熱感受性リンカーを含みうる（例えば、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)を参照されたい）。

【０１４６】

好適な切断性リンカーは、例えば、Zarling D et al., J Immunol 124: 913-20 (1980)、Jung S, Moroi M, Biochem Biophys Acta 761: 152-62 (1983)、Bouizar Z et al., Eur J Biochem 155: 141-7 (1986)、Park L et al., J Biol Chem 261: 205-10 (1986)、Browning J, Ribolini A, J Immunol 143: 1859-67 (1989)、Joshi S, Burrows R, J Biol Chem 265: 14518-25 (1990)などの、当技術分野において公知である切断性基を含むリンカーを含みうる。

【０１４７】

好適なリンカーは、ｐＨ感受性リンカーを含みうる。例えば、特定の好適なリンカーは、標的細胞の細胞内区画内部での解離をもたらすためにより低いｐＨ環境でのそれらの不安定性について選択されることがある。例えば、１又は２以上のトリチル基、誘導体化トリチル基、ビスマレイミドエトキシプロパン基、アジピン酸ジヒドラジド基及び／又は酸不安定性基を含むリンカーは、特異的ｐＨ範囲を有する環境で本発明のタンパク質の成分、例えばポリペプチド成分、の放出をもたらすことができる（例えば、Welhoner H et al., J Biol Chem 266: 4309-14 (1991)、 Fattom A et al., Infect Immun 60: 584-9 (1992)を参照されたい）。例えば腫瘍組織のｐＨが健常組織の場合より低いなどの、組織間の生理的ｐＨ差に対応するｐＨ範囲で切断する特定のリンカーを選択してもよい（例えば、米国特許第５，６１２，４７４号明細書を参照されたい）。

【０１４８】

光切断性リンカーは、可視領域の光などの、特定の波長領域の電磁放射線への曝露に基づいて切断されるリンカーである。（例えば、Goldmacher V et al., Bioconj Chem 3: 104-7 (1992)を参照されたい）。光切断性リンカーを使用して、本発明のタンパク質の成分、例えばポリペプチド成分、を特定の波長の光への曝露に基づいて放出させることができる。光切断性リンカーの非限定的な例は、システインの光切断性保護基のようなニトロベンジル基、ニトロベンジルオキシカルボニルクロリド架橋剤、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド共重合体、グリシン共重合体、フルオレセイン共重合体及びメチルローダミン共重合体を含む（Hazum E et al., Pept Proc Eur Pept Symp, 16th, Brunfeldt K, ed

., 105-110 (1981)、Senter et al., Photochem Photobiol 42: 231-7 (1985)、Yen et al., Makromol Chem 190: 69-82 (1989)、Goldmacher V et al., Bioconj Chem 3: 104-7 (1992))。光切断性リンカーは、ファイバーオプティクスを使用して光に曝露することができる疾患、障害及び状態を治療するために設計された本発明のタンパク質を形成するための連結成分に、特に使用されうる。

【０１４９】

本発明のタンパク質の特定の実施形態において、結合領域は、共有結合性連結及び非共有結合性連結の両方を含む当業者に公知の手段を任意の数用いて、志賀毒素エフェクター領域に連結される（例えば、Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69 (2013)、Behrens C, Liu B, MAbs 6: 46-53 (2014)を参照されたい）。

【０１５０】

本発明のタンパク質の特定の実施形態において、タンパク質は、重鎖可変（V_H）ドメインと軽鎖可変（V_L）ドメインを接続するリンカーを有するｓｃＦｖである結合領域を含む。例えば１５残基（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）$_3$ペプチド（配列番号：１２７）などの、この目的に好適な非常に多くのリンカーが当技術分野において公知である。非共有結合性多価構造の形成に使用することができる好適なｓｃＦｖリンカーは、ＧＧＳ、ＧＧＧＳ（配列番号：１２８）、ＧＧＧＧＳ（配列番号：１２９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧ（配列番号：１３０）、ＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号：１３１）、ＧＳＴＳＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳＳ（配列番号：１３２）及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴＫＧ（配列番号：１３３）を含む（Pluckthun A, Pack P, Immunotechnology 3: 83-105 (1997)、Atwell J et al., Protein Eng 12: 597-604 (1999)、Wu A et al., Protein Eng 14: 1025-33 (2001)、Yazaki P et al., J Immunol Methods 253: 195-208 (2001)、Carmichael J et al., J Mol Biol 326: 341-51 (2003)、Arndt M et al., FEBS Lett 578: 257-61 (2004)、Bie C et al., World J Hepatol 2: 185-91 (2010))。

【０１５１】

本発明のタンパク質の成分の連結に好適な方法は、そのような連結を果たすために当技術分野において現在公知のいずれの方法によるものであってもよいが、ただし、本書に記載するアッセイを含む適切なアッセイによって測定して、その結合が、結合領域の結合能力、タンパク質の細胞内在化、及び／又は志賀毒素エフェクター領域の所望の毒素エフェクター機能を妨げないことを条件とする。

【０１５２】

本発明では、志賀毒素エフェクター領域及び細胞標的化結合領域について、互いとの関連でも、タンパク質全体との関連でも、特定の順序も配向も決められていない（例えば図１を参照されたい）。本発明のポリペプチド及びタンパク質の成分をいずれの順序で配置してもよいが、ただし、結合領域及び志賀毒素エフェクター領域の所望の活性が除去されないことを条件とする。本発明のポリペプチド及びタンパク質の上記実施形態において、結合領域、（細胞毒性であることもあり、並びに／又は触媒活性及び／若しくは細胞毒性を低減若しくは除去する１つ若しくは２つ以上変異を内部に持つこともある）志賀毒素エフェクター領域、及び小胞体残留／回収シグナルモチーフは、互いに直接連結されることもあり、並びに／又は１つ若しくは２つ以上の介在ポリペプチド配列によって、例えば、当技術分野において周知の及び／若しくは本書に記載する１つ若しくは２つ以上のリンカーで、互いに適切に連結されることもある。

【０１５３】

III. 脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質の特異的構造変化の例

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを生成するために、原理上は、提供するエピトープ領域内のいずれのアミノ酸を、例えば側鎖の欠失、挿入、反転、再配列、置換及び化学的修飾などの様々な手段によって、破壊してもよい。しかし、特定の破壊を用いて特定のアミノ酸及びポリペプチド領域を破壊するほうが、志賀毒素エフェクター機

能を保持しつつ抗原性及び／又は免疫原性を首尾よく低減させる可能性が高い。例えば、末端切断及び内部アミノ酸置換は、志賀毒素エフェクター領域の全体的なアミノ酸間隔を維持するため、したがって志賀毒素エフェクター機能を維持する可能性がより高いため、好ましい。

【０１５４】

本発明の特定の実施形態の中で、ポリペプチドは、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）、ＳｔｘＡ（配列番号２）及び／又はＳＬＴ－２Ａ（配列番号３）のアミノ酸７５～２５１を含む、又はそのようなアミノ酸から本質的になる、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。特定の他の実施形態の中には、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）、ＳｔｘＡ（配列番号２）及び／又はＳＬＴ－２Ａ（配列番号３）のアミノ酸１～２４１に由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドがある。さらなる実施形態は、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）、ＳｔｘＡ（配列番号２）及び／又はＳＬＴ－２Ａ（配列番号３）のアミノ酸１～２５１に由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドである。さらなる実施形態は、実施例（表１、２、３、４及び／又は５）において提供する天然位置のエピトープ領域内の少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている、ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）、ＳｔｘＡ（配列番号２）及び／又はＳＬＴ－２Ａ（配列番号３）のアミノ酸１～２６１に由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含むポリペプチドである。

【０１５５】

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを生成するために用いることができる非常に多くの、多様な、内部アミノ酸置換がある。

【０１５６】

エピトープ領域内に用いるための可能な代用アミノ酸のうち、次の代用アミノ酸残基は、エピトープの抗原性／免疫原性を低減させる可能性が最も高いと予測される－Ｇ、Ｄ、Ｅ、Ｓ、Ｔ、Ｒ、Ｋ及びＨ。グリシンを除き、これらの残基はすべて極性及び／又は荷電残基を表す。

【０１５７】

置換することが可能なアミノ酸のうち、次のアミノ酸Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｃ、Ｍ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｎ、Ｑ、Ｈ及びＫは、置換されるアミノ酸に依存して有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつ抗原性及び／又は免疫原性を低減させる可能性が最も高い。一般には、置換は、極性及び／又は荷電アミノ酸残基を非極性及び非荷電残基に変化させるべきである。加えて、全アミノ酸残基のＲ基官能性側鎖のサイズ及び／又は長さを低減させるようなエピトープ破壊は有益でありうる。例えば、アラニンは、一般に、いずれのアミノ酸残基にも許容される置換であり、グリシン残基についてはアラニンが好ましい選択肢である。セリンは、一般に、グルタメート残基にのみ許容される置換である。アスパルテートは、一般に、グルタメート残基にのみ許容される置換である。リジンは、一般に、アルギニン残基にのみ許容される置換である。グルタミンは、一般に、グルタメート、リジン又はアスパラギン残基にのみ許容される置換である。ヒスチジンは、一般に、リジン及びアスパラギン残基にのみ許容される置換である。しかし、エピトープ破壊を付与する可能性が最も高い置換のこれらの一般性にもかかわらず、目的は有意な志賀毒素エフェクター機能を保存することであるため、代用アミノ酸は、置換されるアミノ酸に似ている場合、例えば、極性及び／又は荷電残基が置換される同様のサイズの非極性及び／又は非荷電残基などの場合、志賀毒素エフェクター機能を保存する可能性がより高い可能性がある。

【０１５８】

実施例における経験的証拠に基づいて、志賀毒素のＡサブユニット内の特定のアミノ酸

位置は、エピトープ破壊を許容し、その上、有意な志賀毒素エフェクター機能を依然として保持すると予測される。例えば、下記の自然に存在する位置は、単独で又は組合せでアミノ酸置換を許容し、その上、細胞毒性などの志賀毒素エフェクター機能を保持した－配列番号１又は配列番号２の１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１、配列番号１又は配列番号２の３３、配列番号１又は配列番号２の４３、配列番号１又は配列番号２の４５、配列番号１又は配列番号２の４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４８、配列番号１又は配列番号２の４９、配列番号１又は配列番号２の５３、配列番号１又は配列番号２の５５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５９、配列番号１又は配列番号２の６０、配列番号１又は配列番号２の６１、配列番号１又は配列番号２の６２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９６、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１０９、配列番号１又は配列番号２の１１０、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のＳＥ１４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１７９、配列番号１又は配列番号２の１８０、配列番号１又は配列番号２の１８１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８３、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８４、配列番号１又は配列番号２の１８５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８６、配列番号１又は配列番号２の１８７、配列番号１又は配列番号２の１８８、配列番号１又は配列番号２の１８９、配列番号３の２０４、配列番号１又は配列番号２の２０５、配列番号１又は配列番号２の２４７、配列番号３の２４７、配列番号１又は配列番号２の２４８、配列番号３の２５０、配列番号１又は配列番号２の２５１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の２６４、配列番号１又は配列番号２の２６５、及び配列番号１又は配列番号２の２８６。

【０１５９】

実施例の経験的データは、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつ抗原性及び／又は免疫原性を低減させることができる、他のエピトープ破壊性置換及びエピトープ破壊性置換の組合せ、例えば、置換を許容する上述の切断及び位置の新たな組合せ、並びに関連志賀毒素内の同一位置又は保存された位置での新たな置換などを示唆する。

【０１６０】

保存的官能基のアミノ酸残基への他のアミノ酸置換が、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつ抗原性及び／又は免疫原性を低減させることもあることは、予測することができる。例えば、Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ８Ｖ、Ｔ９Ｉ、Ｓ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｋ１１Ｈ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ４７Ｇ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｌ４９Ａ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｐ５９Ｆ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｔ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｒ１７９Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｙ２４７Ａ、Ｒ２４８Ａ、Ｒ２５０Ａ、Ｒ２５１Ａ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｔ２８６Ａ及び／又はＴ２８６Ｉのいずれかに類似していることが当業者に公知の他の置換は、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能を維持しつつエピトープを破壊することができるだろう。特定の実施形態において、Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ８Ｖ、Ｔ９Ｉ、Ｓ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｋ１１Ｈ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ４７Ｇ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｌ４９Ａ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｐ５９Ｆ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｔ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｒ１７９Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、

Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｙ２４７Ａ、Ｒ２４８Ａ、Ｒ２５０Ａ、Ｒ２５１Ａ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｔ２８６Ａ及び／又はＴ２８６Ｉに類似している保存的アミノ酸置換へのアミノ酸置換には、同じ又は類似の効果があることがある。特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、類似の保存的アミノ酸置換、例えば、Ｋ１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｔ４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｋ１１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｓ３３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｓ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｔ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｄ４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｎ４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ及びＭへの、Ｌ４９のＡ又はＧへの、Ｄ５３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｒ５５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ５８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｐ５９のＡ、Ｇ及びＦへの、Ｅ６０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｅ６１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｇ６２のＡへの、Ｄ９４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ９６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｓ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｇ１１０のＡへの、Ｓ１１２のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１４７のＡへの、Ｒ１７９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｔ１８０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｔ１８１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｄ１８３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｄ１８４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ１８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１８７のＡへの、Ｒ１８８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ１８９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２０４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２０５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｙ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ２６４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｇ２６４のＡへの、並びにＴ２８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの置換などを含むことがある。

【０１６１】

同様に、電荷及び極性を除去する並びに／又は側鎖長を低減させるアミノ酸置換は、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能を維持しつつエピトープを破壊することができる。特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、側鎖電荷が除去される、極性が除去される、及び／又は側鎖長が低減されるような置換、例えば、Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｃ、Ｍ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｎ、Ｑ、Ｈ又はＫの群から選択される適切なアミノ酸での、配列番号１又は配列番号２の１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１、配列番号１又は配列番号２の３３、配列番号１又は配列番号２の４３、配列番号１又は配列番号２の４５、配列番号１又は配列番号２の４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の４８、配列番号１又は配列番号２の４９、配列番号１又は配列番号２の５３、配列番号１又は配列番号２の５５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５８、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の５９、配列番号１又は配列番号２の６０、配列番号１又は配列番号２の６１、配列番号１又は配列番号２の６２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９４、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の９６、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１０９、配列番号１又は配列番号２の１１０、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１１２、配列番号１、配列番号２又は配列番号３のＳＥ１４７、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１７９、配列番号１又は配列番号２の１８０、配列番号１又は配列番号２の１８１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８３、配列番号１、配列番号２

又は配列番号３の１８４、配列番号１又は配列番号２の１８５、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の１８６、配列番号１又は配列番号２の１８７、配列番号１又は配列番号２の１８８、配列番号１又は配列番号２の１８９、配列番号３の２０４、配列番号１又は配列番号２の２０５、配列番号１又は配列番号２の２４７、配列番号３の２４７、配列番号１又は配列番号２の２４８、配列番号３の２５０、配列番号１又は配列番号２の２５１、配列番号１、配列番号２又は配列番号３の２６４、配列番号１又は配列番号２の２６５、及び配列番号１又は配列番号２の２８６の位置のアミノ酸残基の置換などの置換によって破壊された１又は２以上のエピトープを含むことがある。特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、下記のアミノ酸置換：Ｋ１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｔ４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｓ９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｋ１１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＨへの、Ｓ３３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｓ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｔ４５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｄ４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｎ４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ及びＭへの、Ｌ４９のＡ又はＧへの、Ｄ５３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｒ５５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ５８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｐ５９のＡ、Ｇ及びＦへの、Ｅ６０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｅ６１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ及びＲへの、Ｇ６２のＡへの、Ｄ９４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ９６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｓ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｔ１０９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｇ１１０のＡへの、Ｓ１１２のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１４７のＡへの、Ｒ１７９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｔ１８０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｔ１８１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの、Ｄ１８３のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｄ１８４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｓ１８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｇ１８７のＡへの、Ｒ１８８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ１８９のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２０４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２０５のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｓ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ及びＭへの、Ｙ２４７のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭへの、Ｒ２４８のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５０のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｒ２５１のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ及びＨへの、Ｄ２６４のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ及びＱへの、Ｇ２６４のＡへの、並びにＴ２８６のＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ及びＳへの置換の１又は２以上を含むことがある。

【０１６２】

加えて、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつエピトープを破壊する、志賀毒素エフェクターポリペプチドの１つのエピトープ領域における任意のアミノ酸置換は、複数のエピトープ領域が破壊されているが有意な志賀毒素エフェクター機能レベルを依然として保持している脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを形成するために、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつエピトープを破壊する、同じ又は異なるエピトープ領域における任意の他のアミノ酸置換と組み合わせることができる。特定の実施形態において、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、次の組合せの１又は２以上を含むことがある：Ｋ１ＭをＳ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｓ８ＩをＫ１Ｍ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６

０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｔ９ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｓ９ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｋ１１ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｓ３３ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｓ４５Ｖ又はＳ４５ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｔ４５ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｄ５３ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｒ５５Ａ　Ｋ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉ、Ｄ５８Ａ又はＤ５８ＦをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｇ１１０Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又

はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｒ５５ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｐ５９ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｅ６０ＲをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｅ６０Ｉ又はＥ６０ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｅ６１ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｇ６２ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｄ９４ＡをＫ１Ｍ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｓ９６ＩをＫ１Ｍ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｇ１１０ＡをＫ１Ｍ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｇ１４７ＡをＫ１Ｍ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４

F、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｔ１８０ＧをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｔ１８１ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｄ１８３ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０

Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｄ１８４Ａ又はＤ１８４ＦをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｒ２０４ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｒ２０５ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｓ２４７ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｄ２６４ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｇ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｇ２６４ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ

、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６５Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、Ｇ２６５ＡをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ及び／又はＴ２８６Ｉと組み合わせてもよく、及び／又はＴ２８６ＩをＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ４５Ｉ、Ｔ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０４Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｓ２４７Ｉ、Ｄ２６４Ａ、Ｇ２６４Ａ及び／又はＧ２６５Ａと組み合わせてもよい。

【０１６３】

実施例における経験的証拠に基づいて、志賀毒素のＡサブユニット内の特定のアミノ酸領域は、エピトープ破壊を許容し、その上、有意な志賀毒素エフェクター機能を依然として保持すると予測される。例えば、１～１５、５３～６６、５５～６６、９４～１１５及び１８０～１９０に天然に位置するエピトープ領域は、志賀毒素酵素活性を失うことなく、及び多くの場合、細胞毒性を失うことなく、同時に複数のアミノ酸置換を許容した（実施例を参照されたい）。

【０１６４】

細胞標的化結合領域と脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドとの連結によって、哺乳動物、例えばヒト対象、に投与したとき抗原性及び／免疫原性の結果として生じる可能性のある有害作用がより少ない、強力な志賀毒素細胞毒性の細胞タイプ特異的標的化のエンジニアリングが可能になる。本発明のタンパク質は、細胞と物理的に会合している少なくとも１つの細胞外標的生体分子、例えば細胞の表面で発現された標的生体分子、と特異的に結合することができる結合領域に連結された、志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットに由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。この一般構造は、任意の数の多様な細胞標的化結合領域を本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに連結させることができる点で、モジュラーである。

【０１６５】

本発明の特定の実施形態の中で、タンパク質は、抗原の発現ががん細胞に限定される、がん細胞の細胞表面の表面抗原との特異的及び高親和性結合のために選択される免疫グロブリン型ポリペプチドに由来する結合領域を含む（Glokler J et al., Molecules 15: 2478-90 (2010)、Liu Y et al., Lab Chip 9: 1033-6 (2009)を参照されたい）。他の実施形態に従って、結合領域は、抗原が非がん細胞と比較してがん細胞によって過発現される又は優先的に発現されるがん細胞の細胞表面の表面抗原との特異的及び高親和性結合のために選択される。いくつかの代表的標的生体分子は、がん及び／又は特異的免疫細胞タイプと会合する以下の列挙する標的を含むが、これらに限定されない。

【０１６６】

がん細胞と会合しているエピトープを認識する多くの免疫グロブリン型結合領域、例えば、アネキシンＡＩ、Ｂ３黒色腫抗原、Ｂ４黒色腫抗原、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ２０（Ｂリンパ球抗原タンパク質ＣＤ２０）、ＣＤ２２、ＣＤ２５（インターロイキン－２受容体ＩＬ２Ｒ）、ＣＤ３０（ＴＮＦＲＳＦ８）、ＣＤ３８（サイクリックＡＤＰリボースヒドラーゼ）、ＣＤ４０、ＣＤ４４（ヒアルロナン受容体）、ＩＴＧＡＶ（ＣＤ５１）、ＣＤ６６、ＣＤ７１（トランスフェリン受容体）、ＣＤ７３、ＣＤ７４（ＨＬＡ－ＤＲ抗原関連インバリアント鎖）、ＣＤ７９、ＣＤ９８、エンドグリン（ＥＮＤ、ＣＤ１０５）、ＣＤ１０６（ＶＣＡＭ－１）、ケモカイン受容体４型（ＣＤＣＲ－４、フーシン、ＣＤ１８４）、ＣＤ２００、インスリン様増殖因子１受容体（ＣＤ２２１）ムチン１（ＭＵＣ１、ＣＤ２２７）、基底細胞接着分子（Ｂ－ＣＡＭ, basal cell adhesion molecule、ＣＤ２３９）、ＣＤ２４８（エンドシアリン、ＴＥＭ１）、腫瘍壊死因子受容体１０ｂ

（ＴＮＦＲＳＦ１０Ｂ、ＣＤ２６２）、腫瘍壊死因子受容体１３Ｂ（ＴＮＦＲＳＦ１３Ｂ、ＴＡＣＩ、ＣＤ２７６）、血管内皮増殖因子受容体２（ＫＤＲ、ＣＤ３０９）、上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ、ＣＤ３２６）、ヒト上皮増殖因子受容体２（ＨＥＲ２，human epidermal growth factor receptor 2、Ｎｅｕ、ＥｒｂＢ２、ＣＤ３４０）、がん抗原１５－３（ＣＡ１５－３，cancer antigen 15-3）、がん抗原１９－９（ＣＡ１９－９，cancer antigen 19-9）、がん抗原１２５（ＣＡ１２５，cancer antigen 125、ＭＵＣ１６）、ＣＡ２４２、がん胎児抗原関連細胞接着分子（例えば、ＣＥＡＣＡＭ３（ＣＤ６６ｄ）及びＣＥＡＣＡＭ５）、がん胎児抗原（ＣＥＡ，carcinoembryonic antigen）タンパク質、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン４（ＣＳＰ４，chondroitin sulfate proteoglycan 4、ＭＣＳＰ、ＮＧ２）、ＣＴＬＡ４、ＤＬＬ４、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ，epidermal growth factor receptor、ＥｒｂＢ１）、葉酸受容体（ＦＯＬＲ，folate receptor）、Ｇ－２８、ガングリオシドＧＤ２、ガングリオシドＧＤ３、ＨＬＡ－Ｄｒ１０、ＨＬＡ－ＤＲＢ、ヒト上皮増殖因子受容体１（ＨＥＲ１，human epidermal growth factor receptor 1）、エフリンＢ型受容体２（ＥｐｈＢ２，Ephrin type-B receptor 2）、上皮細胞接着分子（ＥｐＣＡＭ，epithelial cell adhesion molecule）、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ，fibroblast activation protein／セプラーゼ）、インスリン様増殖因子１受容体（ＩＧＦ１Ｒ，insulin-like growth factor 1 receptor）、インターロイキン２受容体（ＩＬ－２Ｒ，interleukin 2 receptor）、インターロイキン６受容体（ＩＬ－６Ｒ，interleukin 6 receptor）、インテグリンアルファ－Ｖベーター３（$\alpha_V\beta_3$）、インテグリンアルファ－Ｖベーター５（αｖβ５）、インテグリンアルファ－５ベーター１（$\alpha_5\beta_1$）、Ｌ６、ＭＰＧ、黒色腫関連抗原１タンパク質（ＭＡＧＥ－１）、黒色腫関連抗原３（ＭＡＧＥ－３）、メソセリン（ＭＳＬＮ）、ＭＰＧ、ＭＳ４Ａ、ｐ２１、ｐ９７、ポリオウイルス受容体様４（ＰＶＲＬ４，polio virus receptor-like 4）、プロテアーゼ活性化受容体（例えばＰＡＲ1）、前立腺特異的膜抗原タンパク質（ＰＳＭＡ，prostate-specific membrane antigen protein）、栄養膜糖タンパク質（ＴＰＧＢ）、及び腫瘍関連カルシウムシグナル伝達因子（ＴＡＣＳＴＤ，tumor-associated calcium signal transducers）を標的にする結合領域が、先行技術に存在する（例えばLui B et al., Cancer Res 64: 704-10 (2004)、Novellino L et al., Cancer Immunol Immunother 54: 187-207 (2005)、Bagley R et al., Int J Oncol 34: 619-27 (2009)、Gerber H et al., mAbs 1: 247-53 (2009)、Beck A et al., Nat Rev Immunol 10: 345-52 (2010)、Andersen J et al., J Biol Chem 287: 22927-37 (2012)、Nolan-Stevaux O et al., PLoS One 7: e50920 (2012)、Rust S et al., Mol Cancer 12: 11 (2013)を参照されたい）。標的生体分子のこのリストは、非限定的であることを意図したものである。志賀毒素エフェクター領域と結合させて本発明のタンパク質を産生するための結合領域を設計又は選択するために、がん細胞又は他の所望の細胞タイプに関連したいずれの所望の標的生体分子を使用してもよいことは、当業者には理解されるであろう。

【０１６７】

がん細胞と強く会合する他の標的生体分子、及びそれらに結合することが公知の免疫グロブリン型結合領域の例は、ＢＡＧＥタンパク質（Ｂ黒色腫抗原）、基底細胞接着分子（ＢＣＡＭ又はLutheran式血液型糖タンパク質）、膀胱腫瘍抗原（ＢＴＡ，bladder tumor antigen）、がん－精巣抗原ＮＹ－ＥＳＯ－１、がん－精巣抗原ＬＡＧＥタンパク質、ＣＤ１９（Ｂリンパ球抗原タンパク質ＣＤ１９）、ＣＤ２１（補体受容体－２又は補体３ｄ受容体）、ＣＤ２６（ジペプチジルペプチダーゼ－４（ＤＰＰ４，dipeptidyl peptidase-4）又はアデノシンデアミラーゼ複合体形成受容体２）、ＣＤ３３（シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン－３）、ＣＤ５２（ＣＡＭＰＡＴＨ－１抗原）、ＣＤ５６、ＣＳ１（ＳＬＡＭファミリーメンバー７又はＳＬＡＭＦ７）、細胞表面Ａ３３抗原タンパク質（ｇｐＡ３３）、エプスタイン・バーウイルス抗原タンパク質、ＧＡＧＥ／ＰＡＧＥタンパク質（黒色腫関連がん／精巣抗原）、肝細胞増殖因子受容体（ＨＧＦＲ，hepatocyte growth factor receptor、又はｃ－Ｍｅｔ）、ＭＡＧＥタンパク質、Ｔ細胞１タンパク質によって認識される黒色腫抗原（ＭＡＲＴ－１，melanoma antigen recognized by T-cell 1

／ＭｅｌａｎＡ、ＭＡＲＴＩ）タンパク質、ムチン、優先的に発現される黒色腫抗原（ＰＲＡＭＥ）タンパク質、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ，prostate specific antigen）タンパク質、前立腺幹細胞抗原（ＰＳＣＡ，prostate stem cell antigen）タンパク質、終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ，Receptor for Advanced Glycation Endroduct）、腫瘍関連糖タンパク質７２（ＴＡＧ－７２，tumor-associated glycoprotein 72）、血管内皮増殖因子受容体（ＶＥＧＦＲ，vascular endothelial growth factor receptor）、ウィルムス腫瘍抗原を含む。

【０１６８】

がん細胞と強く会合する他の標的生体分子の例は、炭酸脱水酵素ＩＸ（ＣＡ９／ＣＡＩＸ，carbonic anhydrase IX）、クローディンタンパク質（ＣＬＤＮ３、ＣＬＤＮ４）、エフリンＡ型受容体３（ＥｐｈＡ３，ephrin type-A receptor 3）、葉酸結合タンパク質（ＦＢＰ，folate binding protein）、ガングリオシドＧＭ２，インスリン様増殖因子受容体、インテグリン（例えばＣＤ１１ａ～ｃ）、核因子カッパＢ活性化受容体（ＲＡＮＫ）、受容体型チロシンプロテインキナーゼｅｒＢ－３、腫瘍壊死因子受容体１０Ａ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ１／ＤＲ４）、腫瘍壊死因子受容体１０Ｂ（ＴＲＡＩＬ－Ｒ２）、テネイシンＣ、及びＣＤ６４（ＦｃγＲＩ）である（Hough C et al., Cancer Res 60: 6281-7 (2000)、Thepen T et al., Nat Biotechnol 18: 48-51 (2000)、Pastan I et al., Nat Rev Cancer 6: 559-65 (2006)、Pastan, Annu Rev Med 58: 221-37 (2007)、Fitzgerald D et al., Cancer Res 71: 6300-9 (2011)、Scott A et al., Cancer Immun 12: 14-22 (2012)を参照されたい）。標的生体分子のこのリストは、非限定的であることを意図したものである。

【０１６９】

加えて、ＡＤＡＭメタロプロテイナーゼ（例えばＡＤＡＭ－９、ＡＤＡＭ－１０、ＡＤＡＭ－１２、ＡＤＡＭ－１５、ＡＤＡＭ－１７）、ＡＤＰ－リボシルトランスフェラーゼ（ＡＲＴ１、ＡＲＴ４）、抗原Ｆ４／８０、骨髄間質抗原（ＢＳＴ１、ＢＳＴ２）、破断点クラスター領域－ｃ－ａｂｌがん遺伝子（ＢＣＲ－ＡＢＬ）タンパク質、補体成分３ａ受容体（Ｃ３ａＲ，complement component 3a receptor）、ＣＤ７、ＣＤ１３、ＣＤ１４、ＣＤ１５（Lewis X又はステージ特異的胎児抗原１）、ＣＤ２３（ＦＣイプシロンRII）、ＣＤ４９ｄ、ＣＤ５３、ＣＤ５４（細胞間接着分子１）、ＣＤ６３（テトラスパニン）、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ８８（補体成分５ａ受容体１）、ＣＤ１１５（コロニー刺激因子１受容体）、ＣＤ１２３（インターロイキン－３受容体）、ＣＤ１２９（インターロイキン９受容体）、ＣＤ１８３（ケモカイン受容体ＣＸＣＲ３）、ＣＤ１９１（ＣＣＲ１）、ＣＤ１９３（ＣＣＲ３）、ＣＤ１９５（ケモカイン受容体ＣＣＲ５）、ＣＤ２０３ｃ、ＣＤ２２５（インターフェロン誘導膜貫通タンパク質１）、ＣＤ２４４（ナチュラルキラー細胞受容体２Ｂ４）、ＣＤ２８２（ｔｏｌｌ様受容体２）、ＣＤ２８４（Ｔｏｌｌ様受容体４）、ＣＤ２９４（ＧＰＲ４４）、ＣＤ３０５（白血球関連免疫グロブリン様受容体１）、エフリンＡ型受容体２（ＥｐｈＡ２，ephrin type-A receptor 2）、ＦｃｅＲＩａ、ガレクチン－９、アルファ－フェトプロテイン抗原１７－Ａ１タンパク質、ヒトアスパルチル（アスパラギニル）ベーターヒドロキシラーゼ（ＨＡＡＨ）、免疫グロブリン様転写物ＩＬＴ－３、リゾホスファチジルグリセロールアセチルトランスフェラーゼ１（ＬＰＧＡＴ１，lysophosphatidlglycerol acyltransferase 1／ＩＡＡ０２０５）、リソソーム膜タンパク質（ＬＡＭＰ，lysosome-associated membrane protein、例えばＣＤ１０７）、メラニン細胞タンパク質ＰＭＥＬ（ｇｐ１００）、骨髄関連タンパク質－１４（ｍｒｐ－１４，myeloid-related protein-14）、受容体型チロシンプロテインキナーゼｅｒｂＢ－３、ＳＡＲＴタンパク質、スカベンジャー受容体（例えばＣＤ６４及びＣＤ６８）、Ｓｉｇｌｅｃ（シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン）、シンデカン（例えばＳＤＣ１又はＣＤ１３８）、チロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質１（ＴＲＰ－１，tyrosinease-related protein 1）、チロシナーゼ関連タンパク質２（ＴＲＰ－２，tyrosinease-related protein 2）、チロシナーゼ関連抗原（ＴＡＡ，tyrosinase associated antigen）、ＡＰＯ－３、ＢＣＭＡ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１

