(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112851769 A
(43)申请公布日 2021.05.28

(21)申请号 202110072027.1
(22)申请日 2015.01.26
(30)优先权数据
61/932,000 2014.01.27 US
62/049,325 2014.09.11 US
(62)分案原申请数据
201580015672.2 2015.01.26
(71)申请人 分子模板公司
地址 美国德克萨斯州
(72)发明人 埃里克·波马 埃林·威勒特
加勒特·李·鲁滨逊
桑吉萨·拉贾戈帕兰
布丽吉特·布里斯克
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 张莹
(51)Int.Cl.
C07K 14/25(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

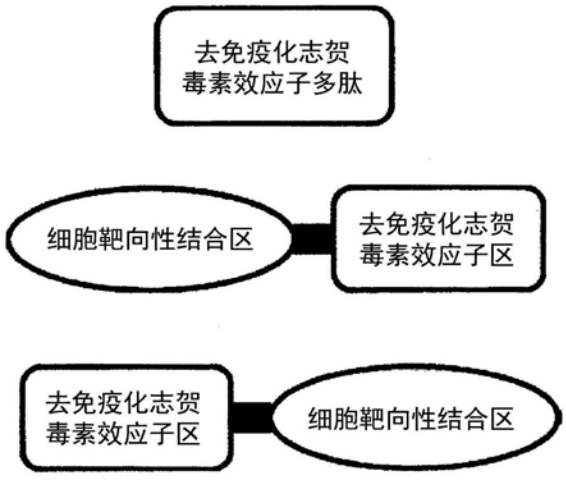
权利要求书4页 说明书115页
序列表116页 附图4页

(54)发明名称

用于哺乳动物中的去免疫化志贺毒素A亚基效应子多肽

(57)摘要

本发明涉及具有减少的抗原性和/或免疫原性潜力的志贺毒素效应子多肽。免疫原性可能是向哺乳动物反复施用志贺毒素来源的蛋白和多肽的限制。本发明的志贺毒素效应子多肽具有作为治疗剂、诊断剂和免疫物质的成分的用途。本发明的细胞毒性蛋白具有选择性杀伤特定细胞类似和作为治疗多种疾病的治疗剂的用途，所述疾病包括癌症、免疫病症和微生物感染。本发明的蛋白还具有用于检测特定细胞类型、收集诊断信息和监测多种疾病的治疗的用途，所述疾病诸如例如癌症、免疫病症和微生物感染。



CN 112851769 A

1.包含志贺毒素效应子区的去免疫化多肽,其中:

(i)所述志贺毒素效应子区与选自下述的野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性:

SEQ ID NO:1的氨基酸残基75至251,

SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至241,

SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至251,和

SEQ ID NO:1的氨基酸残基1至261;

并且其中,与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比,所述志贺毒素效应子区包含选自下述的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少两个表位区中的至少一个氨基酸残基的置换:SEQ ID NO:1的1-15;SEQ ID NO:1的27-37;SEQ ID NO:1的39-48;SEQ ID NO:1的53-66;SEQ ID NO:1的94-115;SEQ ID NO:1的141-153;SEQ ID NO:1的179-190;SEQ ID NO:1的205;SEQ ID NO:1的243-257;和SEQ ID NO:1的254-268;

其中,与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:K1M,T4I,S8I,T9I,K11A,K11H,S33I,S45I,S45V,N48V,N48F,D53A,D53G,D53N,R55A,R55V,R55L,I57F,D58A,D58F,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,S247I,R248A或R251A;

或

(ii)所述志贺毒素效应子区与选自下述的野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列具有至少95%氨基酸序列同一性:

SEQ ID NO:2的氨基酸残基75至251,

SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至241,

SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至251,和

SEQ ID NO:2的氨基酸残基1至261;

并且其中,与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比,所述志贺毒素效应子区包含选自下述的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少两个表位区中的至少一个氨基酸残基的置换:SEQ ID NO:2的1-15;SEQ ID NO:2的27-37;SEQ ID NO:2的39-48;SEQ ID NO:2的53-66;SEQ ID NO:2的94-115;SEQ ID NO:2的141-153;SEQ ID NO:2的179-190;SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:2的243-257;和SEQ ID NO:2的254-268;

其中,与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:K1M,T4I,S8I,T9I,K11A,K11H,S33I,T45I,T45V,N48V,N48F,D53A,D53G,D53N,R55A,R55V,R55L,I57F,D58A,D58F,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,S247I,R248A或R251A;

其中所述志贺毒素效应子区与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比具有降低的抗原性和/或免疫原性;和

其中所述志贺毒素效应子区能够表现出选自细胞内化、亚细胞按路线发送、催化活性和细胞毒性的志贺毒素效应子功能。

2.权利要求1(i)的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比

的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:S45I;R55A,R55V或R55L;I57F;P59F;E60I,E60T或E60R;E61A,E61V或E61L;G110A;R188A或R188L;R248A和/或R251A。

3.权利要求2的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:S45I,R55L,E60T,E61L,G110A和R188A。

4.权利要求3的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换进一步包括下述氨基酸置换:I57F和/或P59F。

5.权利要求4的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:S45I,R55L,I57F,P59F,E60T,E61L,G110A,R188A,C242S,R248A和R251A。

6.权利要求1(ii)的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:

T45I;R55A,R55V或R55L;I57F;P59F;E60I,E60T或E60R;E61A,E61V或E61L;G110A;R188A或R188L;R248A和/或R251A。

7.权利要求6的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:T45I,R55L,E60T,E61L,G110A和R188A。

8.权利要求7的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换进一步包括下述氨基酸置换:I57F和/或P59F。

9.权利要求8的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比的所述氨基酸置换包括下述氨基酸置换:T45I,R55L,I57F,P59F,E60T,E61L,G110A,R188A,C242S,R248A和R251A。

10.权利要求1的去免疫化多肽,其中与所述野生型志贺毒素A亚基氨基酸序列相比,所述志贺毒素效应子区进一步包含氨基酸置换C242S。

11.一种蛋白,其包含:

a)权利要求1-10中任一项的去免疫化多肽,和

b)能够特异性结合至少一种细胞外靶标生物分子的结合区。

12.权利要求11的蛋白,其中所述结合区包含选自下述的多肽:

互补决定区3片段,限制的FR3-CDR3-FR4多肽,单结构域抗体片段,单链可变片段,抗体可变片段,抗原结合片段,Fd片段,纤连蛋白-来源的第10个纤连蛋白III型结构域,生腱蛋白III型结构域,锚蛋白重复基序结构域,低密度脂蛋白受体来源的A-结构域,脂质运载蛋白,Kunitz结构域,蛋白-A-来源的Z结构域,γ-B结晶来源的结构域,泛蛋白-来源的结构域,Sac7d-来源的多肽,Fyn-来源的SH2结构域,小蛋白,C-型凝集素-样结构域支架,以及任何前述物质的保留结合功能性的任何遗传操作的对应物。

13.权利要求11或权利要求12的蛋白,其中所述蛋白施用给与被所述结合区结合的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞引起所述细胞的死亡。

14.权利要求13的蛋白,其中通过将所述细胞外靶标生物分子或其部分与细胞外部关联的共价和/或非共价分子间相互作用,所述细胞与细胞外靶标生物分子物理上偶联;或其中所述细胞外靶标生物分子是所述细胞表达的嵌膜蛋白或周围膜蛋白。

15.权利要求11或12的蛋白,其中所述结合区能够结合选自由下述组成的组的细胞外靶标生物分子:

CD20,CD22,CD40,CD79,CD25,CD30,HER2/neu/ErbB2,EGFR,EpCAM,EphB2,前列腺特异性的膜抗原,Cripto,内皮因子/CD105,成纤维细胞活化蛋白,Lewis-Y,CD19,CD21,CS1/SLAMF7,CD33,CD52,gpA33,粘蛋白,TAG-72,碳酸酐酶IX,叶酸结合蛋白,神经节苷脂GD2,神经节苷脂GD3,神经节苷脂GM2,神经节苷脂Lewis-Y2,VEGFR,αVβ3,α5β1,ErbB1/EGFR,Erb3,c-MET,IGF1R,EphA3,TRAIL-R1,TRAIL-R2,RANKL,生腱蛋白,CD64,间皮素,BRCA1,酪氨酸酶,TRP-1,TRP-2,MAGE-1,MAGE-3,GAGE-1/2,BAGE,RAGE,NY-ESO-1,CDK-4,β-连环蛋白,MUM-1,胱天蛋白酶-8,KIAA0205,HPVE6,SART-1,PRAME,癌胚抗原,前列腺特异性抗原,前列腺干细胞抗原,人天冬氨酰基(天冬酰胺酰基)β-羟化酶,EphA2,HER3/ErbB-3,MUC1,MART-1/MelanA,gp100,酪氨酸酶相关的抗原,HPV-E7,EB病毒抗原,Bcr-Abl,甲胎蛋白抗原,17-A1,膀胱肿瘤抗原,CD38,CD15,CD23,CD53,CD88,CD129,CD183,CD191,CD193,CD244,CD294,CD305,C3AR,半乳凝素-9,mrp-14,Siglec-8,Siglec-10,CD49d,CD13,CD44,CD54,CD63,CD69,CD123,TLR4,FceRIa,IgE,CD107a,CD203c,CD14,CD68,CD80,CD86,CD115,F4/80,ILT-3,半乳凝素-3,CD11a-c,GITRL,MHC II类,CD284-TLR4,CD107-Mac3,CD195-CCR5,HLA-DR,CD16/32,CD282-TLR2,CD11c,以及前述任一种的任意免疫原性片段。

16.权利要求11或权利要求12的蛋白,其包含以下所示的多肽或由以下所示的多肽组成:SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:58,或SEQ ID NO:59。

17.权利要求11或权利要求12的蛋白,其连接至选自下述任一种的另外的外源物质:肽、蛋白、检测促进剂、小分子化学治疗剂和多核苷酸。

18.权利要求17的蛋白,其中所述另外的外源物质是包含抗原的肽或蛋白。

19.权利要求11或权利要求12的蛋白,其为同型多聚体或异型多聚体形式。

20.权利要求11或权利要求12的蛋白,其为药用溶剂化物或盐的形式。

21.药物组合物,其包含权利要求1-10中任一项的去免疫化多肽或权利要求11-20中任一项的蛋白,和至少一种药用赋形剂或载体。

22.权利要求21的药物组合物,其中至少一种药用载体包括溶剂、分散介质、包衣如卵磷脂、抗微生物剂、等渗剂或吸收延缓剂;

和/或其中所述药物组合物还包含水性或非水载体;表面活性剂;稳定剂,防腐剂,缓冲液,抗氧化剂,润湿剂,乳化剂;和/或抗菌剂或抗真菌剂。

23.编码权利要求1-10中任一项的去免疫化多肽或权利要求11-20中任一项的蛋白的多核苷酸。

24.包含权利要求23的多核苷酸的表达载体。

25.包含权利要求23的多核苷酸或权利要求24的表达载体的宿主细胞。

26.权利要求1-10中任一项的去免疫化多肽,权利要求11-20中任一项的蛋白,或权利要求21或22的药物组合物在制备用于治疗患者中的疾病、病症或病患的药物中的用途。

27.权利要求26的用途,其中所述疾病、病症或病患选自癌症、肿瘤、生长异常、免疫病症和微生物感染。

28.权利要求27的用途,其中所述癌症选自骨癌、乳腺癌、中枢/周围神经系统癌症、胃肠癌、生殖细胞癌、腺癌、头颈癌、血液学癌症、肾-尿道癌、肝癌、肺/胸膜癌、前列腺癌、肉瘤、皮肤癌和子宫癌;

或其中所述免疫病症与选自下述的疾病有关:淀粉样变性、强直性脊柱炎、哮喘、克罗恩病、糖尿病、移植排斥、移植物抗宿主病、桥本甲状腺炎、溶血性尿毒性综合征、HIV相关的疾病、红斑狼疮、多发性硬化、多动脉炎、银屑病、银屑病关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、脓毒性休克、舍格伦综合征、溃疡性结肠炎和血管炎。

29.包含权利要求1-10中任一项的去免疫化多肽或权利要求11-20中任一项的蛋白的组合物,所述组合物用于癌症、肿瘤、生长异常、免疫病症或微生物感染的治疗或预防。

30.权利要求1-10中任一项的去免疫化多肽在制备用于哺乳动物免疫或接种的免疫原中的用途。

用于哺乳动物中的去免疫化志贺毒素A亚基效应子多肽

[0001] 本申请是申请日为2015年1月26日、申请号为201580015672.2、发明名称为“用于哺乳动物中的去免疫化志贺毒素A亚基效应子多肽”的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及由天然存在的志贺毒素的A亚基来源的去免疫化志贺毒素效应子多肽。本发明的多肽单独的或作为分子(例如,治疗剂)的成分施用给需要减少相关的免疫应答的哺乳动物是有益的。例如,本发明的多肽可以用作特异性靶向的分子(例如,免疫毒素和配体-毒素融合体)的成分,用于特定细胞类型的靶向杀伤。本发明的蛋白具有,例如,作为治疗剂和诊断剂的成分的用途,用于诊断、预后和治疗多种疾病、病症和病况,包括癌症、肿瘤、免疫病症和微生物感染。

[0003] 背景

[0004] 已经通过合理改变毒素的结构、特征和生物学活性合成改造志贺毒素以用于医学应用(例如,参见US7713915,EP1051482,EP1727827,EP1945660;申请:US2009/0156417 A1,EP2228383 B1,EP2402367 A1,US2013/0196928 A1,WO 2014164680,WO 2014164693,US61/951,110;US61/951,121,它们通过引用分别完全结合在本文中)。即使截短或融合到其他蛋白结构域上,志贺毒素A亚基也是稳定的、有酶活性和细胞毒性的(Haddad J等,J Bacteriol 175:4970-8(1993);A1-Jaufy A等,Infect Immun 62:956-60(1994);A1-Jaufy A等,Infect Immun 63:3073-8(1995);LaPointe P等,J Biol Chem 280:23310-18(2005);Di R等,Toxicon 57:535-39(2011))。这些志贺毒素A亚基-来源的多肽可以通过化学缀合或重组蛋白改造连接或融合到免疫球蛋白结构域或受体配体上,以产生靶向细胞的治疗分子。所述分子改造的一个目的是设计具有下述双重功能性的嵌合分子:1)在系统性施用后,将毒素递送至生物体内的特定细胞类型或位置;和2)利用在真核细胞中有效的强细胞毒性机制实现针对特定细胞的靶向细胞毒性。

[0005] 涉及由非人来源合成改造的蛋白的治疗应用的一种主要的限制是免疫原性。当体内施用分子时,由该分子的抗原性表位诱导抗体和/或免疫应答的能力导致抗原性和/或免疫原性。详细大部分的治疗性蛋白诱导一些种类的免疫应答,范围从产生低水平、低亲和性和暂时的抗体样IgM到高水平的、高亲和性的IgG抗体(Schellekens H,Clin Ther 24:1720-30(2002);Schellekens H,Nat Rev Drug Discov 1:457-62(2002))。治疗剂产品的不需要的免疫原性可能导致不利的后果,诸如降低的功效、改变的药物代谢动力学、全身免疫(general immune)和超敏性反应、过敏症(anaphylaxis)和过敏样反应(anaphylactoid reactions)(Buttel I等,Biologicals 39:100-9(2011))。例如,在患者中产生中和抗体或抗药物抗体可能限制治疗剂的反复剂量或长期给药的长期有效性。

[0006] 由于不需要的免疫应答可能引起治疗剂显著的安全性和/或功效问题,因此,在开发治疗性蛋白时,通常需要使抗原性和/或免疫原性最小化。不幸的是,目前,除了广泛的实验室和临床研究之外,不可能在施用给患者之前预测新治疗性蛋白的免疫原性程度(Descotes J,Gouraud A,Expert Opin Drug Metab Toxicol 4:1537-49(2008))。这在很

大部分上是由于目前缺少对脊椎动物的适用性免疫系统产生抗体的机制的了解和所述机制的异质性。例如,除了可能的具有高溶剂可及性表面积的暴露的亲水性和大体积氨基酸有更高的可能性之外,抗原-抗体复合物的分析没有揭示通用表位的决定性的结构特征。

[0007] 尽管有这些困难,目前利用多种策略来降低蛋白的免疫原性潜力(例如,参见Onda M等,Proc Natl Acad Sci USA 105:11311-6(2008);Vallera D等,Mol Cancer Ther 9:1872-83(2010))。可以通过去除或破坏可能被适应性免疫系统识别的表位而降低蛋白的免疫原性潜力。例如,表位破坏或去除可以通过截短、缺失或氨基酸置换或人源化实现(Nagata S,Pastan I,Adv Drug Deliv Rev 61:977-85(2009);Baker M等,Self Nonself 1:314-22(2010))。

[0008] 对于治疗性分子的去免疫化,通常优先鉴定并破坏B-淋巴细胞(B细胞)抗原表位,由于亲和力成熟,所述表位可能产生高亲和性抗体。在抗原激活后,B细胞能够分化成浆细胞或记忆细胞。激活的B细胞可以进行种类转换,从而从表达低亲和性IgM和IgD抗体变为表达单一Ig同种型,即,IgG,IgE,IgA,或IgD,其识别离散的抗原性表位(Klein U等,Nat Rev Immunol 8:22-33(2008))。激活的表达单一Ig同种型的B细胞可以进行关于产生具有针对特定的抗原性表位的高亲和性的抗体的那些B细胞的选择。因此,当将治疗剂施用给受试者后,治疗剂中表位的破坏可以防止特异性结合该表位的高亲和性抗体的产生以及靶向该表位的长期存在的记忆B细胞的形成。

[0009] 目前,还没有用于多肽中准确且全面的B细胞表位预测的标准技术(Sathish J等,Nat Rev Drug Discov 12:306-24(2013))。B细胞表位可以通过多种经验方法鉴定,利用诱变和抗体、免疫或免疫球蛋白文库的噬菌体展示筛选的组合进行鉴定。可以使用计算工具预测推定的B细胞表位,所述计算工具扫描给定多肽中的预测的线性的和不连续的表位,然后可以将其破坏,以使其沉默(Larsen等,Immunome Res2:2(2006);El-Manzalawy等,J Mol Recognit 21:243-55(2008);Sollner J等,Immunome Res 4:1(2008);Bryson C等,BioDrugs 24:1-8(2010);Yao B等,PLoS One 8:e62249(2013))。这些计算性B细胞表位预测准确度不高,由此必须进行实验验证(参见Nagata,Adv Drug Deliv Rev 61:977-85(2009))。通常通过将推定的B细胞表位内的带电荷和/或芳香族残基突变为丙氨酸残基而尝试进行表位破坏(Onda M等,JImmunol 177:8822-34(2006);Lui W等,Proc NatlAcadSci USA 109:11782-7(2012);Yumura K等,Protein Sci 22:213-21(2012))。此外,所有潜在的表位的准确绘图和破坏,同时保持生物治疗活性,可以是较大的蛋白难以实现的目标(Brauer F等,Antimicrob Agents Chemother 57:678-88(2013))。

[0010] 志贺毒素表现出给改造成用于治疗和诊断应用的有用产物的希望,但是,它们潜在的免疫原性可能是在医学应用中使用的障碍。志贺毒素是一种细菌蛋白,其对于人免疫系统是高度外源的。然而,在志贺毒素A亚基内的抗原性和/或免疫原性位点还没有被系统性地绘图。获得具有减少的抗原性和/或免疫原性的改善的志贺毒素A亚基-来源的多肽将是合乎需要的,其保留有效的志贺毒素效应子功能已用于医学应用,例如,作为多种涉及向特定细胞类型靶向递送细胞毒性的治疗剂的成分。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供在哺乳动物中具有减少的抗原性和/或免疫原性潜力的(在本文中称为“去免疫化的”)志贺毒素效应子多肽。另外,本发明提供包含去免疫化志贺毒素效应子多

肽的细胞毒性蛋白和诊断蛋白。由志贺毒素A亚基来源的去免疫化的多肽可以连接一种或多种多肽，其通过特异性的细胞外结合相互作用调节细胞靶向，以允许改造用于细胞内化的细胞类型特异性靶向和志贺毒素细胞毒性的改进的治疗剂。连接检测促进剂与去免疫化志贺毒素效应子区多肽允许改造用于检测特定细胞类型的存在的改进的诊断分子。本发明的多肽和蛋白具有用于靶向的细胞杀伤、将外源物质递送到特定细胞类型内、获得诊断信息和作为治疗多种疾病、病症和病况(包含癌症、免疫病症和微生物感染)的治疗剂的用途。

[0013] 本发明的多肽包含志贺毒素效应子区，其包含来源于志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基的氨基酸序列的多肽，其中通过突变去除或破坏至少一个预测的B细胞表位，所述突变以保留至少一种志贺毒素效应子功能的方式进行。

[0014] 本发明的多肽的特定实施方案包含志贺毒素效应子区，其包含来源于志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基的氨基酸序列的多肽，其中通过突变去除或破坏至少一个预测的B细胞表位，所述突变以保留至少一种志贺毒素效应子功能的方式进行；并且其中不通过任意B细胞表位破坏引入异位的(ectopic)、I类MHC限制性的T细胞表位。I类MHC限制性的T细胞表位是已知的，或可以通过技术人员预测。术语异位的是指在所述多肽去免疫化之前(即，在去除和/或破坏一个或多个B细胞表位之前的亲本多肽)，不是天然存在于所述多肽中的I类MHC限制性的T细胞表位。

[0015] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽，其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列，所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94-115；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的141-153；SEQ ID NO:3的140-156；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的179-190；SEQ ID NO:3的179-191；SEQ ID NO:3的204；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205；或SEQ ID NO:3的210-218；其中所述志贺毒素效应子区能够展现志贺毒素效应子功能。