８、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ４１、ＣＤ４９、ＣＤ９０、ＣＤ９５（Ｆａｓ）、ＣＤ１０３、ＣＤ１０４、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）、ＣＤ１５２（ＣＴＬＡ－４）、ケモカイン受容体、補体タンパク質、サイトカイン受容体、組織適合性タンパク質、ＩＣＯＳ、インターフェロン－アルファ、インターフェロン－ベータ、ｃ－ｍｙｃ、破骨細胞分化抑制因子、ＰＤ－１、ＲＡＮＫ、ＴＡＣＩ、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーメンバー（ＴＮＦ－Ｒ１、ＴＮＦＲ－２）、Ａｐｏ２／ＴＲＡＩＬ－Ｒ１、ＴＲＡＩＬ－Ｒ２、ＴＲＡＩＬ－Ｒ３及びＴＲＡＩＬ－Ｒ４などの、考えられる標的生体分子の他の例が非常に多くある（標的生体分子については、Scott A et al., Cancer Immunity 12: 14 (2012)、Cheever M et al., Clin Cancer Res 15: 5323-37 (2009)を参照されたく、それらに記載されている標的分子が非限定的な例であることに留意されたい）。脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域と結合させて本発明のタンパク質を産生するための結合領域を設計又は選択するために、いずれの所望の標的生体分子を使用してもよいことは、当業者には理解されるであろう。

【０１７０】

特定の実施形態において、結合領域は、免疫系の細胞タイプの細胞表面との特異的及び高親和性結合のために選択される免疫グロブリン型ポリペプチドを含む、又はそのような免疫グロブリン型ポリペプチドから本質的になる。例えば、ＣＤ１、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ７、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１０、ＣＤ１１、ＣＤ１２、ＣＤ１３、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１７、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２４、ＣＤ２５、ＣＤ２６、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ２９、ＣＤ３０、ＣＤ３１、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３５、ＣＤ３６、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４１、ＣＤ５６、ＣＤ６１、ＣＤ６２、ＣＤ６６、ＣＤ９５、ＣＤ１１７、ＣＤ１２３、ＣＤ２３５、ＣＤ１４６、ＣＤ３２６、インターロイキン－２受容体（ＩＬ－２Ｒ）、核因子カッパＢ活性化受容体（ＲＡＮＫＬ）、ＳＬＡＭ結合タンパク質（ＳＡＰ）及びＴＮＦＳＦ１８（腫瘍壊死因子リガンド１８又はＧＩＴＲＬ）と結合する免疫グロブリン型結合ドメインは公知である。

【０１７１】

特定の実施形態について、脱免疫化された細胞毒性タンパク質は、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５若しくは配列番号５６のアミノ酸を含む、又は、配列番号５３、配列番号５４、配列番号５５若しくは配列番号５６のアミノ酸から本質的になる。これらの脱免疫化されたＣＤ２０結合細胞毒性タンパク質実施形態を用いて、骨がん、白血病、リンパ腫、黒色腫、骨髄腫、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、喘息、クローン病、糖尿病、移植片拒絶、移植片対宿主病、橋本甲状腺炎、溶血性尿毒症症候群、ＨＩＶ関連疾患、エリテマトーデス、多発性硬化症、多発動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ様関節炎、強皮症、敗血症性ショック、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎及び／又は血管炎を処置及び／又は診断することができる。

【０１７２】

特定の実施形態について、脱免疫化された細胞毒性タンパク質は、配列番号５７、配列番号５８若しくは配列番号５９のアミノ酸を含む、又は、配列番号５７、配列番号５８若しくは配列番号５９のアミノ酸から本質的になる。これらの脱免疫化されたＨＥＲ－２結合細胞毒性タンパク質実施形態を用いて、乳がん、子宮頚がん、頭頸部がん（例えば中咽頭）、胃腸がん（例えば食道又は結腸直腸）、腎・尿路がん（例えば膀胱）、肺／胸膜がん、及び卵巣がんを処置及び／又は診断することができる。

【０１７３】

特定の実施形態において、結合領域は、細胞外受容体の標的化のために選択されるリガンドを含む、又はそのようなリガンドから本質的になる。いくつかの代表的リガンドは、下記の骨形成タンパク質及びアクチビン膜結合阻害剤ＢＡＭＢＩ（ＴＧＦＢＲとしても公知）、ＣＤ１３７Ｌ（４－１ＢＢとしても公知）、デコイ受容体３（ＤｃＲ３，decoy receptor 3）（ＴＲ６及びＴＮＦＲＳＦ６Ｂとしても公知）、及び腫瘍壊死因子ＴＷＥＡＫ（ＴＮＦＳＦ１２及びＡＰＯ３Ｌとしても公知）を含むが、これらに限定されない。より

多くの非限定的例示的リガンドについては、実施例の表１２を参照されたい。

【０１７４】

エピトープ破壊後に非毒性になる脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域、例えば、Ｒ１７９Ａを含む志賀毒素エフェクター領域は、細胞への外因性物質の送達になお有用であることもある。触媒活性の有意な志賀毒素機能レベルのみを保持する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、分子の酵素的に活性な脱免疫化された成分としてなお有用である。

【０１７５】

機能性細胞外標的生体分子結合部位を含有する、及びよりいっそう好ましくは（例えばK_Dによって示されるような）高い親和性で標的生体分子に結合することができる、本発明のポリペプチド及びタンパク質の断片、バリアント及び／又は誘導体を使用することは、本発明の範囲内である。例えば、本発明の分子（例えば、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド及び細胞毒性タンパク質）の製造及び本発明の方法における使用に、標的生体分子、好ましくは、細胞表面で発現される標的生体分子と１リットル当たり10^{-5}～10^{-12}モル、好ましくは２００ｎＭ未満の解離定数で結合するポリペプチドを含む任意の結合領域を代用してもよい。

【０１７６】

IV．脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質の一般的な機能

本発明のポリペプチド及びタンパク質は、哺乳動物において望ましくない免疫応答を生じる可能性が低いために、治療剤及び／又は診断剤のいずれかとして哺乳動物種に投与するための改善された実用性を有する。重要なことに、本発明のポリペプチドでは、Ｂ細胞エピトープが破壊された後、元の志賀毒素エフェクター領域の望ましい生物学的機能が保存された。加えて、Ｂ細胞エピトープは、成熟ＣＤ４＋Ｔ細胞のエピトープと一致するか又は重複することが多いため、Ｂ細胞エピトープの破壊は、同時にＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープを破壊することが多い。

【０１７７】

本発明の様々な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドは、様々な哺乳動物に投与された場合のそれらの抗原性プロファイルの点で異なっている可能性があるが、低下した抗原性及び／又は免疫原性を有することが予測される。哺乳動物への投与を含むその医療適用における使用を改善するために志賀毒素に由来するポリペプチドから全ての免疫原性を完全に消滅させることは、必ずしも必要ではない（Nagata, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009)を参照）。治療用タンパク質におけるごく少数の優勢なアミノ酸の改変は、タンパク質の全体的な安定性、構造、及び機能を乱すことなくその抗原性及び／又は免疫原性を大きく低下させることができる。しかしながら、不要なＢ細胞及び／又はＣＤ４＋Ｔ細胞免疫応答を回避することが望ましい場合、志賀毒素エフェクターポリペプチド領域においてより多くの免疫原性Ｂ細胞エピトープが破壊されていることが、哺乳動物への投与にとってより有利であると予測される。

【０１７８】

本発明は、様々な物質の組成物、例えば細胞標的化細胞毒性タンパク質及び診断用組成物の成分として使用される可能性がある様々な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを提供する。特定には、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドは、がん、免疫障害、及び微生物感染を含む様々な疾患を治療するための特異的な細胞型の標的化された殺滅のための、例えば免疫毒素及びリガンド－毒素融合体などの様々なタンパク質治療剤の成分としての用途を有する。

【０１７９】

本発明はまた、細胞毒性タンパク質が、特異的な細胞型を選択的に殺滅する、その成長を阻害する、それに外因性物質を送達する、及び／又はそれを検出するように細胞標的化を引き起こすための結合領域と機能的に関連する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む様々な細胞毒性タンパク質も提供する。本発明のタンパク質の結合領域は、細胞

表面上で発現される標的生体分子などの細胞と物理的に関連する少なくとも１つの細胞外標的生体分子に特異的に結合することが可能である。細胞標的化結合領域と脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドとの連結は、有力な志賀毒素の細胞毒性及び／又は細胞性塞栓の細胞型特異的な標的化の操作を可能にする。

【０１８０】

特定の実施形態において、本発明のタンパク質は、特定の細胞型の細胞表面に関連する細胞外標的生体分子と結合し、細胞に侵入することが可能である。本発明のタンパク質の特定の実施形態は、標的化された細胞型内に内在化されたら、標的細胞のサイトゾルに酵素的に活性な細胞毒性の志賀毒素エフェクターポリペプチドフラグメントの経路を定めることが可能である。本発明の細胞毒性タンパク質の特定の実施形態は、標的化された細胞型のサイトゾル中に入れば、リボソームを酵素的に不活性化し、最終的に細胞を殺滅することが可能である。その代わりに、本発明のタンパク質の非毒性バリアントは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、及び検出促進剤などの追加の外因性物質を標的細胞に送達するのに使用される可能性もある。この系は、この有力な細胞毒性を様々な多様な細胞型に標的化するためにあらゆる数の多様な結合領域を使用することができるモジュール式構造である。

【０１８１】

Ａ．標的化された志賀毒素細胞毒性を介した細胞殺滅

志賀毒素ファミリーのメンバーは真核細胞を殺滅するようになっているため、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を使用して設計された細胞毒性タンパク質は、有力な細胞殺滅活性を示すことができる。志賀毒素ファミリーメンバーのＡサブユニットは、細胞のサイトゾルに入れば真核細胞を殺滅することが可能な酵素ドメインを含む。Ｂ細胞エピトープの破壊は、本発明の特定の志賀毒素エフェクター領域の細胞毒性メカニズムを有意に変更しない。したがって、本発明の脱免疫化された細胞毒性タンパク質は、哺乳動物に投与された場合、一定の免疫応答が起こる可能性を低下させながら、有力な細胞毒性を維持する。

【０１８２】

本発明の脱免疫化された細胞毒性タンパク質の特定の実施形態において、本発明の細胞毒性タンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞を接触させると（標的＋細胞）、細胞毒性タンパク質は、細胞の死を引き起こすことが可能である。細胞殺滅は、エクスビボで操作された標的細胞、インビトロで培養された標的細胞、インビトロで培養された組織サンプル中の標的細胞、又はインビボの標的細胞などの標的細胞の様々な条件下で本発明の細胞毒性タンパク質を使用して達成され得る。

【０１８３】

Ｂ．細胞型間で選択的な細胞毒性

特異的な細胞型への高親和性結合領域を使用して酵素的に活性な脱免疫化された志賀毒素領域の送達を標的化することによって、この有力な細胞殺滅活性を、選択された細胞型を優先的に殺滅することに限定することができる。

【０１８４】

特定の実施形態において、細胞型の混合物に本発明のタンパク質を投与するとき、タンパク質は、細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされていない細胞型と比較して、細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞を選択的に殺滅することが可能である。志賀毒素ファミリーのメンバーは真核細胞の殺滅に適していることから、志賀毒素エフェクター領域を使用して設計された細胞毒性タンパク質は、有力な細胞毒性の活性を示す可能性がある。高親和性結合領域を使用して特異的な細胞型への酵素的に活性な志賀毒素領域の送達を標的化することによって、この有力な細胞殺滅活性を、標的化が望ましい細胞型と選ばれた結合領域の標的生体分子との物理的な関連によってそのような細胞型のみを殺滅することに限定することができる。

【０１８５】

特定の実施形態において、本発明の細胞毒性タンパク質は、２又は３以上の異なる細胞

型の混合物内で特異的な細胞型の死を選択的又は優先的に引き起こすことが可能である。これは、高い優先性で、例えば標的生体分子を発現しない「バイスタンダー」細胞型に対して３倍の細胞毒性作用で、細胞毒性活性を特異的な細胞型に標的化することを可能にする。その代わりに、標的生体分子が十分低い量で発現されるか及び／又は標的化されるべきではない細胞型と少量で物理的に組み合わされる場合、結合領域の標的生体分子の発現は、１つの細胞型に限られない場合がある。これは、高い優先性で、例えば有意な量の標的生体分子を発現しないか、又は有意な量の標的生体分子と物理的に組み合わされない「バイスタンダー」細胞型に対して３倍の細胞毒性作用で、細胞殺滅を特異的な細胞型に標的化することを可能にする。

【０１８６】

特定のさらなる実施形態において、２種の異なる細胞型集団に細胞毒性タンパク質を投与するとき、細胞毒性タンパク質は、そのメンバーが細胞毒性タンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子を発現する標的細胞集団に対する半最大細胞毒性濃度（CD_{50}、half-maximal cytotoxic concentration）が、そのメンバーが細胞毒性タンパク質の結合領域の細胞外標的生体分子を発現しない細胞集団に対する同じ細胞毒性タンパク質のCD_{50}用量の少なくとも３分の１の用量であることによって定義されるような細胞死を引き起こすことが可能である。

【０１８７】

特定の実施形態において、細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞型集団に対する細胞毒性活性は、結合領域のいかなる細胞外標的生体分子とも物理的に組み合わされていない細胞型集団に対する細胞毒性活性より少なくとも３倍高い。本発明によれば、選択的な細胞毒性は、（ａ）結合領域の標的生体分子と物理的に組み合わされた特異的な細胞型の細胞集団に対する細胞毒性の、（ｂ）結合領域の標的生体分子と物理的に組み合わされていない細胞型の細胞集団に対する細胞毒性に対する比率（ａ／ｂ）に関して定量化されてもよい。特定の実施形態において、細胞毒性の比率は、結合領域の標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞集団又は細胞型について、結合領域の標的生体分子と物理的に組み合わされていない細胞集団又は細胞型と比較して、少なくとも３倍、５倍、１０倍、１５倍、２０倍、２５倍、３０倍、４０倍、５０倍、７５倍、１００倍、２５０倍、５００倍、７５０倍、又は１０００倍高い選択的な細胞毒性であることを示す。

【０１８８】

この優先的な細胞殺滅機能は、様々な条件下で、非標的化バイスタンダー細胞の存在下で、例えばエクスビボで操作された細胞型の混合物、インビトロで細胞型の混合物と共に培養された組織、又はインビボの複数の細胞型の存在下で（例えばインサイチュで、又は多細胞生物内におけるその天然位置で）本発明の特定の細胞毒性タンパク質によって、標的化された細胞を殺滅することを可能にする。

【０１８９】

Ｃ．標的化細胞内部への追加の外因性物質の送達

細胞毒性及び細胞増殖抑制性の適用に加えて、本発明のタンパク質は、情報収集及び診断機能のために使用されてもよい。さらに、本発明の細胞毒性タンパク質の非毒性バリアント、又は毒性バリアントは、細胞毒性タンパク質の細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞に追加の外因性物質を送達すること、及び／又はそのような細胞の内部を標識することに使用されてもよい。少なくとも１つの細胞表面に標的生体分子を発現する様々な種類の細胞及び／又は細胞集団は、外因性物質を受け取るために本発明のタンパク質によって標的化されてもよい。本発明の機能的な成分は、モジュール式構造であり、それにおいて、様々な志賀毒素エフェクター領域及び追加の外因性物質が、腫瘍細胞の非侵襲的なインビボでのイメージングなどの多様な適用を提供するために様々な結合領域に連結されていてもよい。

【０１９０】

それらの非毒性形態を含む本発明のタンパク質は、その結合領域によって認識される細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞に侵入することが可能であることから、

本発明のタンパク質の特定の実施形態は、標的化された細胞型の内部に追加の外因性物質を送達するのに使用することができる。ある意味では、本発明のタンパク質全体が細胞に侵入する外因性物質であり、したがって「追加の」外因性物質は、コアの細胞毒性タンパク質そのもの以外に連結される異種材料である。エピトープ破壊後に非毒性になる脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域は、それでもなお細胞に外因性物質を送達するのに有用であり得る（例えばＲ１７９Ａ）。

【０１９１】

「追加の外因性物質」は、本明細書で使用される場合、一般的にネイティブの標的細胞中に存在しないことが多い１又は２以上の分子を指し、ここで本発明のタンパク質は、このような材料を細胞内部に特異的に輸送するのに使用することができる。追加の外因性物質の非限定的な例は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、小分子の化学療法剤、及び検出促進剤である。

【０１９２】

特定の実施形態において、追加の外因性物質は、酵素を含むタンパク質又はポリペプチドを含む。特定の他の実施形態において、追加の外因性物質は、核酸であり、例えば低分子阻害ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ，small inhibiting RNA）又はマイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ，microRNA）として機能するリボ核酸などである。特定の実施形態において、追加の外因性物質は、抗原であり、例えば、細菌タンパク質、ウイルスタンパク質、がんにおいて変異したタンパク質、がんにおいて異常に発現されたタンパク質、又はＴ細胞相補性決定領域に由来する抗原などである。例えば、外因性物質としては、抗原、例えば細菌感染した抗原提示細胞に特徴的な抗原、及び外因性抗原として機能することが可能なＴ細胞相補性決定領域が挙げられる。外因性物質のさらなる例としては、酵素などの抗原性ペプチドよりも大きいポリペプチド及びタンパク質が挙げられる。ポリペプチド又はタンパク質を含む外因性物質は、熟練した作業者にとって公知か又は未知かにかかわらず１又は２以上の抗原を含んでいてもよい。

【０１９３】

Ｄ．診断機能のための情報収集

本発明の特定のタンパク質は、インビトロ及び／又はインビボにおける特異的な細胞、細胞型、及び／又は細胞集団の検出において用途を有する。特定の実施形態において、本明細書で説明されるタンパク質は、診断と治療の両方、又は診断単独に使用される。診断と治療の両方に同じ細胞毒性タンパク質が使用される場合、診断のための検出促進剤を取り入れている細胞毒性タンパク質バリアントは、本明細書で説明される例示的な置換などの１又は２以上のアミノ酸置換を介した志賀毒素エフェクター領域の触媒による不活性化によって非毒性にされてもよい。検出促進剤にコンジュゲートされる本発明の細胞毒性タンパク質の非毒性形態は、診断機能に、例えば同じ又は関連する結合領域を含む治療レジメンと共に使用されるコンパニオン診断に使用されてもよい。

【０１９４】

当業界において公知の検出促進剤を様々な本発明のタンパク質にコンジュゲートする能力は、がん、腫瘍、免疫及び感染細胞の検出に有用な組成物を提供する。これらの本発明のタンパク質の診断の実施形態は、当業界において公知の様々なイメージング技術及びアッセイを介した情報収集に使用される可能性がある。例えば、本発明のタンパク質の診断の実施形態は、患者又は生検サンプルにおける個々のがん細胞、免疫細胞、又は感染細胞の細胞内のオルガネラ（例えばエンドサイトーシス、ゴルジ、小胞体、及びサイトゾル区画）のイメージングを介した情報収集に使用される可能性がある。

【０１９５】

様々な種類の情報は、診断での使用のためか又は他の使用のためかにかかわらず、本発明のタンパク質の診断の実施形態を使用して収集することができる。この情報は、例えば、新生細胞のタイプを診断すること、患者の疾患の治療感受性を決定すること、経時的に抗新生物療法の進行をアッセイすること、経時的に免疫調節療法の進行をアッセイすること、経時的に抗菌療法の進行をアッセイすること、移植材料中の感染細胞の存在を評価す

ること、移植材料中の不要な細胞型の存在を評価すること、及び／又は腫瘤の外科的切除後に残留した腫瘍細胞の存在を評価することにおいて有用であり得る。

【０１９６】

例えば、本発明のタンパク質の診断用バリアントを使用して収集された情報を使用して患者の部分集団を確認できる可能性があり、そうなれば、個々の患者を、そのような診断の実施形態を使用して解明されたそれらの固有の特徴に基づき部分集団に類別することができる。例えば、具体的な医薬品又は療法の有効性が、患者の部分集団を定義するのに使用される基準の１つのタイプとなる可能性がある。例えば、本発明の特定の細胞毒性タンパク質の非毒性の診断用バリアントは、どの患者が、同じ本発明の細胞標的化分子の細胞毒性バリアントに対して陽性に応答すると予測される患者のクラス又は部分集団に属するのかを識別するのに使用することができる。したがって、本発明の細胞毒性タンパク質の非毒性バリアントを含む本発明の脱免疫化されたタンパク質を使用した患者の同定、患者の層別化、及び診断のための関連方法は、本発明の範囲内であるとみなされる。

【０１９７】

Ｅ．免疫化／ワクチン接種材料及び抗毒素

本発明のポリペプチドは、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドの存在下で特異的なエピトープに対する免疫応答の惹起を促進するための、偏向した免疫化及び／又はワクチン接種材料としての用途を有する。志賀毒素を産生する微生物による感染は、罹患率及び死亡率に関連する（Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)）。志賀毒素を産生する細菌は、溶血尿毒症症候群（HUS, hemolytic uremic syndrome）及び細菌性赤痢、加えて出血性大腸炎及び下痢などの関連する状態の主な原因である（Karmali M, Mol Biotechnol 26: 117-22 (2004)を参照）。加えて志賀毒素は、米国疾病対策予防センター（ＣＤＣ, Disease Control and Prevention）により、生物兵器として使用されるそれらの可能性のためにカテゴリーＢの生物学的脅威物質（biothreat agent）に分類される。

【０１９８】

志賀ホロトキシン又は志賀毒素サブユニットに対する免疫応答中に惹起された哺乳動物の抗体は、エピトープに応じて中和又は非中和のいずれかであり得る。さらに、志賀毒素を認識する抗体は、どの志賀毒素サブユニットが抗体のエピトープを含むかに応じて異なる中和作用を有する可能性がある（Krautz-Peterson G et al., Infect Immun 76: 1931-9 (2008)）。したがって本発明の特定のポリペプチドは、例えば望ましくない非中和抗体を惹起するエピトープ領域などの特定のエピトープ領域とは別に、例えば望ましい中和及び／又は防御抗体を惹起するエピトープなどの他のエピトープに対する哺乳動物の免疫応答を人工的に促進するための方法において有用である。

【０１９９】

本発明の特定のポリペプチドは、破壊されていないネイティブのエピトープに対する免疫応答の惹起を許容しながら、特異的なエピトープの抗原性及び／又は免疫原性を低下及び／又は消滅させるための方法における、偏向した免疫化及び／又はワクチン接種材料としての用途を有する。志賀毒素Ａサブユニットの選択されたエピトープ領域とは別に偏向している抗志賀毒素抗体を生成するために、哺乳動物に関する免疫化技術を使用することができる。

【０２００】

加えて、本発明の特定のポリペプチドは、例えば、スクリーニングの選択が志賀毒素Ａサブユニットの選択されたエピトープ領域とは別に偏るように志賀毒素に結合する免疫グロブリン型ドメインなどの様々な結合ドメインの生成、同定、及び親和性成熟のための、例えばタンパク質ディスプレイスクリーニング及びインビトロでの選択などの様々なスクリーニング方法で使用することができる（Glockler J et al., Molecules 15: 2478-90 (2010)、Bradbury A et al., Nat Biotechnol 29: 245-54 (2011)、Chen T, Keating A, Protein Sci 21: 949-63 (2012)、Geyer C et al., Methods Mol Biol 901: 11-32 (2012)を参照）。これらの方法は、他の非標的化エピトープの非存在下で標的化することができ

ない不連続のエピトープを標的化するのに特に有用である。これらの方法は、志賀毒素の毒性を阻害する新規の中和抗体及び非免疫グロブリン型のドメインを生成するのに使用される（Perera L et al., J Clin Microbiol 26: 2127-31 (1988)、Mukherjee J et al., Infect Immun 70: 5896-9 (2002)、Smith M et al., Infect Immun 77: 2730-40 (2009)、Rocha L et al., Toxins 4: 729-47 (2012)、Tremblay J et al., Infect Immun 81: 4592-603 (2013)、Skinner C et al., PLoS One 9: e99854 (2014)を参照）。

【０２０１】

本発明の特定のポリペプチドは、偏向した抗志賀毒素抗体又は抗毒素の作製及び／又は生産のための方法において免疫化材料として使用することができる。志賀毒素のＡサブユニットの選択されたエピトープ領域とは別に偏向している抗志賀毒素抗体を生成するために、哺乳動物のための免疫化技術を使用することができる。例えば、本発明の特定のポリペプチドは、志賀毒素のＡサブユニットの選択されたエピトープ領域とは別に偏向している抗志賀毒素Ａサブユニット抗体を生成するために、免疫化材料として使用することができる。加えて、本発明の脱免疫化された志賀毒素Ａサブユニットを志賀毒素のＢサブユニットと組み合わせることによって、免疫化技術を使用して、ネイティブの志賀毒素のＢサブユニット及び／又はホロトキシン中に存在する志賀毒素サブユニット間の境界に存在するエピトープに偏向した抗志賀毒素抗体を生成することができる。これらの抗志賀毒素抗体は、免疫検出アッセイを含む方法及び志賀毒素中和抗体又は抗毒素の作製のための方法において用途を有する（Mukherjee J et al., Infect Immun 70: 5896-9 (2002)、Sheoran A et al., Infect Immun 71: 3125-30 (2003)、Cheng L et al., Toxins 5: 1845-58 (2013)、He X et al., J Immunol Methods 389: 18-28 (2013)、Tremblay J et al., Infect Immun 81: 4592-603 (2013)を参照）。それゆえに、本発明の特定のポリペプチドは、志賀毒素中和抗体をよりよく生成するのに使用することができ、次いで志賀毒素中和抗体は、予防剤、治療剤として投与されてもよいし、又は志賀毒素を産生する微生物による感染若しくはその他の志賀毒素への曝露を治療するための予防剤及び／若しくは治療剤に加工されてもよい（Fujii J et al., Microb Pathog 25: 139-46 (1998)、Mukherjee J et al., Infect Immun 70: 5896-9 (2002)、Sheoran A et al., Infect Immun 71: 3125-30 (2003)、Gao X et al., Vaccine 29: 6656-63 (2011)、Cheng L et al., Toxins 5: 1845-58 (2013)、He X et al., J Immunol Methods 389: 18-28 (2013)、Tremblay J et al., Infect Immun 81: 4592-603 (2013)、Vance D et al., J Biol Chem 288: 36538-47 (2013)を参照）。

【０２０２】

本発明の特定のポリペプチドは、偏向した抗志賀毒素抗体の作製及び／又は生産のための方法において、ワクチン接種材料として使用することができる。志賀毒素を産生する微生物による将来的な感染若しくはその他の志賀毒素への曝露に対する活性な免疫性を哺乳動物に付与するために、本発明の特定のポリペプチドを含む組成物と共にワクチン接種技術を使用することができる（Bosworth B et al., Infect Immun 64: 55-60 (1996)、Rabinovitz B et al., J Dairy Sci 95: 3318-26 (2012)を参照）。ワクチンの設計は、非中和抗体が対象における防御抗体、中和抗体と干渉する可能性がある非中和抗体よりも、中和抗体を惹起するエピトープ間の差を考慮に入れてもよい。

【０２０３】

例えば、志賀ホロトキシンに対する５つの抗体の研究において、１つのみが中和活性を示し、この１つがＡ及びＢサブユニットの両方に結合した（He X et al., J Immunol Methods 389: 18-28 (2013)）。ＡＢ毒素のリシンの場合と同様に、中和抗体は、Ａ及びＢサブユニット間の境界を認識し、Ａサブユニットフラグメントの遊離を防ぐ（O'Hara J, Mantis N, J Immunol Methods 395: 71-8 (2013)）。

【０２０４】

ワクチン接種目的の場合、主として外来のエピトープ及び／又はホロトキシン構造中のＡサブユニットとＢサブユニットとの境界にわたるエピトープに対する抗体反応を惹起するようにワクチン材料を偏らせることが、より好都合な可能性がある（O'Hara J, Mantis

N, J Immunol Methods 395: 71-8 (2013)、O'Hara J et al., Curr Top Microbiol Immunol 357: 209-41 (2012))。例えば、リシンに対するワクチン接種は、非防御抗体、非中和抗体のみを惹起するネイティブの免疫原性領域をなくすことによって利益を得ていた可能性がある（Olsnes S, Toxicon 44: 361-70 (2004)）。同様に、リシンの免疫優性領域の除去は、特定のエピトープに対する非中和抗体を生産することとは別に（O'Hara J et al., Vaccine 28: 7035-46 (2010))、又は毒素を強化する抗体を生産することとも別に(Maddaloni M et al., J Immunol 172: 6221-8 (2004))、偏向した抗体反応をもたらす可能性がある。その目的のために、志賀毒素Ａの単離された領域内の特定のエピトープの消滅は、望ましくないエピトープを除去して、志賀毒素サブユニットの境界にわたるエピトープなどのより望ましいエピトープの抗体作製を促進することができる。

【０２０５】

偏向した免疫化及び／又はワクチン接種材料として有用な本発明のポリペプチドは、酵素活性及び／又は細胞毒性などの志賀毒素エフェクター機能の低下及び／又は消滅によって利益を得る可能性がある（He X et al., J Immunol Methods 389: 18-28 (2013)、Skinner C et al., PLoS One 9: e99854 (2014)）。志賀毒素エフェクター機能の低下又は消滅は、熟練した作業者に公知又は周知の方法を使用して熟練した作業者により発見された１又は２以上のトランケーション及び／又はアミノ酸置換を使用することによって達成することができる。加えて、志賀毒素エフェクター機能の低下又は消滅は、志賀毒素エフェクターアッセイにおける活性、例えばリボソーム阻害及び標的化された細胞毒性などの弱毒化、著しい低下及び／又は損失を示す、実施例で説明される置換を使用することによって達成される可能性がある。