[0016] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽，其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列，所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94-115；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的141-153；SEQ ID NO:3的140-156；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的179-190；SEQ ID NO:3的179-191；SEQ ID NO:3的204；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205；或SEQ ID NO:3的210-218；其中所述志贺毒素效应子区能够展现显著水平的志贺毒素效应子功能。

[0017] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽，其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列，所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏：SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94-115；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的141-153；SEQ ID NO:3的140-156；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的179-190；SEQ ID NO:3的179-191；SEQ ID NO:3的204；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205；或SEQ ID NO:3的210-218；其中所述志贺毒素效应子区能够具有志贺毒素效应子功能；并且，其中所述破坏不是单一表位区的，并且不是仅由选自由下述组成的组的氨基酸残基置换组成：SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的S96Y；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的Y114S；SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R179A；

SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R179H;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的L185A;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R188A;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R205A;SEQ ID NO:1的R179A/R188A;或SEQ ID NO:2;或SEQ ID NO:3的A188V。

[0018] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列,所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94-115;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的141-153;SEQ ID NO:3的140-156;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的179-190;SEQ ID NO:3的179-191;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;或SEQ ID NO:3的210-218;其中所述志贺毒素效应子区能够展现显著水平的志贺毒素效应子功能;并且,其中所述破坏不是单一表位区的,并且不是仅由选自由下述组成的组的氨基酸残基置换组成:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的S96Y;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的Y114S;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R179A;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R179H;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的L185A;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R188A;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R205A;SEQ ID NO:1的R179A/R188A;或SEQ ID NO:2;或SEQ ID NO:3的A188V。

[0019] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列,所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1-15;SEQ ID NO:3的3-14;SEQ ID NO:3的26-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的27-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的39-48;SEQ ID NO:3的42-48;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的53-66;其中所述志贺毒素效应子区能够展现志贺毒素效应子功能;并且,其中所述志贺毒素效应子区不包含与志贺毒素A亚基的破坏的表位区重叠的氨基端截短,所述氨基端截短来源于志贺毒素A亚基并且与破坏的表位区重叠。

[0020] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列,所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1-15;SEQ ID NO:3的3-14;SEQ ID NO:3的26-37;SEQ IDNO:1或SEQ ID NO:2的27-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的39-48;SEQ ID NO:3的42-48;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的53-66;其中所述志贺毒素效应子区能够展现显著水平的志贺毒素效应子功能;并且,其中所述志贺毒素效应子区不包含与志贺毒素A亚基的破坏的表位区重叠的氨基端截短,所述氨基端截短来源于志贺毒素A亚基并且与破坏的表位区重叠。

[0021] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列,所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1-15;SEQ ID NO:3的3-14;of SEQ ID NO:3的26-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的27-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的39-48;SEQ ID NO:3的42-48;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的53-66;其中所述志贺毒素效应子区能够展现

志贺毒素效应子功能;其中所述破坏不是单一表位区的,并且不是仅由氨基酸残基置换SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R63W组成;并且,其中所述志贺毒素效应子区不包含与志贺毒素A亚基的破坏的表位区重叠的氨基端截短,所述氨基端截短来源于志贺毒素A亚基并且与破坏的表位区重叠。

[0022] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列,所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏:SEQ ID NO:3的240-260;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的243-257;SEQ ID NO:1或SEQID NO:2的254-268;SEQ ID NO:3的262-278;SEQ ID NO:3的281-297;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的285-293;其中所述志贺毒素效应子区能够展现志贺毒素效应子功能;并且,其中所述志贺毒素效应子区不包含与志贺毒素A亚基的破坏的表位区重叠的羧基端截短,所述氨基端截短来源于志贺毒素A亚基并且与破坏的表位区重叠。

[0023] 本发明的特定实施方案提供包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其包含来源于志贺毒素家族的一个成员的A亚基的氨基酸序列,所述志贺毒素效应子区包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个表位区的破坏:SEQ ID NO:3的240-260;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的243-257;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的254-268;SEQ ID NO:3的262-278;SEQ ID NO:3的281-297;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的285-293;其中所述志贺毒素效应子区能够展现志贺毒素效应子功能;其中所述破坏不是单一表位区的,并且不是仅由选自由下述组成的组的氨基酸残基置换组成:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R248H;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的A250V;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R251H;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的A253G;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的S254T;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的C261A;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R289K;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的R248H和R251H;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的A253G和S254T;SEQ ID NO:1的S247-M252的缺失;SEQ ID NO:3的S246F;SEQ ID NO:3的A282V;SEQ ID NO:3的1291V;SEQ ID NO:3的S246F/I291V;并且,其中所述志贺毒素效应子区不包含与志贺毒素A亚基的破坏的表位区重叠的羧基端截短,所述羧基端截短来源于志贺毒素A亚基并且与破坏的表位区重叠。

[0024] 在某些其他实施方案中,本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽包含这样的表位破坏,所述表位破坏包含在本文提供的表位区内的至少一个氨基酸的缺失。在某些其他实施方案中,本发明的多肽包含这样的表位破坏,所述表位破坏包含在本文提供的表位区内的至少一个氨基酸的插入。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有氨基酸倒置或其他重排的破坏,其中至少一个倒置的氨基酸是在所述提供的表位区之内。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有氨基酸残基突变的表位破坏,诸如单一氨基酸置换为非标准氨基酸或具有化学修饰的侧链的氨基酸。

[0025] 在某些实施方案中,去免疫化志贺毒素效应子区包含这样的表位破坏,所述表位破坏包含在本文提供的表位区内的氨基酸残基置换。在某些其他实施方案中,所述多肽包含至少一个成为选自由下述组成的组的氨基酸的置换:A,G,V,L,I,P,C,M,F,S,D,N,Q,H和K。在某些其他实施方案中,所述多肽包含选自由下述组成的组的置换:D置换为A,D置换为G,D置换为V,D置换为L,D置换为I,D置换为F,D置换为S,D置换为Q,E置换为A,E置换为G,E置

换为V,E置换为L,E置换为I,E置换为F,E置换为S,E置换为Q,E置换为N,E置换为D,E置换为M,E置换为R,G置换为A,H置换为A,H置换为G,H置换为V,H置换为L,H置换为I,H置换为F,H置换为M,K置换为A,K置换为G,K置换为V,K置换为L,K置换为I,K置换为M,K置换为H,L置换为A,L置换为G,N置换为A,N置换为G,N置换为V,N置换为L,N置换为I,N置换为F,P置换为A,P置换为G,P置换为F,R置换为A,R置换为G,R置换为V,R置换为L,R置换为I,R置换为F,R置换为M,R置换为Q,R置换为S,R置换为K,R置换为H,S置换为A,S置换为G,S置换为V,S置换为L,S置换为I,S置换为F,S置换为M,T置换为A,T置换为G,T置换为V,T置换为L,T置换为I,T置换为F,T置换为M,T置换为S,Y置换为A,Y置换为G,Y置换为V,Y置换为L,Y置换为I,Y置换为F,和Y置换为M。

[0026] 在某些实施方案中,所述去免疫化志贺毒素效应子区包含含有在表位区内的氨基酸残基置换的破坏,其中所述置换在选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的组的天然位置的氨基酸处发生:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的4;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的8;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的9;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的11;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的33;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的43;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的45;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的47;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的48;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的49;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的53;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的55;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的58;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的59;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的60;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的61;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的62;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的96;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的109;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的110;SEQ IDNO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的112;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的SE 147;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的179;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的180;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的181;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的183;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的184;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的185;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的186;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的187;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的188;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的189;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的247;SEQ IDNO:3的247;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的248;SEQ ID NO:3的250;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的251;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQID NO:3的264;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的265;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的286。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有在表位区内的氨基酸残基置换的表位破坏,其中所述置换是置换为任意不保守的氨基酸,并且所述之后在选自由下述组成的天然位置的氨基酸残基的组的氨基酸残基处发生:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的4;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的8;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的9;SEQ IDNO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的11;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的33;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的43;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的45;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的47;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的48;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的49;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的53;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的55;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的

58;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的59;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的60;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的61;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的62;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的96;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的109;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的110;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的112;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的SE 147;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的179;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的180;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的181;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的183;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的184;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的185;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的186;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的187;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的188;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的189;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的247;SEQ ID NO:3的247;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的248;SEQ ID NO:3的250;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的251;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的264;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的265;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的286。不保守氨基酸置换是用具有一种或多种显著不同的生化特性的另一种氨基酸置换一种氨基酸,诸如例如,带电荷的置换成不带电荷的,极性的置换成疏水性的,以及大体积的置换成小的。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有在表位区内的氨基酸残基置换的表位破坏,其中所述置换发生在天然位置的氨基酸残基处,并且所述置换是置换成选自由下述组成的组的氨基酸:K1置换成A,G,V,L,I,F,M和H;T4置换成A,G,V,L,I,F,M和S;S8置换成A,G,V,I,L,F和M;T9置换成A,G,V,I,L,F,M和S;S9置换成A,G,V,L,I,F和M;K11置换成A,G,V,L,I,F,M和H;S33置换成A,G,V,L,I,F和M;S45置换成A,G,V,L,I,F和M;T45置换成A,G,V,L,I,F和M;D47置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;N48置换成A,G,V,L和M;L49置换成A或G;D53置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;R55置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D58置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;P59置换成A,G和F;E60置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;E61置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;G62置换成A;D94置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S96置换成A,G,V,I,L,F和M;S109置换成A,G,V,I,L,F和M;T109置换成A,G,V,I,L,F,M和S;G110置换成A;S112置换成A,G,V,L,I,F和M;G147置换成A;R179置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;T180置换成A,G,V,L,I,F,M和S;T181置换成A,G,V,L,I,F,M和S;D183置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;D184置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S186置换成A,G,V,I,L,F和M;G187置换成A;R188置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;S189置换成A,G,V,I,L,F和M;R204置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;R205置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;S247置换成A,G,V,I,L,F和M;Y247置换成A,G,V,L,I,F和M;R248置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R250置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R251置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D264置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;G264置换成A;以及T286置换成A,G,V,L,I,F,M和S。

[0027] 对于特定的实施方案,本发明的多肽包含来源于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251的去免疫化志贺毒素效应子区。在某些其他实施方案中,本发明的多肽包含来源于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251;和/或SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261的去免疫化志贺毒素效应子区。在某些实施方案中,本发明的多肽包含来源于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241的去免疫化志贺毒素效应子区。

[0028] 对于特定的实施方案,本发明的多肽包含含有SEQ ID NOs:4-52中的任一个或基

本上由SEQ ID NOs:4-52中的任一个组成的去免疫化志贺毒素效应子区。

[0029] 本发明的特定实施方案提供包含用于细胞靶向的结合区的蛋白,所述结合区与展现一种或多种志贺毒素效应子功能(例如,细胞毒性活性)的去免疫化志贺毒素亚基A来源的区域连接。本发明的蛋白包含含有本发明的多肽的去免疫化志贺毒素效应子区和结合区,所述结合区包含一种或多种能够特异性结合至少一种细胞外靶标生物分子的多肽。

[0030] 在本发明的蛋白的特定的实施方案中,所述结合区包含选自由下述组成的组的多肽:互补决定区3(CDR3)片段限制的(constrained)FR3-CDR3-FR4(FR3-CDR3-FR4)多肽,单结构域抗体片段(sdAb),纳米抗体,从骆驼科动物(camelid)来源的重链抗体结构域(V_HH片段),从软骨鱼(cartilaginous fish)来源的重链抗体结构域,免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR),V_{NAR}片段,单链可变片段(scFv),抗体可变片段(Fv),抗原结合片段(Fab),Fd片段,小模块免疫药物(SMIP)结构域,纤连蛋白-来源的第10个纤连蛋白III型结构域(10Fn3)(例如,单抗体(monobody)),生腱蛋白III型结构域(例如,TNfn3),锚蛋白重复基序结构域(ARD),低密度脂蛋白受体来源的A-结构域(LDLR的A结构域或LDLR-A),脂质运载蛋白(anticalin),Kunitz结构域,蛋白-A-来源的Z结构域,γ-B结晶来源的结构域(Affilin),泛蛋白-来源的结构域,Sac7d-来源的多肽,Fyn-来源的SH2结构域(affitin),小蛋白(miniprotein),C-型凝集素-样结构域支架,改造的抗体模拟物,以及任何前述物质的保留结合功能性的任何遗传操作的对应物。

[0031] 在本发明特定的实施方案中,向与细胞毒性蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞施用本发明的去免疫化的细胞毒性蛋白后,所述细胞毒性蛋白能够引起该细胞死亡。

[0032] 在本发明特定的实施方案中,向相对于细胞外靶标生物分子的存在而不同的两种细胞类型群体施用本发明的去免疫化的细胞毒性蛋白后,所述细胞毒性蛋白能够引起与所述细胞毒性蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞类型的细胞死亡,其CD_{50}比针对没有与所述细胞毒性蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞类型的CD_{50}小至少三倍。

[0033] 在本发明的蛋白的特定的实施方案中,设计或选择结合区与细胞外靶标生物分子结合的能力,所述细胞外靶标生物分子选自由下述组成的组:CD20,CD22,CD40,CD79,CD25,CD30,HER2/neu/ErbB2,EGFR,EpCAM,EphB2,前列腺特异性的膜抗原,Cripto,CDCP1,内皮因子,成纤维细胞活化的蛋白,Lewis-Y,CD19,CD21,CS1/SLAMF7,CD33,CD52,EpCAM,CEA,gpA33,粘蛋白,TAG-72,碳酸酐酶IX,叶酸结合蛋白,神经节苷脂GD2,神经节苷脂GD3,神经节苷脂GM2,神经节苷脂Lewis-Y2,VEGFR,αVβ3,α5β1,ErbB1/EGFR,Erb3,c-MET,IGF1R,EphA3,TRAIL-R1,TRAIL-R2,RANKL,FAP,生腱蛋白,CD64,间皮素(mesothelin),BRCA1,MART-1/MelanA,gp100,酪氨酸酶,TRP-1,TRP-2,MAGE-1,MAGE-3,GAGE-1/2,BAGE,RAGE,NY-ESO-1,CDK-4,β-连环蛋白,MUM-1,胱天蛋白酶-8,KIAA0205,HPVE6,SART-1,PRAME,癌胚抗原,前列腺特异性抗原,前列腺干细胞抗原,人天冬氨酰基(天冬酰胺酰基)β-羟化酶,EphA2,HER3/ErbB-3,MUC1,MART-1/MelanA,gp100,酪氨酸酶相关的抗原,HPV-E7,EB病毒(Epstein-Barr virus)抗原,Bcr-Abl,甲胎蛋白抗原,17-A1,膀胱肿瘤抗原,CD38,CD15,CD23,CD53,CD88,CD129,CD183,CD191,CD193,CD244,CD294,CD305,C3AR,FceRIa,半乳凝素-9,mrp-14,Siglec-8,Siglec-10,CD49d,CD13,CD44,CD54,CD63,CD69,CD123,TLR4,

FceRIa,IgE,CD107a,CD203c,CD14,CD68,CD80,CD86,CD105,CD115,F4/80,ILT-3,半乳凝素-3,CD11a-c,GITRL,MHC II类,CD284-TLR4,CD107-Mac3,CD195-CCR5,HLA-DR,CD16/32,CD282-TLR2,CD11c,以及前述任一种的任意免疫原性片段。

[0034] 在某些实施方案中,本发明的蛋白包含KDEL家族成员的羧基端内质网保留/回收信号基序(carboxy-terminal endoplasmic reticulum retention/retrieval signal motif)。在某些其他实施方案中,本发明的蛋白包含选自由下述组成的组的羧基端内质网保留/回收信号基序:KDEL(SEQ ID NO:60),HDEF(SEQ ID NO:61),HDEL(SEQ ID NO:62),RDEF(SEQ ID NO:63),RDEL(SEQ ID NO:64),WDEL(SEQ ID NO:65),YDEL(SEQ ID NO:66),HEEF(SEQ ID NO:67),HEEL(SEQ ID NO:68),KEEL(SEQ ID NO:69),REEL(SEQ ID NO:70),KAEL(SEQ ID NO:71),KCEL(SEQ ID NO:72),KFEL(SEQ ID NO:73),KGEL(SEQ ID NO:74),KHEL(SEQ ID NO:75),KLEL(SEQ ID NO:76),KNEL(SEQ ID NO:77),KQEL(SEQ ID NO:78),KREL(SEQ ID NO:79),KSEL(SEQ ID NO:80),KVEL(SEQ ID NO:81),KWEL(SEQ ID NO:82),KYEL(SEQ ID NO:83),KEDL(SEQ ID NO:84),KIEL(SEQ ID NO:85),DKEL(SEQ ID NO:86),FDEL(SEQ ID NO:87),KDEF(SEQ ID NO:88),KKEL(SEQ ID NO:89),HADL(SEQ ID NO:90),HAEL(SEQ ID NO:91),HIEL(SEQ ID NO:92),HNEL(SEQ ID NO:93),HTEL(SEQ ID NO:94),KTEL(SEQ ID NO:95),HVEL(SEQ ID NO:96),NDEL(SEQ ID NO:97),QDEL(SEQ ID NO:98),REDL(SEQ ID NO:99),RNEL(SEQ ID NO:100),RTDL(SEQ ID NO:101),RTEL(SEQ ID NO:102),SDEL(SEQ ID NO:103),TDEL(SEQ ID NO:104),和SKEL(SEQ ID NO:105)。

[0035] 对于特定的实施方案,本发明的蛋白包含结合区和去免疫化志贺毒素效应子区,它们在该蛋白内物理定向,以使所述结合区不位于所述志贺毒素效应子区的氨基端附近。

[0036] 对于特定的实施方案,本发明的蛋白包含来源于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251的志贺毒素效应子区。某些其他实施方案提供这样的蛋白,其中所述志贺毒素效应子区来源于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251;和/或SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。在某些实施方案中,本发明的蛋白包含来源于SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241的志贺毒素效应子区。

[0037] 对于特定的实施方案,本发明的蛋白包含含有SEQ ID NOs:4-52中的任一种或基本上由SEQ ID NOs:4-52中的任一种组成的去免疫化志贺毒素效应子区。

[0038] 对于特定的实施方案,本发明的蛋白包含下述或基本上由下述组成:SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,SEQ ID NO:56,SEQ ID NO:57,SEQ ID NO:58,或SEQ ID NO:59。

[0039] 在某些实施方案中,本发明的蛋白包含去免疫化志贺毒素效应子区,相对于志贺毒素一个成员的天然存在的A亚基,其进一步包含改变志贺毒素效应子区的酶活性的突变,所述突变选自至少一个氨基酸残基缺失或置换,诸如,例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中的A231E,N75A,Y77S,Y114S,E167D,R170A,R176K和/或W203A。在某些其他实施方案中,本发明的蛋白包含减少或消除催化活性但保留至少一种其他志贺毒素效应子功能的突变。

[0040] 本发明还提供了药物组合物,其包含本发明的多肽和/或本发明的蛋白和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体;和这样的蛋白或包含所述蛋白的组合物在如本文中进一

步描述的本发明的方法中的用途。

[0041] 除了本发明的多肽、蛋白和组合物以外，能够编码包含去免疫化志贺毒素效应子区的多肽或包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区的本发明的蛋白的多核苷酸也在本发明范围内，以及包含本发明的多核苷酸的表达载体和包含本发明的表达载体的宿主细胞。包含表达载体的宿主细胞可以用在例如通过重组表达生产本发明的多肽和/或蛋白、或其多肽组分或片段的方法中。

[0042] 另外，本发明提供了选择性地杀伤细胞的方法，所述方法包括下述步骤：使细胞与本发明的蛋白或包含本发明的这类蛋白的药物组合物接触。在某些实施方案中，所述接触细胞的步骤在体外发生。在某些其它实施方案中，所述接触细胞的步骤在体内发生。

[0043] 本发明还提供了治疗有此需要的患者中的疾病、病症和/或病况的方法，所述方法包括下述步骤：给有此需要的患者施用治疗有效量的包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽的组合物、包含前述多肽的多肽和/或蛋白、或包含前述任一种的组合物(例如，药物组合物)。在某些实施方案中，要使用本发明的这一方法治疗的疾病、病症或病况选自：癌症、肿瘤、免疫病症或微生物感染。在该方法的某些实施方案中，要治疗的癌症选自由下述组成的组：骨癌、乳腺癌、中枢/周围神经系统癌症、胃肠癌、生殖细胞癌、腺癌、头颈癌、血液学癌症、肾-尿道癌、肝癌、肺/胸膜癌、前列腺癌、肉瘤、皮肤癌和子宫癌。在该方法的某些实施方案中，要治疗的免疫病症是与选自由以下组成的组的疾病有关的免疫病症：淀粉样变性(amyloidosis)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、哮喘、克罗恩病(Crohn's disease)、糖尿病、移植物排斥(graft rejection)、移植物抗宿主病(graft-versus-host disease)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、溶血性尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome)、HIV相关的疾病、红斑狼疮(lupus erythematosus)、多发性硬化(multiple sclerosis)、多动脉炎(polyarteritis)、银屑病(psoriasis)、银屑病关节炎(psoriatic arthritis)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、硬皮病(scleroderma)、脓毒性休克(septic shock)、舍格伦综合征(Sjorgren's syndrome)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)和血管炎(vasculitis)。

[0044] 在本发明的某些实施方案中是用于治疗或预防癌症、肿瘤、免疫病症或微生物感染的包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽的组合物、包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽的多肽和/或蛋白、或包含前述任一种的组合物。在本发明的某些实施方案中是本发明的主题组合物在药物制备中的用途，所述药物用于治疗或预防癌症、肿瘤、免疫病症或微生物感染。

[0045] 本发明的蛋白的某些实施方案可以用于将一种或多种另外的外源物质递送进与本发明的蛋白的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞中。另外，本发明提供了一种用于将外源物质递送至细胞内部的方法，所述方法包括使体外或体内细胞与本发明的蛋白、药物组合物和/或诊断组合物接触。本发明还提供了一种用于将外源物质递送至有此需要的患者中的细胞内部的方法，所述方法包括下述步骤：给所述患者施用本发明的蛋白，其中所述靶细胞与本发明的蛋白的细胞外靶标生物分子物理偶联。

[0046] 在本发明的某些实施方案中是本发明的化合物(例如多肽或蛋白)和/或本发明的组合物(例如药物组合物或诊断组合物)在疾病、病症或病况的诊断、预后或表征中的用途。

[0047] 在本发明的某些实施方案中是诊断组合物，其包含本发明的去免疫化志贺毒素效

应子区多肽、包含前述多肽的多肽和/或蛋白、或包含前述任一种的组合物和检测促进剂，所述检测促进剂用于收集信息，诸如诊断上有用的关于细胞类型、组织、器官、疾病、病症、状况或患者的信息。

[0048] 在本发明的某些实施方案中是使用本发明的蛋白和/或诊断组合物检测细胞的方法，所述方法包括下述步骤：使细胞与所述蛋白和/或诊断组合物接触，并且检测所述蛋白和/或诊断组合物的存在。在某些实施方案中，所述接触细胞的步骤发生在体外。在某些实施方案中，所述接触细胞的步骤发生在体内。在某些实施方案中，所述检测细胞的步骤发生在体外。在某些实施方案中，所述检测细胞的步骤发生在体内。

[0049] 例如，本发明的诊断组合物可以用于如下检测体内细胞：给哺乳动物受试者施用包含本发明的蛋白的组合物，所述组合物包含检测促进剂，并然后在体外或在体内检测本发明的蛋白的存在。收集的信息可以关于与本发明的蛋白的结合区的细胞外靶标物理偶联的细胞的存在，且可以用在疾病、病症或病况的诊断、预后、表征和/或治疗中。本发明的某些化合物(例如多肽和蛋白)、本发明的组合物(例如药物组合物和诊断组合物)和本发明的方法可以用于确定患者是否属于对本发明的药物组合物做出应答的组。

[0050] 本发明的多肽的某些实施方案可以用作免疫原或用作免疫原的组分用于哺乳动物的免疫接种和/或疫苗接种。

[0051] 在本发明的某些实施方案中是试剂盒，其包含本发明的主题组合物和任选的使用说明书、另外的试剂和/或药物递送装置。

[0052] 参考以下描述、所附权利要求和附图，会更好地理解本发明的这些和其它特征、方面和优点。本发明的前述要素可以单个地组合或自由地除去以便形成本发明的其它实施方案，在下文中没有反对这样的组合或除去的任何陈述。

[0053] 附图简要说明

[0054] 图1显示了示例性的多肽和细胞毒性蛋白的一般结构的示意图；显示了示例性的去免疫化多肽和细胞毒性蛋白的总布置。

[0055] 图2显示了去免疫化志贺毒素效应子多肽的蛋白质印迹分析：抗体pAb2不识别包含D58A表位破坏的蛋白；显示去免疫化志贺毒素效应子区中的D58A置换有效地破坏了在变性条件下由pAb2识别的表位，并且降低了包含志贺毒素效应子区的多肽的抗原性。

[0056] 图3显示了去免疫化志贺毒素效应子多肽的蛋白质印迹分析；显示在去免疫化志贺毒素效应子区的多表位区破坏变体的情形中，D58A置换有效地破坏在变性条件下由pAb2识别的表位，并且降低了志贺毒素效应子区的多肽的抗原性。

[0057] 图4显示了去免疫化志贺毒素效应子多肽的蛋白质印迹分析；显示去免疫化志贺毒素效应子区的多表位区破坏变体破坏在变性条件下由pAb2和mAb1识别的表位。与包含亲本、野生型志贺毒素效应子区的多肽相比，这些多表位区破坏变体具有降低的抗原性。

[0058] 图5显示了去免疫化志贺毒素效应子多肽的蛋白质印迹分析；显示去免疫化志贺毒素效应子区的多表位区破坏有效地破坏在变性条件下由pAb2和/或mAb1识别的表位。与包含亲本、野生型志贺毒素效应子区的多肽相比，这些多表位区破坏变体具有降低的抗原性。

[0059] 图6显示了去免疫化志贺毒素效应子多肽的ELISA分析；显示包含多个表位区破坏的去免疫化志贺毒素效应子区产生对在天然蛋白折叠条件下由mAb1识别的表位的非常有

效的破坏。与包含亲本、野生型志贺毒素效应子区的多肽相比，该多表位区破坏变体具有降低的抗原性。

[0060] 图7显示了相关的、体内、抗-细胞毒性蛋白、抗体应答：将本发明包含示例性去免疫化志贺毒素效应子多肽的细胞毒性蛋白与包含野生型志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白进行比较；显示包含多个表位区破坏的去免疫化志贺毒素效应子区引起哺乳动物免疫系统减少的体内抗体应答。与包含亲本、野生型志贺毒素效应子区的多肽相比，该多表位区破坏变体具有降低的抗原性。

[0061] 详述

[0062] 在下文中使用示例性的、非限制性的实施方案和参照附图更充分地描述本发明。但是，本发明可以以许多不同的形式实施，并且不应被理解为限于下面阐述的实施方案。相反，提供这些实施方案使得本公开内容更透彻并且将本发明的范围传递给本领域技术人员。

[0063] 为了可以更容易地理解本发明，在下面定义某些术语。在发明详述内可以发现另外的定义。

[0064] 如在说明书和所附权利要求书中使用的，除非上下文另外清楚地指明，术语“一个”、“一种”和“所述”包括单数和复数指示物。

[0065] 如在说明书和所附权利要求书中使用的，当提及两种物质A和B时，术语“和/或”是指A和B中的至少一种。如在说明书和所附权利要求书中使用的，当提及超过两种物质诸如A、B和C时，术语“和/或”是指A、B、或C中的至少一种，或A、B、或C的任何组合中的至少一种(每种物质以单个或多个可能性存在)。

[0066] 贯穿本说明书，词语“包含”或变体诸如“包括”或“含有”应理解为暗示包括所述的整数(或组分)或整数(或组分)的组，但是不排除任何其它整数(或组分)或整数(或组分)的组。

[0067] 贯穿本说明书，术语“包括”用于指“包括、但不限于”。“包括”和“包括、但不限于”互换使用。

[0068] 术语“氨基酸残基”或“氨基酸”包括对结合到蛋白、多肽或肽中的氨基酸的提及。术语“多肽”包括氨基酸或氨基酸残基的任何聚合物。术语“多肽序列”表示在物理上构成多肽的一系列氨基酸或氨基酸残基。“蛋白”是包含一个或多个多肽或多肽“链”的大分子。“肽”是尺寸小于总计15-20个氨基酸残基的小多肽。术语“氨基酸序列”表示在物理上构成肽或多肽的一系列氨基酸或氨基酸残基，取决于长度。除非另有说明，本文中公开的多肽和蛋白序列从左至右书写，代表它们从氨基端至羧基端的次序。

[0069] 术语“氨基酸”、“氨基酸残基”、“氨基酸序列”或“多肽序列”包括天然存在的氨基酸，且除非另有限制，也包括可以以与天然存在的氨基酸类似方式起作用的天然氨基酸的已知类似物，诸如硒代半胱氨酸、吡咯赖氨酸、N-甲酰基甲硫氨酸、γ-羧基谷氨酸盐、羟脯氨酸羟丁赖氨酸(hydroxyprolinehypusine)、焦谷氨酸和硒代甲硫氨酸。用如下表A中的简写名称描述在本文中提及的氨基酸：

[0070] 表A.氨基酸命名法

[0071]

名称	3字母	1字母
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸或天冬氨酸盐	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸或谷氨酸盐	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I

[0072]

亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

[0073] 关于多肽的短语“保守置换”表示多肽的氨基酸组成的变化,所述变化不会实质上改变整体多肽的功能和结构(参见Creighton,Proteins:Structures and Molecular Properties(W.H.Freeman and Company,New York(第2版,1992))。

[0074] 本文中使用的术语“表达”(“expressed,”“expressing,”或“expresses,”)及其语法变体表示多核苷酸或核酸翻译成多肽或蛋白。表达的多肽或蛋白可以保留在细胞内,变成细胞表面膜的组分,或者被分泌进细胞外空间中。

[0075] 本文中使用的符号“α”是能够与该符号后的生物分子结合的免疫球蛋白型结合区的简写。符号“α”用于表示免疫球蛋白型结合区的功能特性,这基于它与该符号后的生物分子结合的能力。

[0076] 符号“::”是指在它前面和后面的多肽区域物理地连接在一起以形成连续多肽。

[0077] 当用在本说明书中时，符号“/”在位于两个氨基酸残基置换之间时意指在“/”任一侧的氨基酸残基置换或包含在相同的分子内。

[0078] 就本发明的目的而言，短语“来源于”是指，所述多肽区域包含最初在蛋白中发现的氨基酸序列，且其现在可能包含由原始序列的添加、缺失、截短或其它改变，使得总功能和结构是基本上保守的。

[0079] 就本发明的目的而言，术语“效应子”是指提供生物活性，诸如细胞毒性、生物信号传导、酶促催化、亚细胞按路线发送(subcellular routing)、和/或导致一种或多种因子的募集的分子间结合、和/或变构效应。

[0080] 就本发明的目的而言，志贺毒素效应子功能是由来源于志贺毒素A亚基的多肽区赋予的生物活性。志贺毒素效应子功能的非限制性实例包括细胞内化、亚细胞按路线发送、催化活性和细胞毒性。志贺毒素催化活性的非限制性实例包括核糖体失活、蛋白合成抑制、N-糖苷酶活性、多核苷酸:腺苷糖苷酶活性、RNA酶活性和DNA酶活性。RIPs可以使核酸、多核苷、多核苷酸、rRNA、ssDNA、dsDNA、mRNA(和polyA)和病毒核酸去嘌呤化(depurinate)(Barbieri L等,Biochem J 286:1-4(1992);Barbieri L等,Nature 372:624(1994);Ling J等,FEBS Lett 345:143-6(1994);Barbieri L等,Biochem J 319:507-13(1996);Roncuzzi L,Gasperi-Campani A,FEBS Lett 392:16-20(1996);Stirpe F等,FEBS Lett 382:309-12(1996);Barbieri L等,Nucleic Acids Res 25:518-22(1997);Wang P,Tumer N,Nucleic Acids Res 27:1900-5(1999);Barbieri L等,Biochim Biophys Acta 1480:258-66(2000);Barbieri L等,J Biochem 128:883-9(2000);Bagga S等,J Biol Chem 278:4813-20(2003);Picard D等,J Biol Chem 280:20069-75(2005))。一些RIPs表现出抗病毒活性和超氧化物歧化酶活性(Erice A等,Antimicrob Agents Chemother 37:835-8(1993);Au T等,FEBS Lett 471:169-72(2000);Parikh B,Tumer N,Mini Rev Med Chem 4:523-43(2004);Sharma N等,Plant Physiol 134:171-81(2004))。已经在体外和在体内观察到志贺毒素催化活性。用于志贺毒素效应子活性的测定可以测量多种活性，诸如，例如，蛋白合成抑制活性、去嘌呤活性、细胞生长抑制、细胞毒性、超螺旋结构DNA松弛活性和/或核酸酶活性。

[0081] 关于细胞毒性蛋白的细胞毒性活性的术语“选择性细胞毒性”是指在靶向细胞群体和非靶向局外细胞群体之间的细胞毒性的相对水平，其可以表示为针对靶向细胞类型的半最大细胞毒性浓度(CD_{50})与针对非靶向细胞类型的CD_{50}的比例，以显示对靶向细胞类型的细胞杀伤的优先性。

[0082] 本文中使用的志贺毒素效应子功能的保留表示，如通过具有再现性的适当定量测定所测量的，与野生型(WT)志贺毒素效应子多肽对照相当的志贺毒素功能活性水平。对于核糖体抑制，保留的志贺毒素效应子功能是展现10,000pM以下的IC_{50}。对于在靶标阳性细胞杀伤测定中的细胞毒性，取决于细胞类型和其适当的细胞外靶标生物分子的表达，保留的志贺毒素效应子功能是展现1,000nM以下的IC_{50}。

[0083] 用于本文时，“去免疫化”意指在施用给哺乳动物后减少的抗原性和/或免疫原性潜力。这包括降低的整体抗原性和/或免疫原性潜力，而不管一个或多个新表位的引入。

[0084] 引言

[0085] 本发明提供来源于志贺毒素家族成员的A亚基的具有减少的免疫原性潜力的改进

的多肽。这些改进的志贺毒素效应子多肽可以用在多种组合物中，例如，细胞毒性治疗剂、治疗递送剂、诊断分子、和免疫物质中。

[0086] 尽管使用志贺毒素作为治疗剂的组分具有吸引性，但是细菌毒素倾向于对哺乳动物是免疫原性的。蛋白治疗剂中不需要的免疫原性已经导致降低的功效、不可预测的药物代谢动力学和不需要的免疫应答，这限制剂量和反复给药。尽管需要包含具有降低的免疫原性潜力的去免疫化志贺毒素来源的多肽的分子来辅助避免不需要的免疫应答，但是，还没有成功鉴定并去除内部B细胞表位同时保留志贺毒素效应子功能的可预测的方法。

[0087] 尽管一些抗原性和/或免疫原性表位可以通过截短去除，但是，主要的挑战是使志贺毒素多肽的效应子结构域(例如，其酶结构域)内的表位沉默，同时保留需要的志贺毒素效应子功能，例如，有效的核糖体抑制和指导亚细胞按路线发送。尽管这些内部表位可以通过突变和/或化学修饰减少或消除，但是，挑战是这样做的同时要保留志贺毒素效应子功能。在蛋白中通过氨基酸置换破坏抗原性位点同时保持蛋白功能是一个显著的挑战，原因在于必须保留功能上限制的残基和结构，并且某些位置不耐受某些氨基酸置换，不影响蛋白结构、稳定性和/或功能(参见Cantor J等，Methods in Enzymology 502:Ch.12pp.291-301(2012))。

[0088] 进行了广泛的关于志贺毒素来源的多肽区的经验性实验，得到了本发明。如在实施例中更详细描述的，在预测的B细胞表位内产生氨基酸置换，并且检测所得到的多肽是否保留需要的志贺毒素效应子功能。预测每个表位的抗原性和/或免疫原性被所提供的氨基酸置换减少或消除，其又降低了包含至少一个所提供的表位破坏的任意主题组合物的整体抗原性和/或免疫原性。尽管对相关性较远的细菌蛋白毒素，诸如假单胞菌属(Pseudomonas)外毒素A进行了去免疫化的尝试，鉴定具有降低的免疫原性潜力同时保留志贺毒素功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽是不能想当然地预测的。

[0089] 包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区的多肽可以用作重组免疫毒素和配体-毒素融合体的组分，用于特定细胞类型的靶向性杀伤和多种疾病的治疗，所述疾病包括癌症、免疫病症和微生物感染。另外，本发明的多肽可以用作细胞类型特异性的内在化分子的组分，用于外源物质的精确递送，所述外源物质诸如用于诊断信息收集的检测促进剂。此外，本发明的多肽，独立的或作为志贺全毒素的组分，可以用在设计避免针对特定表位的抗体产生同时引发针对志贺毒素的免疫应答的免疫物质中。

[0090] I.志贺毒素效应子多肽和本发明的蛋白的一般结构

[0091] 本发明提供多种包含具有降低的免疫原性潜力的但是保留志贺毒素效应子功能性(诸如细胞内化、亚细胞按路线发送、催化活性和细胞毒性)的志贺毒素效应子区的多肽。本发明的多肽包含含有本文所述的至少一个表位区的破坏的志贺毒素效应子区。本发明的蛋白包含去免疫化志贺毒素效应子区和结合区，所述结合区包含一种或多种能够特异性结合至少一种细胞外靶标生物分子的多肽。

[0092] 蛋白毒素志贺毒素家族由多种天然存在的毒素构成，它们在结构和功能上是相关的，例如，志贺毒素，志贺样毒素1，和志贺样毒素2(Johannes L，Römer W，Nat Rev Microbiol 8:105-16(2010))。志贺毒素家族的成员共有相同的整体结构和作用机制(Engedal，N等，Microbial Biotech 4:32-46(2011))。例如，Stx、SLT-1和SLT-2在不含细胞的系统中表现出不可区分的酶活性(Head S等，J Biol Chem 266:3617-21(1991)；Tesh V

等,Infect Immun 61:3392-402(1993);Brigotti M等,Toxicon 35:1431-1437(1997))。

[0093] A.去免疫化志贺毒素效应子区多肽

[0094] 就本发明的目的而言,短语“志贺毒素效应子区”是指来源于志贺毒素家族的成员的志贺毒素A亚基的多肽区域,其能够展现至少一种志贺毒素功能。志贺毒素功能包括,例如,细胞进入、脂质膜变形、指导亚细胞按路线发送、避免降解、催化灭活核糖体、实施细胞毒性和实施细胞生长抑制作用。

[0095] 用于本文时,保留“显著的”志贺毒素效应子功能是指,通过具有再现性的适当的定量测定测量的,与野生型(WT)志贺毒素效应子多肽对照相当的志贺毒素功能活性水平。对于体外核糖体抑制,显著的志贺毒素效应子功能是展现300pM以下的IC_{50},这取决于核糖体的来源(例如,细菌、古细菌(archaea)或真核生物(藻类,真菌,植物或动物))。与催化失活的SLT-1A 1-251双重突变体(Y77S,E167D)的约100,000pM的IC_{50}相比,这是显著更大的抑制作用。对于在实验室细胞培养物中的靶标阳性细胞杀伤测定中的细胞毒性,显著的志贺毒素效应子功能是展现100、50或30nM以下的CD_{50},这取决于细胞系和其对适当的细胞外靶标生物分子的表达。与单独的没有靶向细胞的结合区的SLT-1A(其具有100-10,000nM的CD_{50})相比,这是对适当的靶细胞系显著更高的细胞毒性,其取决于细胞系。

[0096] 对于一些样品,由于不能收集必要的数据点进行准确的曲线拟合,IC_{50}或CD_{50}的准确值可能是不能获得的。当确定显著的志贺毒素效应子功能活性时,不应该考虑不准确的IC_{50}和/或CD_{50}值。在示例性的志贺毒素效应子功能测定(诸如,例如,在实施例中所述的测定)的数据分析中描述为不足以准确拟合曲线的数据不应该被认为代表实际的志贺毒素效应子功能。例如,如果在给定样品的浓度系列中分别不发生大于50%的核糖体抑制或细胞死亡,则理论上不可能确定IC_{50}和CD_{50}。

[0097] 不能检测志贺毒素效应子功能的活性可能是由于不适当的表达、多肽折叠、和/或多肽稳定性,而不是缺少细胞进入、亚细胞按路线发送和/或酶活性。志贺毒素效应子功能的测定可能不需要很多本发明的多肽来测量显著量的志贺毒素效应子功能活性。在凭经验确定低或没有效应子功能的潜在的原因与蛋白表达或稳定性相关的程度上,本领域技术人员可以能够利用本领域已知的蛋白化学和分子改造技术抵消这些因素,以使志贺毒素功能性效应子活性可以被恢复并测量。例如,基于不适当的细胞的表达可以通过使用不同的表达控制序列进行抵消;不适当的多肽折叠和/或稳定性可以受益于稳定末端序列、或稳定蛋白三维结构的非效应子区中的补偿性突变等。当关于个体志贺毒素功能的新测定可用时,可以分析去免疫化志贺毒素效应子多肽的任意水平的这些志贺毒素效应子功能,诸如是野生型(WT)志贺毒素效应子多肽的活性的1000-倍或100-倍以下,或与功能性敲除的志贺毒素效应子多肽相比,展现3-倍至30-倍或更高的活性。

[0098] 某些志贺毒素效应子功能是不容易测量的,例如,亚细胞按路线发送功能。目前没有途径、定量测定区分去免疫化志贺毒素效应子多肽不是细胞毒性的是否是由于不正确的亚细胞按路线发送,但是,在测试可用的时候,可以与适当的野生型志贺毒素效应子区相比,分析去免疫化志贺毒素效应子多肽任意显著水平的亚细胞按路线发送。

[0099] 应该注意,即使志贺毒素效应子多肽的细胞毒性相对于野生型减少了,在实践中,使用减毒的去免疫化志贺毒素效应子多肽的应用可以与使用野生型(WT)志贺毒素效应子多肽一样有效或更有效,原因在于,减少的抗原性和/或免疫原性可能补偿减少的细胞毒

性,诸如,例如,通过允许更高的剂量或更反复的给药补偿。野生型(WT)志贺毒素效应子多肽是非常有效的,能够仅以到达细胞质的一个分子或内在化的大约40个分子进行杀伤。与野生型志贺毒素效应子多肽相比,具有甚至相当减少的志贺毒素效应子功能(诸如,例如,亚细胞按路线发送或细胞毒性)的去免疫化志贺毒素效应子多肽,对于涉及靶向的细胞杀伤和/或特定的细胞检测的实际应用,可能仍然是足够有效的。