【０２０６】

Ｖ．脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質のポリペプチド配列におけるバリエーション

熟練した作業者であれば、例えば、抗原性及び／又は免疫原性を示す可能性を低下させる１又は２以上のエピトープ破壊と共に毒素エフェクター領域の全体の構造及び機能を維持することによって、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質、並びに前者のいずれかをコードするポリヌクレオチドに、それらの生物活性を低減させることなくバリエーションをもたらすことができることを理解していると予想される。例えば、いくつかの改変が、発現、精製、並びに／又は薬物動態学的特性及び／若しくは免疫原性を容易にする可能性がある。このような改変は熟練した作業者に周知であり、例えば、開始部位を提供するためのアミノ末端に付加されたメチオニン、都合よく配置された制限部位若しくは終止コドンを作製するためのいずれかの末端に配置された追加のアミノ酸、並びに便利な検出及び／若しくは精製のために提供されるいずれかの末端に融合した生化学的な親和性タグが挙げられる。

【０２０７】

また、エピトープタグ又は他の部分に関する配列などの、アミノ及び／又はカルボキシ末端における追加のアミノ酸残基の包含も本明細書において検討される。追加のアミノ酸残基は、例えば、クローニングの容易化、発現の容易化、翻訳後修飾、合成の容易化、精製、検出の容易化、及び投与などの様々な目的に使用することができる。エピトープタグ及び部分の非限定的な例は、キチン結合タンパク質ドメイン、エンテロペプチダーゼ切断部位、Ｘａ因子切断部位、ＦＩＡｓＨタグ、ＦＬＡＧタグ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ, green fluorescent protein）、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ部分、ＨＡタグ、マルトース結合タンパク質ドメイン、ｍｙｃタグ、ポリヒスチジンタグ、ＲｅＡｓＨタグ、ｓｔｒｅｐ－タグ、ｓｔｒｅｐ－タグＩＩ、ＴＥＶプロテアーゼ部位、チオレドキシンドメイン、トロンビン切断部位、及びＶ５エピトープタグである。

【０２０８】

上記実施形態の特定のものにおいて、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質のポリペプチド配列は、少なくとも１つのアミノ酸が本明細書に示される少なくとも１つの天然位置のエピトープ領域において破壊されてい

る限りは、ポリペプチド領域に導入される１又は２以上の保存的アミノ酸置換で変更される。用語「保存的置換」は、本明細書で使用される場合、１又は２以上のアミノ酸が別の生物学的に類似するアミノ酸残基で置き換えられることを示す。その例としては、類似の特徴を有するアミノ酸残基、例えば小さいアミノ酸、酸性アミノ酸、極性アミノ酸、塩基性アミノ酸、疎水性アミノ酸及び芳香族アミノ酸の置換が挙げられる（例えば、下記の表Ｂを参照）。内因性の哺乳動物ペプチド及びタンパク質に通常存在しない残基での保存的置換の例は、アルギニン又はリシン残基の、例えばオルニチン、カナバニン、アミノエチルシステイン、又は別の塩基性アミノ酸での保存的置換である。ペプチド及びタンパク質において表現型ではサイレントな置換に関するさらなる情報については、例えば、Bowie J et al., Science 247: 1306-10 (1990)を参照されたい。

【０２０９】

【表２】

表B.保存的アミノ酸置換の例

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
A G P S T	D E Q N	H K R	C I L M V	F W Y	N Q S T	A G I L V	C M P	F H W Y	A C F G H I L M R T V W Y	C D E H K N Q R S T	A C D G N P S T V	A C D E G H K N Q R S P T	D E G K P Q R S T

【０２１０】

表Ｂにおける保存的置換のスキームでは、例示的なアミノ酸の保存的置換は、物理化学的な特性によって、Ｉ：中性、親水性；II：酸及びアミド；III：塩基性；IV：疎水性；Ｖ：芳香族、嵩高なアミノ酸、VI：親水性で非荷電性、VII：脂肪族で非荷電性、VIII：非極性で非荷電性、IX：シクロアルケニル結合、Ｘ：疎水性、XI：極性、XII：小さい、XIII：ターン許容性、及びXIV：フレキシブルにグループ分けされる。例えば、保存的アミノ酸置換としては、以下：１）Ｓは、Ｃで置換されていてもよい；２）Ｍ又はＬは、Ｆで置換されていてもよい；３）Ｙは、Ｍで置換されていてもよい；４）Ｑ又はＥは、Ｋで置換されていてもよい；５）Ｎ又はＱは、Ｈで置換されていてもよい；及び６）Ｈは、Ｎで置換されていてもよいことが挙げられる。

【０２１１】

追加の保存的アミノ酸置換としては、以下：１）Ｓは、Ｃで置換されていてもよい；２）Ｍ又はＬは、Ｆで置換されていてもよい；３）Ｙは、Ｍで置換されていてもよい；４）Ｑ又はＥは、Ｋで置換されていてもよい；５）Ｎ又はＱは、Ｈで置換されていてもよい；及び６）Ｈは、Ｎで置換されていてもよいことが挙げられる。

【０２１２】

特定の実施形態において、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプ

チド及び／又はタンパク質は、それが実施例で示される天然位置のエピトープ領域（表１、２、３、４、及び／又は５）において少なくとも１つのアミノ酸の破壊を保持する限り、さらにそれが単独で、並びに／又は治療及び／若しくは診断用組成物の成分として、志賀毒素エフェクター機能の有意なレベルを示す限り、本明細書で列挙されたポリペプチド配列と比較して、最大で、２０、１５、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、又は１つのアミノ酸置換を有する本発明のポリペプチド領域の機能的なフラグメント又はバリアントを含んでいてもよい。本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質のバリアントは、変化した細胞毒性、変化した細胞増殖抑制作用、変化した免疫原性、及び／又は変化した血清中半減期などの所望の特性を達成するために、例えば結合領域又は志賀毒素エフェクター領域内で、１又は２以上のアミノ酸を変更すること又は１又は２以上のアミノ酸を欠失させるか若しくは挿入することによって、本発明のタンパク質のポリペプチドを変化させる結果として本発明の範囲内である。本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質のポリペプチドはさらに、シグナル配列を含んでいてもよいし、又は含んでいなくてもよい。

【０２１３】

特定の実施形態において、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質は、それが実施例で示される天然位置のエピトープ領域（表１、２、３、４、及び／又は５）において少なくとも１つのアミノ酸の破壊を保持する限り、本明細書で列挙されたタンパク質のアミノ酸配列のいずれか１つに対して、少なくとも８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又はそれより高いアミノ酸配列同一性と、測定可能な生物活性、例えば細胞毒性、細胞外標的生体分子の結合、酵素による触媒作用、細胞レベル下の経路決定、又はリボソームの触媒的な不活性化とを共有する。

【０２１４】

特定の実施形態において、少なくとも１つのアミノ酸が実施例で示される天然位置のエピトープ領域（表１、２、３、４、及び／又は５）で破壊されている限り、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質を変更して、志賀毒素エフェクター領域の酵素活性及び／又は細胞毒性を変化させてもよい。この変化は、変更された志賀毒素エフェクター領域がその成分である志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド又は細胞毒性タンパク質の細胞毒性における変化をもたらす場合もあるし、又はそうでない場合もある。可能性のある変更としては、実施例で示される天然位置のエピトープ領域（表１、２、３、４、及び／又は５）において少なくとも１つのアミノ酸が破壊されている限り、トランケーション、欠失、転位、挿入及び置換からなる群より選択される志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドへの突然変異が挙げられる。

【０２１５】

志賀毒素ファミリーのメンバーのＡサブユニットの細胞毒性は、変異又はトランケーションによって低減又は消去され得る。チロシン－７７、グルタメート－１６７、アルギニン－１７０、チロシン－１１４、及びトリプトファン－２０３と名付けられた位置は、Ｓｔｘ、Ｓｔｘ１、及びＳｔｘ２の触媒活性にとって重要であることが示されている（Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988)、Deresiewicz R et al., Biochemistry 31: 3272-80 (1992)、Deresiewicz R et al., Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993)、Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993)、Cao C et al., Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994)、Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)）。無細胞リボソーム不活性化アッセイにおいて、グルタメート－１６７とアルギニン－１７０の両方を変異させると、Ｓｌｔ－Ｉ　Ａ１の酵素活性が消去された（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。小胞体でＳｌｔ－Ｉ　Ａ１のデノボ発現を使用する別のアプローチにおいて、グルタメート－１６７とアルギニン－１７０の両方を変異させると、Ｓｌｔ－Ｉ　Ａ１フラグメントの細胞毒性がその発現レベルで消去された（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。トランケーション分析から、残基７５から２６８までのＳｔｘＡのフラグメントが、インビトロで有意な酵素活性をなお保持していることが

実証された（Haddad, J Bacteriol １７５: 4970-8 (1993)）。残基１～２３９を含有するＳｌｔ－Ｉ　Ａ１のトランケートされたフラグメントは、インビトロにおいて有意な酵素活性及びサイトゾルにおいてデノボ発現による細胞毒性を示した（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。小胞体中の残基１～２３９にトランケートされたＳｌｔ－Ｉ　Ａ１フラグメントの発現は、サイトゾルにレトロ転移（retrotranslocate）することができないことから、細胞毒性ではなかった（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。

【０２１６】

志賀毒素のＡサブユニットにおける酵素活性及び／又は細胞毒性にとって最も重要な残基は、なかでも以下の残基位置：アスパラギン－７５、チロシン－７７、チロシン－１１４、グルタメート－１６７、アルギニン－１７０、アルギニン－１７６、及びトリプトファン－２０３にマッピングされた（Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)）。特定には、グルタメート－Ｅ１６７からリシン、及びアルギニン－１７６からリシンの変異を含有するＳｔｘ２Ａの二重ミュータントコンストラクトは完全に不活性化され、それに対して、Ｓｔｘ１及びＳｔｘ２における多くの単一の変異は細胞毒性の１０分の１の低下を示した。さらに、Ｓｔｘ１Ａの１～２３９又は１～２４０へのトランケーションは、その細胞毒性を低下させ、同様に、Ｓｔｘ２Ａの保存された疎水性残基へのトランケーションは、その細胞毒性を低下させた。志賀毒素のＡサブユニットにおける真核性リボソーム及び／又は真核性リボソーム阻害の結合にとって最も重要な残基は、なかでも以下の残基位置、アルギニン－１７２、アルギニン－１７６、アルギニン－１７９、アルギニン－１８８、チロシン－１８９、バリン－１９１、及びロイシン－２３３にマッピングされている（McCluskey A et al., PLoS One 7: e31191 (2012)）。

【０２１７】

志賀毒素様毒素１のＡサブユニットのトランケーションは、インビトロでリボソームを酵素的に不活性化することが可能な場合、触媒活性を示し、細胞内で発現される場合、細胞毒性である（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。完全な酵素活性を示す最小の志賀毒素のＡサブユニットフラグメントは、Ｓｌｔ１Ａの残基１～２３９で構成されるポリペプチドである（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。実質的な触媒活性を保持すると報告された志賀毒素のＡサブユニットの最小のフラグメントは、ＳｔｘＡの７５～２４７残基であるにもかかわらず（Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)）、真核細胞内でデノボ発現されたＳｔｘＡのトランケーションは、サイトゾルに到達してリボソームを触媒的に不活性化させるのに、わずか２４０残基しか必要としない（LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)）。

【０２１８】

ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）又はＳｔｘＡ（配列番号２）に由来する本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質の特定の実施形態において、これらの変化は、７５位におけるアスパラギン、７７位におけるチロシン、１１４位におけるチロシン、１６７位におけるグルタメート、１７０位におけるアルギニン、１７６位におけるアルギニンの置換、及び／又は２０３位におけるトリプトファンの置換を包含する。このような置換の例は、従来技術に基づき熟練した作業者に公知であると予想され、例えば、７５位におけるアスパラギンからアラニンへの置換、７７位におけるチロシンからセリンへの置換、１１４位におけるチロシンからセリンへの置換、１６７位におけるグルタメートからグルタメートへの置換、１７０位におけるアルギニンからアラニンへの置換、１７６位におけるアルギニンからリシンへの置換、及び／又は２０３位におけるトリプトファンからアラニンへの置換である。志賀毒素の酵素活性及び／又は細胞毒性を強化するか又は低下させるかのいずれかの他の変異は本発明の範囲内であり、周知の技術及び本明細書で開示されたアッセイを使用して決定され得る。

【０２１９】

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質は、１又は２以上の追加の薬剤にコンジュゲートされていてもよく、このような薬剤とし

ては、本明細書で説明されるような薬剤を含む当業界において公知の治療剤及び／又は診断剤を挙げることができる。

【０２２０】

VI．脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド又はタンパク質の産生、製造、及び精製

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質は、当業者に周知の生化学工学の技術を使用して産生され得る。例えば、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質は、標準的な合成方法、組換え発現系の使用、又は他のあらゆる好適な方法によって製造され得る。したがって、本発明のポリペプチド及びタンパク質は、多数の方法で合成することが可能であり、このような方法としては、例えば、（１）標準的な固相又は液相の手法を使用して、段階的に又はフラグメントのアセンブリのいずれかによってタンパク質のポリペプチド又はポリペプチド成分を合成するステップと、最終的なペプチド化合物生成物を単離し精製するステップとを含む方法；（２）宿主細胞中の本発明のタンパク質のポリペプチド又はポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを発現させるステップと、宿主細胞又は宿主細胞培養から発現生成物を回収するステップとを含む方法；又は（３）インビトロで本発明のタンパク質のポリペプチド又はポリペプチド成分をコードするポリヌクレオチドを無細胞発現させるステップと、発現生成物を回収するステップとを含む方法；又は（１）、（２）又は（３）の方法のあらゆる組合せによって、ペプチド成分のフラグメントを得て、その後フラグメントを合体させ（例えばライゲートして）ペプチド成分を得て、ペプチド成分を回収する方法が挙げられる。

【０２２１】

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド又はタンパク質のポリペプチド若しくはポリペプチド成分を、固相又は液相ペプチド合成の手段によって合成することが好ましい場合がある。本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及びタンパク質は、好適には、標準的な合成方法によって製造されてもよい。したがって、ペプチドは、例えば、標準的な固相又は液相手法で、段階的に又はフラグメントのアセンブリのいずれかによってペプチドを合成するステップと、最終的なペプチド生成物を単離し精製するステップとを含む方法によって合成されてもよい。これに関して、国際公開第１９９８／１１１２５号パンフレット、又はとりわけFields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis （Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, U.K., 2nd ed., 2002）及びそこに記載された合成の実施例を参照してもよい。

【０２２２】

本発明の脱免疫化されたポリペプチド及びタンパク質は、当業界において周知の組換え技術を使用して調製（産生及び精製）されてもよい。一般的に、コード化ポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞を培養すること、及び細胞培養からポリペプチドを回収することによってポリペプチドを調製するための方法は、例えばSambrook J et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual （Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, U.S., 1989）、Dieffenbach C et al., PCR Primer: A Laboratory Manual （Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., U.S., 1995）で説明されている。本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質を産生するために、あらゆる好適な宿主細胞を使用することができる。宿主細胞は、本発明のポリペプチドの発現を駆動させる１又は２以上の発現ベクターで安定して若しくは一時的にトランスフェクションされた、形質転換された、形質導入された、又は感染した細胞であり得る。加えて、本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質は、変化した細胞毒性、変化した細胞増殖抑制作用、変化した免疫原性、及び／又は変化した血清中半減期などの所望の特性を達成するために、１又は２以上のアミノ酸の変更又は１又は２以上のアミノ酸の欠失若しくは挿入をもたらす本発明のポリペプチド又はタンパク質をコードするポリヌクレオチドの改変によって産生されてもよい。

【０２２３】
本発明のタンパク質を産生するために選ばれる可能性がある多種多様の発現系がある。例えば、本発明のタンパク質の発現のための宿主生物としては、原核生物、例えば大腸菌（E. coli）及び枯草菌（B. subtilis）、真核細胞、例えば酵母及び糸状菌（Ｓ．セレビジエ（S. cerevisiae）、Ｐ．パストリス（P. pastoris）、黒麹菌（A. awamori）、及びＫ．ラクティス（K. lactis）など）、藻類（コナミドリムシ（C. reinhardtii）など）、昆虫細胞株、哺乳動物細胞（ＣＨＯ細胞など）、植物細胞株、並びに真核生物、例えばトランスジェニック植物（シロイスナズナ（A. thaliana）及びベンサミアナタバコ（N. benthamiana）など）が挙げられる。

【０２２４】
したがって、本発明はまた、上記で列挙した方法に従って、本発明のタンパク質の本発明のポリペプチド若しくはポリペプチド成分の一部若しくは全てをコードするポリヌクレオチド、宿主細胞に導入される場合は本発明のポリペプチドの一部若しくは全てをコードすることが可能な本発明の少なくとも１つのポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び／又は本発明のポリヌクレオチド若しくは発現ベクターを含む宿主細胞を使用して、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質を産生するための方法も提供する。

【０２２５】
組換え技術を使用して宿主細胞又は無細胞系中でポリペプチド又はタンパク質が発現される場合、高純度を有するか又は実質的に均一な調製物を得るために、宿主細胞の要素などの他の成分から所望のポリペプチド又はタンパク質を分離（又は精製）することが有利である。精製は、当業界において周知の方法、例えば遠心分離技術、抽出技術、クロマトグラフ及び画分化技術（例えばゲルろ過によるサイズ分離、イオン交換カラム、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、シリカでのクロマトグラフィー又はカチオン交換樹脂、例えばＤＥＡＥなどによる電荷分離、クロマトフォーカシング、及び汚染物質を除去するためのプロテインＡセファロースクロマトグラフィー）、並びに沈殿技術（例えばエタノール沈殿又は硫酸アンモニウム沈殿）によって達成することができる。本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド並びに／又はタンパク質の純度を増加させるために、相当数の生化学精製技術を使用することができる。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド及びタンパク質は、ホモ多量体の形態（すなわち２又は３以上の本発明の同一なポリペプチド又はタンパク質のタンパク質複合体）で精製されてもよい。

【０２２６】
以下の実施例は、本発明のタンパク質を産生するための方法の非限定的な例、加えて本発明の例示的なタンパク質の産生の具体的な、ただし非限定的な態様の説明である。

【０２２７】
VII. 脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド又はタンパク質を含む医薬及び診断用組成物

本発明は、以下のさらなる詳細で説明される状態、疾患、障害、又は症状（例えばがん、悪性腫瘍、非悪性腫瘍、成長異常、免疫障害、及び微生物感染）の治療又は防止のための医薬組成物において、単独で、又は１又は２以上の追加の治療剤と組み合わせて使用するためのポリペプチド及びタンパク質を提供する。本発明はさらに、本発明に従って、少なくとも１つの薬学的に許容される担体、賦形剤、又は媒体と共に、本発明のポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、本発明のポリペプチド又はタンパク質のホモ多量体及び／又はヘテロ多量体の形態を含んでいてもよい。医薬組成物は、以下のさらなる詳細で説明される疾患、状態、障害、又は症状を治療、緩和又は予防する方法において有用であると予想される。このような疾患、状態、障害、又は症状はそれぞれ、本発明に係る医薬組成物の使用に対して別の実施形態であると想定される。本発明は、さらに、以下でより詳細に説明されるように、少なくとも１つの本発明に

係る治療方法で使用するための医薬組成物を提供する。

【０２２８】

用語「患者」及び「対象」は、本明細書で使用される場合、同義的に使用され、あらゆる生物、一般的に脊椎動物、例えば少なくとも１つの疾患、障害、又は状態の症状、症候、及び／又は徴候を示すヒト及び動物を指す。これらの用語は、哺乳動物、例えば霊長類の非限定的な例、家畜動物（例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、コンパニオンアニマル（例えばネコ、イヌなど）及び実験動物（例えばマウス、ウサギ、ラットなど）を包含する。

【０２２９】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、又は「治療」及びそれらの文法上の変化形は、有益な又は所望の臨床結果を得るためのアプローチを指す。この用語は、状態、障害若しくは疾患の発病又は進行速度を遅延させること、それに関連する症状を低減又は軽減すること、状態の完全又は部分退縮をもたらすこと、又は上記いずれかのいくつかの組合せを指す場合もある。本発明の目的に関して、有益な又は所望の臨床結果としては、これらに限定されないが、検出可能か又は検出不可能かにかかわらず、症状の低減又は軽減、疾患の程度の減少、疾患の状況の安定化（例えば悪化しないこと）、疾患進行の遅延又は減速、病状の緩和又は一時的緩和、及び寛解（部分又は完全にかかわらず）が挙げられる。「治療する」、「治療すること」、又は「治療」はまた、治療を受けない場合に予測される生存時間と比べて生存を長くすることを意味する場合もある。したがって治療が必要な対象（例えばヒト）は、すでに問題の疾患又は障害に罹っている対象であり得る。用語「治療する」、「治療すること」、又は「治療」は、治療しない場合と比較して病理学的状況又は症状の重症度の増加を阻害又は低減することを包含し、関連する疾患、障害、又は状態の完全な停止を暗に示すことを必ずしも意味するわけではない。腫瘍及び／又はがんに関して、治療は、全体的な腫瘍負荷量及び／又は個々の腫瘍サイズの低減を包含する。

【０２３０】

本明細書で使用される場合、用語「予防する」、「予防すること」、「予防」及びそれらの文法上の変化形は、状態、疾患、若しくは障害の発症を予防する、又はその病状を変更するためのアプローチを指す。したがって、「予防」は、防止的又は予防的措置を指す場合もある。本発明の目的に関して、有益な又は所望の臨床結果としては、これらに限定されないが、検出可能か又は検出不可能かにかかわらず、疾患の症状、進行又は発症の予防又は減速が挙げられる。したがって予防が必要な対象（例えばヒト）は、まだ問題の疾患又は障害に罹っていない対象であり得る。用語「予防」は、治療しない場合と比較して疾患の発病を減速させることを包含し、関連する疾患、障害又は状態の永続的な予防を暗に示すことを必ずしも意味するわけではない。したがって状態を「予防すること」又は状態の「予防」は、特定の状況において、状態を発症する危険を低下させること、又は状態に関連する症状の発症を予防若しくは遅延することを指す場合がある。

【０２３１】

「有効量」又は「治療有効量」は、本明細書で使用される場合、標的の状態を予防若しくは治療すること、又は状態に関連する症状を有利に軽減することなどの対象における少なくとも１つの望ましい治療効果を生じる組成物（例えば治療用組成物又は薬剤）の量又は用量である。最も望ましい治療有効量は、それを必要とする所与の対象について当業者によって選択された特定の治療の望ましい効能を生じると予想される量である。この量は、これらに限定されないが、治療化合物の特徴（活性、薬物動態学、薬力学、及び生物学的利用率など）、対象の生理学的状態（年齢、性別、疾患のタイプ、疾患の段階、全般的な身体状態、所与の投薬量に対する反応性、及び薬物療法のタイプなど）、製剤中の薬学的に許容される１又は複数の担体の性質、及び投与経路などの熟練した作業者によって理解されている様々な要因に応じて異なると予想される。臨床及び薬理学分野における熟練者は、慣例的な実験を介して、すなわち化合物の投与に対する対象の応答をモニターし、それに応じて投薬量を調整することによって治療有効量を決定することが可能であると予

想される（例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy （Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, U.S., 19th ed., 1995）を参照）。

【０２３２】

診断用組成物は、本発明のポリペプチド又はタンパク質及び１又は２以上の検出促進剤を含む。同位体、色素、比色法用の薬剤、コントラスト増強剤、蛍光剤、生物発光剤、及び磁気性の薬剤などの様々な検出促進剤が当業界において公知である。これらの薬剤は、本発明のポリペプチド又はタンパク質にあらゆる位置で取り込まれていてもよい。薬剤の取り込みは、細胞毒性タンパク質のアミノ酸残基を介して、又はリンカー及び／又はキレート化剤を介した連結などの当業界において公知のいくつかのタイプの連結を介していてもよい。薬剤の取り込みは、スクリーニング、アッセイ、診断手順、及び／又はイメージング技術において診断用組成物の存在の検出が可能になるような方法でなされる。

【０２３３】

本発明の診断用組成物を生産又は製造する場合、本発明のタンパク質は、１又は２以上の検出促進剤に直接的又は間接的に連結されてもよい。情報収集方法のために、例えば生物の疾患、障害、又は状態に対する診断及び／又は予後の適用のために、本発明のポリペプチド又はタンパク質に機能するように連結できる、熟練した作業者に公知の極めて多くの検出促進剤がある（例えばCai W et al., J Nucl Med 48: 304-10 (2007)、Nayak T, Brechbiel M, Bioconjug Chem 20: 825-41 (2009)、Paudyal P et al., Oncol Rep 22: 115-9 (2009)、Qiao J et al., PLoS ONE 6: e18103 (2011)、Sano K et al., Breast Cancer Res 14: R61 (2012)を参照）。例えば、検出促進剤としては、画像を強調する造影剤、例えば蛍光色素（例えばAlexa680、インドシアニングリーン、及びＣｙ５．５）、同位体及び放射性核種、例えば^{11}Ｃ、^{13}Ｎ、^{15}Ｏ、^{18}Ｆ、^{32}Ｐ、^{51}Ｍｎ、^{52}ｍＭｎ、^{52}Ｆｅ、^{55}Ｃｏ、^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ，^{67}Ｃｕ、^{67}Ｇａ、^{68}Ｇａ、^{72}Ａｓ、^{73}Ｓｅ、^{75}Ｂｒ、^{76}Ｂｒ、^{82}ｍＲｂ、^{83}Ｓｒ、^{86}Ｙ、^{90}Ｙ、^{89}Ｚｒ、^{94}ｍＴｃ、^{94}Ｔｃ、^{99}ｍＴｃ、^{110}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ、^{120}Ｉ、^{123}Ｉ、^{124}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{154}Ｇｄ、^{155}Ｇｄ、^{156}Ｇｄ、^{157}Ｇｄ、^{158}Ｇｄ、^{177}Ｌｕ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、及び^{223}Ｒ；常磁性イオン、例えばクロム（ＩＩＩ）、マンガン（ＩＩ）、鉄（ＩＩＩ）、鉄（ＩＩ）、コバルト（ＩＩ）、ニッケル（ＩＩ）、銅（ＩＩ）、ネオジム（ＩＩＩ）、サマリウム（ＩＩＩ）、イッテルビウム（ＩＩＩ）、ガドリニウム（ＩＩＩ）、バナジウム（ＩＩ）、テルビウム（ＩＩＩ）、ジスプロシウム（ＩＩＩ）、ホルミウム（ＩＩＩ）又はエルビウム（ＩＩＩ）；金属、例えばランタン（ＩＩＩ）、金（ＩＩＩ）、鉛（ＩＩ）、及びビスマス（ＩＩＩ）；超音波コントラスト増強剤、例えばリポソーム；放射線不透物質、例えばバリウム、ガリウム、及びタリウム化合物が挙げられる。検出促進剤は、中間官能基、例えば２－ベンジルＤＴＰＡ、ＰＡＭＡＭ、ＮＯＴＡ、ＤＯＴＡ、ＴＥＴＡ、それらの類似体、及び前述のもののいずれかの機能的な均等物のようなキレート化剤を使用することによって直接的又は間接的に取り込まれていてもよい（Leyton J et al., Clin Cancer Res 14: 7488-96 (2008)を参照）。

【０２３４】

タンパク質に、特に免疫グロブリン及び免疫グロブリンに由来するドメインに様々な検出促進剤を取り込む、取り付ける、及び／又はコンジュゲートするための、熟練した作業者に公知の極めて多くの標準的な技術がある（Wu A, Methods 65: 139-47 (2014)）。同様に、医療分野で一般的に使用される非侵襲的なインビボでのイメージング技術などの熟練した作業者に公知の極めて多くのイメージングアプローチがあり、例えば、コンピューター断層撮影イメージング（ＣＴスキャニング）、光学的イメージング（直接の、蛍光による、及び生物発光によるイメージングなど）、磁気共鳴映像法（ＭＲＩ，magnetic resonance imaging）、ポジトロンエミッショントモグラフィー（ＰＥＴ，positron emission tomography）、単光子放射型コンピューター断層撮影法（ＳＰＥＣＴ，single-photon emission computed tomography）、超音波、及びＸ線コンピューター断層撮影イメージングである（総論については、Kaur S et al., Cancer Lett 315: 97-111 (2012)を参照）

。

【０２３５】

脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド又はタンパク質を含む医薬及び／又は診断用組成物の生産又は製造

本発明のポリペプチド及びタンパク質のいずれかの薬学的に許容される塩又は溶媒和物も、同様に本発明の範囲内である。

【０２３６】

本発明の内容における用語「溶媒和物」は、溶質（この場合、本発明に係るポリペプチド化合物又はそれらの薬学的に許容される塩）と溶媒との間で形成された規定の化学量論の複合体を指す。それに関して、溶媒は、例えば、水、エタノール、又は別の薬学的に許容される、典型的には小分子の有機種、例えば、これらに限定されないが、酢酸又は乳酸などであり得る。問題の溶媒が水である場合、このような溶媒和物は通常、水和物と称される。

【０２３７】

本発明のポリペプチド及びタンパク質又はそれらの塩は、典型的には薬学的に許容される担体中に治療有効量の本発明の化合物又はそれらの塩を含む、貯蔵又は投与のために調製された医薬組成物として製剤化されてもよい。用語「薬学的に許容される担体」は、あらゆる標準的な医薬用担体を包含する。治療用途のための薬学的に許容される担体は薬学分野において周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences （Mack Publishing Co. （A. Gennaro, ed., 1985）で説明される。「薬学的に許容される担体」としては、本明細書で使用される場合、ありとあらゆる生理学的に許容できる、すなわち適合する溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に許容される担体又は希釈剤としては、経口、直腸、経鼻又は非経口（皮下、筋肉内、静脈内、皮内、及び経皮など）投与に好適な製剤で使用されるものが挙げられる。例示的な薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液又は分散液、及び滅菌注射用溶液又は分散液を即時調製するための滅菌粉末が挙げられる。本発明の医薬組成物で採用される可能性がある好適な水性及び非水性担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物、植物油、例えばオリーブ油、並びに注射可能な有機エステル、例えばエチルオレエートが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液のケースで求められる粒度の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。特定の実施形態において、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は表皮投与（例えば注射又は点滴による）に好適である。選択された投与経路に応じて、細胞毒性タンパク質又は他の医薬成分は、特定の投与経路によって患者に投与されたときに活性細胞毒性タンパク質が遭遇する可能性がある低いｐＨ及び他の天然の不活性化条件の作用から化合物を保護することを意図した材料でコーティングされていてもよい。

【０２３８】

本発明の医薬組成物の製剤は、単位剤形で便利なように提供されてもよいし、薬学分野において周知の方法のいずれかによって調製されてもよい。このような形態において、組成物は、適切な量の活性成分を含有する単位用量に分割される。単位剤形は、パッケージ化された調製物、別々の量の調製物を含有するパッケージ、例えば、バイアル又はアンプル中にパケット化された錠剤、カプセル、及び粉末であってもよい。また単位剤形は、カプセル剤、カシェ剤、又は錠剤そのものであってもよいし、又は適切な数のこれらのパッケージ化された形態のいずれかであってもよい。単位剤形は、単回用量の注射可能な形態で、例えばペンの形態で提供されてもよい。組成物は、あらゆる好適な経路及び投与手段に合わせて製剤化されてもよい。皮下又は経皮の投与様式は、本明細書で説明される治療用タンパク質に特に好適であり得る。