[0100] 志贺毒素家族包括从痢疾志贺氏菌(S.dysenteriae)血清型1分离的真正志贺毒素(Stx)、从肠出血性大肠杆菌(E.coli)的血清型分离的志贺样毒素1变体(SLT1或Stx1或SLT-1或Slt-I)以及从肠出血性大肠杆菌的血清型分离的志贺样毒素2变体(SLT2或Stx2或SLT-2)。SLT1与Stx仅有一个残基不同,并且二者被称为维罗细胞毒素(Verocytotoxins)或维罗毒素(Verotoxins)(VTs)(O'Brien,Curr Top Microbiol Immunol 180:65-94(1992))。尽管SLT1和SLT2变体彼此在氨基酸序列水平上仅约53-60%相似,但是它们共有志贺毒素家族成员所共有的酶活性和细胞毒性机制(Johannes,Nat Rev Microbiol 8:105-16(2010))。已经描述了超过39种不同的志贺毒素,诸如限定的亚型Stx1a、Stx1c、Stx1d和Stx2a-g(Scheutz F等,J Clin Microbiol 50:2951-63(2012))。由于志贺毒素编码基因能够通过水平基因转移在细菌物种之间传播(Strauch E等,Infect Immun 69:7588-95(2001);Zhaxybayeva O,Doolittle W,Curr Biol 21:R242-6(2011)),因此,志贺毒素家族的成员不天然限于任意细菌物种。作为物种之间转移的实例,在从患者分离的溶血不动杆菌(A.haemolyticus)菌株中发现志贺毒素(Grotiuz G等,J Clin Microbiol 44:3838-41(2006))。当编码志贺毒素的多核苷酸进入新的亚种或物种时,推测志贺毒素氨基酸序列由于基因漂变和/或选择压力能够发展少量序列变化,同时仍然保留志贺毒素家族成员共有的细胞毒性机制(参见Scheutz,J Clin Microbiol 50:2951-63(2012))。

[0101] 本发明的多肽包含来源于志贺毒素家族成员的A亚基的志贺毒素效应子区,其具有至少一个推定的破坏的表位区,从而在施用给哺乳动物后降低所述多肽的抗原性和/或免疫原性潜力。术语"破坏的"或"破坏"与表位区相关用在本文时,是指表位区中至少一个氨基酸的缺失,两个以上氨基酸的倒置,其中至少一个倒置的氨基酸是在表位区,在表位区插入至少一个氨基酸,和表位区至少一个氨基酸的突变。通过突变进行的表位区破坏包括用非标准氨基酸和/或非天然氨基酸进行的氨基酸置换。表位区可以备选地通过突变破坏,所述突变包括通过加入掩蔽表位区的至少一个氨基酸的共价连接的化学结构修饰氨基酸,例如,参见聚乙二醇化(参见Zhang C等,BioDrugs 26:209-15(2012)和小分子辅助物(Flower D,Expert Opin Drug Discov 7:807-17(2012))。

[0102] 在本文中参照序列表中提供的天然志贺毒素A亚基的特定氨基酸位置显示特定的表位区和破坏,注意,天然存在的志贺毒素A亚基可以包含在其氨基端含有约22个氨基酸的信号序列的前体形式,信号序列被去除,产生成熟的志贺毒素A亚基,并且可被熟练的工作人员识别。此外,在本文中,参照在天然志贺毒素A亚基内的特定位置天然存在的特定氨基酸(例如,S表示丝氨酸残基)(例如,S33表示在氨基端位置33的丝氨酸残基),在该氨基酸后是所讨论的以特定的突变置换的残基(例如,S33I表示在氨基端氨基酸残基33的丝氨酸置换为异亮氨酸的氨基酸置换),来表示特定的表位区破坏。

[0103] 本发明的某些实施方案提供包含含有来源于志贺毒素家族成员的A亚基的氨基酸序列的志贺毒素效应子区的多肽,所述志贺毒素效应子区包含本文提供的至少一个表位区

的破坏(例如,见表1、2和3)。在某些实施方案中,本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽可以包含下述或基本上由下述组成:包含选自由下述组成的天然位置的氨基酸的组的至少一个氨基酸序列的破坏的全长志贺毒素A亚基(例如,SLT-1A(SEQ ID NO:1),StxA(SEQ ID NO:2),或SLT-2A(SEQ ID NO:3)):SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1-15;SEQ ID NO:3的3-14;SEQ ID NO:3的26-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的27-37;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的39-48;SEQ ID NO:3的42-48;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的53-66;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94-115;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的141-153;SEQ ID NO:3的140-156;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的179-190;SEQ ID NO:3的179-191;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:3的210-218;SEQ ID NO:3的240-258;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的243-257;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的254-268;SEQ ID NO:3的262-278;of SEQ ID NO:3的281-297;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的285-293,或在保守的志贺毒素效应子多肽和/或非天然志贺毒素效应子多肽序列中的等价位置。

[0104] 在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含截短的志贺毒素A亚基或基本上由截短的志贺毒素A亚基组成。志贺毒素A亚基的截短可能导致整个表位区的缺失,但不影响毒素效应子催化活性和细胞毒性。展现显著的酶活性的最小的志贺毒素A亚基片段是由StxA的残基75-247组成的多肽(A1-Jaufy,Infect Immun 62:956-60(1994))。截短SLT-1A、StxA或SLT-2A的羧基端成为氨基酸1-251去除两个预测的B细胞表位区、两个预测的CD4阳性的(CD4+)T细胞表位和一个预测的不连续的B细胞表位。截短SLT-1A、StxA或SLT-2A的氨基端至75-293去除至少三个预测的B细胞表位区和三个预测的CD4+T细胞表位。截短SLT-1A、StxA或SLT-2A的氨基端和羧基端二者至75-251删除至少五个预测的B细胞表位区、四个推定的CD4+T细胞表位和一个预测的不连续的B细胞表位。

[0105] 在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含下述或基本上由下述组成:在提供的表位区具有至少一个突变(例如,缺失、插入、倒置或置换)的全长或截短的志贺毒素A亚基。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有表位区内至少一个氨基酸的缺失的破坏。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有在表位区内至少一个氨基酸的插入的破坏。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有氨基酸倒置的破坏,其中至少一个倒置的氨基酸位于表位区内。在某些其他实施方案中,所述多肽包含含有突变的破坏,所述突变诸如置换为非标准氨基酸或具有化学修饰的侧链的氨基酸的氨基酸置换。实施例中提供了单个氨基酸置换的多个实例。

[0106] 在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含下述或基本上由下述组成:与天然序列相比,具有一个或多个突变的全长或截短的志贺毒素A亚基,其包含选自由下述组成的组的至少一个氨基酸置换:A,G,V,L,I,P,C,M,F,S,D,N,Q,H,和K。在某些其他实施方案中,所述肽可以包含下述或基本上由下述组成:与天然序列相比,具有单个突变的全长或截短的志贺毒素A亚基,其中置换选自由下述组成的组:D置换成A,D置换成G,D置换成V,D置换成L,D置换成I,D置换成F,D置换成S,D置换成Q,E置换成A,E置换成G,E置换成V,E置换成L,E置换成I,E置换成F,E置换成S,E置换成Q,E置换成N,E置换成D,E置换成M,E置换成R,G置换成A,H置换成A,H置换成G,H置换成V,H置换成L,H置换成I,H置换成F,H置换成M,K置换成A,K置换成G,K置换成V,K置换成L,K置换成I,K置换成M,K置换成H,L置换成A,L置

换成G,N置换成A,N置换成G,N置换成V,N置换成L,N置换成I,N置换成F,P置换成A,P置换成G,P置换成F,R置换成A,R置换成G,R置换成V,R置换成L,R置换成I,R置换成F,R置换成M,R置换成Q,R置换成S,R置换成K,R置换成H,S置换成A,S置换成G,S置换成V,S置换成L,S置换成I,S置换成F,S置换成M,T置换成A,T置换成G,T置换成V,T置换成L,T置换成I,T置换成F,T置换成M,T置换成S,Y置换成A,Y置换成G,Y置换成V,Y置换成L,Y置换成I,Y置换成F,以及Y置换成M。

[0107] 在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽包含下述或基本上由下述组成:与天然氨基酸残基序列相比,具有一个或多个突变的全长或截短的志贺毒素A亚基,其包含表位区内的至少一个氨基酸置换,其中至少一个置换发生在选自由下述组成的组的天然位置的氨基酸组:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的4;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的8;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的9;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的11;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的33;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的43;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的45;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的47;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的48;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的49;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的53;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的55;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的58;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的59;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的60;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的61;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的62;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的96;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的109;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的110;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的112;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的SE 147;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的179;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的180;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的181;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的183;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的184;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的185;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的186;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的187;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的188;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的189;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的247;SEQ ID NO:3的247;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的248;SEQ ID NO:3的250;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的251;SEQ ID NO:1、SFO ID NO:2或SFO ID NO:3的264:SFO ID NO:1或SFO ID NO:2的265;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的286。

[0108] 在某些其他实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽包含下述或基本上由下述组成:具有表位区内的至少一个置换的全长或截短的志贺毒素A亚基,其中至少一个氨基酸置换是相对于下述天然位置中之一的位置上天然存在的氨基酸置换为非保守氨基酸(例如,参见,表B,同前):SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的4;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的8;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的9;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的11;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的33;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的43;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的45;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的47;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的48;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的49;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的53;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的55;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的58;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的59;SEQ

ID NO:1或SEQ ID NO:2的60;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的61;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的62;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的96;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的109;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的110;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的112;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的SE 147;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的179;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的180;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的181;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的183;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的184;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的185;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的186;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的187;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的188;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的189;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的247;SEQ ID NO:3的247;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的248;SEQ ID NO:3的250;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的251;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的264;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的265;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的286。

[0109] 在某些其他实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽包含下述或基本上由下述组成:具有选自由下述组成的组的至少一个氨基酸置换的全长或截短的志贺毒素A亚基:K1置换成A,G,V,L,I,F,M和H;T4置换成A,G,V,L,I,F,M和S;S8置换成A,G,V,I,L,F和M;T9置换成A,G,V,I,L,F,M和S;S9置换成A,G,V,L,I,F和M;K11置换成A,G,V,L,I,F,M和H;S33置换成A,G,V,L,I,F和M;S45置换成A,G,V,L,I,F和M;T45置换成A,G,V,L,I,F和M;D47置换成A,G,V,L,I,F,S和L;N48置换成A,G,V,L和M;L49置换成A或G;D53置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;R55置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D58置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;P59置换成A,G和F;E60置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;E61置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;G62置换成A;D94置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S96置换成A,G,V,I,L,F和M;S109置换成A,G,V,I,L,F和M;T109置换成A,G,V,I,L,F,M和S;G110置换成A;S112置换成A,G,V,L,I,F和M;G147置换成A;R179置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;T180置换成A,G,V,L,I,F,M和S;T181置换成A,G,V,L,I,F,M和S;D183置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;D184置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S186置换成A,G,V,I,L,F和M;G187置换成A;R188置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;S189置换成A,G,V,I,L,F和M;R204置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;R205置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;S247置换成A,G,V,I,L,F和M;Y247置换成A,G,V,L,I,F和M;R248置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R250置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R251置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D264置换成A,G,V,L,I,F,S和L;G264置换成A;和T286置换成A,G,V,L,I,F,M和S。

[0110] 在某些其他实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽包含下述或基本上由下述组成:具有至少一个下述氨基酸置换的全长或截短的志贺毒素A亚基: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和/或T286I。这些表位破坏性置换可以组合,以形成每个表位区具有多个置换和/或具有多个破坏的表位区同时仍然保留志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。例如,在可能的情形中,在天然位置排列的残基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和/或T286处的置换可以与在天然位置排列的残基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和/或T286处的置换组合,以产生本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽。

[0111] 在其他实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽包含短于全长志贺毒素A亚基的截短的志贺毒素A亚基或基本上由短于全长志贺毒素A亚基的截短的志贺毒素A亚基组成,其中在实施例中提供的天然位置排列的表位区中的至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。志贺样毒素1A亚基截短是有催化活性的,能够在体外使核糖体酶促失活,并且在细胞内表达时有细胞毒性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。展现完全的酶活性的最小的志贺毒素A亚基片段是由Slt1A的残基1-239组成的多肽(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。

[0112] 尽管报道保留实质性催化活性的志贺毒素A亚基的最小片段是StxA的残基75-247(A1-Jaufy,Infect Immun 62:956-60(1994)),但是在真核细胞内从头表达StxA截短物仅需要至残基240以到达细胞质并且发挥核糖的催化灭活作用(LaPointe,JBiol Chem 280:23310-18(2005))。

[0113] 尽管本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽可能普遍小于全长A亚基,但是优选所述去免疫化志贺毒素效应子区保留氨基酸位置77-239的多肽区(SLT-1A(SEQ ID NO:1)或StxA(SEQ ID NO:2))或志贺毒素家族成员的其他A亚基中的等价部分(例如,(SEQ ID NO:3)的77-238)。例如,在本发明的特定实施方案中,来源于SLT-1A的志贺毒素效应子区多肽可以包含下述或基本上由下述组成:SEQ ID NO:1的氨基酸75-251,SEQ ID NO:1的1-241,SEQ ID NO:1的1-251,或SEQ ID NO:1的氨基酸1-261,其中,在实施例中提供的天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。类似地,来源于StxA的去免疫化志贺毒素效应子区可以包含下述或基本上由下述组成:SEQ ID NO:2的氨基酸75-251、SEQ ID NO:2的1-241、SEQ ID NO:2的1-251或SEQ ID NO:2的氨基酸1-261,其中,在实施例中提供的至少一个天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。另外,来源于SLT-2的志贺毒素效应子区可以包含下述或基本上由下述组成:SEQ ID NO:3的氨基酸75-251、SEQ ID NO:3的1-241、SEQ ID NO:3的1-251或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261,其中,在实施例中提供的至少一个天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。

[0114] 本发明还提供本发明的多肽的变体,其中所述志贺毒素效应子区与天然存在的志贺毒素A亚基的不同仅为或多至1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,15,20,25,30,35,40个或更多个氨基酸残基(但是不多于使其保留至少85%,90%,95%,99%或更多的氨基酸序列同一性的数目)。因此,本发明的来源于志贺毒素家族成员的A亚基的志贺毒素效应子区多肽,与原始序列相比,可以包含添加、缺失、截短或其他的变化,只要保留与天然存在的志贺毒素A亚基有至少85%,90%,95%,99%或更多的氨基酸序列同一性,并且在实施例中提供的至少一

个天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。

[0115] 因此,在某些实施方案中,所述志贺毒素效应子区多肽包含与天然存在的志贺毒素A亚基(诸如SLT-1A(SEQ ID NO:1),StxA(SEQ ID NO:2),和/或SLT-2A(SEQ ID NO:3))具有至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%或99.7%的总序列同一性的氨基酸序列或基本上由其组成,其中,在实施例中提供的至少一个天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。

[0116] 任选地,志贺毒素A亚基的全长或截短的版本可以包含一个或多个突变(例如,置换、缺失、插入或倒置),只要在实施例中提供的至少一个天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。在本发明的特定实施方案中,优选所述去免疫化志贺毒素效应子区多肽与天然存在的志贺毒素A亚基具有充分的序列同一性,以足以在进入细胞后保留细胞毒性,进入细胞通过宿主细胞转化、转染、感染或诱导的公知方法,或通过由与志贺毒素效应子区多肽连接的靶向细胞的结合区介导的内在化进行。志贺毒素A亚基中对酶活性和/或细胞毒性而言最关键的残基已经绘图定位到下述残基位置:特别是天冬酰胺-75、酪氨酸-77、谷氨酸-167、精氨酸-170和精氨酸-176(Di,Toxicon 57:535-39(2011))。在本发明的任一个实施方案中,去免疫化志贺毒素效应子区多肽可以优选地但不是必须地保留在下述位置的一个或多个保守氨基酸:诸如在StxA、SLT-1A的位置77、167、170和176处的保守氨基酸,或在志贺毒素家族其他成员中典型地是细胞毒性活性所需要的等价保守位置。本发明的细胞毒性蛋白引起细胞死亡的能力,例如,其细胞毒性,可以使用本领域公知的多种测定中的任一种或多种进行测量。

[0117] B.包含去免疫化志贺毒素效应子区的蛋白

[0118] 本发明的蛋白包含与细胞外靶标生物分子特异性结合区连接的含有本发明的多肽的去免疫化志贺毒素效应子区。本发明的蛋白的结合区包含一个或多个能够选择性和特异性结合细胞外靶标生物分子的多肽。结合区可以包含一个或多个不同的多肽结构部分,诸如配体(不管是合成的或天然存在的配体)及其衍生物、免疫球蛋白来源的结构域、合成地改造的支架(作为免疫球蛋白结构域的替代物)等。

[0119] 存在众多本领域已知的可用于通过它们的结合特征将多肽靶向特定细胞类型的结合区域,诸如配体、单克隆抗体、改造的抗体衍生物和改造的抗体替代物。

[0120] 根据一个具体的、但是非限制性的方面,本发明的蛋白的结合区包含保留对细胞外靶标生物分子(通常是细胞表面受体)的结合功能性的天然存在的配体或其衍生物。例如,本领域已知的多种细胞因子、生长因子和激素可以用于将细胞毒性蛋白靶向至表达相应细胞因子受体、生长因子受体或激素受体的特定细胞类型的细胞表面。配体的某些非限制性例子包括(在括弧中显示别称):B-细胞活化因子(BAFFs、APRIL)、集落刺激因子(CSFs)、表皮生长因子(EGFs)、成纤维细胞生长因子(FGFs)、血管内皮生长因子(VEGFs)、胰岛素样生长因子(IGFs)、干扰素、白介素(诸如IL-2、IL-6和IL-23)、神经生长因子(NGFs)、血小板来源的生长因子、转化生长因子(TGFs)和肿瘤坏死因子(TNFs)。

[0121] 根据某些其它实施方案,所述结合区包含能够结合细胞外靶标生物分子的合成配体。一种非限制性例子是针对细胞毒性的T-淋巴细胞抗原4(CTLA-4)的拮抗剂。

[0122] 根据一个具体的、但是非限制性的方面,所述结合区可以包含免疫球蛋白型结合区。本文中使用的术语“免疫球蛋白型结合区”表示能够结合一个或多个靶标生物分子(诸

如抗原或表位)的多肽区域。结合区可以在功能上由它们的结合靶分子的能力来限定。免疫球蛋白型结合区通常来源于抗体或抗体样结构;但是,预见到来自其它来源的替代支架在该术语的范围内。

[0123] 免疫球蛋白(Ig)蛋白具有被称为Ig结构域的结构域。Ig结构域的长度范围为约70-110个氨基酸残基并且拥有特征性Ig折叠,其中典型地7-9个反向平行的β链排列为两个形成夹心样结构的β片层。Ig折叠通过夹心的内表面上的疏水氨基酸相互作用和链中半胱氨酸残基之间的高度保守的二硫键来稳定。Ig结构域可以是可变的(IgV或V-组)、恒定的(IgC或C-组)或中间的(IgI或I-组)。一些Ig结构域可能与互补决定区(CDR)有关,所述互补决定区(CDR)对于抗体与它们的表位的结合的特异性而言是重要的。Ig-样结构域也存在于非免疫球蛋白的蛋白中,并且基于此被分类为Ig蛋白超家族的成员。HUGO基因命名委员会(HUGO Gene Nomenclature Committee,HGNC)提供了含有Ig-样结构域的家族的成员的清单。

[0124] 免疫球蛋白型结合区可以是抗体或其抗原结合片段的多肽序列,其中例如通过分子工程改造或通过文库筛选进行选择,所述氨基酸序列已经与天然抗体或非免疫球蛋白蛋白的Ig-样结构域的氨基酸序列有所不同。因为重组DNA技术和体外文库筛选在免疫球蛋白型结合区的产生中的关联性,可以重新设计抗体以获得期望的特征,诸如较小的尺寸、细胞进入(cell entry)、或其它治疗改善。可能的变化有很多,并且范围可以为从仅一个氨基酸的改变到例如可变区的完全重新设计。典型地,将做出可变区的改变以便改善抗原结合特征、改善可变区稳定性、或降低免疫原性应答的潜力。

[0125] 存在众多预见到作为本发明的组分的免疫球蛋白型结合区。在某些实施方案中,免疫球蛋白型结合区来源于免疫球蛋白结合区域,诸如能够结合细胞外靶标生物分子的抗体互补位。在某些其它实施方案中,免疫球蛋白型结合区包含经工程改造的多肽,所述经工程改造的多肽并非来源于任何免疫球蛋白结构域,而是通过提供对细胞外靶标生物分子的高亲和力结合而像免疫球蛋白结合区域一样发挥作用。这种经工程改造的多肽可以任选地包括包含来自如本文中所述的免疫球蛋白的互补决定区或者基本上由所述互补决定区组成的多肽支架。

[0126] 还存在众多现有技术中的结合区域,其可用于通过它们的高亲和力结合特性将多肽靶向特定细胞类型。在某些实施方案中,本发明蛋白的结合区选自包括下述的组:单结构域抗体结构域(sdAbs)、纳米抗体、从骆驼科动物来源的重链抗体结构域(V_HH片段)、二价纳米抗体、从软骨鱼来源的重链抗体结构域、免疫球蛋白新抗原受体(IgNARs)、V_{NAR}片段、单链可变(scFv)片段、多聚化scFv片段(双抗体、三抗体、四抗体)、双特异性的串联的scFv片段、二硫键稳定化的抗体可变(Fv)片段、由V_L、V_H、C_I,和C_H 1结构域组成的二硫键稳定化的抗原结合(Fab)片段、二价F(ab')2片段、由重链和C_H1结构域组成的Fd片段、单链Fv-C_H3微抗体、双特异性微抗体、二聚C_H2结构域片段(C_H2D)、Fc抗原结合结构域(Fcabs)、分离的互补决定区3(CDR3)片段、受约束的构架区3、CDR3、构架区4(FR3-CDR3-FR4)多肽、小模块免疫药物(SMIP)结构域、以及保留它的互补位和结合功能的前述物质的任何遗传操作的对应物(参见Saerens D等,Curr.Opin.Pharmacol 8:600-8(2008);Dimitrov D,MAbs 1:26-8(2009);Weiner L,Cell 148:1081-4(2012);Ahmad Z等,Clin Dev Immunol 2012:980250(2012))。

[0127] 根据某些其它实施方案,所述结合区包括免疫球蛋白结构域的经工程改造的替代

支架,其表现出类似的功能特征,诸如对靶标生物分子的高亲和力和特异性结合,并且能够工程改造改善的特征,诸如更大稳定性或降低的免疫原性。对于本发明的蛋白的某些实施方案,所述结合区选自包括下述的组:经工程改造的、纤连蛋白来源的、第10个纤连蛋白III型(10Fn3)结构域(单抗体、AdNectins™或AdNexins™);经工程改造的、生腱蛋白来源的、生腱蛋白III型结构域(Centryns™);经工程改造的、含有锚蛋白重复基序的多肽(DARPins™);经工程改造的、低密度-脂蛋白-受体来源的、A结构域(LDLR-A)(Avimers™);脂质运载蛋白(anticalins);经工程改造的、蛋白酶抑制剂来源的、Kunitz结构域;经工程改造的、蛋白-A来源的、Z结构域(Affibodies™);经工程改造的、γ-B结晶来源的支架或经工程改造的、泛蛋白来源的支架(Affilins);Sac7d来源的多肽(Nanoffitins®或affitins);经工程改造的、Fyn来源的、SH2结构域(Fynomers®);小蛋白;C-型凝集素-样结构域支架;经工程改造的抗体模拟物;以及保留它的结合功能性的前述物质的任何遗传操作的对应物(Wörn A,Plückthun A,JMol Biol 305:989-1010(2001);Xu L等,Chem Biol 9:933-42(2002);Wikman M等,Protein Eng Des Sel 17:455-62(2004);Binz H等,Nat Biotechnol 23:1257-68(2005);Hey T等,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等,JBiol Chem 285:12096(2010);Zoller F等,Molecules 16:2467-85(2011))。

[0128] 任何以上结合区可以用作本发明的组分,只要所述结合区组分对细胞外靶标生物分子具有10^{-5}至10^{-12}摩尔/升、优选地小于200纳摩尔(nM)的解离常数即可。

[0129] 细胞外靶标生物分子

[0130] 本发明的蛋白的结合区包含这样的多肽区域:其能够特异性地结合细胞外靶标生物分子,优选地其物理偶联至目标细胞类型(诸如癌细胞、肿瘤细胞、浆细胞、被感染的细胞或携带细胞内病原体的宿主细胞)的表面。

[0131] 术语"靶标生物分子"表示这样的生物分子,通常是蛋白或通过翻译后修饰(诸如糖基化)而修饰的蛋白:其能够被结合区结合以使蛋白靶向生物体内的特定细胞类型或位置。细胞外靶标生物分子可以包括多个表位,包括未修饰的多肽、通过添加生化官能团而修饰的多肽、和糖脂(参见例如美国专利5,091,178;EP 2431743)。合乎需要的是,细胞外靶标生物分子在与本发明的蛋白相互作用以后被内源性地内化或容易地被迫内化。

[0132] 就本发明的目的而言,关于修饰靶标生物分子,术语"细胞外的"表示这样的生物分子:它的结构的至少一部分暴露于细胞外环境。细胞外靶标生物分子包括细胞膜组分、跨膜蛋白、细胞膜锚定的生物分子、细胞表面结合的生物分子和分泌的生物分子。

[0133] 关于本发明,当用于描述靶标生物分子时,短语"物理偶联"是指将靶标生物分子或其部分与细胞外部关联的共价和/或非共价分子间相互作用,诸如靶标生物分子和细胞之间的多个非共价相互作用,其中每个单独相互作用的能量是在约1-5千卡的量级(例如静电键、氢键、范德华相互作用、疏水力等)。可以发现所有嵌膜蛋白与细胞膜、以及周围膜蛋白物理偶联。例如,细胞外靶标生物分子可能包含跨膜区域、脂质锚、糖脂锚和/或与包含前述任一种的因子非共价地结合(例如通过非特异性疏水相互作用和/或结合脂质的相互作用)。

[0134] 可以基于众多标准(诸如它们的靶标生物分子的细胞类型特异性的表达和/或它

们的靶标生物分子关于特定细胞类型的物理定位)来设计或选择本发明的蛋白的结合区。例如,本发明的某些蛋白包含这样的结合结构域:其能够使由仅一种细胞类型排他地表达的细胞表面靶标结合至细胞表面。这允许相对于不表达该细胞外靶标生物分子的"旁观"细胞类型以高优先性(至少3-倍的细胞毒性作用)进行特定细胞类型的靶向性细胞杀伤。备选地,如果细胞外靶标生物分子以足够低的量表达和/或以低量与不被靶向的细胞类型物理偶联,则结合区的靶标生物分子的表达可以不专属于一种细胞类型。这还允许相对于不表达显著量的细胞外靶标生物分子或不与显著量的细胞外靶标生物分子物理偶联的"旁观"细胞类型以高优先性(至少3-倍的细胞毒性作用)进行特定细胞类型的靶向性细胞杀伤。可以在不同细胞条件下,诸如离体、体外培养的或在体内——包括在多细胞生物体内在它们天然位置的原位的细胞,用本发明的细胞毒性蛋白杀伤被靶向的细胞。

[0135] 本发明的蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子可以包括过比例地或排他地存在于癌细胞、免疫细胞和被细胞内病原体(诸如病毒、细菌、真菌、朊病毒或原生动物)感染的细胞中的生物标志物。

[0136] 去免疫化志贺毒素效应子区

[0137] 在本发明的蛋白的某些实施方案中,可以突变、插入或缺失一个或多个氨基酸残基,以便增加去免疫化志贺毒素效应子区的酶活性。例如,将Stx1A中的残基-位置丙氨酸-231突变成谷氨酸会增加它的体外酶活性(Suhan M,Hovde C,Infect Immun 66:5252-9(1998))。

[0138] 在本发明的蛋白的某些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸残基突变或缺失以便降低或消除去免疫化志贺菌毒素效应子区的催化和/或细胞毒性活性。可以通过突变或截短来降低或消除志贺菌毒素家族成员的A亚基的催化和/或细胞毒性,只要在实施例中提供的至少一个天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。已经显示标记为酪氨酸-77、谷氨酸-167、精氨酸-170、酪氨酸-114和色氨酸-203的位置对于Stx、Stx1和Stx2的催化活性是重要的(Hovde C等,Proc Natl Acad Sci USA 85:2568-72(1988);Deresiewicz R等,Biochemistry 31:3272-80(1992);Deresiewicz R等,Mol Gen Genet 241:467-73(1993);Ohmura M等,Microb Pathog 15:169-76(1993);Cao C等,Microbiol Immunol 38:441-7(1994);Suhan,Infect Immun 66:5252-9(1998))。在无细胞核糖体失活测定中,将谷氨酸-167和精氨酸-170二者突变消除了Slt-I A1的酶活性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。在利用内质网中Slt-I A1的从头表达的另一种方法中,将谷氨酸-167和精氨酸-170二者突变或将Slt-I A1截短为残基1-239在所述表达水平上消除了Slt-I A1片段细胞毒性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。

[0139] 本发明的蛋白分别包含去免疫化志贺毒素效应子区多肽,其保留至少一种志贺毒素效应子功能,但是其可以通过突变一个或多个对酶活性重要的残基由细胞毒性的亲本分子改造成具有降低的或消除的细胞毒性的蛋白,以用于非细胞毒性功能,例如,完成白细胞淤积(cytostasis)、外源物质的递送和/或细胞类型的检测。该整体结构是模块式的,原因在于,本发明的多肽可以连接到任意数量的多样性主题组合物上,诸如结合区和/或检测促进剂,以用于本文所述的多种应用。

[0140] 可以通过观察施用给活生物体(诸如脊索动物)后针对分子的任何免疫应答(抗体

和/或免疫细胞-介导的)来评估分子的免疫原性(诱导抗体和/或细胞介导的免疫应答的能力)。可以随时间测量特定的免疫应答,诸如特异性靶向施用的分子的抗体的量和形成。特异性结合所施用的分子的抗体的存在表示:1)预先存在一种或多种识别所施用的分子的抗体,和/或2)诱导一种或多种识别所施用的分子的抗体的从头形成。

[0141] 可以通过研究施用之前的血清是否存在抗-分子抗体来确定预先形成的抗-分子抗体的存在。从头抗-“施用的分子”抗体形成的诱导可以通过监测施用后血清中随时间产生的抗-分子抗体的量来确定。

[0142] 在施用分子(例如,志贺毒素效应子区多肽)后在脊索动物中诱导的抗体的量可以通过比较施用前抗-分子抗体的量与施用后抗-分子抗体的量进行测量。施用后在脊索动物中诱导的抗-“施用的分子”抗体的量指示所述分子的一般免疫原性和所述分子在不同脊索动物中诱导不同免疫应答的能力,诸如在施用后,诱导增加的和多样性的抗-分子抗体产生,免疫细胞介导的免疫应答。分子中和活性,超敏性反应,过敏性反应,过敏样反应和其他免疫应答。

[0143] 没有参比点,诸如另一种更加免疫原性的分子,可能难以定量弱免疫原性分子的免疫原性。两种分子(例如,野生型志贺毒素效应子区多肽与去免疫化志贺毒素效应子多肽)的相对免疫原性可以通过观察在向不同的生物体单独施用每种分子后针对每种分子分别阐述的抗-分子抗体的相对差异而进行评估。从头抗-“施用的分子”抗体形成的相对诱导可以通过测量施用后血清中分别针对每种分子的随时间产生的抗-分子抗体的量的相对差异而确定。

[0144] 在用不同分子(例如,野生型志贺毒素效应子区多肽和去免疫化志贺毒素效应子多肽)处理的脊索动物(如小鼠)中诱导的抗体的量可以用基于标准ELISA的测定进行测量,并用于比较不同分子的相对免疫原性。

[0145] KDEL家族成员的内质网保留/回收信号基序

[0146] 就本发明的目的而言,短语“内质网保留/回收信号基序”、KDEL-型信号基序或信号基序表示能够在真核细胞内起作用以促进蛋白通过KDEL受体向内质网的亚细胞定位的KDEL家族的任何成员。

[0147] 羧基端赖氨酸-天冬酰胺-谷氨酸-亮氨酸(KDEL(“KDEL”公开为SEQ ID NO:60))序列是真核细胞中的可溶性蛋白的一种规范的、内质网停留和取回信号基序,且被KDEL受体识别(关于综述,参见Capitani M,Sallese M,FEBS Lett 583:3863-71(2009))。KDEL信号基序家族包括许多KDEL-样基序,诸如HDEL(SEQ ID NO:62),RDEL(SEQ ID NO:64),WDEL(SEQ ID NO:65),YDEL(SEQ ID NO:66),HEEL(SEQ ID NO:68),KEEL(SEQ ID NO:69),REEL(SEQ ID NO:70),KFEL(SEQ ID NO:73),KIEL(SEQ ID NO:85),DKEL(SEQ ID NO:86),KKEL(SEQ ID NO:89),HNEL(SEQ ID NO:93),HTEL(SEQ ID NO:94),KTEL(SEQ ID NO:95),和HVEL(SEQ ID NO:96),它们都存在于蛋白的羧基端,所述羧基端已知是遍布于多个系统发生界的内质网的腔的停留者(Munro S,Pelham H,Cell 48:899-907(1987);Raykhel I等,J Cell Biol 179:1193-204(2007))。KDEL信号基序家族包括至少46个使用合成构建体证实的多肽变体(RaVkhel,J Cell Biol 179:1193-204(2007))。另外的KDEL信号基序包括ALEDEL(SEQ ID NO:106),HAEDEL(SEQ ID NO:107),HLEDEL(SEQ ID NO:108),KLEDEL(SEQ ID NO:109),IRSDEL(SEQ ID NO:110),ERSTEL(SEQ ID NO:111)和RPSTEL(SEQ ID NO:112)

(Alanen H等,JMol Biol 409:291-7(2011))。一种代表大多数KDEL信号基序的普遍化共有基序已经描述为[KRHQSA]-[DENQ]-E-L(Hulo N等,Nucleic Acids Res 34:D227-30(2006))。

[0148] 含有KDEL家族信号基序的蛋白被遍布于高尔基复合体的KDEL受体结合并通过微管依赖性机制运输至内质网用于释放进内质网的腔中(Griffiths G等,J Cell Biol 127:1557-74(1994);Miesenböck G,Rothman J,J Cell Biol 129:309-19(1995))。KDEL受体在高尔基复合体和内质网之间动态地循环(Jackson M等,EMBO J 9:3153-62(1990);Schutze M等,EMBO J 13:1696-1705(1994))。

[0149] 就本发明的目的而言,KDEL家族的成员包括合成的信号基序,其能够在真核细胞内起作用以促进蛋白通过KDEL受体向内质网的亚细胞定位。换而言之,KDEL家族的有些成员可能不存在于自然界中,或尚未在自然界中观察到,但是已经或可以使用本领域已知的方法构建和根据经验进行验证;例如,参见Raykhel I等,J Cell Biol 179:1193-204(2007)。

[0150] 作为本发明的蛋白的某些实施方案的组分,KDEL-型信号基序在蛋白内物理地定位、朝向或排列,使得它是在羧基端。

[0151] 为了本发明的目的,志贺毒素效应子区和结合区相对于彼此或整个蛋白的N-端和C-端的具体顺序或取向不是固定的(例如,参见图1)。在本发明的蛋白中,结合区和志贺毒素效应子区可以彼此直接连接和/或适当地通过一个或多个插入多肽序列(诸如使用一个或多个本领域公知的接头)彼此连接。任选地,本发明的蛋白可以进一步包含羧基端内质保留/回收信号基序,诸如KDEL(SEQ ID NO:60)。

[0152] 本发明的蛋白的一般结构是模块的,因此多种不同的结合区可以与同一种去免疫化志贺毒素效应子区一起使用以提供多种细胞外靶标生物分子的多样性靶向,从而提供细胞毒性的靶向、白细胞淤积和/或外源物质向多种不同细胞类型的递送。由于不适当的亚细胞按路线发送而不具有细胞毒性的去免疫化志贺毒素效应子区仍然可以用于将外源物质递送进细胞中。

[0153] II连接本发明的多肽组分和/或它们的亚组分的连接键

[0154] 本发明的各个多肽和/或蛋白组分,例如结合区和志贺毒素效应子区(其可以是有细胞毒性的和/或携带一个或多个改变、降低或消除催化活性和/或细胞毒性的突变),可以通过本领域众所周知的和/或本文描述的一个或多个接头适当地彼此连接。结合区的各个多肽亚组分,例如重链可变区(V_H)、轻链可变区(V_L)、CDR和/或ABR区,可以通过本领域众所周知的和/或本文描述的一个或多个接头适当地彼此连接(例如,参见Weisser N,Hall J,Biotechnol Adv 27:502-20(2009);Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。本发明的蛋白组分,例如,多链结合区域,可以通过本领域众所周知的一个或多个接头适当地彼此连接或连接至本发明的其它多肽组分。本发明的肽组分,例如,KDEL家族内质网保留/回收信号基序,可以通过本领域众所周知的一个或多个接头(诸如蛋白性接头)适当地连接至本发明的另一个组分。

[0155] 合适的接头通常是允许本发明的每个多肽组分以这样的三维结构折叠的那些接头,所述三维结构非常类似于在没有任何接头或其它组分的情况下单独产生的多肽组分。合适的接头包括单个氨基酸、肽、多肽和缺乏前述任一种的接头,诸如例如各种非蛋白性的

碳链,无论是分支的还是环状的(例如,参见Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。

[0156] 合适的接头可以是蛋白性的,且包含一个或多个氨基酸、肽和/或多肽。蛋白性的接头适合用于重组融合蛋白和化学连接的缀合物。蛋白性的接头典型地具有约2至约50个氨基酸残基,诸如,例如,约5至约30个或约6至约25个氨基酸残基。选择的接头的长度取决于多种因素,诸如,例如,选择所述接头所期望的一种或多种性质(例如,参见Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。

[0157] 合适的接头可以是非蛋白性的,例如,化学接头(例如,参见Dosio F等,Toxins 3:848-83(2011);Feld J等,Oncotarget 4:397-412(2013))。本领域已知的各种非蛋白性的接头可以用于连接结合区和志贺毒素效应子区,诸如常用于将免疫球蛋白来源的多肽缀合至异源多肽的接头。例如,使用它们的氨基酸残基的功能侧链和碳水化合物结构部分(诸如,例如,羧基、胺、巯基、羧酸、羰基、羟基和/或环状环基),可以连接多肽区域。例如,二硫键和硫醚键可以用于连接两个或更多个多肽(参见例如Fitzgerald D等,Bioconjugate Chem 1:264-8(1990);Pasqualucci L等,Haematologica 80:546-56(1995))。另外,非天然的氨基酸残基可以与其它功能侧链诸如酮基一起使用(参见例如Sun S等,Chembiochem Jul 18(2014);Tian F等,Proc Natl Acad Sci USA 111:1766-71(2014))。非蛋白性化学接头的例子包括、但不限于:N-琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯,S-(N-琥珀酰亚胺基)硫代乙酸酯(SATA),N-琥珀酰亚胺基-氧基羰基-cu-甲基-a-(2-吡啶基二硫基)甲苯(SMPT),N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶基二硫基)-戊酸酯(SPP),琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷甲酸酯(SMCC或MCC),磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)-氨基苯甲酸酯,4-琥珀酰亚胺基-氧基羰基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯,磺基琥珀酰亚胺基-6-(α-甲基-α-(吡啶基二硫醇)-甲苯酰氨基)己酸酯,N-琥珀酰亚胺基-3-(-2-吡啶基二硫基)-丙酸酯(SPDP),琥珀酰亚胺基6(3(-(-2-吡啶基二硫基)-丙酰氨基)己酸酯,磺基琥珀酰亚胺基6(3(-(-2-吡啶基二硫基)-丙酰氨基)己酸酯,马来酰亚胺基己酰基(MC),马来酰亚胺基己酰基-缬氨酸-瓜氨酸-p-氨基苄氧基羰基(MC-vc-PAB),3-马来酰亚胺基苯甲酸N-羟基琥珀酰业胺酯(MBS),α-烷基衍生物,磺基NHS-ATMBA(磺基琥珀酰亚胺基N-[3-(乙酰基硫基)-3-甲基丁酰基-β-丙氨酸]),磺基二氯苯酚,2-亚氨基硫杂环戊烷(2-iminothiolane),3-(2-吡啶基二硫基)-丙酰基酰肼,Ellman氏试剂,二氯三嗪酸和S-(2-硫代吡啶基)-L-半胱氨酸(参见例如Thorpe P等,Eur J Biochem 147:197-206(1985);Thorpe P等,Cancer Res 47:5924-31(1987);Thorpe P等,Cancer Res 48:6396-403(1988);Grossbard M等,Blood 79:576-85(1992);Lui C等,Proc Natl Acad Sci USA 93:8618-23(1996);Doronina S等,Nat Biotechnol 21:778-84(2003);Feld J等,Oncotarget 4:397-412(2013))。

[0158] 合适的接头(无论是蛋白性的还是非蛋白性的)可以包括,例如,蛋白酶敏感的、环境氧化还原电位敏感的、pH敏感的、酸可切割的、光可切割的和/或热敏感的接头(参见例如Dosio F等,Toxins 3:848-83(2011);Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013);Feld J等,Oncotarget 4:397-412(2013))。

[0159] 可以选择蛋白性的接头用于掺入本发明的重组融合蛋白中。对于本发明的重组融合蛋白,接头典型地包含约2-50个氨基酸残基,优选约5-30个氨基酸残基(Argos P,J Mol Biol 211:943-58(1990);Williamson M,Biochem J 297:240-60(1994);George R,

Heringa J,Protein Eng15:871-9(2002);Kreitman R,AAPSJ 8:E532-51(2006))。通常,蛋白性的接头包含大多数具有极性的、不带电荷的和/或带电荷的残基的氨基酸残基,诸如,例如,苏氨酸、脯氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸和丙氨酸(参见例如Huston J等Proc Natl Acad Sci U.S.A.85:5879-83(1988);Pastan I等,Annu Rev Med 58:221-37(2007);Li J等,Cell Immunol 118:85-99(1989);Cumber A等Bioconj Chem 3:397-401(1992);Friedman P等,Cancer Res 53:334-9(1993);Whitlow M等,Protein Engineering 6:989-95(1993);Siegall C等,JImmunol 152:2377-84(1994);Newton等Biochemistry 35:545-53(1996);Ladurner等J Mol Biol 273:330-7(1997);Kreitman R等,Leuk Lymphoma 52:82-6(2011);U.S.4,894,443)。蛋白性的接头的非限制性例子包括丙氨酸-丝氨酸-甘氨酸-甘氨酸-脯氨酸-谷氨酸(ASGGPE(SEQ ID NO:113))、缬氨酸-甲硫氨酸(VM)、丙氨酸-甲硫氨酸(AM)、AM$(G_{2-4}S)_x$AM,其中G是甘氨酸,S是丝氨酸,且x是1-10的整数(SEQ ID NO:114)。

[0160] 可以基于期望的性能选择蛋白性的接头。技术人员可以记住特定特征来选择蛋白性的接头,诸如以优化融合分子的折叠、稳定性、表达、溶解度、药代动力学性能、药效动力学性能和/或在融合构建体的背景下融合的结构域的活性(相对于相同结构域自身的活性)中的一种或多种。例如,可以基于柔性、刚度和/或切割性选择蛋白性的接头(参见例如Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。技术人员在选择接头时可以使用数据库和接头设计软件工具。可以选择某些接头以优化表达(参见例如Turner D等,J Immunol Methods 205:43-54(1997))。可以选择某些接头以促进相同多肽或蛋白之间(以形成同型多聚体)或不同多肽或蛋白之间(以形成异型多聚体)的分子间相互作用。例如,可以选择蛋白性的接头,其允许本发明的蛋白的多肽组分之间的期望的非共价相互作用,诸如,例如,与二聚体和其它更高级多聚体的形成有关的相互作用(参见例如U.S.4,946,778)。