【０２３９】

本発明の医薬組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などのアジュバントを

含有していてもよい。微生物の存在の防止は、滅菌手順と、様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの包含との両方によって確実にすることができる。組成物への等張剤、例えば糖、塩化ナトリウムなども望ましい場合がある。加えて、注射可能な医薬の形態の持続吸収は、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの吸収を遅延させる物質の包含によって達成することができる。

【０２４０】

また本発明の医薬組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を包含していてもよい。例示的な薬学的に許容される抗酸化剤は、水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；油溶性抗酸化剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ，butylated hydroxyanisole）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ，butylated hydroxytoluene）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ－トコフェロールなど；及び金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ，ethylenediamine tetraacetic acid）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などである。

【０２４１】

別の態様において、本発明は、本発明の異なるポリペプチド及び／若しくはタンパク質、又は前述のもののいずれかのエステル、塩若しくはアミドの１つ又は組合せと、少なくとも１つの薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【０２４２】

治療用組成物は、典型的には滅菌されており、製造及び貯蔵条件下で安定である。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、又は高い薬物濃度に好適な他の秩序ある構造として製剤化されてもよい。担体は、例えば、水、アルコール、例えばエタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）、又はあらゆる好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、当業界において周知の調合の化学に従って、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液のケースで求められる粒度の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。特定の実施形態において、等張剤、例えば糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウムが組成物において望ましい可能性がある。注射用組成物の持続吸収は、組成物中に、例えばモノステアリン酸塩及びゼラチンなどの吸収を遅延させる物質を包含させることによって達成することができる。

【０２４３】

皮内又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は、典型的には、滅菌希釈剤、例えば注射用水、食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩；及び張度調節剤、例えば塩化ナトリウム又はデキストロースなどの１又は２以上を包含する。ｐＨは、酸又は塩基、例えば塩酸若しくは水酸化ナトリウム、又はクエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩を含む緩衝剤などで調整することができる。このような調製物は、ガラス又はプラスチックで製作された、アンプル、使い捨てのシリンジ又は複数回用量用のバイアル中に封入されていてもよい。

【０２４４】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて上述した成分の１つ又は組合せを含む適切な溶媒中に本発明のポリペプチド又はタンパク質を必要な量で取り込み、続いて滅菌精密ろ過することによって調製されてもよい。分散液は、分散媒及び上述したものなどの他の成分を含有する滅菌媒体に活性化合物を取り込むことによって調製されてもよい。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末のケースにおいて、調製方法は、それらの滅菌ろ過溶液から任意の追加の望ましい成分に加えて活性成分の粉末を生じる真空乾燥及びフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【０２４５】
本発明のポリペプチド又はタンパク質の治療有効量が、例えば静脈内、皮膚又は皮下注射によって投与するために設計される場合、結合剤は、パイロジェンフリーの非経口的に許容できる水溶液の形態であると予想される。適切なｐＨ、等張性、安定性などを検討して非経口的に許容できるタンパク質溶液を調製するための方法は、当業界における能力の範囲内である。静脈内、皮膚、又は皮下注射にとって好ましい医薬組成物は、結合剤に加えて、等張の媒体、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、デキストロース注射液、デキストロース及び塩化ナトリウム注射液、乳酸加リンゲル注射液、又は当業界で公知の他の媒体を含有すると予想される。また本発明の医薬組成物は、安定剤、保存剤、緩衝液、抗酸化剤、又は当業者に周知の他の添加剤を含有していてもよい。

【０２４６】
本明細書の他所で説明されるように、本発明のポリペプチド又はタンパク質は、インプラント、経皮パッチ、及びマイクロカプセル化された送達系を含む放出制御製剤などの、急速な放出から化合物を保護すると予想される担体を用いて調製されてもよい。生分解性の生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸を使用することができる。このような製剤を調製するための多くの方法は特許化されているか、又は一般的に当業者に公知である（例えばSustained and Controlled Release Drug Delivery Systems （Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, U.S., 1978）を参照）。

【０２４７】
特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、インビボにおいて望ましい分布を確実にするように製剤化されてもよい。例えば、血液脳関門は、多くの大きい及び／又は親水性の化合物を排除する。特定のインビボにおける配置に本発明の治療化合物又は組成物を標的化するために、それらを例えばリポソーム中に製剤化してもよく、ここでリポソームは、特定の細胞又は臓器に選択的に輸送されることにより標的化された薬物送達を強化する１又は２以上の部分を含んでいてもよい。例示的な標的化部分は、葉酸塩又はビオチン；マンノシド；抗体；界面活性プロテインＡ受容体；ｐ１２０カテニンなどを包含する。

【０２４８】
医薬組成物は、インプラント又は微粒子系として使用するように設計された非経口製剤を包含する。インプラントの例は、エマルジョン、イオン交換樹脂、及び可溶性塩溶液などの高分子又は疎水性成分で構成されるデポ製剤である。微粒子系の例は、マイクロスフェア、微粒子、ナノカプセル、ナノスフェア、及びナノ粒子である（例えばHonda M et al., Int J Nanomedicine 8: 495-503 (2013)、Sharma A et al., Biomed Res Int 2013: 960821 (2013)、Ramishetti S, Huang L, Ther Deliv 3: 1429-45 (2012)を参照）。放出制御製剤は、イオンに対する感受性を有するポリマー、例えばリポソーム、ポロキサマー４０７、及びヒドロキシアパタイトなどを使用して調製されてもよい。

【０２４９】
VIII. ポリヌクレオチド、発現ベクター、及び宿主細胞
本発明のポリペプチド及びタンパク質のほかにも、本発明のポリペプチド及びタンパク質、又はそれらの機能的な部分をコードするポリヌクレオチドも、本発明の範囲内にある。用語「ポリヌクレオチド」は、用語「核酸」と同等であり、その両方が、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ, deoxyribonucleic acid）のポリマー、リボ核酸（ＲＮＡ, ribonucleic acid）のポリマー、ヌクレオチド類似体を使用して生成されたこれらのＤＮＡ又はＲＮＡの類似体、並びにそれらの誘導体、フラグメント及びホモログを包含する。本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、又は三本鎖であり得る。開示されるポリヌクレオチドは、例えば、ＲＮＡコドンの第三の位置で許容されるが異なるＲＮＡコドンとして同じアミノ酸をコードすることが公知のゆらぎを考慮に入れて、例示的な細胞毒性タンパク質をコードすることが可能な全てのポリヌクレオチドを包含するように具体的に開示されている（Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000)を参照）。

【０２５０】
一態様において、本発明は、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質、又はそれらのフラグメント若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、例えば、タンパク質のアミノ酸配列の１つを含むポリペプチドに対して、少なくとも５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％又はそれよりより高い同一性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を包含し得る。また本発明は、本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質、又はそれらのフラグメント若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、又はあらゆるこのような配列のアンチセンス若しくは相補物を含むポリヌクレオチドも包含する。

【０２５１】
本発明のポリヌクレオチド（又は、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／若しくはタンパク質）の誘導体又は類似体は、とりわけ、例えば、同じサイズのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列に対して、又は当業界において公知のコンピューター相同性プログラムによってアライメントが行われる並べられた配列と比較した場合に、少なくとも約４５％、５０％、７０％、８０％、９５％、９８％、又は９９％もの同一性で（好ましい同一性は８０～９９％である）、本発明のポリヌクレオチド、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド、又はタンパク質に実質的に相同な領域を有するポリヌクレオチド（又はポリペプチド）分子を包含する。例示的なプログラムは、Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Math. 2: 482-9 (1981)のアルゴリズムを使用するデフォルト設定を使用した、ＧＡＰプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package、ＵＮＩＸ用バージョン８、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison、WI、U.S.）である。また、ストリンジェントな条件下で本発明のタンパク質をコードする配列の相補物にハイブリダイズすることが可能なポリヌクレオチドも包含される（例えばAusubel F et al., Current Protocols in Molecular Biology （John Wiley & Sons, New York, NY, U.S., 1993）、及び以下を参照）。ストリンジェントな条件は当業者公知であり、Current Protocols in Molecular Biology （John Wiley & Sons, NY, U.S., Ch. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989)）で見出すことができる。

【０２５２】
本発明はさらに、本発明の範囲内のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質をコードすることが可能なポリヌクレオチドは、発現ベクターを生産するための当業界において周知の材料及び方法を使用して、細菌プラスミド、ウイルスベクター及びファージベクターなどの公知のベクターに挿入されてもよい。このような発現ベクターは、いずれかの選択された宿主細胞又は無細胞発現系（例えば以下の実施例で説明されるｐＴｘｂ１及びｐＩＶＥＸ２．３）内での検討される本発明の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質の産生を維持するのに必要なポリヌクレオチドを包含すると予想される。特定のタイプの宿主細胞又は無細胞発現系と共に使用するための発現ベクターを含む具体的なポリヌクレオチドは当業者周知であり、それらを慣例的な実験を使用して決定してもよいし、又は購入してもよい。

【０２５３】
用語「発現ベクター」は、本明細書で使用される場合、１又は２以上の発現単位を含む直鎖状又は環状のポリヌクレオチドを指す。用語「発現単位」は、所望のポリペプチドをコードし、宿主細胞中で核酸セグメントの発現をもたらすことが可能なポリヌクレオチドセグメントを示す。発現単位は、典型的には、転写プロモーター、所望のポリペプチドをコードするオープンリーディングフレーム、及び転写ターミネーターを含み、全て機能できるように配置される。発現ベクターは、１又は２以上の発現単位を含有する。したがって、本発明の内容において、単一のポリペプチド鎖を含む、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質（例えば、志賀毒素エフェクター領域が

遺伝子組換えされたｓｃＦｖ）をコードする発現ベクターは、少なくとも単一のポリペプチド鎖のための発現単位を包含し、それに対して例えば２又は３以上のポリペプチド鎖（例えばV_Lドメインを含む１つの鎖及び毒素エフェクター領域に連結されたV_Hドメインを含む第二の鎖）を含むタンパク質は、そのタンパク質の２つのポリペプチド鎖それぞれにつき１つずつの少なくとも２つの発現単位を包含する。本発明の多重鎖のタンパク質を発現させるために、各ポリペプチド鎖のための発現単位が、異なる発現ベクターに別々に含有されていてもよい（例えば発現は、各ポリペプチド鎖のための発現ベクターが導入された単一の宿主細胞で達成され得る）。

【０２５４】

ポリペプチド及びタンパク質の一過性の又は安定な発現を指示することが可能な発現ベクターは当業界において周知である。発現ベクターは、一般的に、これらに限定されないが、以下：それぞれ当業界において周知の、異種シグナル配列又はペプチド、複製起点、１又は２以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列の１又は２以上を包含する。任意の調節制御配列、統合配列、及び採用される可能性がある有用なマーカーは、当業界において公知である。

【０２５５】

用語「宿主細胞」は、発現ベクターの複製又は発現を維持することができる細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌又は真核細胞（例えば酵母、昆虫、両生類、鳥類、又は哺乳動物細胞）であり得る。本発明のポリヌクレオチドを含むか又は本発明のポリペプチド及び／若しくはタンパク質を産生することが可能な宿主細胞株の作出及び単離は、当業界において公知の標準的な技術を使用して達成することができる。

【０２５６】

本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド及び／又はタンパク質は、宿主細胞でのより最適な発現などの所望の特性を達成するのにより好適にすることができる、１又は２以上のアミノ酸の変更又は１又は２以上のアミノ酸の欠失若しくは挿入によってポリペプチド及び／又はタンパク質をコードするポリヌクレオチドを改変することによって生産される、本明細書で説明されるポリペプチド及びタンパク質のバリアント又は誘導体であってもよい。

【０２５７】

IX．送達デバイス及びキット

特定の実施形態において、本発明は、１又は２以上の本発明の物質の組成物、例えば対象に送達するための医薬組成物を含むデバイスに関する。したがって、１又は２以上の本発明の化合物を含む送達デバイスを使用して、静脈内、皮下、筋肉内又は腹膜内注射；経口投与；経皮投与；肺内又は経粘膜投与；インプラント、浸透圧ポンプ、カートリッジ又はマイクロポンプによる投与；又は当業者によって認識される他の手段による投与などの様々な送達方法によって本発明の物質の組成物を患者に投与することができる。

【０２５８】

また、少なくとも１つの本発明の物質の組成物を含み、包装及び使用説明書を含んでいてもよいキットも本発明の範囲内である。キットは、薬物の投与及び／又は診断の情報収集に有用であり得る。本発明のキットは、少なくとも１つの追加の試薬（例えば、標準、マーカーなど）を含んでいてもよい。キットは、典型的には、キット内容物の意図した使用を表示するラベルを包含する。キットは、サンプル又は対象中で細胞型（例えば腫瘍細胞）を検出するための、又は患者が、本明細書で説明されるような本発明の化合物、組成物又は関連する方法を利用する治療方策に応答するグループに属するかどうかを診断するための試薬及び他のツールをさらに含んでいてもよい。

【０２５９】

Ｘ．脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの医薬及び／若しくは診断用組成物を使用するための方法

一般的に、本発明の目的は、特定のがん、腫瘍、成長異常、免疫障害、又は本明細書で述べられるさらなる病的状態などの疾患、障害、及び状態の予防及び／又は治療において

使用することができる薬理活性薬剤、加えてそれを含む組成物を提供することである。したがって、本発明は、標的化された細胞の殺滅のために、標的化された細胞に追加の外因性物質を送達するために、標的化された細胞の内部を標識するために、診断の情報を収集するために、及び本明細書で説明されるような疾患、障害、及び状態を治療するために、本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物を使用する方法を提供する。

【０２６０】

特定には、本発明の目的は、現在のところ当業界において公知の薬剤、組成物、及び／又は方法と比較して一定の利点を有するこのような薬理活性薬剤、組成物、及び／又は方法を提供することである。したがって、本発明は、特定のポリペプチド配列を有するポリペプチド及びタンパク質並びにそれらの医薬組成物を使用する方法を提供する。例えば、配列番号４～５９のポリペプチド配列のいずれかが、以下の方法で使用されるタンパク質の成分として具体的に利用される可能性がある。

【０２６１】

本発明は、細胞を殺滅する方法であって、細胞を、インビトロ又はインビボのいずれかで本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物と接触させるステップを含む方法を提供する。本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物を使用して、１又は複数の細胞を特許請求された物質の組成物の１つと接触させたときに特異的な細胞型を殺滅することができる。特定の実施形態において、本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用して、がん細胞、感染細胞、及び／又は血液学的な細胞を含む混合物などの異なる細胞型の混合物中の特異的な細胞型を殺滅することができる。特定の実施形態において、本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用して、異なる細胞型の混合物中のがん細胞を殺滅することができる。特定の実施形態において、本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用して、移植前の組織などの異なる細胞型の混合物中の特異的な細胞型を殺滅することができる。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用して、治療目的の投与前の組織材料などの細胞型の混合物中の特異的な細胞型を殺滅することができる。特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用して、ウイルス又は微生物に感染した細胞を選択的に殺滅するか、又はそれとは別に細胞表面生体分子などの特定の細胞外標的生体分子を発現する細胞を選択的に殺滅することができる。本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、例えば、インビトロ又はインビボのいずれかで組織から不要な細胞型を枯渇させることにおける使用、移植片対宿主病を治療するために免疫応答をモジュレートすることにおける使用、抗ウイルス剤としての使用、抗寄生虫剤としての使用、及び移植組織から不要な細胞型を取り除くことにおける使用などの様々な適用を有する。

【０２６２】

特定の実施形態において、本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物は、単独で、又は他の化合物又は医薬組成物と組み合わせて、インビトロで、又は対象において、例えば治療が必要な患者においてインビボで細胞集団に投与されると、有力な細胞殺滅活性を示すことができる。特異的な細胞型に対して高親和性の結合領域を使用して酵素的に活性な志賀毒素領域の送達を標的化することによって、生物内の、例えば特定のがん細胞、新生細胞、悪性細胞、非悪性腫瘍細胞、又は感染細胞内の特定の細胞型を特異的且つ選択的に殺滅することに、この有力な細胞殺滅活性を限定することができる。

【０２６３】

本発明は、それを必要とする患者において細胞を殺滅する方法であって、患者に、少なくとも１つの本発明の細胞毒性ポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの医薬組成物を投与するステップを含む方法を提供する。

【０２６４】

細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又はそれらの医薬組成物の特定の実施形態を使用して、がん又は腫瘍細胞と物理的に組み合わされていることが見出された細胞外生体分子を標的化することによって、患者におけるがん細胞を殺滅することができる。用語「がん

細胞」又は「癌細胞」は、異常に速い速度の様式で成長し分裂する様々な新生細胞を指し、当業者には明らかであると予想される。用語「腫瘍細胞」は、悪性及び非悪性細胞の両方を包含する。一般的に、がん及び／又は腫瘍は、治療及び／又は予防を受けることが可能な疾患、障害、又は状態と定義することができる。がん細胞及び／又は腫瘍細胞で構成されるがん及び腫瘍（悪性又は良性のどちらも）は、当業者には明らかであると予想される。新生細胞は、以下：制御不能な成長、分化の欠如、局所的な組織浸潤、血管新生、及び転移の１又は２以上を伴うことが多い。

【０２６５】

本発明の細胞毒性ポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの医薬組成物の特定の実施形態を使用して、免疫細胞と物理的に組み合わされていることが見出された細胞外生体分子を標的化することによって、患者における免疫細胞（健康か又は悪性かどうかにかかわらず）を殺滅することができる。

【０２６６】

本発明の細胞毒性ポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの医薬組成物の特定の実施形態を使用して、感染細胞と物理的に組み合わされていることが見出された細胞外生体分子を標的化することによって、患者における感染細胞を殺滅することができる。

【０２６７】

悪性、新生物、又はそれとは別の意味で不要なＴ細胞及び／又はＢ細胞の細胞集団（例えば骨髄）を患者から取り出し、次いでＴ細胞及び／又はＢ細胞が枯渇した材料を患者に再注入する目的のために、本発明のタンパク質又はそれらの医薬組成物を利用することは、本発明の範囲内である（例えばvan Heeckeren W et al., Br J Haematol 132: 42-55 (2006)を参照；例えばAlpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)を参照）。

【０２６８】

患者から取り出された単離された細胞集団からＴ細胞及び／又はＢ細胞をエクスビボで枯渇させる目的で、本発明のタンパク質又はそれらの医薬組成物を利用することは、本発明の範囲内である。１つの非限定的な例において、本発明のタンパク質は、臓器及び／又は組織の移植による拒絶反応を防止するための方法で使用することができ、ここでドナーの臓器又は組織は、臓器からドナーのＴ細胞及び／又はＢ細胞を取り除くために、移植前に、本発明の細胞毒性タンパク質又はそれらの医薬組成物で潅流される（例えばAlpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)を参照）。

【０２６９】

また、骨髄及び又は幹細胞移植を受けようとする患者における移植片対宿主病及び耐性の誘発に対する防止策として、ドナー細胞集団からＴ細胞及び／又はＢ細胞を枯渇させる目的で本発明のタンパク質又はそれらの医薬組成物を利用することも本発明の範囲内である（例えばvan Heeckeren W et al., Br J Haematol 132: 42-55 (2006)を参照;例えばAlpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)を参照）。

【０２７０】

本発明の細胞毒性のポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの医薬組成物の特定の実施形態を使用して、感染細胞と物理的に組み合わされていることが見出された細胞外生体分子を標的化することによって、患者における感染細胞を殺滅することができる。

【０２７１】

加えて、本発明は、患者において疾患、障害又は状態を治療する方法であって、それを必要とする患者に、本発明の細胞毒性ポリペプチド若しくはタンパク質、又はそれらの医薬組成物の少なくとも１つの治療有効量を投与するステップを含む方法を提供する。本方法を使用して治療が可能な検討される疾患、障害、及び状態としては、がん、悪性腫瘍、非悪性腫瘍、成長異常、免疫障害、及び微生物感染が挙げられる。本発明の化合物の「治療上有効な投薬量」の投与は、疾患の症状の重症度の減少、疾患の症状がない期間の頻度及び持続時間の増加、又は疾患の苦しみによる損傷若しくは能力障害の予防をもたらすことができる。

【０２７２】
本発明の化合物の治療有効量は、投与経路、治療される哺乳動物のタイプ、及び検討される具体的な患者の身体的特性によって決まると予想される。この量を決定するためのこれらの要因及びそれらの関係は、医療分野における熟練した技術者に周知である。この量及び投与方法は、最適な効能を達成するように調整されてもよく、体重、食事、並行して行われる薬物療法のような要因、及び医療分野における当業者に周知の他の要因によって決めてもよい。ヒトでの使用にとって最も適切な投薬量及び用量レジメンは、本発明により得られた結果から導くことができ、適切に設計された臨床試験で確認してもよい。有効な投薬量及び治療プロトコールは、実験動物において低用量で開始して、次いで作用をモニターしながら投薬量を増加させ、同様に投薬レジメンを系統的に変更するという従来の手段によって決定してもよい。所与の対象ごとの最適な投薬量を決定する際に、臨床医により極めて多くの要因を検討に入れることができる。このような検討は当業者公知である。

【０２７３】
許容できる投与経路は、これらに限定されないが、エアロゾル、経腸、経鼻、眼、経口、非経口、直腸、経膣、又は経皮（例えばクリーム、ゲル又は軟膏の局所投与、又は経皮パッチ手段による）などの当業界において公知のあらゆる投与経路を指す場合がある。「非経口投与」は、典型的には、作用が意図される部位での注射又はそのような部位と連通する注射に関連し、眼窩下、点滴、動脈内、嚢内、心臓内、皮内、筋肉内、腹膜内、肺内、脊髄内、胸骨内、髄腔内、子宮内、静脈内、クモ膜下、被膜下、皮下、経粘膜、又は経気管投与などが挙げられる。

【０２７４】
本発明の医薬組成物の投与のために、投薬量範囲は、一般的には、宿主の体重に対して、約０．０００１～１００ミリグラム／キログラム（ｍｇ／ｋｇ）及びそれより多く、通常は０．０１～５ｍｇ／ｋｇであると予想される。例示的な投薬量は、体重１ｋｇ当たり０．２５ｍｇ、体重１ｋｇ当たり１ｍｇ、体重１ｋｇ当たり３ｍｇ、体重１ｋｇ当たり５ｍｇ若しくは体重１ｋｇ当たり１０ｍｇ、又は１～１０ｍｇ／ｋｇの範囲内であり得る。例示的な治療計画は、１日１回若しくは２回の投与、又は週１回若しくは２回の投与、２週毎に１回、３週毎に１回、４週毎に１回、月１回、２若しくは３ヶ月毎に１回、又は３～６ヶ月毎に１回である。投薬量は、特定の患者ごとに治療的有用性を最大化するために必要に応じて、熟練した健康管理の専門家によって選択及び再調整が可能である。

【０２７５】
本発明の医薬組成物は、典型的には、同じ患者に複数の機会で投与されると予想される。１回の投薬間の間隔は、例えば２～５日、１週間、１ヶ月、２若しくは３ヶ月、６ヶ月、又は１年であり得る。また投与間の間隔は、対象又は患者における血中濃度又は他のマーカーの調節に基づいて不規則であってもよい。本発明の化合物のための投薬レジメンは、体重１ｋｇ当たり１ｍｇ又は体重１ｋｇ当たり３ｍｇの静脈内投与を包含し、ここで本化合物は、２～４週間毎に６回の投薬、次いで３ヶ月毎に体重１ｋｇ当たり３ｍｇ又は体重１ｋｇ当たり１ｍｇで投与される。

【０２７６】
本発明の医薬組成物は、当業界において公知の様々な方法の１又は２以上を使用する１又は２以上の投与経路を介して投与してもよい。熟練した作業者は認識しているものと予想されるように、投与の経路及び／又は様式は、所望の結果に応じて様々であると予想される。本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物のための投与経路としては、例えば、静脈内、筋肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊髄、又は他の非経口投与経路、例えば注射又は点滴による投与経路が挙げられる。他の実施形態において、本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物は、非経口経路、例えば、局所、表皮又は粘膜の投与経路、例えば、鼻腔内、口腔、経膣、直腸、舌下、若しくは局所での投与経路などによって投与され得る。

【０２７７】

本発明の治療用ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物は、当業界において公知の様々な医療用デバイスの１又は２以上を用いて投与されてもよい。例えば、一実施形態において、本発明の医薬組成物は、無針皮下注射デバイスを用いて投与されてもよい。本発明において有用な周知のインプラント及びモジュールの例は、当業界において、例えば、制御された速度で送達するための埋め込み型マイクロ点滴ポンプ；経皮投与するためのデバイス；正確な点滴速度で送達するための点滴ポンプ；連続的に薬物送達するための流量可変の埋め込み型点滴デバイス；及び浸透性薬物の送達系などが挙げられる。これらの及び他のこのようなインプラント、送達系、及びモジュールは、当業者公知である。

【０２７８】

本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物は、単独で、又は１又は２以上の他の治療剤又は診断剤と組み合わせて投与されてもよい。組合せ療法は、治療しようとする特定の患者、疾患又は状態に基づき選択された少なくとも１つの他の治療剤と組み合わされた、本発明の細胞毒性タンパク質又はそれらの医薬組成物を包含していてもよい。他のこのような薬剤の例としては、とりわけ、細胞毒性の抗がん剤若しくは化学療法剤、抗炎症剤若しくは増殖抑制剤、抗微生物剤若しくは抗ウイルス剤、成長因子、サイトカイン、鎮痛薬、治療活性を有する小分子若しくはポリペプチド、単鎖抗体、古典的な抗体若しくはそれらのフラグメント、又は１又は２以上のシグナル伝達経路をモジュレートする核酸分子、及び治療的又は予防的処置レジメンを補足するか又は別の方法でそのようなレジメンにおいて有益な可能性がある類似のモジュレートする治療剤が挙げられる。

【０２７９】

本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を用いた患者の治療は、好ましくは、標的化された細胞の細胞死及び／又は標的化された細胞の成長の阻害をもたらす。そのようなものとして、本発明の細胞毒性タンパク質、及びそれらを含む医薬組成物は、標的細胞の殺滅又は枯渇が有益であり得る様々な病理学的障害、例えば、とりわけ、がん、腫瘍、他の成長異常、免疫障害、及び感染細胞を治療するための方法において有用であると予想される。本発明は、細胞増殖を抑制し、新形成、過剰に活性なＢ細胞、及び過剰に活性なＴ細胞などの細胞の障害を治療するための方法を提供する。

【０２８０】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、がん、腫瘍（悪性及び良性）、成長異常、免疫障害、及び微生物感染を治療又は予防するのに使用することができる。さらなる態様において、上記のエクスビボの方法を上記のインビボの方法と組み合わせて、骨髄移植のレシピエントにおける拒絶を治療又は予防する方法、及び免疫寛容を達成するための方法を提供することができる。

【０２８１】

特定の実施形態において、本発明は、ヒトなどの哺乳動物の対象において悪性腫瘍又は新生物及び他の血液細胞に関連するがんを治療するための方法であって、それを必要とする対象に本発明の細胞毒性タンパク質又は医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【０２８２】

本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、例えば、不要なＴ細胞を除去することにおける使用、免疫応答をモジュレートして移植片対宿主病を治療することにおける使用、抗ウイルス剤としての使用、抗菌剤としての使用、及び移植組織から不要な細胞型を取り除くことにおける使用などの様々な適用を有する。本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、一般的に抗新生物剤であり、すなわちそれらは、がん又は腫瘍細胞の成長を阻害すること及び／又はそれらの死を引き起こすことによって、新生物又は悪性細胞の発生、成熟、又は蔓延の治療及び／又は予防が可能であることを意味する。

【０２８３】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物は、Ｂ細胞、形質細胞又は抗体が媒介する疾患又は障害、例えば白血病、リンパ腫、骨髄腫、ヒ

ト免疫不全ウイルス関連の疾患、アミロイド症、溶血尿毒症症候群、多発性動脈炎、敗血症性ショック、クローン病、リウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸炎、乾癬、喘息、シェーグレン症候群、移植片対宿主病、移植片拒絶反応、糖尿病、血管炎、強皮症、及び全身性エリテマトーデスなどを治療するのに使用される。

【０２８４】

別の態様において、本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物の特定の実施形態は、抗菌剤であり、すなわちそれらは、例えばウイルス、細菌、菌類、プリオン、又は原生動物によって引き起こされる微生物学的な病原性感染の獲得、発達、又は結果の治療及び／又は予防が可能であることを意味する。

【０２８５】

患者におけるＴ細胞又はＢ細胞を殺滅する目的で本発明の細胞毒性タンパク質、又はそれらの医薬組成物を患者に投与することによるＴ細胞又はＢ細胞が媒介する疾患又は状態の予防又は治療を提供することは、本発明の範囲内である。この使用法は、移植される材料の源、例えばヒト又はヒト以外の源であるかどうかに関係なく、骨髄移植、幹細胞移植、組織移植、又は臓器移植のために患者を準備又は調整することに適合する。

【０２８６】

本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用して宿主Ｔ細胞の標的化された細胞を殺滅することによって、宿主対移植片病の予防又は治療のために骨髄のレシピエントを提供することは、本発明の範囲内である。

【０２８７】

本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、本発明の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物の治療有効量をそれを必要とする患者に投与することを含むがんの治療方法に利用することができる。本発明の方法の特定の実施形態において、治療されるがんは、骨がん（例えば多発性骨髄腫又はユーイング肉腫）、乳がん、中枢／末梢神経系のがん（例えば脳がん、神経線維腫症、又は膠芽腫）、消化器がん（例えば胃がん又は結腸直腸がん）、生殖細胞がん（例えば卵巣がん及び睾丸がん）、腺がん（例えば膵臓がん、副甲状腺がん、褐色細胞腫、唾液腺がん、又は甲状腺がん）、頭頸部がん（例えば鼻咽頭がん、口腔がん、又は咽頭がん）、血液がん（例えば白血病、リンパ腫、又は骨髄腫）、腎臓から尿道のがん（例えば腎臓がん及び膀胱がん）、肝臓がん、肺／胸膜がん（例えば中皮腫、小細胞肺癌、又は非小細胞肺癌）、前立腺がん、肉腫（例えば血管肉腫、線維肉腫、カポジ肉腫、又は滑膜肉腫）、皮膚がん（例えば基底細胞癌、扁平上皮癌、又は黒色腫）、及び子宮がんからなる群より選択される。

【０２８８】

本発明のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、本発明の細胞毒性タンパク質又は医薬組成物の治療有効量をそれを必要とする患者に投与することを含む免疫障害の治療方法に利用することができる。本発明の方法の特定の実施形態において、免疫障害は、アミロイド症、強直性脊椎炎、喘息、クローン病、糖尿病、移植片拒絶反応、移植片対宿主病、橋本甲状腺炎、溶血尿毒症症候群、ＨＩＶ関連の疾患、紅斑性狼瘡、多発性硬化症、多発性動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ様関節炎、強皮症、敗血症性ショック、シェーグレン症候群、潰瘍性大腸炎、及び血管炎からなる群より選択される疾患に関連する炎症に関する。

【０２８９】

本発明の特定の実施形態は、がん、腫瘍、他の成長異常、免疫障害、及び／又は微生物感染を治療又は予防するための医薬組成物又は医薬品の成分として、本発明のポリペプチド又はタンパク質を使用することである。例えば、患者の皮膚上に現れる免疫障害は、炎症を低下させようとする努力において、このような医薬品で治療され得る。別の例において、皮膚の腫瘍は、腫瘍サイズを低下させるか又は腫瘍を完全になくそうとする努力において、このような医薬品で治療され得る。