[0161] 柔性的蛋白性的接头经常具有大于12个氨基酸残基的长度,且富含小的、非极性的氨基酸残基、极性的氨基酸残基和/或亲水的氨基酸残基,诸如,例如,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸(参见例如Bird R等,Science 242:423-6(1988);Friedman P等,Cancer Res 53:334-9(1993);Siegall C等,J Immunol 152:2377-84(1994))。可以选择柔性的蛋白性的接头以增加组分之间的空间分离和/或允许组分之间的分子内相互作用。例如,多种"GS"接头是技术人员已知的,且由多个甘氨酸和/或一个或多个丝氨酸组成,有时在重复单元中,例如,$(G_xS)_n$(SEQ ID NO:115)、$(S_xG)_n$(SEQ ID NO:116)、$(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:117)和$(G)_n$(SEQ ID NO:118),其中x是1-6,且n是1-30(参见例如WO 96/06641)。柔性的蛋白性的接头的非限制性例子包括GKSSGSGSESKS(SEQ ID NO:119),GSTSGSGKSSEGKG(SEQ ID NO:120),GSTSGSGKSSEGSGSTKG(SEQ ID NO:121),GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:122),EGKSSGSGSESKEF(SEQ ID NO:123),SRSSG(SEQ ID NO:124)和SGSSC(SEQ ID NO:125)。

[0162] 刚性的蛋白性的接头经常是坚硬的α-螺旋结构且富含脯氨酸残基和/或一个或多个在战略上放置的脯氨酸(参见Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。可以选择刚性的接头以防止连接的组分之间的分子内相互作用。

[0163] 可以选择合适的接头以允许组分的体内分离,例如,由于切割和/或环境特异性的不稳定性(参见Dosio F等,Toxins 3:848-83(2011);Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。体内可切割的蛋白性的接头能够通过蛋白水解加工和/或还原环境(经常在生物体内的特定部位或在特定细胞类型内)而解连(参见例如Doronina S等,Bioconjug

Chem 17:144-24(2006);Erickson H等,CancerRes 66:4426-33(2006))。体内可切割的蛋白性的接头经常包含蛋白酶敏感的基序和/或由一个或多个半胱氨酸对形成的二硫键(参见例如Pietersz G等,Cancer Res 48:4469-76(1998);The J等,J Immunol Methods 110:101-9(1998);参见Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。可以将体内可切割的蛋白性的接头设计成对仅存在于生物体中的某些位置、细胞内的隔室的蛋白酶敏感,和/或仅在某些生理学或病理学状况下变得有活性(例如,具有异常高水平的蛋白酶,在某些疾病部位过表达的蛋白酶,和由病原性微生物特异性地表达的蛋白酶)。例如,存在本领域已知的蛋白性的接头,其被仅存在于细胞内的蛋白酶、仅存在于特定细胞类型内的蛋白酶和仅在病理学状况(如癌症或炎症)下存在的蛋白酶切割,例如,R-x-x-R基序和AMGRSGGGCAGNRVGSSLSCGGLNLQAM(SEQ ID NO:126)。

[0164] 在本发明的蛋白的某些实施方案中,可以使用这样的接头:其包含一个或多个蛋白酶敏感的位点以提供存在于靶细胞内的蛋白酶的切割。在本发明的蛋白的某些实施方案中,可以使用不可切割的接头以在施用给脊椎动物生物体以后降低不希望的毒性。

[0165] 合适的接头可以包括,例如,蛋白酶敏感的、环境氧化还原电位敏感的、pH敏感的、酸可切割的、光可切割的和/或热敏感的接头,无论是蛋白性的还是非蛋白性的(参见Chen X等,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。

[0166] 合适的可切割的接头可以包括含有本领域已知的可切割基团的接头,诸如,例如,Zarling D等,J Immunol 124:913-20(1980);Jung S,Moroi M,Biochem Biophys Acta 761:152-62(1983);Bouizar Z等,Eur J Biochem 155:141-7(1986);Park L等,J Biol Chem 261:205-10(1986);Browning J,Ribolini A,J hnmunol 143:1859-67(1989);Joshi S,Burrows R,J Biol Chem 265:14518-25(1990))。

[0167] 合适的接头可以包括pH敏感的接头。例如,可以由于它们在较低pH环境中的不稳定性而选择某些合适的接头以提供在靶细胞的亚细胞隔室内的解离。例如,包含一个或多个三苯甲基、衍生化的三苯甲基、双马来酰亚胺othoxy丙烷基团(bismaleimideothoxy propane groups)、己二酸二酰肼基和/或酸不稳定的转铁蛋白基团的接头可以提供本发明的蛋白的组分(例如多肽组分)在具有特定pH范围的环境中的释放(参见例如Welhöner H等,J Biol Chem 266:4309-14(1991);Fattom A等,Infect Immun 60:584-9(1992))。可以选择在特定pH范围被切割的某些接头,所述特定pH范围对应于组织之间的生理pH差异,诸如,例如,肿瘤组织的pH低于健康组织中的pH(参见例如US 5,612,474)。

[0168] 光可切割的接头是在暴露于某些波长范围的电磁辐射(诸如可见范围内的光)后被切割的接头(参见例如Goldmacher V等,Bioconj Chem 3:104-7(1992))。光可切割的接头可以用于在暴露于某些波长的光以后释放本发明的蛋白的组分(例如多肽组分)。光可切割的接头的非限制性例子包括硝基苄基(作为半胱氨酸的光可切割的保护基)、硝基苄氧基碳酰氯交联剂、羟丙基甲基丙烯酰胺共聚物、甘氨酸共聚物、荧光素共聚物和甲基罗丹明共聚物(Hazum E等,Pept Proc Eur Pept Symp,第16版,Brunfeldt K,编,105-110(1981);Senter等,Photochem Photobiol 42:231-7(1985);Yen等,Makromol Chem 190:69-82(1989);Goldmacher V等,Bioconj Chem 3:104-7(1992))。光可切割的接头可以在连接组分以形成本发明的蛋白(其被设计成用于治疗可以使用纤维光学暴露于光的疾病、病症和病况)中具有特定用途。

[0169] 在本发明的蛋白的某些实施方案中，使用任意数目的技术人员已知的方式，包括共价键和非共价键，将结合区域连接至志贺毒素效应子区(参见例如Chen X等，Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013)；Behrens C，Liu B，MAbs 6:46-53(2014)。

[0170] 在本发明的蛋白的某些实施方案中，所述蛋白包含结合区域，所述结合区域是具有连接重链可变(V_H)结构域和轻链可变(V_L)结构域的接头的scFv。存在众多本领域已知的适合用于此目的的接头，诸如，例如，15-残基$(Gly4Ser)_3$肽(SEQ ID NO:127)。可以用于形成非共价多价结构的合适的scFv接头包括GGS，GGGS(SEQ ID NO:128)，GGGGS(SEQ ID NO:129)，GGGGSGGG(SEQ ID NO:130)，GGSGGGG(SEQ ID NO:131)，GSTSGGGSGGGSGGGGSS(SEQ ID NO:132)和GSTSGSGKPGSSEGSTKG(SEQ ID NO:133)(Plückthun A，Pack P，Immunotechnology 3:83-105(1997)；Atwell J等，Protein Eng 12:597-604(1999)；Wu A等，Protein Eng 14:1025-33(2001)；Yazaki P等，J Immunol Methods 253:195-208(2001)；Carmichael J等，J Mol Biol 326:341-51(2003)；Arndt M等，FEBS Lett 578:257-61(2004)；Bie C等，World J Hepatol 2:185-91(2010))。

[0171] 用于连接本发明的蛋白的组分的合适方法可以是通过目前本领域已知的用于实现该目的的任意方法，只要所述连接不会实质上阻碍结合区的结合能力、蛋白的细胞内在化和/或当通过适当测定(包括本文描述的测定)测量的志贺毒素效应子区的期望的毒素效应子功能即可。

[0172] 关于本发明的目的，志贺毒素效应子区和靶向细胞的结合区相对于彼此或整个蛋白的具体顺序或取向没有固定(参见例如图1)。本发明的多肽和蛋白的组分可以以任意顺序排列，前提条件是，期望的结合区和志贺毒素效应子区的活性没有消除。在本发明的多肽和蛋白的某些实施方案中，结合区、志贺毒素效应子区(其可以是细胞毒性的/或携带一个或多个减少或消除催货活性和/或细胞毒性的突变)和内质网保留/回收信号基序可以直接地彼此连接和/或适当地通过一个或多个插入多肽序列(诸如用本领域众所周知的和/或本文描述的一个或多个接头)彼此连接。

[0173] III.去免疫化志贺毒素效应子区多肽和蛋白的特异性结构变化的实例

[0174] 为了产生去免疫化志贺毒素效应子多肽，原则上，可以通过多种方式破坏所提供的表位区中的任意氨基酸，诸如例如，通过缺失、插入、倒置、重排、置换侧链的化学修饰破坏。然而，利用特定的破坏来破坏特定的氨基酸和多肽区更可能成功地降低抗原性和/或免疫原性，同时保留志贺毒素效应子功能。例如，优选末端截短和内部氨基酸置换，原因在于它们保留志贺毒素效应子区的整体氨基酸间距，由此更可能保持志贺毒素效应子功能。

[0175] 在本发明的某些实施方案中，所述多肽包含含有SLT-1A(SEQ ID NO:1)、StxA(SEQ ID NO:2)和/或SLT-2A(SEQ ID NO:3)的氨基酸75-251或基本上由其组成的去免疫化志贺毒素效应子区，其中，在实施例提供的天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。在某些其他实施方案中，是包含来源于SLT-1A(SEQ ID NO:1)、StxA(SEQ ID NO:2)和/或SLT-2A(SEQ ID NO:3)的氨基酸1-241的去免疫化志贺毒素效应子的多肽，其中，在实施例提供的天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。其他实施方案是包含来源于SLT-1A(SEQ ID NO:1)、StxA(SEQ ID NO:2)和/或SLT-2A(SEQ ID NO:3)的氨基酸1-251的去免疫化志贺毒素效应子区的多肽，其中，在实施例提供的天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。其他实施方案是

包含来源于SLT-1A(SEQ ID NO:1),、StxA(SEQ ID NO:2)和/或SLT-2A(SEQ ID NO:3)的氨基酸1-261的去免疫化志贺毒素效应子区的多肽,其中,在实施例提供的天然位置排列的表位区中至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。

[0176] 存在多种多样性的可以用于产生本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽的内部氨基酸置换。

[0177] 在用于表位区内的可能的置换氨基酸中,预测下述置换氨基酸残基最可能降低表位的抗原性和/或免疫原性-G,D,E,S,T,R,K,和H。除了甘氨酸之外,这些残基全都表示极性和/或带电荷的残基。

[0178] 在用来置换的可能的氨基酸中,预测下述氨基酸A,G,V,L,I,P,C,M,F,S,D,N,Q,H和K更可能降低抗原性和/或免疫原性,同时保留显著的志贺毒素效应子功能,这取决于所要置换的氨基酸。通常,置换应该讲极性和/或带电荷的氨基酸残基改变为非极性且不带电荷的残基。另外,减小整体氨基酸残基R基团功能性侧链的尺寸和/或长度可能是对表位破坏有益的。例如,丙氨酸他海沧是可接受的对任意氨基酸残基的置换,并且,对于甘氨酸残基,丙氨酸是优选的选择。丝氨酸通常仅是用于丙氨酸残基的可接受的置换。天冬氨酸通常仅是用于谷氨酸残基的可接受的置换。赖氨酸通常仅是用于精氨酸残基的可接受的置换。谷氨酰胺通常仅是用于谷氨酸、赖氨酸或精氨酸残基的可接受的置换。组氨酸通常仅是用于赖氨酸和精氨酸残基的可接受的置换。然而,尽管这些置换的一般性更可能赋予表位破坏,但是,由于目的是保留显著的志贺毒素效应子功能,因此,如果其与要被置换的氨基酸相似(诸如,例如,用较小尺寸的非极性和/或不带电荷的残基置换极性和/或带电荷的残基),置换氨基酸可能更可能保留志贺毒素效应子功能。

[0179] 基于实施例长的经验性证据,预测志贺毒素A亚基中的某些氨基酸位置耐受表位破坏,同时仍然保留显著的志贺毒素效应子功能。例如,下述天然存在的位置耐受氨基酸置换(单独的或组合的),同时保留志贺毒素效应子功能(诸如细胞毒性)-SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的4;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的8;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的9;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的11;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的33;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的43;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的45;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的47;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的48;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的49;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的53;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的55;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的58;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的59;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的60;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的61;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的62;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的96;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的109;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的110;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的112;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的SE 147;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的179;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的180;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的181;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的183;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的184;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的185;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的186;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的187;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的188;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的189;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID

NO:1或SEQ ID NO:2的247;SEQ ID NO:3的247;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的248;SEQ ID NO:3的250;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的251;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的264;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的265;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的286。

[0180] 实施例中的经验数据指出能够降低抗原性和/或免疫原性同时保留显著的志贺毒素效应子功能的其他表位破坏性置换和表位破坏性置换的组合,诸如,例如,前述截短耐受置换的位置以及在相关志贺毒素中相同的位置或保守位置的新置换的新组合。

[0181] 可以预测针对保守官能团的氨基酸残基的其他氨基酸置换可以减低抗原性和/或免疫原性同时保留显著的志贺毒素效应子功能。例如,技术人员已知与下述任一种相似的其他置换可以破坏表位,同时保留至少一种志贺毒素效应子功能: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和/或T286I。具体地,与下述相似的针对保守氨基酸残基的氨基酸置换可以具有相同或相似的作用: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和/或T286I。在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含相似的保守氨基酸置换,诸如,例如,K1置换成A,G,V,L,I,F,M和H;T4置换成A,G,V,L,I,F,M和S;S8置换成A,G,V,I,L,F和M;T9置换成A,G,V,I,L,F,M和S;S9置换成A,G,V,L,I,F和M;K11置换成A,G,V,L,I,F,M和H;S33置换成A,G,V,L,I,F和M;S45置换成A,G,V,L,I,F和M;T45置换成A,G,V,L,I,F和M;D47置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;N48置换成A,G,V,L和M;L49置换成A或G;D53置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;R55置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D58置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;P59置换成A,G和F;E60置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;E61置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;G62置换成A;D94置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S96置换成A,G,V,I,L,F和M;S109置换成A,G,V,I,L,F和M;T109置换成A,G,V,I,L,F,M和S;G110置换成A;S112置换成A,G,V,L,I,F和M;G147置换成A;R179置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;T180置换成A,G,V,L,I,F,M和S;T181置换成A,G,V,L,I,F,M和S;D183置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;D184置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S186置换成A,G,V,I,L,F和M;G187置换成A;R188置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;S189置换成A,G,V,I,L,F,和M;R204置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R205置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;S247置换成A,G,V,I,L,F和M;Y247置换成A,G,V,L,I,F和M;R248置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R250置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R251置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D264置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;G264置换成A;和T286置换成A,G,V,L,I,F,M和S。

[0182] 类似地,去除电荷、极性和/或减少侧链长度的氨基酸置换可以破坏表位同时保留至少一种志贺毒素效应子功能。在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含一个或多个通过置换破坏的表位,使得侧链电荷被去除,极性被去除,和/或侧链长度减小,诸如,例如,用选自下组的适当的氨基酸:A,G,V,L,I,P,C,M,F,S,D,N,Q,H或K,来置换

在下述位置的氨基酸残基:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的1;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的4;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的8;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的9;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的11;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的33;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的43;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的45;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的47;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的48;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的49;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的53;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的55;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的58;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的59;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的60;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的61;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的62;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的94;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的96;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的109;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的110;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的112;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的SE 147;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的179;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的180;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的181;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的183;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的184;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的185;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的186;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的187;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的188;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的189;SEQ ID NO:3的204;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的205;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的247;SEQ ID NO:3的247;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的248;SEQ ID NO:3的250;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的251;SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的264;SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的265;和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的286。在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含一个或多个下述氨基酸置换:K1置换成A,G,V,L,I,F,M和H;T4置换成A,G,V,L,I,F,M和S;S8置换成A,G,V,1,L,F和M;T9置换成A,G,V,I,L,F,M和S;S9置换成A,G,V,L,I,F和M;K11置换成A,G,V,L,I,F,M和H;S33置换成A,G,V,L,I,F和M;S45置换成A,G,V,L,I,F和M;T45置换成A,G,V,L,I,F和M;D47置换成A,G,V,L,I,F,S和L;N48置换成A,G,V,L和M;L49置换成A或G;D53置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;R55置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D58置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;P59置换成A,G和F;E60置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;E61置换成A,G,V,L,I,F,S,Q,N,D,M和R;G62置换成A;D94置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;S96置换成A,G,V,I,L,F和M;S109置换成A,G,V,I,L,F和M;T109置换成A,G,V,I,L,F,M和S;G110置换成A;S112置换成A,G,V,L,I,F和M;G147置换成A;R179置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;T180置换成A,G,V,L,I,F,M和S;T181置换成A,G,V,L,I,F,M和S;D183置换成A,G,V,L,I,F,S和L;D184置换成A,G,V,L,I,F,S和L;S186置换成A,G,V,I,L,F和M;G187置换成A;R188置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;S189置换成A,G,V,I,L,F和M;R204置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R205置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;S247置换成A,G,V,I,L,F和M;Y247置换成A,G,V,L,I,F和M;R248置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;R250置换成A,G,V,L,I,F,M,L,S,K和H;R251置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;D264置换成A,G,V,L,I,F,S和Q;G264置换成A;和T286置换成A,G,V,L,I,F,M和S。

[0183] 另外,在志贺毒素效应子多肽的一个表位区中破坏表位同时保留显著的志贺毒素效应子功能的氨基酸置换可以与在相同或不同表位区中任意其他破坏表位同时保留显著的志贺毒素效应子功能的氨基酸置换组合,以形成具有多个被破坏的表位区同时仍然保留

显著水平的志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。在某些实施方案中，本发明的志贺毒素效应子区多肽可以包含下个或多个下述组合:K1M可以与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,和/或T286I组合;S8I可以与K1M,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,和/或T286I组合;T9I可以与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,和/或T286I组合;S9I可以与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,和/或T286I组合;K11A可以与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,和/或T286I组合;S33I可以与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,和/或T286I组合;S45V或S45I可以与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,和/或T286I组合;T45I可以与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,和/或T286I组合;D53A可以与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,和/或T286I组合;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,和/或T286I可以与;D58A或D58F可以与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,和/或T286I组合;R55A可以与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,和/或T286I组合;P59A可以与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,和/或T286I组合;E60R可以与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,和/或T286I组合;E60I或E60A可以与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,和/或T286I组合;E61A可以与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,和/或T286I组合;G62A可以与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,和/或T286I组合;D94A可以与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,和/或T286I组合;S96I可以与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,和/或T286I组合;G110A可以与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,和/或T286I组合;G147A可以与K1M,T9I,K11A,S33I,S45I,T45I,D53A,R55A,D58A,D58F,P59A,E60I,E60R,E61A,G62A,D94A,S96I,G110A,T180G,T181I,D183A,D184A,D184F,S186A,G187A,R188A,S189A,R204A,R205A,S247I,D264A,G264A,G265A,和/或T286I组合;T180G可以与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,和/或T286I组合;T181I可以与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,和/或T286I组合;D183A可以与K1M,S8I,T9I,K11A,S33I,S45I,T45I,D53A,R55A,D58A,D58F,P59A,E60I,E60R,E61A,G62A,D94A,S96I,G110A,G147A,T180G,T181I,D184A,D184F,S186A,G187A,R188A,S189A,R204A,R205A,S247I,D264A,G264A,G265A,和/或T286I组合;D184A或D184F可以与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,和/或T286I组合;R204A可以与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,和/或T286I组合;R205A可以与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,和/或T286I组合;S247I可以与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,和/或T286I组合;D264A可以与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,和/或T286I组合;G264A可以与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,和/或T286I组合;G265A可以与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,和/或T286I组合;和/或T286I可以与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,和/或G265A组合。

[0184] 基于实施例中的经验证据,预测志贺毒素A亚基中的某些氨基酸耐受表位破坏,同时仍保留显著的志贺毒素效应子功能。例如,天然位置在1-15、53-66、55-66、94-115和180-190的表位区耐受多个氨基酸置换组合,同时不丧失志贺毒素酶活性,并且通常不丧失细胞毒性(见实施例)。

[0185] 靶向细胞的结合区与去免疫化志贺毒素效应子区多肽连接允许当施用给哺乳动物(例如,人受试者)时有效的志贺毒素细胞毒性的细胞类型特异性的靶向的改造,具有较少的由抗原性和/或免疫原性导致的潜在的副作用。本发明的蛋白包含来源于志贺毒素家族成员A亚基的去免疫化志贺毒素效应子区,所述去免疫化志贺毒素效应子区与能够特异性结合至少一种与细胞物理关联的细胞外靶标生物分子,诸如表达在细胞表面上的靶标生物分子。由于任何数量的多样性靶向细胞的结合区可以与本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽连接,因此,该通用结构是模块式的。

[0186] 在本发明的某些实施方案中,蛋白包含来源于免疫球蛋白型多肽的结合区,针对与癌细胞的细胞表面上的表面抗原的特异性和高亲和力结合选择所述结合区,其中所述抗原在癌细胞中的表达是受限的(参见GlöklerJ等,Molecules 15:2478-90(2010);Liu Y等,Lab Chip 9:1033-6(2009))。按照其他实施方案,所述结合区针对与癌细胞的细胞表面上的表面抗原的特异性和高亲和力结合进行选择,其中所述抗原较非癌症细胞由癌细胞过表达或优先表达。一些代表性的靶标生物分子包括,但不限于,下文列举的与癌症和/或特异性免疫细胞型相关的靶标。

[0187] 现有技术中存在许多种识别与癌细胞相关的表位的免疫球蛋白型结合区,诸如靶向下述的结合区:膜联蛋白AI,B3黑素瘤抗原,B4黑素瘤抗原,CD2,CD3,CD4,CD20(B-淋巴细胞抗原蛋白CD20),CD22,CD25(白介素-2受体IL2R),CD30(TNFRSF8),CD38(环形ADP核糖水解酶),CD40,CD44(透明质酸受体),ITGAV(CD51),CD66,CD71(转铁蛋白受体),CD73,CD74(HLA-DR抗原-相关的不变链),CD79,CD98,内皮因子(END,CD105),CD106(VCAM-1),4型趋化因子受体(CDCR-4,融合素,CD184),CD200,胰岛素样生长因子1受体(CD221),粘蛋白1(MUC1,CD227),基细胞粘附分子(B-CAM,CD239),CD248(内皮唾液酸蛋白,TEM1),肿瘤坏死因子受体10b(TNFRSF10B,CD262),肿瘤坏死因子受体13B(TNFRSF13B,TACI,CD276),血管内

皮生长因子受体2(KDR,CD309),上皮细胞粘附分子(EpCAM,CD326),人表皮生长因子受体2(HER2,Neu,ErbB2,CD340),癌症抗原15-3(CA15-3),癌症抗原19-9(CA 19-9),癌症抗原125(CA125,MUC16),CA242,癌胚抗原-相关的细胞粘附分子(例如,CEACAM3(CD66d)和CEACAM5),癌胚抗原蛋白(CEA),硫酸软骨素蛋白聚糖4(CSP4,MCSP,NG2),CTLA4,DLL4,表皮生长因子受体(EGFR,ErbB1),叶酸受体(FOLR),G-28,神经节苷脂GD2,神经节苷脂GD3,HLA-Dr10,HLA-DRB,人表皮生长因子受体1(HER1),Ephrin型-B受体2(EphB2),上皮细胞粘附分子(EpCAM),成纤维细胞激活蛋白(FAP/seprase),胰岛素样生长因子1受体(IGF1R),白介素2受体(IL-2R),白介素6受体(IL-6R),整联蛋白α-Vβ-3($\alpha_V\beta_3$),整联蛋白α-Vβ-5(αvβ5),整联蛋白α-5β-1($\alpha_5\beta_1$),L6,MPG,黑素瘤-相关的抗原1蛋白(MAGE-1),黑素瘤-相关的抗原3(MAGE-3),mesothelin(MSLN),MPG,MS4A,p21,p97,脊髓灰质炎病毒受体-样4(PVRL4),蛋白酶-活化的-受体(诸如PAR1),前列腺-特异性膜抗原蛋白(PSMA),营养细胞糖蛋白(TPGB),和肿瘤-相关的钙信号转导蛋白(TACSTDs)(参见,例如,Lui B等,Cancer Res 64:704-10(2004);Novellino L等,Cancer Immunol Immunother 54:187-207(2005);Bagley R等,Int J Oncol 34:619-27(2009);Gerber H等,mAbs 1:247-53(2009);Beck A等,Nat Rev Immunol 10:345-52(2010);Andersen J等,J Biol Chem 287:22927-37(2012);Nolan-Stevaux O等,PLoS One 7:e50920(2012);Rust S等,Mol Cancer 12:11(2013))。该靶标生物分子的列表旨在是非限制性的。技术人员应该理解,可以使用任何与癌细胞或其他需要的细胞类型相关的靶标生物分子来设计或选择与志贺毒素效应子区偶联的结合区,从而产生本发明的蛋白。

[0188] 与癌细胞强烈相关的并且具有已知与癌细胞结合的免疫球蛋白型结合区的其他靶标生物分子的实例包括BAGE蛋白(B黑素瘤抗原),基细胞粘附分子(BCAMs或Lutheran血型糖蛋白),膀胱肿瘤抗原(BTA),睾丸癌抗原NY-ESO-1,睾丸癌抗原LAGE蛋白,CD19 (B-淋巴细胞抗原蛋白CD19),CD21(补体受体-2或补体3d受体),CD26(二肽基肽酶-4,DPP4,或腺苷脱氨酶复合蛋白2),CD33(唾液酸-结合免疫球蛋白-型凝集素-3),CD52(CAMPATH-1抗原),CD56,CS1(SLAM家族7号或SLAMF7),细胞表面A33抗原蛋白(gpA33),EB病毒抗原蛋白,GAGE/PAGE蛋白(黑素瘤相关的癌症/睾丸抗原),肝细胞生长因子受体(HGFR或c-Met),MAGE蛋白,由T细胞1蛋白识别的黑素瘤抗原(MART-1/MelanA,MARTI),粘蛋白,优先表达的黑素瘤抗原(PRAME)蛋白,前列腺特异性的抗原蛋白(PSA),前列腺干细胞抗原蛋白(PSCA),晚期糖基化终产物受体(Receptor for Advanced Glycation Endroducts (RAGE)),肿瘤相关的糖蛋白72(TAG-72),血管内皮生长因子受体(VEGFRs),和肾母细胞瘤(Wilms' tumor)抗原。

[0189] 其他与癌细胞强烈相关的靶标生物分子的实例是碳酸酐酶IX(CA9/CAIX),Claudin蛋白(CLDN3,CLDN4),蝶素(ephrin)型-A受体3(EphA3),叶酸结合蛋白(FBP),神经节苷脂GM2,胰岛素样生长因子受体,整联蛋白(诸如CD11a-c),核因子κB的受体激活剂(RANK),受体酪氨酸-蛋白激酶erB-3,肿瘤坏死因子受体10A(TRAIL-R1/DR4),肿瘤坏死因子受体10B(TRAIL-R2),生腱蛋白C,和CD64(Fcγ RI)(参见Hough C等,Cancer Res 60:6281-7(2000);Thepen T等,Nat Biotechnol 18:48-51(2000);Pastan I等,Nat Rev Cancer 6:559-65(2006);Pastan,Annu Rev Med 58:221-37(2007);Fitzgerald D等,Cancer Res 71:6300-9(2011);ScottA等,CancerImmun 12:14-22(2012))。该靶标生物分

子的列表旨在是非限制性的。

[0190] 另外,存在所考虑的靶标生物分子的多种其他的实例,诸如ADAM金属蛋白酶(例如,ADAM-9,ADAM-10,ADAM-12,ADAM-15,ADAM-17),ADP-核糖基转移酶(ART1,ART4),抗原F4/80,骨髓间质抗原(BST1,BST2),断点簇区-c-abl癌基因(break point cluster region-c-abl oncogene(BCR-ABL))蛋白,C3aR(补体成分3a受体),CD7,CD13,CD14,CD15(Lewis X或阶段特异胚抗原1),CD23(FCεRII),CD49d,CD53,CD54(细胞内粘附分子1),CD63(四跨膜蛋白(tetraspanin)),CD69,CD80,CD86,CD88(补体成分5a受体1),CD115(集落刺激因子1受体),CD123(白介素-3受体),CD129(白介素9受体),CD183(趋化因子受体CXCR3),CD191(CCR1),CD193(CCR3),CD195(趋化因子受体CCR5),CD203c,CD225(干扰素-诱导的跨膜蛋白1),CD244(天然杀伤细胞受体2B4),CD282(toll-样受体2),CD284(Toll-样受体4),CD294(GPR44),CD305(白细胞-相关的免疫球蛋白-样受体1),蝶素型-A受体2(EphA2),FceRIa,半乳凝素-9,甲胎蛋白抗原17-A1蛋白,人天冬氨酰(天冬酰胺酰)β-羟化酶(HAAH),免疫球蛋白-样转录物ILT-3,溶血磷脂酰甘油酰基转移酶1(LPGAT1/IAA0205),溶酶体-相关的膜蛋白(LAMPs,诸如CD107),黑素细胞蛋白PMEL(gp100),骨髓-相关的蛋白-14(mrp-14),受体酪氨酸-蛋白激酶erbB-3,SART蛋白,清道夫受体(诸如CD64和CD68),Siglecs(唾液酸-结合免疫球蛋白-型凝集素),多配体聚糖(诸如SDC1或CD138),酪氨酸酶,酪氨酸酶-相关的蛋白1(TRP-1),酪氨酸酶-相关的蛋白2(TRP-2),酪氨酸酶相关的抗原(TAA),APO-3,BCMA,CD2,CD3,CD4,CD8,CD18,CD27,CD28,CD29,CD41,CD49,CD90,CD95(Fas),CD103,CD104,CD134(OX40),CD137(4-1BB),CD152(CTLA-4),趋化因子受体,补体蛋白,细胞因子受体,组织相容性蛋白,ICOS,白介素-α,白介素-β,c-myc,骨保护素,PD-1,RANK,TACI,TNF受体超家族成员(TNF-R1,TNFR-2),Apo2/TRAIL-R1,TRAIL-R2,TRAIL-R3,和TRAIL-R4(参见Scott A等,Cancer Immunity 12:14(2012);Cheever M等,Clin Cancer Res 15:5323-37(2009)),关于靶标生物分子,并且注意本文所述的靶标分子是非限制性的实例)。技术人员应该理解,可以使用任何需要的靶标生物分子来设计或选择要与去免疫化志贺毒素效应子区偶联的结合区,以产生本发明的蛋白。

[0191] 在某些实施方案中,所述结合区包含针对与免疫系统细胞类型的细胞表面的特异性和高亲和力结合选择的免疫球蛋白型多肽或基本上由其组成。例如,已知结合下述的免疫球蛋白型结合结构域: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,白介素-2受体(IL-2R),核因子κ B的受体激活剂(RANKL),SLAM-相关的蛋白(SAP),和TNFSF18(肿瘤坏死因子配体18或GITRL)。

[0192] 对于特定的实施方案,去免疫化细胞毒性蛋白包含下述氨基酸或基本上由下述氨基酸组成:SEQ ID NO:53,SEQ ID NO:54,SEQ ID NO:55,或SEQ ID NO:56。这些去免疫化的CD20-结合性细胞毒性蛋白实施方案可以用于治疗和/或诊断骨癌、白血病、淋巴瘤、黑素瘤、骨髓瘤、淀粉样变性(amyloidosis)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis)、哮喘、克罗恩病(Crohn's disease)、糖尿病、移植物排斥、移植物对抗宿主病(graft-versus-host disease)、桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、溶血性尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome)、HIV-相关的疾病、红斑狼疮、多发性硬化(multiple

sclerosis)、多动脉炎(polyarteritis)、银屑病(psoriasis)、牛皮癣关节炎(psoriatic arthritis)、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)、硬皮病(scleroderma)、感染性休克(septic shock)、舍格伦综合征(Sjorgren's syndrome)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)和/或脉管炎(vasculitis)。

[0193] 对于特定的实施方案,去免疫化细胞毒性蛋白包含SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58或SEQ ID NO:59的氨基酸或基本上由其组成。这些去免疫化的HER-2-结合性细胞毒性蛋白实施方案可以用于治疗和/或诊断乳腺癌、宫颈癌(cervical cancer)、头颈癌(例如,口咽癌(oropharynx))、胃肠癌(例如,食道癌和结直肠癌)、肾-尿道癌(例如,膀胱癌)、肺/胸膜癌和卵巢癌。

[0194] 在某些实施方案中,所述结合区包含针对靶向细胞外受体选择的配体或基本上由所述配体组成。一些代表性的配体包括,但不限于,下述骨形态生成蛋白和激活蛋白膜结合的抑制剂BAMBI(也称为TGFBR),CD137L(也称为4-1BB),诱饵受体3DcR3(也称为TR6和TNFRSF6B),和肿瘤坏死因子TWEAK(也称为TNFSF12和APO3L)。关于更多非限制性的示例性配体,见实施例中的表12。

[0195] 在表位破坏后变为非毒性的去免疫化志贺毒素效应子区,例如,包含R179A的志贺毒素效应子区,仍然可以用于将外源物质递送到细胞内。仅保留显著水平的志贺毒素催化活性功能的去免疫化志贺毒素效应子区仍然可以用作酶活性的去免疫化的分子成分。

[0196] 使用本发明的多肽和蛋白的片段、变体和/或衍生物也在本发明的范围内,其包含功能性细胞外靶标生物分子结合位点,并且甚至更优选地能够以高亲和力结合所述靶标生物分子(例如,由K_D所示)。例如,任何包含以10^{-5}至10^{-12}摩尔/升、优选小于200nM的解离常数结合靶标生物分子(优选表达在细胞表面上)的多肽的结合区可以替代用于制备本发明的分子(例如,去免疫化志贺毒素效应子多肽和细胞毒性蛋白)和用于本发明的方法。

[0197] IV.去免疫化志贺毒素效应子区多肽和蛋白的一般功能

[0198] 由于在哺乳动物中产生不需要的免疫应答的可能性降低,本发明的多肽和蛋白具有改进的应用,用于施用给哺乳动物物种作为治疗剂和/或诊断剂。重要的是,在本发明的多肽中,在B细胞表位破坏后,原始志贺毒素效应子区的需要的生物学功能得以保留。另外,B细胞表位通常与成熟CD4+T细胞的表位相同或重叠,由此破坏B细胞表位通常同时破坏了CD4+T细胞表位。

[0199] 在施用给多种哺乳动物时,本发明的多种去免疫化志贺毒素效应子多肽可能区别在于它们的抗原性模式,但是预测具有降低的抗原性和/或免疫原性。为了改善其在涉及施用给哺乳动物的医学应用中的用途,不需要完全消除志贺毒素来源的多肽的所有免疫原性(参见Nagata,Adv Drug Deliv Rev 61:977-85(2009))。治疗性蛋白中仅一些主导性氨基酸的修饰可以极大地降低其抗原性和/或免疫原性,而不干扰蛋白的整体稳定性、结构和功能。然而,当理想地避免了不需要的B细胞和/或CD4+T细胞免疫应答时,预测在更加免疫原性的B细胞表位中具有破坏的志贺毒素效应子多肽对于施用给哺乳动物是更有利的。

[0200] 本发明提供多种去免疫化志贺毒素效应子多肽,其可以用作多种主题组合物的组分,诸如靶向细胞的细胞毒性蛋白和诊断组合物。特别地,所述去免疫化志贺毒素效应子多肽具有作为多种蛋白治疗剂(诸如,例如,免疫毒素和配体-毒素融合体)的组分的用途,用于特定细胞类型的靶向性杀伤,以用于治疗多种疾病,包括癌症、免疫病症和微生物感染。

[0201] 本发明还提供多种细胞毒性蛋白，其包含与结合区功能性缔合的去免疫化志贺毒素效应子区，从而实现细胞靶向，使得所述细胞毒性蛋白选择性杀伤、抑制特定细胞类型、向特定细胞类型递送外源物质和/或检测特定细胞类型。本发明的蛋白的结合区能够特异性结合与细胞物理关联的至少一种细胞外靶标生物分子，诸如在细胞的表面上表达的靶标生物分子。靶向细胞的结合区与去免疫化志贺毒素效应子区多肽的结合允许有效的志贺毒素细胞毒性和/或白细胞淤积的细胞型特异性靶向的改造。

[0202] 在某些实施方案中，本发明的蛋白能够结合与特定细胞性的细胞表面缔合的细胞外靶标生物分子并且进入这些分子。一旦在靶向的细胞型中内在化，本发明的蛋白的某些实施方案能够提供路线运送酶活性的、细胞毒性的志贺毒素效应子多肽片段进入靶细胞的细胞质中。一旦进入靶向的细胞型的细胞质中，本发明的细胞毒性蛋白的某些实施方案能够使核糖体酶促失活，并且最终杀伤所述细胞。备选地，本发明的蛋白的无毒变体可以用于将另外的外源物质递送到靶细胞中，诸如，肽、多肽、蛋白、多核苷酸和检测促进剂。由于任意数量的多样性结合区可以用于使该有效的细胞毒性靶向多种、多样性的细胞性，该系统是模块式的。

[0203] A.通过靶向的志贺毒素细胞毒性的细胞杀伤

[0204] 由于志贺毒素家族的成员适合杀伤真核细胞，因此，使用去免疫化志贺毒素效应子区设计的细胞毒性蛋白可以表现出有效的细胞杀伤活性。志贺毒素家族的成员的A亚基包含能够在进入细胞的细胞质中后杀伤真核细胞的酶结构域。B细胞表位的破坏没有显著改变本发明的特定志贺毒素效应子区的细胞毒性机制。因此，本发明的去免疫化细胞毒性蛋白保持有效的细胞毒性，同时降低了在施用给哺乳动物时某些免疫应答的可能性。

[0205] 在本发明的去免疫化细胞毒性蛋白的特定实施方案中，当与本发明细胞毒性蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞接触时(靶标+细胞)，所述细胞毒性蛋白能够引起该细胞的死亡。在不同的靶细胞条件下，诸如离体操作的靶细胞、体外培养的靶细胞、在体外培养的组织样品内的靶细胞或体内靶细胞，使用本发明的细胞毒性蛋白可以实现细胞杀伤。

[0206] B.在多种细胞型之间的选择性细胞毒性

[0207] 通过利用高亲和性结合区使酶活性、去免疫化的志贺毒素区的递送靶向特定细胞类型，该有效的细胞杀伤活性可以限制为优先杀伤所选择的细胞型。

[0208] 在某些实施方案中，在将本发明的蛋白施用给细胞型的混合物后，所述蛋白能够相对于没有与细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞类型选择性地杀伤与细胞外靶标生物分子物理偶联的那些细胞。因为志贺毒素家族的多个成员适合用于杀伤真核细胞，使用志贺毒素效应子区设计的细胞毒性蛋白可以显示出有效的细胞毒性活性。通过使用高亲和力结合区域将酶活性的志贺毒素区域的递送靶向特定细胞类型，该有效的细胞杀伤活性可以限于仅杀伤希望通过它们与选择的结合区的靶标生物分子的物理结合而靶向的那些细胞型。

[0209] 在某些实施方案中，本发明的细胞毒性蛋白能够选择性地或优先地造成两个或更多个不同细胞型的混合物内的特定细胞型的死亡。这能够实现与不表达靶标生物分子的“旁观”细胞类型相比高优先的对特定细胞类型的靶向细胞毒性活性，诸如3倍细胞毒性效应。备选地，如果靶标生物分子以足够低的量表达和/或以低量与不靶向的细胞型物理偶

联,则结合区的靶标生物分子的表达可以不专属于一种细胞类型。这允许相对于不表达显著量的靶标生物分子或不与显著量的靶标生物分子物理偶联的“旁观”细胞类型以高优先性(诸如3-倍的细胞毒性作用)进行特定细胞类型的靶向性细胞杀伤。

[0210] 在某些其它实施方案中,在将细胞毒性蛋白施用给两个不同的细胞型群体后,细胞毒性蛋白能够造成细胞死亡,如通过关于靶细胞群体(其成员表达细胞毒性蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子)的半数最大细胞毒性浓度(CD_{50})所确定的,其剂量比相同细胞毒性蛋白对于其成员不表达细胞毒性蛋白的结合区的细胞外靶标生物分子的细胞群体的CD_{50}剂量低至少3倍。

[0211] 在某些实施方案中,对与细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞型的群体的细胞毒性活性比对没有与结合区的任何细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞型群体的细胞毒性活性至少3倍高。根据本发明,可以以下述比率(a/b)的方式定量选择性的细胞毒性:(a)对与结合区的靶标生物分子物理偶联的特定细胞型的细胞群体的细胞毒性:(b)对没有与结合区的靶标生物分子物理偶联的细胞型的细胞群体的细胞毒性。在某些实施方案中,所述细胞毒性比率指示,相对于没有与结合区的靶标生物分子物理偶联的细胞群体或细胞型,对与结合区的靶标生物分子物理偶联的细胞群体或细胞型的选择性的细胞毒性至少3倍高、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倍或1000倍。

[0212] 该优先细胞杀伤功能允许本发明的某些细胞毒性蛋白在不同条件下和在有非靶向的旁观细胞(诸如离体操作的细胞型的混合物、体外培养的含有细胞型混合物的组织)存在下、或在体内在有多个细胞型存在下(例如原位或在多细胞生物体内的天然位置)杀伤被靶向的细胞。

[0213] C.另外的外源物质向被靶向的细胞的内部的递送

[0214] 除了细胞毒性和细胞生长抑制应用以外,本发明的蛋白任选地可以用于信息收集和诊断功能。此外,本发明的细胞毒性蛋白的无毒变体或任选的有毒变体可以用于将另外的外源物质递送至与细胞毒性蛋白的细胞外靶标生物分子物理偶联的细胞内部和/或标记所述细胞内部。本发明的用于接收外源物质的蛋白可以靶向表达所述靶标生物分子到至少一个细胞表面的不同类型的细胞和/或细胞群体。本发明的功能组分是模块化的,因为不同的志贺毒素效应子区和另外的外源物质可以连接至不同的结合区以提供不同的应用,诸如肿瘤细胞的非侵入性体内成像。

[0215] 因为本发明的蛋白(包括其无毒形式)能够进入与细胞外靶标生物分子(被本发明的蛋白的结合区识别)物理偶联的细胞中,本发明的蛋白的某些实施方案可以用于将另外的外源物质递送进被靶向的细胞型的内部。在一个意义上,本发明的整个蛋白是进入细胞的外源物质;因而,“另外的”外源物质是与核心细胞毒性蛋白本身连接、但是除此以外的异源物质。在表位破坏后变成无毒性的去免疫化志贺毒素效应子区仍然可以用于将外源物质递送到细胞内(例如,R179A)。