【０２９０】

有益な臨床作用は、本発明の多重的な細胞毒性タンパク質を同じ対象に逐次投与するこ

とを含む治療レジメンによって得られる可能性があり、ここで同一な治療剤の連続投与を含む治療レジメンからの単一の細胞毒性タンパク質に対する持続的な免疫応答の発生を回避するか又は低下させるために、各細胞毒性タンパク質は、異なる領域で脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む。

【０２９１】

本発明の特定の細胞毒性ポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物は、免疫の破壊（immunolesioning）及びニューロンのトレースなどの分子神経外科適用で使用することができる（総論については、Wiley R, Lappi D, Adv Drug Deliv Rev 55: 1043-54 (2003)を参照）。例えば、標的化ドメインは、様々なリガンド、例えば神経回路に特異的なＧタンパク質共役受容体などのニューロン表面の受容体と結合することによって特異的な神経細胞型を標的化する神経伝達物質及び神経ペプチドから選択又は誘導されてもよい。同様に、標的化ドメインは、ニューロン表面の受容体と結合する抗体から選択又は誘導されてもよい。志賀毒素がそれら自身の逆行性軸索輸送をロバストに指示することから、本発明の特定の細胞毒性タンパク質を使用して、細胞体から遠位の細胞毒性タンパク質注射部位で細胞外標的を発現するニューロンを殺滅することができる（Llewellyn-Smith I et al., J Neurosci Methods 103: 83-90 (2000)を参照）。これらの神経細胞型特異的な標的化細胞毒性ポリペプチド及びタンパク質は、例えば感覚のメカニズムを解明するための神経科学の調査（例えばMishra S, Hoon M, Science 340: 968-71 (2013)を参照）、及びパーキンソン及びアルツハイマーなどの神経変性疾患のモデル系を作製すること（例えばHamlin A et al., PLoS One e53472 (2013)を参照）において用途を有する。

【０２９２】

本発明の特定の実施形態は、新生細胞及び／又は免疫細胞型の内部を標識又は検出するために、本発明のポリペプチド、タンパク質、医薬組成物、及び／又は診断用組成物を使用する方法である。本発明の特定のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物の、逆行性細胞内輸送を介して細胞内の特異的な細胞型及び経路に侵入する能力に基づいて、特異的な細胞型の内部区画が、検出のために標識される。これは、患者内のインサイチュの細胞に、又は生物から取り出された細胞及び組織、例えば生検材料に行うことができる。

【０２９３】

本発明の特定の実施形態は、疾患、状態及び／又は障害に関する情報収集の目的で細胞型の存在を検出するために、本発明のポリペプチド、タンパク質、医薬組成物、及び／又は診断用組成物を使用する方法である。本方法は、細胞を診断に十分な量の細胞毒性分子と接触させて、アッセイ又は診断技術によって細胞毒性分子を検出するステップを含む。成句「診断に十分な量」は、利用される特定のアッセイ又は診断技術によって情報収集目的で十分な検出及び正確な測定がもたらされる量を指す。一般的に、インビボでの診断での使用における生物全体にとって診断に十分な量は、対象１ｋｇ当たり０．１ｍｇ～１００ｍｇの非累積用量の、検出促進剤が連結された本発明のタンパク質と予想される。典型的には、これらの情報収集方法で使用される本発明のポリペプチド又はタンパク質の量は、なお診断に十分な量であるという条件で、可能な限り低いと予想される。例えば、生物におけるインビボでの検出の場合、対象に投与される本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物の量は、実行可能なレベルで可能な限り低いと予想される。

【０２９４】

検出促進剤と組み合わされた本発明のポリペプチド及びタンパク質の細胞型特異的な標的化は、本発明の分子の結合領域の細胞外標的生体分子と物理的に組み合わされた細胞を検出及びイメージングする方法を提供する。本発明のポリペプチド又はタンパク質を使用する細胞のイメージングは、当業界において公知のあらゆる好適な技術によってインビトロ又はインビボで行ってもよい。診断の情報は、生物の全身イメージングなどの当業界において公知の様々な方法を使用して、又は生物から採取したエクスビボのサンプルを使用して収集してもよい。本明細書において使用される用語「サンプル」は、これらに限定されないが、流体、例えば血液、尿、血清、リンパ液、唾液、肛門の分泌物、膣の分泌物、及び精液、並びに生検手順により得られた組織などのあらゆるものを指す。例えば、様々

な検出促進剤は、磁気共鳴映像法（ＭＲＩ）、光学的方法（例えば直接の、蛍光による、及び生物発光によるイメージング）、ポジトロンエミッショントモグラフィー（ＰＥＴ）、単光子放射型コンピューター断層撮影法（ＳＰＥＣＴ）、超音波、Ｘ線コンピューター断層撮影、及び上述のものの組合せなどの技術による、非侵襲的なインビボでの腫瘍イメージングために利用することができる（総論については、Kaur S et al., Cancer Lett 315: 97-111 (2012)を参照）。

【０２９５】

本発明の特定の実施形態は、がん、腫瘍、及び／又は免疫細胞型の内部を標識又は検出するための診断用組成物として、本発明のポリペプチド、タンパク質、又は医薬組成物を使用する方法である（例えば、Koyama Y et al., Clin Cancer Res 13: 2936-45 (2007)、Ogawa M et al., Cancer Res 69: 1268-72 (2009)、Yang L et al., Small 5: 235-43 (2009)を参照）。本発明の特定のポリペプチド、タンパク質、及び医薬組成物の、逆行性細胞内輸送を介して細胞内の特異的な細胞型及び経路に侵入する能力に基づいて、特異的な細胞型の内部区画が、検出のために標識される。これは、患者内のインサイチュの細胞に、又は生物から取り出された細胞及び組織、例えば生検材料に行うことができる。

【０２９６】

本発明の診断用組成物は、疾患、障害、又は状態を本発明の関連医薬組成物によって潜在的に治療可能であると特徴付けるのに使用することができる。本発明の特定の物質の組成物は、患者が、本明細書で説明されるような本発明の化合物、組成物又は関連方法を利用する治療方策に応答するグループに属するのかどうか、又は本発明の送達デバイスの使用に十分な適正があるのかどうかを決定するのに使用することができる。

【０２９７】

本発明の診断用組成物は、疾患、例えばがんが検出された後、その疾患をより十分に特徴付けるために、例えば遠隔転移、不均質性、及びがん進行のステージをモニターするために使用することができる。疾患、障害又は感染の表現型の評価は、治療の決定をする間の予想及び予測を助けることができる。疾患の再発において、本発明の特定の方法は、局所的な問題か又は全身性の問題かを識別するのに使用することができる。

【０２９８】

本発明の診断用組成物は、治療剤のタイプ、例えば小分子薬物、生物学的薬物、又は細胞ベースの療法に関係なく、治療剤に対する応答を評価するのに使用することができる。例えば、本発明の診断の特定の実施形態は、腫瘍サイズの変化、数及び分布などの抗原陽性細胞集団の変化を測定すること、又はすでに患者に施された療法によって標的化された抗原とは異なるマーカーをモニターすることに使用することができる（Smith-Jones P et al., Nat. Biotechnol 22: 701-6 (2004)、Evans M et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108: 9578-82 (2011)を参照）。

【０２９９】

細胞型の存在を検出するのに使用される方法の特定の実施形態は、例えば骨がん（例えば多発性骨髄腫又はユーイング肉腫）、乳がん、中枢／末梢神経系のがん（例えば脳がん、神経線維腫症、又は膠芽腫）、消化器がん（例えば胃がん又は結腸直腸がん）、生殖細胞がん（例えば卵巣がん及び睾丸がん）、腺がん（例えば膵臓がん、副甲状腺がん、褐色細胞腫、唾液腺がん、又は甲状腺がん）、頭頸部がん（例えば鼻咽頭がん、口腔がん、又は咽頭がん）、血液がん（例えば白血病、リンパ腫、又は骨髄腫）、腎臓から尿道のがん（例えば腎臓がん及び膀胱がん）、肝臓がん、肺／胸膜がん（例えば中皮腫、小細胞肺癌、又は非小細胞肺癌）、前立腺がん、肉腫（例えば血管肉腫、線維肉腫、カポジ肉腫、又は滑膜肉腫）、皮膚がん（例えば基底細胞癌、扁平上皮癌、又は黒色腫）、子宮がん、ＡＩＤＳ、アミロイド症、強直性脊椎炎、喘息、自閉症、心臓発生、クローン病、糖尿病、エリテマトーデス、胃炎、移植片拒絶反応、移植片対宿主病、グレーブス病、橋本甲状腺炎、溶血尿毒症症候群、ＨＩＶ関連の疾患、紅斑性狼瘡、リンパ増殖性障害、多発性硬化症、重症筋無力症、神経炎症、多発性動脈炎、乾癬、乾癬性関節炎、リウマチ様関節炎、強皮症、敗血症性ショック、シェーグレン症候群、全身性エリテマトーデス、潰瘍性大腸

炎、血管炎、細胞増殖、炎症、白血球活性化、白血球接着、白血球走化性、白血球成熟、白血球遊走、ニューロンの分化、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ，acute lymphoblastic leukemia）、Ｔ急性リンパ性白血病／リンパ腫（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ，acute myeloid leukemia）、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病（Ｂ－ＣＬＬ，B-cell chronic lymphocytic leukemia）、Ｂ細胞前リンパ球性リンパ腫、バーキットリンパ腫（ＢＬ，Burkitt's lymphoma）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ，chronic lymphocytic leukemia）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ－ＢＰ，chronic myelogenous leukemia）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ，chronic myeloid leukemia）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病（ＨＣＬ，hairy cell leukemia）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ，Hodgkin's Lymphoma）、血管内大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、リンパ形質細胞性リンパ腫、ＭＡＬＴリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、多発性骨髄腫（ＭＭ，multiple myeloma）、ナチュラルキラー細胞白血病、節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ，Non-Hodgkin's lymphoma）、プラズマ細胞性白血病、形質細胞腫、原発性滲出液リンパ腫、前リンパ球性白血病、前骨髄球性白血病、小リンパ球性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ，T-cell lymphoma）、重鎖病、単クローン性免疫グロブリン血症、単クローン性免疫グロブリン沈着症、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ，myelodusplastic syndrome）、くすぶり型多発性骨髄腫、及びワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症などの疾患、障害、及び状態に関する情報を収集するのに使用することができる。

【０３００】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチド及びタンパク質、又はそれらの医薬組成物は、診断と治療の両方、又は診断単独に使用される。

【０３０１】

本発明のポリペプチドは、選択されたエピトープ領域における破壊の存在に基づき特異的なエピトープに対する免疫応答を惹起するための免疫化材料としての用途を有する。本発明のポリペプチドは、哺乳動物に投与するための免疫化材料として使用することができ、及び／又は志賀毒素を認識する免疫グロブリンドメインを生成するためのディスプレイスクリーニングにおいて使用することができる。

【０３０２】

志賀毒素ファミリーメンバーのＡサブユニットに由来する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域と、特異的な細胞型と物理的に組み合わされた細胞外標的生体分子と結合することが可能な結合領域とを含む、選択的に細胞毒性のタンパク質の以下の非限定的な例によって、本発明をさらに例示する。

［実施例］

【０３０３】

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態を証明する。しかしながら、これらの実施例は例示目的のためのものに過ぎず、本発明の条件及び範囲に関して全体的に明確であると意図されるものではなく、解釈されるべきでもないと理解される。以下の実施例における実験は、そうでなければ詳細に説明される場合を除いて、当業者には周知であり、日常的である標準的な技術を用いて実行された。

【０３０４】

哺乳動物における治療及び診断適用のために志賀毒素に由来するポリペプチド領域を改善するために、哺乳動物のＢ細胞媒介免疫応答を弱める目的で、毒素エフェクター領域全体にわたる予測されたＢ細胞エピトープを系統的に破壊した。多重的な志賀毒素のＡサブユニットを表すアミノ酸配列を分析して、推定上の抗原性及び／又は免疫原性エピトープを同定した。コンピューターによるツールを使用して、公共的に利用可能なタンパク質データベースの構造データを考慮に入れて、Ｂ細胞及びＴ細胞エピトープを予測した。エピトープ予測を実験的に検証した。様々な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを、ネイティブの志賀毒素Ａサブユニット中に存在するエピトープの損失と志賀毒素エフェクター機能の保持に関して実験的に試験した。様々な細胞毒性タンパク質の成分とし

ての例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドの生物活性を、本明細書では「野生型」又は「ＷＴ」と称される脱免疫化されていない志賀毒素エフェクターポリペプチドを含む細胞毒性タンパク質と比較した。

【０３０５】

以下の脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドの実施例は、様々な細胞毒性タンパク質の成分としての志賀毒素エフェクター機能の保持を実証する。例示的な細胞毒性タンパク質は、標的化された細胞型によって発現された標的生体分子に結合し、標的化された細胞に侵入した。内在化した細胞毒性タンパク質は、それらの脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域をサイトゾルに効果的に経路決定してリボソームを不活性化し、その後、野生型志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質と類似して標的化された細胞のアポトーシスによる死をもたらした。さらに、以下の実施例は、多重的なエピトープ破壊を、志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド中で組み合わせることにより、有力な細胞毒性を保持しながら、本発明の細胞毒性タンパク質の全体的な抗原性及び／又は免疫原性を低下させることができることを実証する。

【実施例１】

【０３０６】

志賀毒素Ａサブユニットにおける免疫原性及び抗原エピトープの予測

志賀毒素のＡサブユニット内の抗原性及び／又は免疫原性部位は、これまで系統的にマッピングされていなかった。コンピューターによる方法を利用して、様々な志賀毒素Ａサブユニットにおける抗原性及び／又は免疫原性エピトープを予測した。哺乳動物の免疫系において応答を惹起する可能性があるＢ細胞エピトープとＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープの両方をインシリコで予測した。

【０３０７】

ProImmune Inc.社（Sarasota、FL、U.S.）により、それらのREVEAL（登録商標）システムを使用して、志賀毒素様毒素鎖Ａ（ＰＤＢ番号：１ＤＭ０＿Ａ）のポリペプチド配列及び３次元構造データから、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ；配列番号１）に関して、直鎖状Ｂ細胞エピトープを予測した。

【０３０８】

平行して、志賀毒素のＡサブユニット（ＳｔｘＡ；配列番号２）、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ；配列番号１）、及び志賀毒素様毒素２のＡサブユニット（Ｓｔｘ２Ａ；配列番号３）のアミノ酸配列から、BcePredウェブサーバー（Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)）、Bepipred Linearエピトープ予測（Larsen J et al., Immunome Res 2: 2 (2006)）、及びElliPro抗体エピトープ予測（Haste Andersen P et al., Protein Sci 15: 2558-67 (2006)、Ponomarenko J, Bourne P, BMC Struct Biol 7: 64 (2007)）を使用して、Ｂ細胞エピトープを予測した。様々なコンピューターによる方法によって、３つの原型的な志賀毒素Ａサブユニットにおけるｂ細胞エピトープ領域に関して類似の予測が明らかになった（表１～３）。

【０３０９】

【表３】

表1.成熟かつ天然志賀様毒素Aサブユニット(配列番号1)に対するB細胞エピトープの予測

天然に配置されるアミノ酸の位置			
REVEAL	**BcePred**	**Bepipred**	**ElliPro**
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	43-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110
144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190
		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

【０３１０】

【表４】

表2.成熟かつ天然志賀毒素Aサブユニット(配列番号2)に対するB細胞エピトープの予測

天然に配置されるアミノ酸の位置			
REVEAL	**BcePred**	**Bepipred**	**ElliPro**
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	44-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110
144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190
		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

【０３１１】

【表５】

表3.成熟かつ天然志賀様毒素2Aサブユニット(配列番号3)に対するB細胞エピトープの予測

天然に配置されるアミノ酸の位置		
BcePred	**Bepipred**	**ElliPro**
3-11	8-14	
29-35	28-36	26-37
		42-48
	57-62	56-66
108-115	109-115	96-110
141-156		140-153
	179-188	180-191
	210-218	210-217
240-257	244-258	241-255
		262-278
		281-297

【０３１２】

以前の配列アライメント研究では、中和抗体と結合するリシン中のエピトープに基づき抗原性及び／又は免疫原性である可能性がある志賀毒素Ａサブユニットにおける免疫エピトープ領域が予測された（Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol 24: 19-26 (1999)、Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)）。ＳｔｘＡにおいておよそ残基９０～１０７及びＳｔｘ２Ａにおいておよそ残基１１２～１２９の保存された免疫原性エピトープが存在する可能性があることが予測された（Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)）。しかしながら、この予測は、広く認められている通り、植物性毒素リシンと細菌性の志賀毒素との間の主要な差、例えばリシンと志賀毒素間の大量の配列の変動、志賀毒素のＡサブユニットにおけるＮ末端アルファヘリックスの欠如などのために信頼できるものではなく、さらにリシンと比較して志賀毒素では、予測された領域はより短く、溶媒露出がより少ない（(Fraser M et al., Nature Struct Biol 1: 59 (1994)、Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol 24: 19-26 (1999)、Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)）。

【０３１３】

米国の国立アレルギー感染症研究所（ＮＩＡＩＤ, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases）によって企画された免疫エピトープデータベース（ＩＥＤＢ, Immune Epitope Database）は、志賀毒素の全ての実験的に特徴付けられたＢ及びＴ細胞エピトープを提供するといわれている。現在のところ、ＩＥＤＢは、唯一の志賀毒素Ａサブユニット（Ｓｔｘ２ｄＡ）に関する唯一のエピトープ：ＩＥＤＢ識別番号１１０４９３を提供しており、これは、アミノ酸４２～４９、９６～１００、及び２４５～２６０を含む実験的に決定された不連続のＢ細胞エピトープである（Smith M et al., Infect Immun 77: 2730-40 (2009)）。

【０３１４】

以下の実施例で、ＳＬＴ－１Ａにおいて１つより多くの方法によって同定された９つの予測されたＢ細胞エピトープ領域（表４）を破壊した。

【０３１５】

【表６】

表4.原型的な志賀毒素のAサブユニットによって共有される9つの推定上のB細胞エピトープ領域

エピトープ領域	天然に配置されるアミノ酸の位置		
	SLT-1A	StxA	SLT-2A
			3-14
1	27-37	27-37	26-37
2	39-48	39-48	42-49
3	55-66	55-66	56-66
4	96-115	96-115	96-115
5	141-153	141-153	140-156
6	180-190	180-190	179-191
			210-218
7	243-257	243-257	240-260
8	254-268	254-268	262-278
9	285-293	285-293	281-297

【０３１６】

加えて、Ｂ細胞エピトープ及び免疫原性の残基を予測するためのEpitopiaウェブサーバーを使用して志賀毒素のＡサブユニットを分析した（Rubinstein N et al., BMC Bioinformatics 10: 287 (2009)）。Epitopiaを使用して、直鎖状アミノ酸残基ストレッチにおけるアミノ酸残基の大部分にわたり４又は５（「高い」）のEpitopiaスコアに基づき、ＳＬＴ－１Ａにおいて免疫原性であることが予測される直鎖状アミノ酸残基領域を同定した。Epitopia分析から、免疫原性領域は、ＳＬＴ－１Ａにおいてアミノ酸残基１～１５に存在することが予測された（以下でエピトープ領域０と称される。下記の表５を参照）。Epitopia分析に基づき、ＳＬＴ－１Ａにおける免疫原性エピトープ領域２（表４を参照）は、４９位を包含する可能性がある。Epitopia分析に基づき、ＳＬＴ－１Ａにおける免疫原性エピトープ領域３（表４を参照）は、５３位を包含し、およそ６２～６６位まで伸長する可能性があり（以下でエピトープ領域３＊と称される。下記の表５を参照）、ＳＬＴ－１Ａにおけるエピトープ領域４（表４を参照）は、９４位を包含する可能性があり（以下でエピトープ領域４＊と称される。下記の表５を参照）、ＳＬＴ－１Ａにおけるエピトープ領域６（表４を参照）は、１７９位から始まり、およそ１８８～１９０位まで伸長する可能性がある（以下でエピトープ領域６＊と称される。下記の表５を参照）。星印の付いたＢ細胞エピトープ領域は全て、同じ数値の識別子を有するそれら各々の重複領域を完全に包含することに留意されたい。

【０３１７】

これらの１０のエピトープ領域（番号０～９）を、予測されたＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープとの重複に関して比較した。ProImmune Inc.社（Sarasota、FL、U.S.）によって行われたREVEAL（商標）免疫原性システム（ＩＳ，Immunogenicity System）Ｔ細胞アッセイによって、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）に関してＴ細胞エピトープを予測した。このアッセイは、対象のタンパク質からの複数の重複するペプチド配列を使用して、ＣＤ８＋Ｔ細胞を枯渇させた健康なドナー細胞サンプルからのＣＤ４＋Ｔ細胞によるあらゆる免疫応答の惹起を試験する。１３種の予測されたＢ細胞エピトープ領域のうち、それら全てが少なくとも１つの予測されたＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープと重複した（

表５）。以下の実施例において、表５に記載の予測されたＢ細胞エピトープ領域は全て、個々に又は組み合わせて破壊又は欠失されていた。

【０３１８】

【表７】

表5.重複する予測されたCD4+T細胞エピトープを有する予測されたB細胞エピトープ領域

エピトープ領域	天然に配置されるアミノ酸の位置	
	B細胞エピトープ領域	T細胞エピトープ(ProImmune)
0	1-15	4-33
1	27-37	4-33; 34-78
2	39-48	34-78
3*	53-66	34-78
3	55-66	34-78
4*	94-115	77-103
4	96-115	77-103
5	141-153	128-168
6*	179-190	160-183
6	180-190	160-183
7	243-257	236-258
8	254-268	236-258
9	285-293	274-293

【実施例２】

【０３１９】

志賀毒素エフェクターポリペプチドの脱免疫化

志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来する志賀毒素エフェクターポリペプチドの推定上のＢ細胞及びＴ細胞エピトープ中に、欠失及び／又はアミノ酸置換を作製した。一部のコンストラクトは、予測されたエピトープを破壊した記載された点突然変異に加えて、志賀毒素エフェクターの酵素活性又は細胞毒性への明確な作用がない１又は２以上の点突然変異、例えばＳＬＴ－１ＡにおけるＲ２２３Ａ、ＳＬＴ－１ＡにおけるＣ２４２Ｓ、及び／又はＳＬＴ－１ＡにおけるＣ２６１Ｓなどを含んでいた。

【０３２０】

この実施例において、志賀毒素エフェクターポリペプチド領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来した。ＳＬＴ－１Ａのアミノ酸１～２５１をコードしたポリヌクレオチドをテンプレートとして使用して、予測されたＢ細胞エピトープの１又は２以上の破壊を有する様々な志賀毒素エフェクターポリペプチドをコードする様々なポリヌクレオチドを作製した。これらのポリヌクレオチドから１又は２以上のエピトープ破壊を含む志賀毒素エフェクターポリペプチドを発現させて、どの破壊が、本発明の細胞毒性タンパク質の状況において様々な志賀毒素エフェクターポリペプチドを最も効果的に脱免疫化する可能性があるかを調査した。

【０３２１】

ＳＬＴ－１Ａのカルボキシ末端を配列番号１のアミノ酸１～２５１にトランケートすることにより、最後の２つのＢ細胞エピトープ領域（表５の８番及び９番）、最後の２つのＣＤ４＋Ｔ細胞エピトープ領域（表５、８番及び９番）、及びElliProによって予測され

た最も高くスコア付けされた不連続のＢ細胞エピトープ（２８９～２９３）が除去された。加えて、２５１位でのトランケーションは、推定上のＢ細胞及びＴ細胞エピトープを含む第７のエピトープ領域を破壊する可能性がある（表５）。

【０３２２】

合理的に選択されたアミノ酸置換（表６を参照）を、当業界において公知の方法を使用して、配列番号１のアミノ酸１～２５１を含むトランケートされた志賀毒素エフェクターポリペプチドで作製した。エピトープ領域番号０（表５を参照）において、少なくとも７つの異なるアミノ酸置換を作製して、試験した（表６を参照）。エピトープ領域番号０において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１位に配置されたリジンを、メチオニン（Ｋ１Ｍ））に変異させた。エピトープ領域番号０において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では４位に配置されたスレオニンを、イソロイシン（Ｔ４Ｉ）に変異させた。エピトープ領域番号０において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では８位に配置されたセリンを、イソロイシン（Ｓ８Ｉ）に変異させた。エピトープ領域番号０において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では９位に配置されたスレオニンを、イソロイシン（Ｔ９Ｉ）及びバリン（Ｔ９Ｖ）に変異させた。エピトープ領域番号０において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１１位に配置されたリジンを、アラニン（Ｋ１１Ａ）及びヒスチジン（Ｋ１１Ｈ）に変異させた。エピトープ領域番号０において変異した以下の５つのアミノ酸残基：Ｋ１、Ｔ４、Ｓ８、Ｔ９、及びＫ１１は、Epitopiaウェブサーバーによって、溶媒に露出していることが予測された。

【０３２３】

エピトープ領域番号１（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では３３位に配置されたセリンを、イソロイシン（Ｓ３３Ｉ）に変異させた。

【０３２４】

エピトープ領域番号２（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）において天然では４５位に配置されたセリンを、バリン（Ｓ４５Ｖ）及びイソロイシン（Ｓ４５Ｉ）に変異させた。エピトープ領域番号２（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）において天然では４７位に配置されたアスパラギン酸を、グリシン（Ｄ４７Ｇ）に変異させた。エピトープ領域番号２（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）において天然では４８位に配置されたアスパラギンを、バリン（Ｎ４８Ｖ）及びフェニルアラニン（Ｎ４８Ｆ）に変異させた。

【０３２５】

エピトープ領域番号３＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では５３位に配置されたアスパラギン酸を、アラニン（Ｄ５３Ａ）、グリシン（Ｄ５３Ｇ）、及びアスパラギン（Ｄ５３Ｎ）に変異させた。Ｄ５３残基は、Epitopiaウェブサーバーによって、溶媒に露出しており、５又は「高」の免疫原性スケール値を有することが予測された。エピトープ領域番号３及び番号３＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では５５位に配置されたアルギニンを、アラニン（Ｒ５５Ａ）、バリン（Ｒ５５Ｖ）、及びロイシン（Ｒ５５Ｌ）に変異させた。エピトープ領域番号３及び番号３＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では５８位に配置されたアスパラギン酸を、アラニン（Ｄ５８Ａ）、バリン（Ｄ５８Ｖ）、及びフェニルアラニン（Ｄ５８Ｆ）に変異させた。エピトープ領域番号３及び番号３＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では５９位に配置されたプロリンを、アラニン（Ｐ５９Ａ）に変異させた。エピトープ領域番号

３及び番号３＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では６０位に配置されたグルタメートを、イソロイシン（Ｅ６０Ｉ）、スレオニン（Ｅ６０Ｔ）、及びアルギニン（Ｅ６０Ｒ）に変異させた。エピトープ領域番号３及び番号３＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では６１位に配置されたグルタメートを、アラニン（Ｅ６１Ａ）、バリン（Ｅ６１Ｖ）、及びロイシン（Ｅ６１Ｌ）に変異させた。エピトープ領域番号３及び番号３＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では６２位に配置されたグリシンを、アラニン（Ｇ６２Ａ）に変異させた。

【０３２６】

エピトープ領域番号４＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では９４位に配置されたアスパラギン酸を、アラニン（Ｄ９４Ａ）に変異させた。このＤ９４残基は、Epitopiaウェブサーバーによって、溶媒に露出しており、５又は「高」の免疫原性スケール値を有することが予測された。エピトープ領域番号４及び番号４＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では９６位に配置されたセリンを、イソロイシン（Ｓ９６Ｉ）に変異させた。エピトープ領域番号４及び番号４＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１０９位に配置されたセリンを、バリン（Ｓ１０９Ｖ）に変異させた。エピトープ領域番号４及び番号４＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１１０位に配置されたグリシンを、アラニン（Ｇ１１０Ａ）に変異させた。エピトープ領域番号４及び番号４＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１１２位に配置されたセリンを、バリン（Ｓ１１２Ｖ）に変異させた。

【０３２７】

エピトープ領域番号５（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１４７位に配置されたグリシンを、アラニン（Ｇ１４７Ａ）に変異させた。

【０３２８】

エピトープ領域６＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１７９位に配置されたアルギニンを、アラニン（Ｒ１７９Ａ）に変異させた。このＲ１７９残基は、Epitopiaウェブサーバーによって、露出しており、５又は「高」の免疫原性値を有することが予測された。エピトープ領域番号６及び番号６＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８０位に配置されたスレオニンを、グリシン（Ｔ１８０Ｇ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８１位に配置されたスレオニンを、イソロイシン（Ｔ１８１Ｉ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８３位に配置されたアスパラギン酸を、アラニン（Ｄ１８３Ａ）及びグリシン（Ｄ１８３Ｇ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８４位に配置されたアスパラギン酸を、アラニン（Ｄ１８４Ａ）又はフェニルアラニン（Ｄ１８４Ｆ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８５位に配置されたロイシンを、バリン（Ｌ１８５Ｖ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では

１８６位に配置されたセリンを、アラニン（Ｓ１８６Ａ）及びフェニルアラニン（Ｓ１８６Ｆ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８７位に配置されたグリシンを、アラニン（Ｇ１８７Ａ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８８位に配置されたアルギニンを、アラニン（Ｒ１８８Ａ）及びロイシン（Ｒ１８８Ｌ）に変異させた。エピトープ領域番号６及び番号６＊において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では１８９位に配置されたセリンを、アラニン（Ｓ１８９Ａ）に変異させた。

【０３２９】

エピトープ領域番号７（表５を参照）において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では２４８位に配置されたアルギニンを、アラニン（Ｒ２４８Ａ）に変異させた。エピトープ領域番号７において、志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では２５１位に配置されたアルギニンを、アラニン（Ｒ２５１Ａ）に変異させた。

【０３３０】

志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では４９位に配置されたロイシンを、アラニン（Ｌ４９Ａ）に変異させた。このＬ４９残基は、Epitopiaウェブサーバーによって、溶媒に露出しており、４の免疫原性値を有することが予測された。志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）において天然では２０５位に配置されたアルギニンを、アラニン（Ｒ２０５Ａ）に変異させた。このＲ２０５残基は、Epitopiaウェブサーバーによって、溶媒に露出しており、５又は「高」の免疫原性値を有することが予測された。

【０３３１】

【表８】

表6.例示的な志賀毒素エフェクターポリペプチドにおけるアミノ酸置換

破壊されたエピトープ領域	天然に配置されるアミノ酸の位置		
	置換	B細胞エピトープ領域	T細胞エピトープ領域
0	K1M	1-15	4-33
0	T4I	1-15	4-33
0	S8I	1-15	4-33
0	T9V	1-15	4-33
0	T9I	1-15	4-33
0	K11A	1-15	4-33
0	K11H	1-15	4-33
1	S33I	27-37	4-33, 34-78
2	S45V	39-48	34-78
2	S45I	39-48	34-78
2	D47G	39-48	34-78
2	N48V	39-48	34-78
2	N48F	39-48	34-78
-	L49A	免疫原性の残基	34-78
3*	D53A	53-66	34-78
3*	D53G	53-66	34-78
3*	D53N	53-66	34-78
3 & 3*	R55A	55-66	34-78
3 & 3*	R55V	55-66	34-78
3 & 3*	R55L	55-66	34-78
3 & 3*	I57F	55-66	34-78
3 & 3*	D58A	55-66	34-78
3 & 3*	D58F	55-66	34-78
3 & 3*	P59A	55-66	34-78
3 & 3*	P59F	55-66	34-78
3 & 3*	E60I	55-66	34-78
3 & 3*	E60T	55-66	34-78
3 & 3*	E60R	55-66	34-78
3 & 3*	E61A	55-66	34-78
3 & 3*	E61V	55-66	34-78
3 & 3*	E61L	55-66	34-78

3 & 3*	G62A	55-66	34-78
4*	D94A	94-115	77-103
4 & 4*	S96I	96-115	77-103
4 & 4*	S109V	96-115	
4 & 4*	G110A	96-115	
4 & 4*	S112V	96-115	
5	G147A	141-153	128-168
6*	R179A	179-190	160-183
6 & 6*	T180G	180-190	160-183
6 & 6*	T181I	180-190	160-183
6 & 6*	D183A	180-190	160-183
6 & 6*	D183G	180-190	160-183
6 & 6*	D184A	180-190	
6 & 6*	D184F	180-190	
6 & 6*	L185V	180-190	
6 & 6*	S186A	180-190	
6 & 6*	S186F	180-190	
6 & 6*	G187A	180-190	
6 & 6*	R188A	180-190	
6 & 6*	R188L	180-190	
6 & 6*	S189A	180-190	
-	R205A	免疫原性の残基	
7	R248A	243-257	236-258
7	R251A	243-257	236-258

【０３３２】
アミノ酸置換を含む志賀毒素エフェクターポリペプチドを、細胞を標的化する結合領域を有する推定上の細胞毒性タンパク質の成分として試験した。細胞毒性タンパク質は、一緒に連結されて融合タンパク質を形成する免疫グロブリン型の結合領域と志賀毒素エフェクター領域とを含んでいた。これらの推定上の細胞毒性融合タンパク質を、当業界において公知の細菌系を使用してそれらをコードするポリヌクレオチドから発現させることによって生産した。
【実施例３】
【０３３３】
１又は２以上の志賀毒素エフェクター機能の保持に関して脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドの実験的試験
様々な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを、酵素活性及び細胞毒性の保持に関して実験的に試験した。
【０３３４】
脱免疫化後における志賀毒素エフェクターポリペプチドの酵素活性の保持を、志賀毒素エフェクターポリペプチドが細胞毒性タンパク質の成分であるという状況でリボソーム阻害アッセイを使用して試験した。特定の実験で、検出及び精製を容易にするために、この実施例の細胞毒性タンパク質の全長コード配列は、Strep-tag（登録商標）IIをコードす

るポリヌクレオチドを始めと終わりに有していた。

【０３３５】

脱免疫化された細胞毒性タンパク質のリボソームの不活性化能力は、TNT（登録商標）Quick Coupled Transcription/Translationキット（L1170 Promega社、Madison、WI、U.S.）を用いた無細胞の、インビトロでのタンパク質翻訳アッセイを用いて決定した。このキットには、Luciferase T7 Control DNA（L4821 Promega社、Madison、WI、U.S.）及びTNT（登録商標）Quick Master Mixが含まれる。リボソーム活性反応は製造業者の説明書に従って調製した。変異した志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を含む、被検タンパク質の１０倍希釈系列は適切な緩衝液中で調製し、同一のTNT反応混合物成分系列を各希釈液について作製した。希釈系列中の各試料は、Luciferase T7 Control DNAと共に各TNT反応混合物と合わせた。被験試料を３０℃で１．５時間インキュベートした。インキュベーション後、Luciferase Assay試薬（E1483 Promega社、Madison、WI、U.S.）を全ての被験試料に添加し、ルシフェラーゼタンパク質翻訳量を製造業者の説明書に従って発光により測定した。翻訳阻害のレベルを、相対発光単位に対する総タンパク質の対数変換された濃度の非線形回帰分析により決定した。統計ソフトウェア（GraphPad Prism社、San Diego、CA、U.S.）を用いて、見出し用量応答阻害の下でｌｏｇ（阻害剤）対応答（３つのパラメータ）のPrismソフトウェア関数［Ｙ＝最低値＋（（最高値－最低値）／（１＋１０＾（Ｘ－ＬｏｇＩＣ５０））］を用いて最大半量阻害濃度（IC_{50}）値を各試料について計算した。脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を含む各タンパク質及び内部エピトープ破壊がない野生型志賀毒素エフェクター領域を含む対照タンパク質のＩＣ５０を計算した。

【０３３６】

表７に、リボソーム阻害を示した例示的な志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を表示する。表７で報告されるように、野生型ＳＬＴ－１Ａ対照コンストラクトの１０倍以内のIC_{50}を示す置換を含むコンストラクトは、野生型に匹敵するリボソーム阻害活性を示すとみなされ、野生型ＳＬＴ－１Ａ対照の１０倍～１００倍IC_{50}を示すコンストラクトは、野生型と比較して減弱された活性を示すとみなされ、野生型ＳＬＴ－１Ａ対照の１００倍より大きいIC_{50}を示すコンストラクトは、著しく能力が損なわれたか又は不活性であるとみなされる（著しく能力が損なわれた／不活性）。

【０３３７】

【表９】

表7.例示的な志賀毒素エフェクターポリペプチドのリボソーム阻害活性

エピトープ領域	置換	*インビトロ*でのリボソーム阻害(IC_{50})
0	K1M, K11A	野生型に匹敵
0	S8I	野生型に匹敵
0	T9I	野生型に匹敵
1	S33I	野生型に匹敵
2	S45I	野生型に匹敵
3*	D53A	野生型に匹敵
3 & 3*	R55A	野生型に匹敵
3 & 3*	D58A	野生型に匹敵
3 & 3*	D58F	野生型に匹敵
3 & 3*	P59A	野生型に匹敵
3 & 3*	E60I	野生型に匹敵
3 & 3*	E60R	野生型に匹敵
3 & 3*	E61A	野生型に匹敵
3 & 3*	G62A	野生型に匹敵
4 & 4*	D94A, S96I	野生型に匹敵
6*	R179A	著しく能力が損なわれたか又は不活性
6 & 6*	D183A	野生型に匹敵
6 & 6*	D184A	野生型に匹敵
6 & 6*	D184F	野生型に匹敵
6 & 6*	R188A	野生型に匹敵
6 & 6*	D183A, D184A, R188A	野生型に匹敵
-	R205A	野生型に匹敵

【０３３８】

発現されて、標的細胞（すなわち「標的を発現する細胞」又は「標的生体分子陽性細胞」）の細胞表面に発現し、物理的に組み合わされた細胞外標的生体分子に特異的に且つ高親和性で結合することが可能な結合領域を有する、細胞毒性タンパク質の成分としての志賀毒素エフェクターポリペプチドという状況で、脱免疫化後の様々な例示的な志賀毒素エフェクターポリペプチドの細胞毒性活性の保持を、標的細胞殺滅アッセイを使用して試験した。脱免疫化された細胞毒性タンパク質の細胞毒性レベルを、標的を発現する細胞を使用して、細胞毒性タンパク質の結合領域の標的生体分子を発現しない細胞と比較して決定した。

【０３３９】

標的を発現する細胞を３８４ウェルプレート中の２０μＬの細胞培養液に播種した（接着細胞はウェル当たり２×１０^{3}細胞、タンパク質追加の前の日に播種し、浮遊細胞はウェル当たり７．５×１０^{3}細胞、タンパク質追加と同じ日に播種した）。試験対象の変異志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を含む各タンパク質の１０倍希釈系列を適切な緩衝液で調製し、５μＬの希釈液又は緩衝液対照を細胞に加えた。培地のみを含む対照のウェルを、ベースライン補正に用いた。細胞試料を、タンパク質又は緩衝液のみと共に、３７℃で３日間、５％二酸化炭素（CO_2）の雰囲気中でインキュベートした。全細胞生存

又は生存率を、製造業者の説明書に従って、CellTiter-Glo（登録商標）Luminescent Cell Viability Assay（G7573 Promega社、Madison、WI、U.S.）を用いる発光読み出しを用いて決定した。

【０３４０】

実験ウェルの生存率を、以下の式：（試験ＲＬＵ－平均培地ＲＬＵ）／（平均細胞ＲＬＵ－平均培地ＲＬＵ）＊１００を用いて計算した。Ｌｏｇポリペプチド濃度対生存率を、Prism（GraphPad Prism社、San Diego、CA、U.S.）中にプロットし、ｌｏｇ（阻害剤）対応答（３つのパラメーター）分析を用いて、被検タンパク質に関する最大半量細胞毒性濃度（CD_{50}）値を決定した。脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド及び内部エピトープ破壊がない野生型対照タンパク質を含む各タンパク質のCD_{50}を計算した。

【０３４１】

表８に、例示的な志賀毒素エフェクターポリペプチド領域の細胞毒性を表示する。表８で報告されるように、野生型ＳＬＴ－１Ａ対照コンストラクトの１０倍以内のCD_{50}を示す置換を含むコンストラクトは、野生型に匹敵する細胞毒性を示すとみなされ、野生型ＳＬＴ－１Ａ対照の１０倍～１００倍のCD_{50}を示すコンストラクトは、野生型と比較して減弱された細胞毒性を示すとみなされ、野生型ＳＬＴ－１Ａ対照の１００倍より大きいCD_{50}を示すコンストラクトは、著しく能力が損なわれた／不活性であるとみなされる。

【０３４２】

【表１０】

表8.例示的な志賀毒素エフェクターポリペプチドの細胞毒性活性

エピトープ領域	置換	細胞毒性(CD_{50})
0	K1M, K11A	野生型に匹敵
0	S8I	野生型に匹敵
0	T9I	減弱
1	S33I	野生型に匹敵
2	S45I	野生型に匹敵
3*	D53A	野生型に匹敵
3 & 3*	R55A	野生型に匹敵
3 & 3*	D58A	野生型に匹敵
3 & 3*	D58F	野生型に匹敵
3 & 3*	P59A	野生型に匹敵
3 & 3*	E60I	野生型に匹敵
3 & 3*	E60R	野生型に匹敵
3 & 3*	E61A	野生型に匹敵
3 & 3*	G62A	野生型に匹敵
4 & 4*	D94A, S96I	減弱
6*	R179A	著しく能力が損なわれたか又は不活性
6 & 6*	D183A	野生型に匹敵
6 & 6*	D184A	野生型に匹敵
6 & 6*	D184F	減弱
6 & 6*	R188A	野生型に匹敵
6 & 6*	D183A, D184A, R188A	野生型に匹敵
-	R205A	野生型に匹敵

【０３４３】

用語「成功した」は、予測されたエピトープ領域における１又は２以上のアミノ酸残基置換によって、１又は２以上の志賀毒素エフェクター機能を保持した志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドが得られたことを意味するのに使用される。同じエピトープ領域（番号６及び６＊）において個々に成功した３つの置換（Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、及びＲ１８８Ａ）を組み合わせて、野生型に匹敵する志賀毒素エフェクター機能を保持する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド（Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４Ａ／Ｒ１８８Ａ）を生成した（表７及び８）。これらの結果から、志賀毒素エフェクターポリペプチドの同じエピトープ領域におけるいくつかの成功したアミノ酸置換を組み合わせて、有意なレベルの１又は２以上の志賀毒素エフェクター機能をなお保持しつつもより大規模に全体的なエピトープ破壊がなされたエピトープ破壊を作製できることが示唆される。同様に、エピトープ領域番号０と番号４及び４＊はどちらも、それら各々の領域内に多重的なアミノ酸置換をうまく許容した（表７及び８：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ及びＤ９４Ａ／Ｓ９６Ｉ）。これは、同じエピトープ領域における様々な例示的な置換を組み合わせて、有意なレベルの１又は２以上の志賀毒素エフェクター機能をなお保持しつつもより大規模に全体的なエピトープ破壊がなされたエピトープ破壊を作製できるという概念を強化した。

【０３４４】

加えて、他の志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを、本明細書における実施例で説明したような方法を使用して志賀毒素エフェクター機能及びエピトープ破壊に関して試験したところ、志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、単一の予測されたＢ細胞エピトープ領域内に多重的なアミノ酸置換を含んでいた。試験された領域は、以下の志賀毒素様毒素１の成熟Ａサブユニット（配列番号１）及び志賀毒素（配列番号２）中に存在する天然位置の領域：４～１２、４３～５２、５３～６１、１０４～１１２、及び１８０～１８８であった。これらの単一の領域に多重的な置換を有するコンストラクトを、ＳＬＴ－１Ａ（配列番号１）の残基１～２５１を含む志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質という状況において、様々な組合せで作製した。これらのコンストラクトは、野生型ＳＬＴ－１Ａのエフェクターコンストラクトに匹敵するリボソーム阻害を保持し、標的細胞に対して選択的に細胞毒性であった。これらのコンストラクトは、単一の領域に、以下のアミノ酸置換：領域４～１２：Ｔ４Ｉ、Ｔ９Ｖ、及びＫ１１Ｈ；領域４３～５２：Ｓ４５Ｖ、Ｄ４７Ｇ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、及びＬ４９Ａ；領域５３～６１：Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ｖ、Ｒ５５Ｌ、Ｄ５８Ｖ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６１Ｖ及びＥ６１Ｌ；領域１０４～１１２：Ｓ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、及びＳ１１２Ｖ；領域１８０～１８８：Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ｇ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ｆ、及びＲ１８８Ｌの１又は２以上を他のアミノ酸置換との様々な組合せで含んでいた。加えて、これらのコンストラクトのウェスタン分析から、野生型ＳＬＴ－１Ａを認識することができる１又は２以上の抗体（実施例４で説明されるｍＡｂ１、ｐＡｂ１、及びｐＡｂ２）による、各コンストラクトの認識の低下又は消失が示された。

【０３４５】

加えて、エピトープ領域番号７は、リボソーム阻害活性又は細胞毒性のいずれにもいかなる有意な作用を起こすことなく、置換Ｒ２４８Ａ又はＲ２５１によって破壊される。Ｒ２４８Ａ又はＲ２５１Ａは、リボソーム阻害又は細胞毒性のいずれも変更することなく、上述した例示的な志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドにうまく導入することができる。

【０３４６】

上述の個々のエピトープ破壊、加えて新しい破壊を組み合わせて、２又は３以上のエピトープ領域の破壊を含む志賀毒素エフェクターポリペプチドの様々な組合せ（表９）を作製し、次いでこの実施例で説明されるように志賀毒素エフェクター機能の保持に関して実験的に調査した。表９に、単一のエピトープ領域内又は５つもの異なるエピトープ領域中にアミノ酸置換の組合せを有するコンストラクトによって示される活性を、これまでに説明された用語を使用して列挙した。

【０３４７】

【表１１】

表9.脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド及び細胞毒性タンパク質における多重的なエピトープ領域のアミノ酸置換の組合せ

破壊されたエピトープ領域	置換	リボソーム阻害	細胞毒性
3/3*, 4/4*	E60I, G110A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 5	E60I, G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
2, 6/6*	S45I, R188A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
1, 4/4*, 5	S33I, G110A, G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
2, 4/4*, 5	S45I, G110A,G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5	D58A, G110A, G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5	E60I, G110A, G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
2, 3/3*, 4/*4, 5	S45I, D58A, E60I, G110A, G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
2, 3/3*, 4/*4, 5	S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A	野生型に匹敵	減弱
2, 4/4*, 5, 6/6*	S45I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S186A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, G187A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, R188A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S189A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S186A, R188A	野生型に匹敵	減弱
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, G187A, R188A	野生型に匹敵	減弱
1, 2, 3/3*, 4/*4, 5	S33I, S45I, D58A, G110A, G147A	野生型に匹敵	野生型に匹敵
2, 3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	S45I, D58A, E60I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	野生型に匹敵	減弱
2, 3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	野生型に匹敵	減弱

【０３４８】

これらの結果から、全般的に、志賀毒素エフェクターポリペプチドの１つのエピトープ領域における全てではないとしてもほとんどの成功したアミノ酸置換は、志賀毒素エフェクター機能を保持することが実験的に示され、エピトープを破壊すると予測されたあらゆる置換を意味し、このような置換は、異なるエピトープ領域における全てではないとしてもほとんどの他の成功したアミノ酸置換と組み合わされて、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能をなお保持しつつも破壊された多重的なエピトープ領域を有する、脱免疫

化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを形成することが示唆される。
【実施例４】
【０３４９】
抗原性及び／又は免疫原性エピトープの破壊のための脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドの実験的試験
公知の抗体によって認識される実験的に検証可能なエピトープに基づきＢ細胞エピトープの破壊を確認するために、実験的試験を行った。変性条件下でエピトープ破壊を決定するために、ウェスタン分析を行った。よりネイティブのタンパク質フォールディング条件（すなわち非変性条件）下でエピトープ破壊を決定するために、酵素結合免疫吸着検査法（ＥＬＩＳＡ，enzyme-linked immunosorbent assay）分析を行った。
【０３５０】
Streptag（登録商標）II及び野生型志賀毒素エフェクターポリペプチド領域又は脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を含む細胞毒性タンパク質を等量でローディングして４～２０％ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）ポリアクリルアミドゲル（Lonza社、Basel、CH）を複製し、変性条件下で電気泳動した。得られたゲルはクマシー染色により分析するか、製造業者の説明書に従って、iBlot（登録商標）（Life Technologies社、Carlsbad、CA、U.S.）システムを用いてポリビニルジフルオライド（ＰＶＤＦ、polyvinyl difluoride）膜に転写した。得られたメンブレンに、以下の抗体を使用して標準条件下でプローブを付けた：Streptag（登録商標）IIとしても公知のポリペプチドＮＷＳＨＰＱＦＥＫ（配列番号：１３４）を認識するウサギポリクローナルα－ＮＷＳＨＰＱＦＥＫ（配列番号：１３４）（Ａ００６２６、Genscript社、Piscataway、NJ、U.S.）、マウスモノクローナルα－ＳｔｘＡ（抗ＳＬＴ－１Ａ　ｍＡｂ１又はｍＡｂ１）（BEI NR-867 BEI Resources社、Manassas、VA、U.S.）、ウサギポリクローナル抗体α－ＳＬＴ－１Ａ（抗ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ１又はｐＡｂ１）（Harlan Laboratories, Inc.社、Indianapolis、IN、U.S.、ＳＬＴ－１Ａアミノ酸１～２５１に対して生じた特注の抗体産生）、及びペプチドＲＧＩＤＰＥＥＧＲＦＮＮ（配列番号：１３５）及びＨＧＱＤＳＶＲＶＧＲ（配列番号：１３６）に対して生じたウサギポリクローナル抗体α－ＳＬＴ－１Ａ（抗ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ２又はｐＡｂ２）（Genscript社、Piscataway、NJ、U.S.、特注の抗体産生）。ペプチド配列ＲＧＩＤＰＥＥＧＲＦＮＮ（配列番号：１３５）は、推定上のＢ細胞エピトープ領域番号３（表５）にかかり、ペプチド配列ＨＧＱＤＳＶＲＶＧＲ（配列番号：１３６）は、ＳＬＴ－１Ａ及びＳｔｘＡにおいて２１４～２２３に配置されている。抗体に結合した膜は標準的な条件下で検出し、適切な場合は西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ、horseradish peroxidase）合成二次抗体（ヤギ抗ウサギＨＲＰ又はヤギ抗マウスＨＲＰ、Thermo Scientific社、Rockford、IL、U.S.）を用いた。図２～５は、ゲル及び／又はメンブレンのレーンに番号付けされたウェスタンブロットを示しており、図の凡例は、各レーンにローディングしたタンパク質内にどの志賀毒素エフェクター領域が含まれていたのかを、同じそれぞれの番号付けにより表示する。

【０３５１】
Ｄ５８Ａ置換は、ポリクローナルα－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ２によって認識されるエピトープの１つをうまく破壊した（図２）。同様に、Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａの三重置換及びＳ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａの五重置換ミュータントも、α－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ２によって認識されるエピトープの少なくとも１つの強い破壊（図３；図４）及びα－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ１によって認識されるエピトープの少なくとも１つの部分的な破壊を示した（図３）。
【０３５２】
Ｓ４５Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ及びＳ３３Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重置換ミュータントは、α－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ１によって認識されるエピトープの少なくとも１つの部分的な破壊を示した（図３）。Ｓ４５Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重ミュータントは、モノクローナル抗体ｍＡｂ１によって認識されるエピトープを強く破壊し、さら

に、ポリクローナルα－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ２によって認識されるエピトープを部分的に破壊した（図３；図４）。Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重ミュータントは、モノクローナル抗体ｍＡｂ１によって認識されるエピトープ及びポリクローナルα－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ２によって認識されるエピトープの少なくとも１つを極めて効果的に破壊した（図３；図４）。

【０３５３】

Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４Ａ／Ｒ１８８Ａ三重ミュータントは、モノクローナル抗体ｍＡｂ１によって認識されるエピトープの極めて有効な破壊を示した（図５）。Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ四重ミュータントは、モノクローナル抗体ｍＡｂ１によって認識されるエピトープ及びポリクローナルα－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ２によって認識されるエピトープの少なくとも１つを極めて効果的に破壊し、さらに、α－ＳＬＴ－１Ａ　ｐＡｂ１によって認識されるエピトープの少なくとも１つを部分的に破壊した（図５）。

【０３５４】

Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｓ４５Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、及びＤ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ四重ミュータントにおいて破壊されたエピトープ（１つはｍＡｂ１によって認識され、その他のものはｐＡｂ２によって認識される）は、２つの連続しない領域に存在する可能性が最も高いようである。したがって、Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｓ４５Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、及びＤ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ四重置換ミュータントはそれぞれ、少なくとも２種の異なるエピトープが同時に破壊されていることが実験的に検証された、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含んでいた。

【０３５５】

同様に、Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｓ４５Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｓ３３Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ四重、及びＳ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ五重ミュータントにおいて破壊された特定の優勢なエピトープ（ｐＡｂ１及びｐＡｂ２によって認識されるエピトープ）は、少なくとも２つの連続しない領域に存在する可能性が最も高いようである。したがって、Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｓ４５Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｓ３３Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ三重、Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ四重、及びＳ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ五重ミュータントは、少なくとも２種の異なるエピトープが同時に破壊されていることが実験的に検証された、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含んでいた可能性がある。

【０３５６】

標準的なＥＬＩＳＡを使用して、細胞毒性タンパク質の状況で、破壊された多重的なエピトープ領域を有する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を認識するｍＡｂ１の能力を測定した。細胞毒性タンパク質は、そのｓｃＦｖ結合領域の標的生体分子に結合した。リン酸緩衝生理食塩水（１×ＰＢＳ）（Hyclone Brand、Fisher Scientific社、Waltham、MA、U.S.）中のNunc社のMaxiSorp（登録商標）プレートのウェルを、細胞毒性タンパク質の結合領域の組換えヒト標的タンパク質でコーティングした。プレートを４℃で一晩インキュベートした。ウェルを１×ＰＢＳ　０．０５％Tween-20（ＰＢＳ－Ｔ）で洗浄し、ウェルをＰＢＳ－Ｔ中の３％乳汁と共に室温で１時間インキュベートすることによって、非特異的結合をブロックした。Streptag（登録商標）II及び脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）を含む細胞毒性タンパク質を、結合解離定数（K_D）を超えると決定された濃度でウェルに添加した。野生型活性の陽性対照及び参照として、野生型志賀毒素エフェクター領域及びStreptag（登録商標）IIを含む細胞毒性タンパク質を同じ濃度でウェルに添加した。

【０３５７】

プレートを室温で１時間インキュベートし、非変性条件下で細胞毒性タンパク質を結合させた。ウェルをＰＢＳ－Ｔで洗浄し、次いでＰＢＳ－Ｔ又はマウスモノクローナル抗体

の抗ＳＬＴ－１Ａ　ｍＡｂ１のいずれかと共に室温で１時間インキュベートした。ウェルをＰＢＳ－Ｔ中で洗浄し、次いで検出抗体：Streptag（登録商標）IIに対して向けられたＨＲＰ－コンジュゲート抗体又は抗マウス－ＨＲＰ－コンジュゲート抗体と共にインキュベートした。ウェルをＰＢＳ－Ｔ中で洗浄し、次いでPierce TMB Ultra（Thermo Scientific Inc.社、Rockford、IL、U.S.）と共にインキュベートした。反応を２５０ｍM塩酸（ＨＣｌ）で止めた。４５０ナノメートル（ｎｍ）の波長に設定された吸光度（Ａｂ）を測定するプレート読み取りデバイスによって、ＨＲＰ活性の生成物を検出した。いずれかの志賀毒素コンストラクトの代わりにＰＢＳと共にインキュベートされた、コーティングされブロックされたウェルの吸光度値を引くことによって、測定された吸光度値をバックグラウンドに対して補正した。

【０３５８】

Streptag（登録商標）II抗体の高い吸光度値によって測定されたように（図６）、両方の細胞毒性タンパク質が、ヒト組換えタンパク質、ｓｃＦｖの標的生体分子に結合した。脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）は、モノクローナル抗体である抗ＳＬＴ－１Ａ　ｍＡｂ１によって認識されなかった（図６）。陽性対照の、野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドを含む細胞毒性タンパク質は、抗体である抗ＳＬＴ－１Ａ　ｍＡｂ１と結合した（図６）。これらの結果から、抗ＳＬＴ－１Ａ　ｍＡｂ１によって認識されるエピトープは、ネイティブに折り畳まれた野生型志賀毒素エフェクター領域中に存在するが、ネイティブに折り畳まれた脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域において、変異Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａの組合せによってエピトープが破壊されたことが示された。

【実施例５】

【０３５９】

志賀毒素エフェクターポリペプチドにおける抗原性及び／又は免疫原性エピトープの破壊の予測

BcePredウェブサーバーを使用して、以下：親水性２、接近しやすさ２、露出した表面２．４、抗原性の性質１．８、フレキシビリティー１．９、ターン１．９、極性２．３、及び複合化１．９のデフォルト設定を用いたフレキシビリティーの読み出しにより、志賀毒素エフェクター機能を保持しつつ志賀毒素エフェクターポリペプチドを脱免疫化する目的で実施例４で作製された各置換を、置換を含むエピトープ領域における予測されたＢ細胞エピトープの壊滅に関して調べた（Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)）。表１０は、分析中に存在する置換と、最後の列にＢ細胞エピトープ予測の結果とを示す。注目すべきことに、エピトープ領域番号０（１～１５）及び番号７（２４３～２５７）は、野生型ＳＬＴ－１Ａでは、デフォルト設定を用いたBcePredフレキシビリティーアプローチによって予測されなかった。エピトープ領域番号０におけるＫ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ；エピトープ領域番号４＊におけるＤ９４Ａ；及びエピトープ領域番号４及び４＊におけるＳ９６Ｉなどの試験された置換（表６を参照）は、BcePredフレキシビリティーアプローチによれば、デノボのいかなる予測されたＢ細胞エピトープも生じなかった（例えば表１０を参照）。加えて、表１０に、BcePredコンピューター使用アプローチを使用して分析された、ただし実験的にはまだ試験されていない他の置換の結果を列挙する。

【０３６０】

【表１２】

表10.アミノ酸置換後のB細胞エピトープ予測

エピトープ領域番号	天然に配置されるアミノ酸の位置		
	B細胞エピトープ領域	置換	BcePredによるB細胞エピトープ
0	1-15	K1M	変化なし
0	1-15	T4I	変化なし
0	1-15	S8I	変化なし
0	1-15	T9V	変化なし
0	1-15	T9I	変化なし
0	1-15	K11A	変化なし
0	1-15	K11H	変化なし
1	27-37	S33I	消滅
1	27-37	S45V	消滅
2	39-48	S45I	消滅
2	39-48 (StxA)	T45I	消滅
2	39-48	D47G	変化なし
2	39-48	N48V	変化なし
2	39-48	N48F	変化なし
3*	53-66	D53A	変化なし
3*	53-66	D53G	変化なし
3*	53-66	D53N	変化なし
3 & 3*	55-66	R55A	変化なし
3 & 3*	55-66	R55V	変化なし
3 & 3*	55-66	R55L	変化なし
3 & 3*	55-66	D58A	消滅
3 & 3*	55-66	D58F	消滅
3 & 3*	55-66	P59A	消滅
3 & 3*	55-66	P59F	消滅
3 & 3*	55-66	E60I	消滅
3 & 3*	55-66	E60T	消滅
3 & 3*	55-66	E60R	変化なし
3 & 3*	55-66	E61A	消滅
3 & 3*	55-66	E61V	消滅
3 & 3*	55-66	E61L	消滅

3 & 3*	55-66	G62A	消滅
4*	94-115	D94A	変化なし
4 & 4*	96-115	S96I	変化なし
4 & 4*	96-115	S109V	消滅
4 & 4*	96-115	G110A	消滅
4 & 4*	96-115	S112V	消滅
5	141-153	G147A	消滅
6*	179-190	R179A	変化なし
6 & 6*	180-190	T180G	変化なし
6 & 6*	180-190	T181I	変化なし
6 & 6*	180-190	D183A	変化なし
6 & 6*	180-190	D183G	変化なし
6& 6*	180-190	D184A	消滅
6& 6*	180-190	D184F	消滅
6& 6*	180-190	L185V	消滅
6& 6*	180-190	S186A	消滅
6& 6*	180-190	S186F	消滅
6& 6*	180-190	G187A	消滅
6& 6*	180-190	R188A	消滅
6& 6*	180-190	R188L	消滅
6& 6*	180-190	S189A	消滅
7	243-257	S247I	消滅
7	243-257	R248A	消滅
7	243-257	R251A	消滅
8	254-268	D264A	消滅
8	254-268	G265A	消滅
8	262-278 (SLT-2A)	G264A	消滅
9	285-293	T286A	消滅
9	285-293	T286I	消滅

【０３６１】
ＳＬＴ－１Ａ　Ｄ５８Ａと比較したＳＬＴ－１Ａ野生型のウェスタン分析（図２）から、ＢｃｅＰｒｅｄコンピューター使用フレキシビリティーアプローチは、ＳＬＴ－１Ａの５５～６６位におけるＢ細胞エピトープの存在を正確に予測し（表１）、Ｄ５８Ａ置換によるそのエピトープ領域の破壊も正確に予測された（表１０）ことが示された。
【実施例６】
【０３６２】
野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドと比較した、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドの相対的な免疫原性の哺乳動物モデルを使用した実験的試験
この実施例において、脱免疫化されていない細胞毒性タンパク質と比較した、本発明の脱免疫化された細胞毒性タンパク質の相対的な免疫原性を、ヒト免疫系の哺乳動物モデルを使用して決定した。哺乳動物の免疫系のマウスモデルを使用して、例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを含む例示的な細胞毒性タンパク質の、野生型配

列のみを有する志賀毒素エフェクター領域を含む親の細胞毒性タンパク質に対する相対的な免疫原性を比較した。細菌に由来する志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは哺乳動物に対して外来（又は非自己）の分子構造であるため、野生型志賀毒素エフェクターポリペプチドはある程度の免疫原性を示すであろうということが予測された。マウスを使用して決定された非哺乳動物タンパク質の相対的な免疫原性は、一般的に、全ての哺乳動物にとってその相対的な免疫原性の指標である。

【０３６３】

溶液中のＥＬＩＳＡアッセイ（in-solution ELISA assay）を使用して、異なる細胞毒性タンパク質サンプルに特異的な血清マウス抗体：野生型志賀毒素エフェクターポリペプチド（ＳＬＴ－１Ａのアミノ酸１～２５１）又は例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド（特定のアミノ酸置換を有するＳＬＴ－１Ａのアミノ酸１～２５１）のいずれかを含む細胞毒性タンパク質の相対量を決定した。雌ＢＡＬＢ／ｃマウスを無作為にグループに割り振って、それぞれ６匹のマウスを含むグループを形成した。最初に、細胞毒性タンパク質に曝露する前に、各マウスから血清サンプルを収集した。次に、グループ中の各マウスに、野生型（ＳＬＴ－１Ａのアミノ酸１～２５１）又は例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａを含むＳＬＴ－１Ａのアミノ酸１～２５１）のいずれかを含む細胞毒性タンパク質を、１２日間にわたり合計６回の注射に相当する２週間の持続時間にわたり週３回の腹腔内注射によって、１用量当たり０．２５ｍｇ／ｋｇで投与した。細胞毒性タンパク質投与の経過中及びその後、全てのグループのマウスからマウスの血清を収集して、溶液中のＥＬＩＳＡアッセイを使用して抗「投与タンパク質」のレベルを観察した。

【０３６４】

溶液中の抗「細胞毒性タンパク質」ＥＬＩＳＡアッセイを以下のようにして行った。マウスグループにおける注射に使用された同じ細胞毒性タンパク質を、そのグループからのマウスの血清を含む溶液中で４℃で一晩インキュベートし、次いで免疫複合体（血清中のいずれかの誘導された抗体に結合した細胞毒性タンパク質からなる）を、適切な標的タンパク質でコーティングしたＥＬＩＳＡプレートウェルを使用して捕獲した。捕獲されたマウスＩｇＧを含む免疫複合体を、二次抗体のホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート抗マウスＩｇＧを使用して検出した。ＥＬＩＳＡプレートを展開してホースラディッシュ（horsereadish）ペルオキシダーゼ活性を検出し、プレートリーダーを使用して４５０ｎｍでホースラディッシュペルオキシダーゼ活性又は「ＥＬＩＳＡシグナル」を測定した。「ＥＬＩＳＡシグナル」又は「ＥＬＩＳＡ値」を、「血清なし」の陰性対照を用いて測定した場合のバックグラウンドシグナルを引いた後に、吸光度値として計算した。この溶液中のＥＬＩＳＡアッセイ及び設定の場合、より大きいＥＬＩＳＡ値は、より強い免疫応答（抗体誘導）を示す。

【０３６５】

いずれのグループのマウスも、この溶液中のＥＬＩＳＡアッセイによれば、注射を介した細胞毒性タンパク質への曝露前に細胞毒性タンパク質のいずれかを認識する前もって形成された血清抗体を有するとは測定されなかった。したがって、これらのマウスにおける溶液中のＥＬＩＳＡアッセイを使用した抗「細胞毒性タンパク質」抗体の投与後の検出はいずれも、投与後に起こった誘導されたデノボ抗体形成を表す。

【０３６６】

この実施例の相対的な免疫原性の研究に関して、マウスのグループに注射された同じ細胞毒性タンパク質を、そのグループのマウスから血清抗体を捕獲するためのＥＬＩＳＡアッセイで使用した。言い換えれば、「野生型志賀毒素エフェクター領域」グループのマウスからの血清中に存在する抗体を、野生型志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質を用いたＥＬＩＳＡアッセイで捕獲し、「脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド」グループのマウスからの血清中に存在する抗体を、例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む例示的な細胞毒性タンパク質を用いたＥＬＩＳＡアッセイで捕獲した（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）。

【０３６７】
１５日目（６回目の用量投与後の３日）及び２２日目（６回目の用量投与後の１０日）に、上述した溶液中のＥＬＩＳＡアッセイによって抗「細胞毒性タンパク質」ＩｇＧ応答を測定した（図７）。図７において、記号は、個々のマウスを表し、塗り潰しの記号は、野生型志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質が投与されたマウスを表し、白い記号は、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む例示的な細胞毒性タンパク質が投与されたマウスを表す。図７において、垂直線は、各グループそれぞれの平均ＩｇＧ応答シグナルを示す。
【０３６８】
野生型志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質が投与されたグループのマウスは、ＥＬＩＳＡシグナルによって示された通り、１５及び２２日目の両方に脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）が投与されたグループのマウスより高い規模の抗体反応を有していた（図７）。「脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド」グループに関する平均ＥＬＩＳＡシグナル（抗体反応の定量化）は、「野生型志賀毒素エフェクター領域」グループの２５％（１５日目）及び３９％（２２日目）であった。「脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド」グループと「野生型志賀毒素エフェクター領域」グループとのＥＬＩＳＡシグナルの差は、ｔ検定に基づき、統計学的に有意であった（ｐ値は０．００５未満であった）。「強い」抗体反応を表すのに０．９Ａｂｓ単位の基準の吸光度値カットオフを使用して、「野生型志賀毒素エフェクター領域」グループにおける６匹中６匹（１００％）のマウスが１５又は２２日目に強い抗体反応を有したが、それに対して「脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド」グループでは６匹中わずか３匹（５０％）のマウスしか強い抗体反応を有していなかった。
【０３６９】
脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む例示的な細胞毒性タンパク質（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）は、哺乳動物モデルにおいて免疫原性の低下を示した（図７）。「脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド」グループのマウスにおける抗体誘導の全体的な規模の減少、加えて「野生型志賀毒素エフェクター領域」グループと比較して有力な抗体反応を誘導したこのグループにおけるマウス数の低下は、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド（Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）がうまく脱免疫化され（すなわち哺乳動物において起こり得る免疫原性を低下させ）、それを含む例示的な細胞毒性タンパク質は、脱免疫化された細胞毒性タンパク質である（すなわち哺乳動物において起こり得る免疫原性が低下されている）ことを示す。
【０３７０】
この例示的な脱免疫化された細胞毒性タンパク質は、３又は４以上の志賀毒素エフェクター機能：触媒性のリボソーム阻害、細胞内の経路決定、及び細胞毒性を保持しつつ、４つの異なるＢ細胞エピトープ領域の破壊を含む志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含んでいた（表９）。加えて、この細胞毒性タンパク質の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、ウェスタンブロットでｍＡｂ１、ｐＡｂ２、及びｐＡｂ１によって認識される破壊されたエピトープ（図５）及びＥＬＩＳＡアッセイでｍＡｂ１によって認識される破壊されたエピトープ（図６）を有することが示された。それゆえに、この例示的な細胞毒性タンパク質は、哺乳動物の免疫系に対する抗原性と免疫原性の両方が低下した、脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む脱免疫化された細胞毒性タンパク質である。この例示的な細胞毒性タンパク質の抗原性及び／又は免疫原性は、同じ又は追加の予測されたＢ細胞エピトープ領域に追加の変異を導入することによってさらに低下する可能性がある。加えて、すでに破壊されたＢ細胞エピトープ領域における同一又は異なる位置での代替の置換は、相対的な免疫原性の低下をもたらすと予想される。
【０３７１】

様々な例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド又は様々な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を含む例示的な細胞毒性タンパク質の相対的な免疫原性が類似の方式で試験される。１．（１－２５１：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ／Ｓ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｒ１８８Ａ）、２．（１－２５１：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ／Ｓ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４Ａ／Ｒ１８８Ａ）、３．（１－２５１：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ／Ｓ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｅ６０Ｉ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４／Ｒ１８８Ａ）、４．（１－２５１：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ／Ｓ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｒ５５Ａ／Ｄ５８Ａ／Ｐ５９Ａ／Ｅ６０Ｉ／Ｅ６１Ａ／Ｇ６２Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４Ａ／Ｒ１８８Ａ）、５．（１－２５１：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ／Ｓ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｄ５８Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４Ａ／Ｓ１８９Ａ）、及び６．（１－２５１：Ｋ１Ｍ／Ｋ１１Ａ／Ｓ３３Ｉ／Ｓ４５Ｉ／Ｒ５５Ａ／Ｄ５８Ａ／Ｐ５９Ａ／Ｅ６０Ｉ／Ｅ６１Ａ／Ｇ６２Ａ／Ｇ１１０Ａ／Ｇ１４７Ａ／Ｄ１８３Ａ／Ｄ１８４／Ｒ１８８Ａ／Ｒ２０５Ａ）、並びに配列番号４～５２を含む特定の例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドは、本明細書で説明されるか又は熟練した作業者に公知の動物モデル及びアッセイを使用して、野生型アミノ酸配列のみを含む志賀毒素エフェクターポリペプチド及び／又は野生型志賀毒素エフェクターポリペプチド領域を含む親の細胞毒性タンパク質と比較される。

【０３７２】

この実施例において、マウスに、脱免疫化された形態又は野生型の形態のいずれかを７日の間隔で４回静脈内投与する。注射されたマウスから血液サンプルを採取し、細胞毒性タンパク質及び／又は志賀毒素エフェクターポリペプチドに対する反応性に関してＥＬＩＳＡアッセイにより試験する。特定の例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド又はそれを含む細胞毒性タンパク質が注射されたマウスにおいて、野生型アミノ酸配列のみを含む志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む分子と比較して比較的低い免疫原性の応答が測定されると予想される。

【０３７３】

多重的なＢ細胞エピトープ領域の破壊を含む例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む特定の例示的な脱免疫化された細胞毒性タンパク質は、有意なレベルの１又は２以上の志賀毒素エフェクター機能：触媒性のリボソーム阻害、細胞内の経路決定、及び細胞毒性を保持し、ウェスタンブロット及び／又はＥＬＩＳＡアッセイの両方で抗志賀毒素様毒素Ａサブユニット抗体を認識する前もって形成された抗体による認識が低下されると予想される。多重的なＢ細胞エピトープ領域の破壊を有する脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含むこれらの例示的な細胞毒性タンパク質は、抗原性及び／又は免疫原性が低下した脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドである。

【０３７４】

要約

前述の実施例から、志賀毒素エフェクター領域ポリペプチド内のＢ細胞エピトープ領域をアミノ酸置換により破壊して、抗原性と免疫原性の両方における低下をもたらすことができることが実証された。表１１に、細胞毒性タンパク質が少なくとも１つの志賀毒素の機能を保持するという状況における、志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドの予測されたエピトープ領域内のアミノ酸残基の置換を要約する。例示的な置換の全てが、２又は３以上の志賀毒素エフェクター機能に干渉する置換Ｒ１７９Ａを除いて、１又は２以上のＢ細胞エピトープが同時に破壊されることにより高い細胞毒性を機能的に保持した志賀毒素エフェクター領域をもたらした。

【０３７５】

【表１３】

表11.志賀毒素エフェクター機能を保持するB細胞エピトープ領域における置換の要約

天然に配置されるアミノ酸の位置				
B細胞エピトープ領域	置換	エピトープ予測	リボソーム阻害	細胞毒性
0: 1-15	K1M/K11A	変化なし	あり	あり
0: 1-15	S8I	変化なし	あり	あり
0: 1-15	T9I	変化なし	あり	あり
1: 27-37	S33I	消滅	あり	あり
2: 39-48	S45I	消滅	あり	あり
3*: 53-66	D53A	変化なし	あり	あり
3/3*: 55-66	R55A	変化なし	あり	あり
3/3*: 55-66	D58A	消滅	あり	あり
3/3*: 55-66	D58F	消滅	あり	あり
3/3*: 55-66	P59A	消滅	あり	あり
3/3*: 55-66	E60I	消滅	あり	あり
3/3*: 55-66	E60R	変化なし	あり	あり
3/3*: 55-66	E61A	消滅	あり	あり
3/3*: 55-66	G62A	消滅	あり	あり
4*: 94-115	D94A/S96I	変化なし	あり	あり
6: 180-190	D183A	変化なし	あり	あり
6: 180-190	D184A	消滅	あり	あり
6: 180-190	D184F	消滅	あり	あり
6: 180-190	R188A	消滅	あり	あり
6: 180-190	D183A/ D184A/ R188A	消滅	あり	あり
免疫原性の残基	R205A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*	E60I/ G110A	消滅	あり	あり
3/3*, 5	E60I/ G147A	消滅	あり	あり
2, 6/6*	S45I/R188A	消滅	あり	あり
1, 4/4*, 5	S33I/ G110A/ G147A	消滅	あり	あり
2, 4/4*, 5	S45I/ G110A/G147A	消滅	あり	あり

3/3*, 4/4*, 5	D58A/ G110A/ G147A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5	E60I/ G110A/ G147A	消滅	あり	あり
2, 3/3*, 4/4*, 5	S45I/ D58A/ E60I/ G110A/ G147A	消滅	あり	あり
2, 3/3*, 4/4*, 5	S45I/ D58A/ E60I/ G62A/ G110A/ G147A	消滅	あり	あり
2, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5, 6	D58A/ G110A/ G147A/ S186A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ G187A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ R188A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ S189A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ S186A/ R188A	消滅	あり	あり
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/ G110A/ G147A/ G187A/ R188A	消滅	あり	あり
1, 2, 3/3*, 4/4*, 5	S33I/ S45I/ D58A/ G110A/ G147A	消滅	あり	あり
2, 3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/ D58A/ E60I/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A	消滅	あり	あり
2, 3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/ D58A/ E60I/ G62A/ G110A/ G147A/ D183A/ D184A/ R188A	消滅	あり	あり

【０３７６】

推測的に成功する置換を予測しようとする挑戦にもかかわらず、本明細書に記載の実施例で示されるデータから、特定のアミノ酸置換が、有意な志賀毒素エフェクター機能を維持しながら抗原性及び／又は免疫原性をうまく低下させる可能性があると考えられる理由が示される。例えば、置換をうまく許容するものとしての本明細書に示される特異的なアミノ酸位置における置換（表１１）は、特定の他のアミノ酸で置換された場合、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能の保持に成功する可能性が最も高い。多重的な単一のアミノ酸置換（エピトープ領域を破壊すると予測され、細胞毒性を保持していた）を組み合わせたところ（表９；表１１）、志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質は細胞毒性を保持したという実証から、一般的に、成功した単一のアミノ酸置換を異なるエピトープ領域における他の成功したアミノ酸置換と組み合わせて、有意な志賀毒素エフ

ェクター機能を保持する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを生成することが可能なことが示唆される。同様に、同じエピトープ領域内に多重的な単一のアミノ酸置換を有する志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質が酵素活性を保持したという実証（表９；表１１）から、一般的に、同じエピトープ領域における成功した単一のアミノ酸置換を同じエピトープ領域における他の単一のアミノ酸置換と組み合わせて、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを生成することが可能なことが示唆される。同じエピトープ領域内に多重的な単一のアミノ酸置換を有する志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを含む細胞毒性タンパク質が細胞毒性を保持するという事実（表９；表１１）から、エピトープ領域における成功した単一のアミノ酸置換を同じエピトープ領域における他の単一のアミノ酸置換と組み合わせて、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを生成することが可能なことが示唆される。

【０３７７】

実験的なデータから、特定の置換（Ｋ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ２０５Ａ、及び／又はそれらの組合せ）及び特定の位置が、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能に関して有意なレベルの活性を保持しつつ置換（１、４、８、９、１１、３３、４５、４８、５３、５５、５７、５８、５９、６０、６１、６２、９４、９６、１０９、１１０、１４７、１８０、１８１、１８３、１８４、１８５、１８６、１８７、１８８、１８９、２０５、２４８、及び２５１）を許容したことが実証された。この実験的なデータから、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを生成するのに使用することができる特定の他のエピトープを破壊する置換及びエピトープを破壊する置換の組合せが示唆される。保存的官能基のアミノ酸残基への他のアミノ酸置換も許容されることが予測可能である。例えば、Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｖ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｖ、Ｓ４５Ｉ、Ｄ４７Ｇ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｌ４９Ａ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｌ、Ｉ５７Ｆ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｐ５９Ｆ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｒ２４８Ａ、又はＲ２５１Ａのいずれかに類似していることが熟練した作業者に公知の他の置換が、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能を維持しつつもエピトープを破壊することができるとも予想される。特定には、Ｋ１Ｍ、Ｔ４Ｉ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｖ、Ｔ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｖ、Ｓ４５Ｉ、Ｄ４７Ｇ、Ｎ４８Ｖ、Ｎ４８Ｆ、Ｌ４９Ａ、Ｄ５３Ａ、Ｄ５３Ｇ、Ｄ５３Ｎ、Ｒ５５Ａ、Ｒ５５Ｌ、Ｉ５７Ｆ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｐ５９Ｆ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｔ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｅ６１Ｖ、Ｅ６１Ｌ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｓ１０９Ｖ、Ｇ１１０Ａ、Ｓ１１２Ｖ、Ｇ１４７Ａ、Ｔ１８０Ｇ、Ｔ１８１Ｉ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８３Ｇ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｌ１８５Ｖ、Ｓ１８６Ａ、Ｓ１８６Ｆ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｒ１８８Ｌ、Ｓ１８９Ａ、Ｒ２０５Ａ、Ｒ２４８Ａ、又はＲ２５１Ａに類似した保存的アミノ酸残基へのアミノ酸置換は、同じ作用を有すると予想される。類似の保存的アミノ酸置換の例としては、Ｋ１からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、及びＨ；Ｔ４ＩからＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｆ、Ｍ、及びＳ；Ｓ８からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｔ９からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｆ、Ｍ、及びＳ；Ｋ１１からＧ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、及びＭ；Ｓ３３からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｓ４５からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｔ４５からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、及びＭ；Ｄ４７からＡ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、及びＱ；Ｎ４８からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｉ、及びＭ；Ｌ４９からＧ；Ｄ５３からＶ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、及びＱ；Ｒ５５からＧ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ、及びＨ；Ｄ５８からＧ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、及びＱ；Ｐ５９からＧ；Ｅ６０からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、及びＭ；Ｅ６

１からＧ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、Ｑ、Ｎ、Ｄ、Ｍ、及びＲ；Ｄ９４からＧ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、及びＱ；Ｓ９６からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｓ１０９からＡ、Ｇ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｔ１０９からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｓ１１２からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｉ、Ｆ及びＭ；Ｔ１８０からＡ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、及びＳ；Ｔ１８１からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｆ、Ｍ、及びＳ；Ｄ１８３からＶ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｓ、及びＱ；Ｄ１８４からＧ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、及びＱ；Ｌ１８５からＡ及びＧ；Ｓ１８６からＧ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｒ１８８からＧ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ、及びＨ；Ｓ１８９からＧ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｒ２０４からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ、及びＨ；Ｒ２０５からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｆ、Ｍ、Ｑ、Ｓ、Ｋ、及びＨ；Ｓ２４７からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、及びＭ；Ｙ２４７からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、及びＦ、Ｒ２４８からＧ、Ｖ、Ｌ、及びＩ；Ｒ２５０からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、及びＦ；並びにＲ２５１からＧ、Ｖ、Ｌ、及びＩが挙げられる。

【０３７８】

電荷、極性を除去する、及び／又は側鎖長を短くするアミノ酸置換も、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能を維持しつつもエピトープを破壊することができると予想される。例えば、側鎖の電荷が除去される、極性が除去される、及び／又は側鎖長が短くなるように、アミノ酸残基Ｋ１、Ｔ４、Ｓ８、Ｔ９、Ｋ１１、Ｓ３３、Ｓ４５、Ｄ４７、Ｎ４８、Ｌ４９、Ｄ５３、Ｒ５５、Ｉ５７、Ｄ５８、Ｐ５９、Ｅ６０、Ｅ６１、Ｇ６２、Ｄ９４、Ｓ９６、Ｓ１０９、Ｔ１０９、Ｇ１１０、Ｓ１１２、Ｇ１４７、Ｔ１８０、Ｔ１８１、Ｄ１８３、Ｄ１８４、Ｌ１８５、Ｓ１８６、Ｇ１８７、Ｒ１８８、Ｓ１８９、Ｒ２０５、Ｒ２４８、又はＲ２５１が、Ａ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｐ、Ｃ、Ｍ、Ｆ、Ｓ、Ｄ、Ｎ、Ｑ、Ｈ、及びＫで置換される。特定には、以下のアミノ酸置換：Ｄ４７、Ｄ５３、Ｄ５８、Ｄ９４、Ｄ１８３、Ｄ１８４、Ｄ２６４からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｓ、及びＮ；Ｅ６０又はＥ６１からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｖ、Ｉ、Ｓ、Ｎ、Ｑ、Ｄ、及びＭ；Ｇ６２、Ｇ１１０、Ｇ１４７、Ｇ１８７、又はＧ２６５からＡ；Ｋ１又はＫ１１からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｖ、Ｉ、Ｆ、Ｃ、Ｍ、Ｐ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｈ、及びＱ；Ｌ４９又はＬ１８５からＡ及びＧ；Ｎ４８からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、及びＩ；Ｒ５５、Ｒ１８８、Ｒ２０５、Ｒ２４７、Ｒ２４８、Ｒ２５０、又はＲ２５１からＡ、Ｇ、Ｌ、Ｖ、Ｉ、Ｓ、Ｑ、Ｋ、Ｍ、Ｆ、及びＨ；Ｓ３３、Ｓ４５、Ｓ９６、Ｓ１０９、Ｓ１１２、Ｓ１８６、又はＳ１８９からＡ、Ｇ、Ｖ、及びＬ、並びにＴ４、Ｔ９、Ｔ４５、Ｔ１０９、Ｔ１８０、Ｔ１８１、Ｔ２８６からＡ、Ｇ、Ｖ、Ｌ、Ｉ、Ｍ及びＦは、少なくとも１つの志賀毒素エフェクター機能を維持しつつもエピトープを破壊することができると予想される。

【０３７９】

加えて、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつエピトープを破壊する志賀毒素エフェクターポリペプチドの１つのエピトープ領域におけるアミノ酸置換は、一般的に、志賀毒素エフェクター機能の有意なレベルをなお保持しつつも破壊された多重的なエピトープ領域を有する脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを形成するために、有意な志賀毒素エフェクター機能を保持しつつエピトープを破壊する同じ又は異なるエピトープ領域において他のアミノ酸置換と組合せ可能であると予測される。本発明の脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドを作製するために、例えば、Ｋ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｓ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、及び／又はＲ２０５Ａは、可能であれば、Ｋ１Ｍ、Ｓ８Ｉ、Ｔ９Ｉ、Ｓ９Ｉ、Ｋ１１Ａ、Ｓ３３Ｉ、Ｓ４５Ｉ、Ｄ５３Ａ、Ｒ５５Ａ、Ｄ５８Ａ、Ｄ５８Ｆ、Ｐ５９Ａ、Ｅ６０Ｉ、Ｅ６０Ｒ、Ｅ６１Ａ、Ｇ６２Ａ、Ｄ９４Ａ、Ｓ９６Ｉ、Ｇ１１０Ａ、Ｇ１４７Ａ、Ｄ１８３Ａ、Ｄ１８４Ａ、Ｄ１８４Ｆ、Ｓ１８６Ａ、Ｇ１８７Ａ、Ｒ１８８Ａ、Ｓ１８９Ａ、及び／又はＲ２０５Ａと組み合わせることができる。

【実施例７】

【０３８０】

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド及びＣＤ２０に特異的な結合領域を含む細胞毒性タンパク質（ＳＬＴ－１Ａと融合したαＣＤ２０）

この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αＣＤ２０抗原は、ヒトＣＤ２０を認識する免疫グロブリン型ドメインに由来し（例えば、Haisma et al., Blood 92: 184-90 (1999)、Geng S et al., Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006)、Olafesn T et al., Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010)を参照されたい）、ＣＤ２０の細胞外部分に結合することができる免疫グロブリン型結合領域を含む。ＣＤ２０は、例えば、Ｂ細胞リンパ腫細胞、有毛細胞白血病細胞、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病細胞、及びメラノーマ細胞などの複数のがん細胞型で発現する。さらに、ＣＤ２０はいくつかの自己免疫疾患、障害、及び過活動Ｂ細胞を含む状態を治療するための治療学への魅力的な標的である。

【０３８１】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０の構築、産生、及び精製

免疫グロブリン型結合領域αＣＤ２０及び志賀毒素エフェクター領域（例えば、配列番号４～５２など）を共に連結した。例えば、融合タンパク質は、αＣＤ２０抗原結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０をコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される（例えば、配列番号５３、５４、５５、及び５６を参照されたい）。ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０細胞毒性タンパク質の発現は、前の実施例で説明したような、又は熟練した作業者に公知の、細菌及び／又は無細胞のタンパク質翻訳系のいずれかを使用して達成される。

【０３８２】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０のインビトロでの特性の決定

ＣＤ２０＋細胞及びＣＤ２０－細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性、最大特異的結合（B_{max}）及び平衡結合定数（K_D）は、蛍光に基づくフローサイトメトリーアッセイにより決定する。ＣＤ２０＋細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０のB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはＣＤ２０－細胞への有意な結合はない。

【０３８３】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０のリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０のIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０３８４】

ＣＤ２０＋細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０の細胞毒性の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０の細胞毒性特性を、ＣＤ２０＋細胞を用いて前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０の選択的細胞毒性特性を、ＣＤ２０＋細胞と比較してＣＤ２０－細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、ＣＤ２０＋細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にＣＤ２０を発現する細胞と比較して細胞表面上にＣＤ２０を発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０３８５】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０の相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェ

クター領域ポリペプチドに関して決定した。

【０３８６】

動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０のインビボでの効果の決定

動物モデルを用いて、新生物細胞に対する細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＤ２０のインビボでの効果を決定する。様々なマウス株を用いて、細胞表面上にＣＤ２０を発現するヒト新生物細胞のマウスへの注射から得られるマウスにおける異種移植腫瘍に対する静脈内投与後の細胞毒性タンパク質の効果を試験する。

【実施例８】

【０３８７】

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びにＨＥＲ２に特異的な結合領域を含む細胞毒性タンパク質（「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」）

この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含んでいた。免疫グロブリン型結合領域は、米国特許出願第２０１１／００５９０９０号に記載される、ラクダ抗体の単ドメイン可変領域（V_HＨ）であるタンパク質５Ｆ７に由来するαＨＥＲ２　V_HＨである。

【０３８８】

細胞毒性タンパク質「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」の構築、産生、及び精製

免疫グロブリン型結合領域及び志賀毒素エフェクター領域は共に連結して、融合タンパク質を形成した（例えば、配列番号５７、５８、及び５９を参照されたい）。本実施例において、タンパク質５Ｆ７に由来するαＨＥＲ２－V_HＨ可変領域をコードするポリヌクレオチドは、当技術分野で既知のリンカーをコードするポリヌクレオチドを有するフレーム、及び配列番号４～５２のアミノ酸を含む志賀毒素エフェクター領域をコードするポリヌクレオチドを有するフレームにクローニングすることができる。細胞毒性タンパク質「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」のバリアントは、結合領域を志賀毒素エフェクター領域のアミノ末端の隣に配置していてもよく、カルボキシ末端にＫＤＥＬファミリーの小胞体シグナルモチーフを含んでいてもよいように作製した。細胞毒性タンパク質バリアント「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」の発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。

【０３８９】

細胞毒性タンパク質「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」のインビトロでの特性の決定

ＨＥＲ２＋細胞及びＨＥＲ２－細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーアッセイにより決定する。ＨＥＲ２＋細胞への「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」のB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはＨＥＲ２－細胞への有意な結合はない。

【０３９０】

細胞毒性タンパク質「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」のリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対する「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」のIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０３９１】

ＨＥＲ２＋細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」の細胞毒性の決定

「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」バリアントの細胞毒性特性を、ＨＥＲ

２＋細胞を用いて前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、「ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨ」の選択的細胞毒性特性を、ＨＥＲ２＋細胞と比較してＨＥＲ２－細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、ＨＥＲ２＋細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にＨＥＲ２を発現する細胞と比較して細胞表面上にＨＥＲ２を発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０３９２】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【０３９３】

動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨのインビボでの効果の決定

動物モデルを用いて、新生物細胞に対する細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａと融合したαＨＥＲ２－V_HＨのインビボでの効果を決定する。様々なマウス株を用いて、細胞表面上にＨＥＲ２を発現するヒト新生物細胞のマウスへの注射から得られるマウスにおける異種移植腫瘍に対する静脈内投与後の細胞毒性タンパク質の効果を試験する。

【実施例９】

【０３９４】

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに抗体αエプスタイン・バー抗原に由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質

この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αエプスタイン・バー抗原は、エプスタイン・バー抗原に対するモノクローナル抗体（Fang C et al., J Immunol Methods 287: 21-30 (2004)）に由来し、エプスタイン・バーウイルスに感染したヒト細胞又はエプスタイン・バー抗原を発現する形質転換細胞に結合することができる免疫グロブリン型結合領域を含む。エプスタイン・バー抗原は、エプスタイン・バーウイルスに感染した細胞やがん細胞（例えば、リンパ腫及び上咽頭がん細胞）などの複数の細胞型で発現する。さらに、エプスタイン・バー感染は、他の疾患、例えば、多発性硬化症を伴う。

【０３９５】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製

免疫グロブリン型結合領域αエプスタイン・バー抗原及び志賀毒素エフェクター領域を共に連結し、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、タンパク質を形成する。例えば、融合タンパク質は、αエプスタイン・バー抗原結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。

【０３９６】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬのインビトロでの特性の決定

エプスタイン・バー抗原陽性細胞及びエプスタイン・バー抗原陰性細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーアッセイにより決定する。エプスタイン・バー抗原陽性細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・

バー：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはエプスタイン・バー抗原陰性細胞への有意な結合はない。

【０３９７】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０３９８】

細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、エプスタイン・バー抗原陽性細胞を用いて、前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、エプスタイン・バー抗原陽性細胞と比較してエプスタイン・バー抗原陰性細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、エプスタイン・バー抗原陽性細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にエプスタイン・バー抗原を発現する細胞と比較して細胞表面上にエプスタイン・バー抗原を発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０３９９】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタインバー：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【０４００】

動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬのインビボでの効果の決定

動物モデルを用いて、新生物細胞に対する細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αエプスタイン・バー：：ＫＤＥＬのインビボでの効果を決定する。様々なマウス株を用いて、細胞表面上にエプスタイン・バー抗原を発現するヒト新生物細胞のマウスへの注射から得られるマウスにおける異種移植腫瘍に対する静脈内投与後の細胞毒性タンパク質の効果を試験する。

【実施例１０】

【０４０１】

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに抗体αリーシュマニア抗原に由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質

この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αリーシュマニア抗原は、当技術分野で既知の技術を用いて生成された、細胞内トリパノソーマ原虫を保有するヒト細胞に存在する細胞表面のリーシュマニア抗原への抗体に由来する（Silveira T et al., Int J Parasitol 31: 1451-8 (2001)、Kenner J et al., J Cutan Pathol 26: 130-6 (1999)、Berman J and Dwyer, Clin Exp Immunol 44: 342-348 (1981)を参照されたい）。

【０４０２】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製

免疫グロブリン型結合領域αリーシュマニア抗原及び志賀毒素エフェクター領域を共に

連結し、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、タンパク質を形成する。例えば、融合タンパク質は、リーシュマニア抗原結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。

【０４０３】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬのインビトロでの特性の決定

リーシュマニア抗原陽性細胞及びリーシュマニア抗原陰性細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーにより決定する。リーシュマニア抗原陽性細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはリーシュマニア抗原陰性細胞への有意な結合はない。

【０４０４】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０４０５】

細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、リーシュマニア抗原陽性細胞を用いて前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、リーシュマニア抗原陽性細胞と比較してリーシュマニア抗原陰性細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、リーシュマニア抗原陽性細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にリーシュマニア抗原を発現する細胞と比較して細胞表面上にリーシュマニア抗原を発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０４０６】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αリーシュマニア：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【実施例１１】

【０４０７】

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに免疫グロブリン型結合領域αニューロテンシン受容体に由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質

この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αニューロテンシン受容体は、DARPin（商標）（GenBank受託番号：２Ｐ２Ｃ＿Ｒ）又はヒトニューロテンシン受容体と結合するモノクローナル抗体（Ovigne Ｊ et al., Neuropeptides 32: 247-56 (1998)）に由来する。ニューロテンシン受容体は、乳がん、結腸がん、肺がん、メラノーマ、及び膵臓がん細胞など様々ながん細胞で発現する。

【０４０８】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製

免疫グロブリン型結合領域αニューロテンシンＲ及び志賀毒素エフェクター領域を共に連結した、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、タンパク質を形成する。例えば、融合タンパク質は、ニューロテンシン受容体結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成した。

【０４０９】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬのインビトロでの特性の決定

ニューロテンシン受容体陽性細胞及びニューロテンシン受容体陰性細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーにより決定する。ニューロテンシン受容体陽性細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはニューロテンシン受容体陰性細胞への有意な結合はない。

【０４１０】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０４１１】

細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、ニューロテンシン受容体陽性細胞を用いて、前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、ニューロテンシン受容体陽性細胞と比較してニューロテンシン受容体陰性細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、ニューロテンシン受容体陽性細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にニューロテンシン受容体を発現する細胞と比較して細胞表面上にニューロテンシン受容体を発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０４１２】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【０４１３】

動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬのインビボでの効果の決定

動物モデルを用いて、新生物細胞に対する細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αニューロテンシンＲ：：ＫＤＥＬのインビボでの効果を決定する。様々なマウス株を用いて、細胞表面上にニューロテンシン受容体を発現するヒト新生物細胞のマウスへの注射から得られるマウスにおける異種移植腫瘍に対する静脈内投与後の細胞毒性タンパク質の効果を試験する。

【実施例１２】
【０４１４】
脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに免疫グロブリン型結合領域αＥＧＦＲに由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質
本実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクター領域である。結合領域αＥＧＦＲは、AdNectin（商標）（GenBank受託番号：３ＱＷＱ＿Ｂ）、Affibody（商標）（GenBank受託番号：２ＫＺＩ＿Ａ；米国特許第８，５９８，１１３号明細書）、又は、その全てが１又は２以上のヒト上皮増殖因子受容体に結合する抗体に由来する。上皮増殖因子受容体の発現は、例えば、肺がん細胞、乳がん細胞、及び結腸がん細胞などのヒトがん細胞と関連がある。
【０４１５】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製
免疫グロブリン型結合領域αＥＧＦＲ及び志賀毒素エフェクター領域を共に連結し、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、タンパク質を形成する。例えば、融合タンパク質は、ＥＧＦＲ結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。
【０４１６】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬのインビトロでの特性の決定
ＥＧＦＲ＋細胞及びＥＧＦＲ－細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーにより決定する。ＥＧＦＲ＋細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはＥＧＦＲ－細胞への有意な結合はない。
【０４１７】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。
【０４１８】
細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定
ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、ＥＧＦＲ＋細胞を用いて、前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、リーシュマニア抗原陽性細胞と比較してＥＧＦＲ－細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、ＥＧＦＲ＋細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にＥＧＦＲを発現する細胞と比較して細胞表面上にＥＧＦＲを発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。
【０４１９】
抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定
ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【０４２０】
動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬのインビボでの効果の決定
動物モデルを用いて、新生物細胞に対する細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥＧＦＲ：：ＫＤＥＬのインビボでの効果を決定する。様々なマウス株を用いて、細胞表面上にＥＧＦＲを発現するヒト新生物細胞のマウスへの注射から得られるマウスにおける異種移植腫瘍に対する静脈内投与後の細胞毒性タンパク質の効果を試験する。
【実施例１３】
【０４２１】
脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに抗体αＣＣＲ５に由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質
この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αＣＣＲ５は、ヒトＣＣＲ５（ＣＤ１９５）に対するモノクローナル抗体（Bernstone L et al., Hybridoma 31: 7-19 (2012)）に由来する。ＣＣＲ５は主に、Ｔ細胞、マクロファージ、樹状細胞、及びミクログリアで発現する。さらに、ＣＣＲ５はヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ、human immunodeficiency virus）の発症及び蔓延に影響を与える。
【０４２２】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製
免疫グロブリン型結合領域αＣＣＲ５及び志賀毒素エフェクター領域を共に連結し、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、タンパク質を形成する。例えば、融合タンパク質は、αＣＣＲ５結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。

【０４２３】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５のインビトロでの特性の決定
ＣＣＲ５＋細胞及びＣＣＲ５－細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーにより決定する。ＣＣＲ５＋陽性細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはＣＣＲ５－細胞への有意な結合はない。
【０４２４】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。
【０４２５】
細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定
ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、ＣＣＲ５＋細胞を用いて前記の実施例において上記ように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、ＣＣＲ５＋細胞と比較してＣＣＲ５－細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、ＣＣＲ５＋細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にＣＣＲ５を発現する細胞と比較して細胞表面上にＣＣＲ５を発現しない細胞について約１０～１０，００

０倍高い（細胞毒性が低い）。
【０４２６】
抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定
ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。
【０４２７】
動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬのインビボでの効果の決定
動物モデルを用いて、ドナー材料のＴ細胞を枯渇し（Tsirigotis P et al., Immunotherapy 4: 407-24 (2012)を参照されたい）、細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬのインビボでの効果を決定する。非ヒト霊長類を用いて、ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５のインビボでの効果を決定する。ドナー臓器をＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬで前処理したとき（Weaver T et al., Nat Med 15: 746-9 (2009)を参照されたい）、腎臓移植後のアカゲザルの移植片対宿主病について分析する。異なる用量のＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬの非経口投与後、霊長類カニクイザルの末梢血Ｔリンパ球のインビボでの枯渇を観察する。ＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬを使用したＨＩＶ感染の阻害は、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ、simian immunodeficiency virus）にさらされたときに循環するＴ細胞を大きく枯渇させるために、非ヒト霊長類に急性用量のＳＬＴ－１Ａ：：αＣＣＲ５：：ＫＤＥＬを与えることによって試験する（Sellier P et al., PLoS One 5: e10570 (2010)を参照されたい）。
【実施例１４】
【０４２８】
脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに抗Ｅｎｖ免疫グロブリンドメインに由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質
この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素のＡサブユニット（ＳｔｘＡ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αＥｎｖは、ＧＰ４１、ＧＰ１２０、ＧＰ１４０、又はＧＰ１６０（例えば、Chen W et al., J Mol Bio 382: 779-89 (2008)、Chen W et al., Expert Opin Biol Ther 13: 657-71 (2013)、van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10: 102 (2013)を参照されたい）などのＨＩＶエンベロープ糖タンパク質（Ｅｎｖ）に結合する既存の抗体、又は標準的な技術を用いて生成された抗体（Prabakaran et al., Front Microbiol 3: 277 (2012)を参照されたい）に由来する。ＥｎｖはＨＩＶ複製中のＨＩＶ感染細胞の細胞表面に提示される、ＨＩＶ表面タンパク質である。Ｅｎｖは、主に感染細胞のエンドソーム区画に発現するが、本発明の強力な細胞毒性タンパク質によって、十分な量のＥｎｖが標的とされる細胞表面に存在させることができる。さらに、Ｅｎｖ標的細胞毒性タンパク質は、ＨＩＶビリオンと結合でき、ビリオンと宿主細胞が融合する間に、感染細胞に新たに進入することができる。
【０４２９】
ＨＩＶが高割合の変異を提示するので、複数株のＨＩＶのＥｎｖに結合する広域中和抗体（van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10: 102 (2013)）などの、Ｅｎｖの機能的束縛部分に結合する免疫グロブリンドメインを使用することが好ましい。感染細胞の表面に存在するＥｎｖは立体的に制限されたエピトープを提示するとされているので（Chen W et al., J Virol 88: 1125-39 (2014)）、ｓｄＡｂ又はV_HＨドメインなどの１００ｋＤより小さい、理想的には２５ｋＤより小さいものを使用することが好ましい。
【０４３０】
細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製
免疫グロブリン型結合領域αＥｎｖ及び志賀毒素エフェクター領域を共に連結し、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、細胞毒性タンパク質を形成する。例

えば、融合タンパク質は、αＥｎｖ結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。

【０４３１】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬのインビトロでの特性の決定

Ｅｎｖ＋細胞及びＥｎｖ－細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーにより決定する。Ｅｎｖ＋陽性細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはＥｎｖ－細胞への有意な結合はない。

【０４３２】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０４３３】

細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、Ｅｎｖ＋細胞を用いて前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、Ｅｎｖ＋細胞と比較してＥｎｖ－細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株及び／又は細胞に感染して、細胞をＥｎｖ＋にするのに使用されるＨＩＶ株に応じて、Ｅｎｖ＋細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にＥｎｖを発現する細胞と比較して細胞表面上にＥｎｖを発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０４３４】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【０４３５】

動物モデルを使用した細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬのインビボでの効果の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬを使用したＨＩＶ感染の阻害は、サル免疫不全ウイルス（ＳＩＶ）に感染した非ヒト霊長類（Sellier P et al., PLoS One 5: e10570 (2010)を参照されたい）に、ＳＬＴ－１Ａ：：αＥｎｖ：：ＫＤＥＬを投与することによって試験する。

【実施例１５】

【０４３６】

脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチド、並びに抗体αＵＬ１８抗体に由来する結合領域を含む細胞毒性タンパク質

この実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、志賀毒素様毒素１のＡサブユニット（ＳＬＴ－１Ａ）に由来し、前の実施例で説明した１又は２以上の脱免疫化アミノ酸置換を含む脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。免疫グロブリン型結合領域αＵＬ１８は、当技術分野で既知の技術を用いて、細胞表面サイトメガロウイルス

タンパク質ＵＬ１８に生成され、サイトメガロウイルスに感染したヒト細胞に存在する（Yang Z, Bjorkman P, Proc Natl Acad Sci USA 105: 10095-100 (2008)）。ヒトサイトメガロウイルス感染は、様々ながん及び炎症性障害を伴う。

【０４３７】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬの構築、産生、及び精製

免疫グロブリン型結合領域αＵＬ１８及び志賀毒素エフェクター領域を共に連結し、カルボキシ末端にＫＤＥＬ（配列番号：６０）を付加し、タンパク質を形成する。例えば、融合タンパク質は、αＵＬ１８結合タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬをコードするポリヌクレオチドを発現させることによって産生される。細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬの発現を、前記の実施例において記載したように、細菌及び／又は無細胞のいずれかのタンパク質翻訳系を用いて達成する。

【０４３８】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬのインビトロでの特性の決定

サイトメガロウイルスＵＬ１８陽性細胞及びサイトメガロウイルスＵＬ１８陰性細胞に対する、本実施例の細胞毒性タンパク質の結合特性は、蛍光に基づくフローサイトメトリーにより決定する。サイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８陽性細胞へのＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬのB_{max}は約５０，０００～２００，０００ＭＦＩ、K_Dは０．０１～１００ｎＭである一方、このアッセイにおいてはサイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８陰性細胞への有意な結合はない。

【０４３９】

細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬのリボソーム不活性化能力を、前記の実施例において上記のように、無細胞のインビトロでのタンパク質翻訳において決定する。無細胞タンパク質合成に対する本実施例の細胞毒性タンパク質の阻害効果は有意である。この無細胞アッセイにおけるタンパク質合成に対するＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬのIC_{50}は約０．１～１００ｐＭである。

【０４４０】

細胞殺滅アッセイを用いた細胞毒性タンパク質ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬの細胞毒性の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬの細胞毒性特性を、サイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８陽性細胞を用いて、前記の実施例において上記のように、一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。さらに、ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬの選択的細胞毒性特性を、サイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８陽性細胞と比較してサイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８陰性細胞を用いる同じ一般的な細胞殺滅アッセイにより決定する。本実施例の細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞株に応じて、サイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８陽性細胞について約０．０１～１００ｎＭである。細胞毒性タンパク質のCD_{50}は、細胞表面上にサイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８を発現する細胞と比較して細胞表面上にサイトメガロウイルスタンパク質ＵＬ１８を発現しない細胞について約１０～１０，０００倍高い（細胞毒性が低い）。

【０４４１】

抗原性及び／又は免疫原性の低下の決定

ＳＬＴ－１Ａ：：αＵＬ１８：：ＫＤＥＬの相対的な脱免疫化を、実施例４及び６で説明したようなウェスタン分析、ＥＬＩＳＡ分析、及びマウスモデルを使用して、野生型志賀毒素エフェクター領域ポリペプチドに関して決定した。

【実施例１６】

【０４４２】

様々な細胞型を標的化する脱免疫化された細胞毒性タンパク質

本実施例において、志賀毒素エフェクター領域は、上記Ｂ細胞エピトープ領域の任意の組合せが破壊された、志賀様毒素１、志賀毒素、及び／又は志賀様毒素２のＡサブユニッ

ト（ＳＬＴ－１Ａ、ＳｔｘＡ、ＳＬＴ－２Ａ）に由来する、脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドである。結合領域は表１２の第１列から選択される分子の免疫グロブリンドメインに由来し、表１２の第２列に示される細胞外標的生体分子と結合する。本実施例の例示的細胞毒性タンパク質は、カルボキシ末端にＫＤＥＬ型シグナルモチーフを有し及び／又は当技術分野で既知の試薬及び技術を用いて作製していてもよい。本実施例の例示的細胞毒性タンパク質は、前記の実施例において記載したように、適切な細胞外標的生体分子を発現する細胞を用いて試験される。本実施例の例示的タンパク質は、例えば、表１２の第３列に示される疾患、状態、及び／又は障害を診断及び治療するために用いることができる。

【０４４３】

【表１４】

表12.細胞毒性タンパク質の細胞標的化のための様々な結合領域

結合領域の起源	細胞外標的	適用
アレムツズマブ	CD52	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
バシリキシマブ	CD25	臓器移植拒絶の予防などのT細胞障害、及びいくつかのB細胞系列のがん
ブレンツキシマブ	CD30	血液のがん、B細胞関連免疫障害、及びT細胞関連免疫障害
カツマキソマブ	EpCAM	卵巣がん、悪性腹水、胃がんなどの様々ながん
セツキシマブ	EGFR	結腸直腸がん及び頭頸部がんなどの様々ながん
ダクリズマブ	CD25	B細胞系列のがん及び臓器移植の拒絶などのT細胞障害
ダラツムマブ	CD38	血液のがん、B細胞関連免疫障害、及びT細胞関連免疫障害
ジヌツキシマブ	ガングリオシドGD2	乳がん、骨髄がん、及び神経芽腫などの様々ながん
エファリズマブ	LFA-1 (CD11a)	乾癬などの自己免疫疾患
エリツマキソマブ	HER2/neu	乳がん及び結腸直腸がんなどの様々ながん及び腫瘍
ゲムツズマブ	CD33	骨髄がん又は免疫障害
イブリツモマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
イピリムマブ	CD152	T細胞関連障害及び白血病、メラノーマなどの様々ながん
ムロモナブ	CD3	臓器移植拒絶の予防

ナタリズマブ	インテグリンα4	多発性硬化症及びクローン病などの自己免疫疾患
オビヌツズマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
オカラツズマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
オクレリズマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
オファツムマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
パリビズマブ	呼吸器合胞体ウイルスのFタンパク質	呼吸器合胞体ウイルスの治療
パニツムマブ	EGFR	結腸直腸がん及び頭頸部がんなどの様々ながん
ペルツズマブ	HER2/neu	乳がん及び結腸直腸がんなどの様々ながん及び腫瘍
pro 140	CCR5	HIV感染及びT細胞障害
ラムシルマブ	VEGFR2	様々ながん及び固形腫瘍などのがん関連障害
リツキシマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
トシリズマブ又はアトリズマブ	IL-6受容体	リウマチ様関節炎などの自己免疫疾患
トシツモマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
トラスツズマブ	HER2/neu	乳がん及び結腸直腸がんなどの様々ながん及び腫瘍
ウブリツキシマブ	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自

		己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
ベドリズマブ	インテグリンα4β7	クローン病及び潰瘍性大腸炎などの自己免疫疾患
CD20結合scFv Geng S et al., *Cell Mol Immunol* 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al., *Protein Eng Des Sel* 23: 243-9 (2010)	CD20	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
CD22結合scFv Kawas S et al., *MAbs* 3 : 479-86 (2011)	CD22	B細胞がん又はB細胞関連免疫障害
CD25結合scFv Muramatsu H et al., *Cancer Lett* 225: 225-36 (2005)	CD25	B細胞系列の様々ながん及びT細胞と関連する免疫障害
CD30結合モノクローナル抗体 Klimka A et al., *Br J Cancer* 83: 252-60 (2000)	CD30	B細胞がん又はB細胞/T細胞関連免疫障害
CD33結合モノクローナル抗体 Benedict C et al., *J Immunol Methods* 201: 223-31 (1997)	CD33	骨髄がん又は免疫障害
CD38結合免疫グロブリンドメイン 米国特許第8,153,765号明細書	CD38	血液のがん、B細胞関連免疫障害、及びT細胞関連免疫障害
CD40結合scFv Ellmark P et al., *Immunology* 106: 456-63 (2002)	CD40	様々ながん及び免疫障害
CD52結合モノクローナル抗体 米国特許第7,910,104B2号明細書	CD52	リンパ腫及び白血病などのB細胞がん、並びに自己免疫疾患などのB細胞関連免疫障害
CD56結合モノクローナル抗体 Shin J et al., *Hybridoma* 18: 521-7 (1999)	CD56	免疫障害、及び肺がん、メルケル細胞癌、骨髄腫などの様々ながん
CD79結合モノクローナル抗体 Zhang L et al., *Ther Im*	CD79	B細胞がん又はB細胞関連免疫障害

munol 2: 191-202 (1995)		
CD248結合scFv Zhao A et al., *J Immunol Methods* 363: 221-32 (2011)	CD248	血管新生の阻害などの様々ながん
EpCAM結合モノクローナル抗体 Schanzer J et al., *J Immunother* 29: 477-88 (2006)	EpCAM	卵巣がん、悪性腹水、胃がんなどの様々ながん
PSMA結合モノクローナル抗体 Frigerio B et al., *Eur J Cancer* 49: 2223-32 (2013)	PSMA	前立腺がん
Eph-B2結合モノクローナル抗体 Abengozar M et al., *Blood* 119: 4565-76 (2012)	Eph-B2	結腸直腸がん及び前立腺がんなどの様々ながん
エンドクリン結合モノクローナル抗体 Volkel T et al., *Biochim Biophys Res Acta* 1663: 158-66 (2004)	エンドクリン	乳がん及び結腸直腸がんなどの様々ながん
FAP結合モノクローナル抗体 Zhang J et al., *FASEB J* 27: 581-9 (2013)	FAP	肉腫及び骨のがんなどの様々ながん
CEA結合抗体及びscFv Neumaier M et al., *Cancer Res* 50: 2128-34 (1990); Pavoni E et al., *BMC Cancer* 6: 4 (2006); Yazaki P et al., *Nucl Med Biol* 35: 151-8 (2008); Zhao J et al., *Oncol Res* 17: 217-22 (2008)	CEA	消化器がん、膵臓がん、肺がん、及び乳がんなどの様々ながん
CD24結合モノクローナル抗体 Kristiansen G et al., *Lab Invest* 90: 1102-16 (2010)	CD24	膀胱がんなどの様々ながん
LewisY抗原結合scFv Power B et al., *Protein Sci* 12: 734-47 (2003); モノクローナル抗体B	LewisY抗原	子宮頸がん及び子宮がんなどの様々ながん

R96 Feridani A et al., *Cytometry* 71: 361-70 (2007)		
アダリムマブ	TNF-α	様々ながん、及びリウマチ様関節炎、クローン病、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、若年性特発性関節炎、新生児溶血性疾患などの免疫障害
アフェリモマブ	TNF-α	様々ながん及び免疫障害
ald518	IL-6	様々ながん及びリウマチ様関節炎などの免疫障害
アンルキンズマブ又はima-638	IL-13	様々ながん及び免疫障害
ブリアキヌマブ	IL-12, IL-23	様々ながん、及び乾癬、リウマチ様関節炎、炎症性腸疾患、多発性硬化症などの免疫障害
ブロダルマブ	IL-17	様々ながん及び炎症性疾患などの免疫障害
カナキヌマブ	IL-1	様々ながん及びリウマチ様関節炎などの免疫障害
セルトリズマブ	TNF-α	様々ながん、及びクローン病などの免疫障害
フェザキヌマブ	IL-22	様々ながん、及びリウマチ様関節炎、乾癬などの免疫障害
ガニツマブ	IGF-I	様々ながん
ゴリムマブ	TNF-α	様々ながん、及びリウマチ様関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、免疫障害
インフリキシマブ	TNF-α	様々ながん、及びリウマチ様関節炎、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎などの免疫障害
イクセキズマブ	IL-17A	様々ながん及び自己免疫疾患などの免疫障害
メポリズマブ	IL-5	様々な免疫障害及びB細胞がんなどのがん
ネレリモマブ	TNF-α	様々ながん及び免疫障害

オロキズマブ	IL6	様々ながん及び免疫障害
オゾラリズマブ	TNF-α	炎症
ペラキズマブ	IL17A	様々ながん及び関節炎などの免疫障害
プラクルマブ	ヒトTNF	様々な免疫障害及びがん
サリルマブ	IL6	様々ながん、及びリウマチ様関節炎、強直性脊椎炎などの免疫障害
シルツキシマブ	IL-6	様々ながん及び免疫障害
シルクマブ	IL-6	様々ながん及びリウマチ様関節炎などの免疫障害
タバルマブ	BAFF	B細胞がん
チシリムマブ又はトレメリムマブ	CTLA-4	様々ながん
チルドラキズマブ	IL23	免疫介在性炎症性障害
tnx-650	IL-13	B細胞がんなどの様々ながん及び免疫障害
トシリズマブ又はアトリズマブ	IL-6受容体	様々ながん及びリウマチ様関節炎などの免疫障害
ウステキヌマブ	IL-12, IL-23	様々ながん、及び多発性硬化症、乾癬、乾癬性関節炎などの免疫障害
様々な増殖因子: VEGF, EGF1, EGF2, FGF	VEGFR, EGFR, FGFR	乳がん及び結腸がんなどの様々ながん、並びに血管新生の阻害
様々なサイトカイン: IL-2, IL-6, IL-23, CCL2, BAFFs, TNFs, RANKL	IL-2R, IL-6R, IL-23R, CD80/CD86, TNFRSF13/TNFRSF17, TNFR	様々な免疫障害及びがん
患者の試料から同定された広域中和抗体 Prabakaran et al., *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	血球凝集素及びインフルエンザマトリックスタンパク質2などのインフルエンザ表面抗原	ウイルス感染
患者の試料から同定された広域中和抗体 Prabakaran et al., *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	コロナウイルス表面抗原	ウイルス感染
患者の試料から同定された広域中和抗体 Prabakaran et al., *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	ヘニパウイルス表面抗原	ウイルス感染

【０４４４】

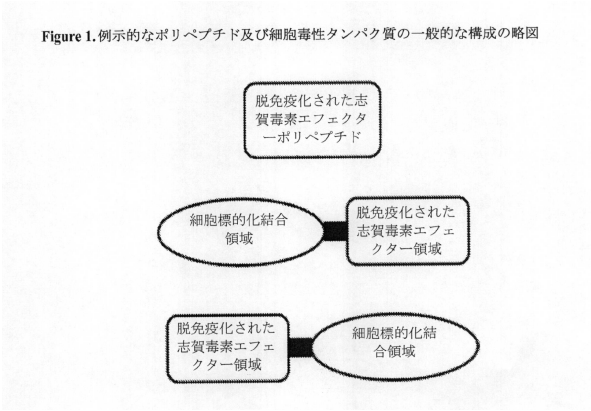
本発明のいくつかの実施形態を例示によって説明してきたが、本発明を多くの改変、変更及び適合化と共に実行することができ、本発明の精神から逸脱するか、又は特許請求の範囲を超えることなく、いくつかの等価物又は代替的な解決法の使用が当業者の範囲内にあることが明らかである。

【０４４５】

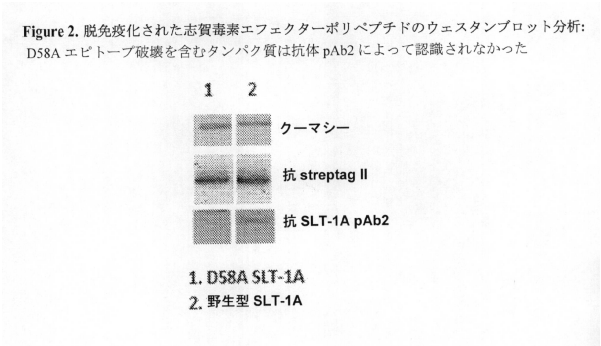
全ての刊行物、特許、及び特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物、特許又は特許出願の全体が参照により組み込まれると具体的かつ個別的に示されたのと同程度に、その

全体が参照により本明細書に組み込まれる。米国仮特許出願第６１／７７７，１３０号明細書、第６１／９３２，０００号明細書、第６１／９５１，１１０号明細書、第６１／９５１，１２１号明細書、第６２／０１０，９１８号明細書、及び第６２／０４９，３２５号明細書の開示はそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる。国際公開第２０１４１６４６８０号及び国際公開第２０１４１６４６９３号の開示はそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる。本明細書で引用されるアミノ酸及び核酸配列に関するGenBank（National Center for Biotechnology Information、U.S.）からの全ての電子的に利用可能な生物学的配列情報の完全な開示は、その全体が参照により組み込まれる。

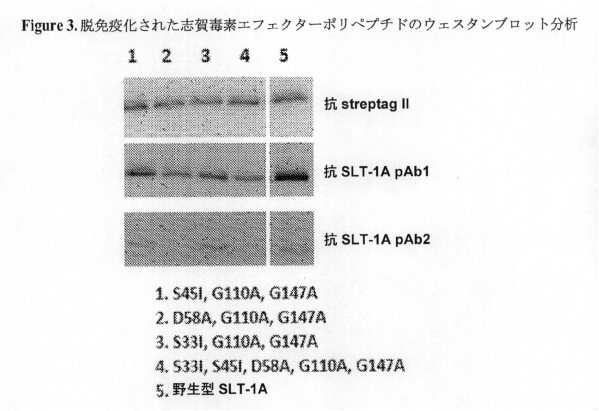
【図１】



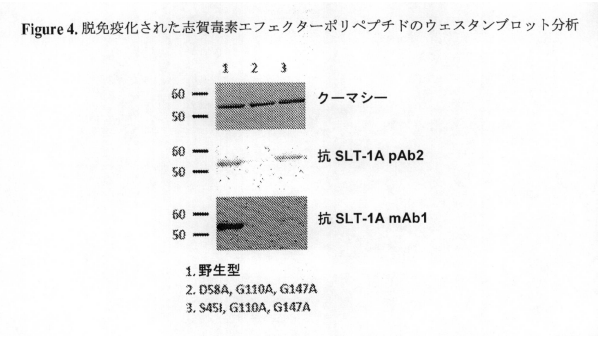
【図２】



【図３】

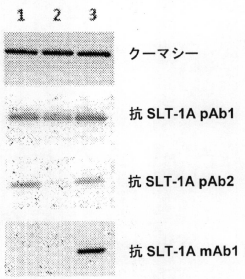


【図４】



【図５】

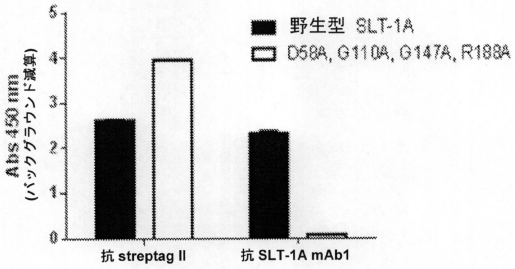
Figure 5. 脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドのウェスタンブロット分析



1. D183A, D184A, R188A
2. D58A, G110A, G147A, R188A
3. 野生型 SLT-1A

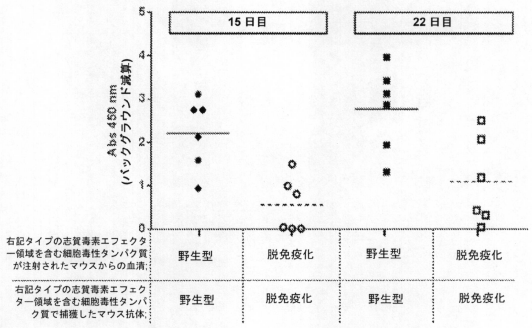
【図６】

Figure 6. 脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドの ELISA 分析



【図７】

Figure 7. 相対的なインビボでの抗細胞毒性タンパク質、抗体応答:
例示的な脱免疫化された志賀毒素エフェクターポリペプチドを含む本発明の細胞毒性タンパク質と野生型志賀毒素エフェクター領域を含む細胞毒性タンパク質との比較



【配列表】

0006646584000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02	
Ａ６１Ｐ	*31/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ	*11/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	11/06	
Ａ６１Ｐ	*1/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ	*3/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ	*37/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｐ	*5/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	5/14	
Ａ６１Ｐ	*31/18*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18	
Ａ６１Ｐ	*25/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00	
Ａ６１Ｐ	*9/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00	
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06	
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１
Ａ６１Ｐ	*17/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/00	

(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真
(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子
(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一
(74)代理人 100198074
弁理士 山村 昭裕
(74)代理人 100145920
弁理士 森川 聡
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(72)発明者 ポーマ エリック
アメリカ国 ニューヨーク１００１４ ニューヨーク クリストファーストリート １６５
(72)発明者 ウィラート エリン
アメリカ国 テキサス７８６８１ ラウンドロック モッキングバードドライブ ２２３０
(72)発明者 ロビンソン ガレット リー
アメリカ国 テキサス７８７２９ オースティン ＃９１３ アンダーソンミルロード ８６０１
(72)発明者 ラジャゴパラン サンギータ
アメリカ国 テキサス７８６６５ ラウンドロック ウエストメドウトレイル １５２４
(72)発明者 ブリシュケ ブリジット
アメリカ国 テキサス７８７０２ オースティン カストロストリート ３１０２

審査官 松本 淳

(56)参考文献 特表２０１２－５１５５５１（ＪＰ，Ａ）
特表平１１－５０７３８９（ＪＰ，Ａ）
Abstract 1380: Engineered toxin bodies with specific activity against EGFR and HER2 expressing cells, Cancer Res 2011;71(8 Suppl):Abstract nr 1380, ２０１１年 ４月, インターネット<http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/8_Supplement/1380>, 検索日:2018-12-14
CD20-Specific Engineered Toxin Body Demonstrates Direct Cell Kill Of Multiple B-Cell N

on-Hodgkin's L, Blood Volume: 122 Issue: 21 Pages: 5152, ２０１３年　4月, インターネット<http://www.bloodjournal.org/content/122/21/5152>, 検索日:2018-12-14

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