[0216] 本文中使用的“另外的外源物质”表示一个或多个分子,其经常是通常不存在于天然靶细胞内,其中本发明的蛋白可以用于特异性地将这样的物质运输至细胞内部。另外的外源物质的非限制性例子是肽、多肽、蛋白、多核苷酸、小分子化学治疗剂和检测促进剂。

[0217] 在某些实施方案中,所述另外的外源物质包含含有酶的蛋白或多肽。在某些其它

实施方案中，所述另外的外源物质是核酸，例如，作为小抑制RNA(siRNA)或微RNA(miRNA)起作用的核糖核酸。在某些实施方案中，所述另外的外源物质是抗原，诸如从细菌蛋白、病毒蛋白、在癌症中突变的蛋白、在癌症中异常表达的蛋白、或T-细胞互补决定区来源的抗原。例如，外源物质包括抗原，诸如被细菌感染的抗原呈递细胞特有的那些抗原，和能够作为外源抗原起作用的T-细胞互补决定区。外源物质的其它例子包括比抗原肽更大的多肽和蛋白，诸如酶。包含多肽或蛋白的外源物质可以任选地包含一个或多个抗原，无论是技术人员已知的还是未知的。

[0218] D.用于诊断功能的信息收集

[0219] 本发明的某些蛋白用在特定细胞、细胞型和/或细胞群体的体外和/或体内检测中。在某些实施方案中，本文描述的蛋白用于诊断和治疗二者，或仅用于诊断。当相同细胞毒性蛋白用于诊断和治疗二者时，通过一个或多个氨基酸置换(包括本文描述的示例性置换)对志贺毒素效应子区的催化灭活，可以使包含用于诊断的检测促进剂的细胞毒性蛋白变体无毒。与检测促进剂缀合的、本发明的细胞毒性蛋白的无毒形式任选地可以用于诊断功能，诸如用于与包含相同或相关结合区域的治疗方案联合使用的伴侣诊断。

[0220] 将本领域已知的检测促进剂与本发明的各种蛋白缀合的能力会提供用于检测癌症、肿瘤、免疫和被感染的细胞的有用组合物。通过本领域已知的各种成像技术和测定，本发明的蛋白的这些诊断实施方案可以用于信息收集。例如，通过患者或活组织检查样品中各个癌细胞、免疫细胞或受感染的细胞的细胞内细胞器(例如内吞隔室、高尔基隔室、内质网隔室和细胞溶质隔室)的成像，本发明的蛋白的诊断实施方案可以用于信息收集。

[0221] 使用本发明的蛋白的诊断实施方案可以收集不同类型的信息，无论用于诊断用途还是其它用途。该信息可用于，例如，诊断赘生性细胞类型，确定患者的疾病的治疗敏感性，测定抗肿瘤治疗随时间的进展，测定免疫调节治疗随时间的进展，测定抗微生物治疗随时间的进展，评价受感染的细胞在移植物中的存在，评价不希望的细胞类型在移植物中的存在，和/或评价肿瘤块的外科手术切除以后残余肿瘤细胞的存在。

[0222] 例如，使用用本发明的蛋白的诊断变体收集的信息，可能确定患者亚群，然后可以基于使用那些诊断实施方案揭示的他们的独特特征将各个患者分类成亚群。例如，特定药物或治疗的有效性可能是用于定义患者亚群的一类判据。例如，可以使用本发明的特定细胞毒性蛋白的无毒诊断变体区分哪些患者属于预期对本发明的相同蛋白的细胞毒性变体做出阳性应答的患者的类别或亚群。因此，使用本发明的去免疫化的蛋白(包括本发明的细胞毒性蛋白的无毒变体)进行患者鉴别、患者分级和诊断的有关方法被认为是在本发明范围内。

[0223] E.免疫/接种物质和抗毒素

[0224] 本发明的多肽具有作为偏向性免疫(biased immunization)和/或接种材料用于在存在本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽的条件下驱动针对特异性表位的免疫应答的引发。产生志贺毒素的微生物的感染负责发病率和死亡率(Johannes，Nat Rev Microbiol 8:105-16(2010))。产生志贺毒素的细菌是溶血性尿毒症综合征(hemolytic uremic syndrome)(HUS)和志贺氏菌病(Shigellosis)以及相关的病况(诸如出血性结肠炎和痢疾)的主要原因(参见Karmali M，Mol Biotechnol 26:117-22(2004))。另外，美国疾病控制和预防中心(U.S.Centers for Disease Control and Prevention，CDC)将志贺毒素

依据它们用作生物武器的潜力将它们分类为B类生物威胁剂。

[0225] 在针对志贺全毒素或志贺毒素亚基的免疫应答过程中引发的哺乳动物抗体可以是中和性的或非中和性的(取决于表位)。此外,识别志贺毒素的抗体可能具有不同的中和作用,这取决于哪个志贺毒素亚基包含抗体的表位(Krautz-Peterson G等,Infect Immun 76:1931-9(2008))。本发明的某些多肽因此用于人工驱动与某些表位区无关的哺乳动物免疫应答(诸如例如,其引发不需要的非中和抗体)和针对其他表位的哺乳动物免疫应答(诸如,例如,其引发需要的中和和/或保护性抗体)的方法,。

[0226] 本发明的某些多肽具有作为偏向性免疫和/或接种材料的应用,用在用于降低和/或消除特定表位的抗原性和/或免疫原性同时允许引发针对没有破坏的天然表位的免疫应答的方法中。可以使用用于哺乳动物的免疫技术来产生偏离志贺毒素A亚基的选定表位区的抗志贺毒素抗体。

[0227] 另外,本发明的某些多肽可以用于多种筛选方法,诸如,例如,蛋白展示筛选和体外选择,用于产生、鉴定和亲和力成熟多种结合结构域(诸如,例如,免疫球蛋白型结构域),其结合志贺毒素,以使筛选选择偏离志贺毒素A亚基选定的表位区(参见Glökler J等,Molecules 15:2478-90(2010);Bradbury A等,Nat Biotechnol 29:245-54(2011);Chen T,Keating A,Protein Sci 21:949-63(2012);Geyer C等,Methods Mol Biol 901:11-32(2012))。这些方法特别用于靶向不连续的表位,所述不连续的表位在不存在其他未被靶向的表位的条件下不能被靶向。这些方法用于产生新型中和抗体和抑制志贺毒素毒性的非免疫球蛋白型结构域(参见Perera L等,J Clin Microbiol 26:2127-31(1988);Mukherjee J等,Infect Immun 70:5896-9(2002);Smith M等,Infect Immun 77:2730-40(2009);Rocha L等,Toxins 4:729-47(2012);Tremblay J等,Infect Immun 81:4592-603(2013);Skinner C等,PLoS One 9:e99854(2014))。

[0228] 本发明的某些多肽可以用作免疫材料用在产生和/或制备偏向性抗志贺毒素抗体或抗毒素的方法中。可以使用用于免疫动物的免疫技术来产生偏离志贺毒素A亚基选定的表位区的抗志贺毒素抗体。例如,本发明的某些多肽可以用作免疫材料以产生偏离志贺毒素A亚基选定的表位区的抗志贺毒素A亚基抗体。另外,通过将本发明的去免疫化志贺毒素A亚基与志贺毒素B亚基组合,可以使用免疫技术来产生偏向针对存在于天然志贺毒素B亚基和/或全毒素中存在的各个志贺毒素亚基之间的界面上的表位的抗志贺毒素抗体。这些抗志贺毒素抗体具有在涉及免疫检测测定且用于产生志贺毒素中和抗体或抗毒素的方法中的应用(参见Mukherjee J等,Infect Immun 70:5896-9(2002);Sheoran A等,Infect Immun 71:3125-30(2003);Cheng L等,Toxins 5:1845-58(2013);He X等,J Immunol Methods 389:18-28(2013);Tremblay J等,Infect Immun 81:4592-603(2013))。因此,本发明的某些多肽可以用于更好地产生志贺毒素中和抗体,然后,该可以可以作为保护剂、治疗剂施用,或者被改造成保护剂和/或治疗剂用于治疗由产生志贺毒素的微生物或对志贺毒素的其他暴露引起的感染(参见Fujii J等,Microb Pathog 25:139-46(1998);Mukherjee J等,Infect Immun 70:5896-9(2002);Sheoran A等,Infect Immun 71:3125-30(2003);Gao X等,Vaccine 29:6656-63(2011);Cheng L等,Toxins 5:1845-58(2013);He X等,J Immunol Methods 389:18-28(2013);Tremblay J等,Infect Immun 81:4592-603(2013);Vance D等,JBiol Chem 288:36538-47(2013))。

[0229] 本发明的某些多肽可以用作接种材料用在用于产生和/或制备偏向性抗志贺毒素抗体的方法中。可以与包含本发明的某些多肽的组合物一起使用接种技术，以赋予哺乳动物针对由产生志贺毒素的微生物或其他暴露于志贺毒素引起的将来的感染的主动免疫性(参见Bosworth B等，Infect Immun 64:55-60(1996)；Rabinovitz B等，JDairy Sci 95:3318-26(2012))。疫苗设计可以考虑引发中和抗体相对于非中和抗体的表位之间的差异(存在非中和抗体干扰受试者中国的保护性中和抗体的可能性)。

[0230] 例如，在五种针对志贺全毒素的抗体的研究中，仅有一种表现出中和活性，并且这种抗体结合A和B亚基二者(He X等，J Immunol Methods 389:18-28(2013))。类似地，对于AB毒素蓖麻毒蛋白，中和抗体识别A与B亚基之间的界面，并且防止A亚基片段的释放(O'Hara J，Mantis N，J Immunol Methods 395:71-8(2013))。

[0231] 为了接种目的，使疫苗材料偏向引发主要针对外部表位和/或跨越全毒素结构中A亚基与B亚基的交界面的表位的抗体应答可能是更有利的(O'Hara J，Mantis N，J Immunol Methods 395:71-8(2013)；O'Hara J等，Curr Top Microbiol Immunol 357:209-41(2012))。例如，针对蓖麻毒蛋白的接种已经得益于仅引发非保护性的非中和抗体的天然免疫原性区域的消除(Olsnes S，Toxicon 44:361-70(2004))。类似地，去除蓖麻毒蛋白的免疫显性区域可能具有偏离产生针对某些表位的非中和抗体的偏向性抗体反应(O'Hara J等，Vaccine 28:7035-46(2010))或甚至偏离产生毒素增强抗体的偏向性抗体反应(Maddaloni M等，J Immunol 172:6221-8(2004))。为了该目的，消除分离的志贺毒素A区域内的某些表位可能去除不需要的表位，并且驱动更需要的表位的抗体产生，诸如跨越志贺毒素亚基界面的表位。

[0232] 本发明用作偏向性免疫和/或接种材料的多肽可能得益于志贺毒素效应子功能(诸如酶活性和/或细胞毒性)的减少和/或消除，诸如酶活性和/或细胞毒性(He X等，J Immunol Methods 389:18-28(2013)；Skinner C等，PLoS One 9:e99854(2014))。志贺毒素效应子功能的减少或消除可以使用公知的方法通过使用技术人员已知的或由技术人员发现的一个或多个截短和/或氨基酸置换来实现。另外，志贺毒素效应子功能的减少或消除可以通过使用实施例中所述的置换来实现，所述置换在志贺毒素效应子测定中表现出减弱的、严重降低的活性和/或活性丧失，诸如，例如，核糖体抑制和靶向性细胞毒性。

[0233] V.去免疫化志贺毒素效应子区多肽和蛋白的多肽序列中的变异

[0234] 技术人员会认识到，可以对本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和蛋白以及编码前述任一种的多核苷酸做出变化，而不减少它们的生物活性，例如，通过维持毒素效应子区的整体结构和功能联合一个或多个降低抗原性和/或免疫原性潜力的表位破坏。例如，有些修饰可以促进表达、纯化和/或药代动力学性能和/或免疫原性。这样的修饰是技术人员众所周知的，且包括，例如，将甲硫氨酸添加在氨基端以提供起始位点，将另外的氨基酸放置在任一端上以产生方便地定位的限制位点或终止密码子，和使生化亲和标签与任一端融合以提供方便的检测和/或纯化。

[0235] 在本文中还预见到在氨基端和/或羧基端包括另外的氨基酸残基，诸如表位标签或其它结构部分的序列。所述另外的氨基酸残基可以用于多种目的，包括，例如，促进克隆，促进表达、翻译后修饰，促进合成、纯化，促进检测和施用。表位标签和结构部分的非限制性例子是：壳多糖(chitin)结合蛋白结构域、肠肽酶切割位点、因子Xa切割位点、FIAsH标签、

FLAG标签、绿色荧光蛋白(GFP)、谷胱甘肽-S-转移酶结构部分、HA标签、麦芽糖结合蛋白结构域、myc标签、聚组氨酸标签、ReAsH标签、strep-标签、strep-标签II、TEV蛋白酶位点、硫氧还蛋白结构域、凝血酶切割位点和V5表位标签。

[0236] 在某些以上实施方案中，本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白的多肽序列不同在于多肽区中的一个或多个保守氨基酸置换，条件是在本文提供的至少一个天然位置的表位区中至少一个氨基酸被破坏。本文中使用的术语“保守置换”表示一个或多个氨基酸被另一个生物学上相似的氨基酸残基替换。例子包括具有相似特征的氨基酸残基(例如小氨基酸、酸性氨基酸、极性氨基酸、碱性氨基酸、疏水氨基酸和芳族氨基酸)的置换(例如，参见下表B)。使用通常不存在于内源哺乳动物肽和蛋白中的残基的保守置换的一个例子是利用例如鸟氨酸、刀豆氨酸、氨基乙基半胱氨酸或另一种碱性氨基酸对精氨酸或赖氨酸残基的保守置换。关于与肽和蛋白中表型上沉默的置换相关的其它信息，参见，例如，Bowie J等，Science 247:1306-10(1990)。

[0237] 表B.保守氨基酸置换的实例

[0238]

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

[0239] 在表B的保守置换方案中，示例性的保守氨基酸置换根据物理化学性质进行分组——I:中性的、亲水的;II:酸和酰胺;III:碱性的;IV:疏水的;V:芳族的、庞大氨基酸,VI亲水的、不带电荷的,VII脂族不带电荷的,VIII非极性的不带电荷的,IX环烯基相关的、X疏水的,XI极性的,XII小的,XIII允许旋转的,和XIV柔性的。例如，保守氨基酸置换包括下述：1)S可以置换C;2)M或L可以置换F;3)Y可以置换M;4)Q或E可以置换K;5)N或Q可以置换H;和6)H可以置换N。

[0240] 另外的保守氨基酸置换包括下述:1)S可以置换C;2)M或L可以置换F;3)Y可以置换M;4)Q或E可以置换K;5)N或Q可以置换H;和6)H可以置换N。

[0241] 在某些实施方案中，本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白可以包含本发明的多肽区域的功能片段或变体，与本文引用的多肽序列相比，所述功能片段或变体最多具有20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换，条件是，其保留在实施例中提供的在天然位置的表位区中的至少一个氨基酸的破坏(表1,2,3,4,和/或5)，并且其单独地或作为本发明的治疗和/或诊断组合物的组分时表现出显著水平的志贺毒素效应子功能。作为通过下述改变本发明的蛋白的多肽的结果，本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽

和/或蛋白的变体是在本发明范围内:改变一个或多个氨基酸或删除或插入一个或多个氨基酸(诸如在结合区或志贺毒素效应子区内),以便实现期望的性能,诸如改变的细胞毒性、改变的细胞生长抑制作用、改变的免疫原性和/或改变的血清半衰期。去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或本发明的蛋白的多肽还可以具有或没有信号序列。

[0242] 在某些实施方案中,本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白与本文引用的蛋白的氨基酸序列中的任一个具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的氨基酸序列同一性的氨基酸序列,只要其保留在实施例中提供的在天然位置的表位区中的至少一个氨基酸的破坏(表1,2,3,4,和/或5),并且保持可测量的生物活性如细胞毒性、细胞外靶标生物分子结合、酶催化、亚细胞按路线发送或催化失活核糖体。

[0243] 在某些实施方案中,可以改变本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白,以改变志贺毒素效应子区的酶活性和/或细胞毒性,只要在实施例中提供的在天然位置的表位区中的至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)。这种改变可以或可以不引起改变的志贺毒素效应子区是其中的组分的志贺毒素效应子区多肽或细胞毒性蛋白的细胞毒性的改变。可能的改变包括志贺毒素效应子区多肽的选自由下列各项组成的组的突变:截短、缺失、倒置、插入和置换,只要在实施例中提供的在天然位置的表位区中的至少一个氨基酸被破坏(表1,2,3,4,和/或5)即可。

[0244] 可以通过突变或截短来减少或消除志贺毒素家族成员的A亚基的细胞毒性。已经证明标记为酪氨酸-77、谷氨酸-167、精氨酸-170、酪氨酸-114、和色氨酸-203的位置对于Stx、Stx1、和Stx2的催化活性是重要的(Hovde C等,Proc Natl Acad Sci USA 85:2568-72(1988);Deresiewicz R等,Biochemistry 31:3272-80(1992);Deresiewicz R等,Mol Gen Genet 241:467-73(1993);Ohmura M等,Microb Pathog 15:169-76(1993);Cao C等,Microbiol Immunol 38:441-7(1994);Suhan M,Hovde C,Infect Immun 66:5252-9(1998))。在无细胞核糖体失活测定中将谷氨酸-167和精氨酸-170二者突变消除了Slt-I A1的酶活性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。在利用内质网中Slt-I A1的从头表达的另一种方法中,将谷氨酸-167和精氨酸-170二者突变在所述表达水平上消除了Slt-I A1片段细胞毒性(LaPointe,JBiol Chem 280:23310-18(2005))。截短分析表明,残基75至268的StxA的片段在体外仍然保持明显的酶活性(Haddad,J Bacteriol 175:4970-8(1993))。通过细胞质中的从头表达,含有残基1-239的Slt-I A1的截短片段显示出明显的体外酶活性和细胞毒性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。截短至残基1-239的Slt-I A1片段在内质网中的表达不是细胞毒性的,因为其不能逆移位到细胞质中(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。

[0245] 志贺毒素A亚基中对酶活性和/或细胞毒性最重要的残基被绘图定位至以下残基位置:特别是天冬酰胺-75、酪氨酸-77、酪氨酸-114、谷氨酸-167、精氨酸-170、精氨酸-176和色氨酸-203(Di,Toxicon 57:535-39(2011))。尤其是,含有谷氨酸-E167到赖氨酸和精氨酸-176到赖氨酸突变的Stx2A的双突变构建体完全失活;而Stx1和Stx2中的许多单一突变显示出细胞毒性的10倍降低。此外,截短Stx1A至1-239或1-240降低了其细胞毒性,并且类似地,截短Stx2A至保守疏水残基降低了其细胞毒性。志贺毒素A亚基中对结合真核核糖体和/或真核核糖体抑制最重要的残基被绘图定位至以下残基位置:特别是精氨酸-172、精氨酸-176、精氨酸-179、精氨酸-188、酪氨酸-189、缬氨酸-191和亮氨酸-233(McCluskey A等,

PLoS One 7:e31191(2012)。

[0246] 志贺样毒素1A亚基截短是具有催化活性的,能够在体外使核糖体酶促失活,并且当在细胞内表达时是具有细胞毒性的(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。展现出完全酶活性的最小志贺毒素A亚基片段是由Slt1A的残基1-239组成的多肽(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。尽管报道的保持基本催化活性的志贺毒素A亚基的最小片段是StxA的残基75-247(A1-Jaufy,Infect Immun 62:956-60(1994)),在真核细胞内从头表达的StxA截短仅需要至多残基240以到达细胞质并且进行核糖体的催化失活(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。

[0247] 在来源于SLT-1A(SEQ ID NO:1)或StxA(SEQ ID NO:2)的本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白的某些实施方案中,这些改变包括位置75处的天冬酰胺、位置77处的酪氨酸、位置114处的酪氨酸、位置167处的天冬氨酸、位置170处的精氨酸、位置176处的精氨酸的置换,和/或位置203处的色氨酸的置换。对于技术人员来说,基于现有技术,这种置换的实例将会是已知的,如位置75处的天冬酰胺变为丙氨酸、位置77处的酪氨酸变为丝氨酸、位置114处的酪氨酸变为丝氨酸的置换、位置167处的谷氨酰胺变为天冬氨酸的置换、位置170处的精氨酸变为丙氨酸的置换、位置176处的精氨酸变为赖氨酸的置换、和/或位置203处的色氨酸变为丙氨酸的置换。增强或减少志贺毒素的酶活性和/或细胞毒性的其他突变在本发明的范围内,并且可以使用公知的技术和本文公开的测定来确定。

[0248] 本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白可以任选地与可以包括本领域中已知的治疗剂和/或诊断剂(包括本文所述的此类试剂)的一种或多种另外的药剂缀合。

[0249] VI.去免疫化志贺毒素效应子区多肽或蛋白的产生、制备和纯化

[0250] 本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和蛋白可以使用对本领域技术人员来说公知的生物化学工程技术生产。例如,本发明的志贺毒素效应子区多肽和蛋白可以通过标准合成方法、利用重组表达系统生产,或者通过任何其他适合的方法生产。因此,本发明的志贺毒素效应子区多肽和蛋白可以以多种方式合成,包括,例如包括下列各项的方法:(1)使用标准固相或液相方法、分步地或通过片段组装来合成蛋白的多肽或多肽组分,并且将最终的肽化合物产物分离并纯化;(2)在宿主细胞中表达编码本发明的蛋白的多肽或多肽组分的多核苷酸并且从宿主细胞或宿主细胞培养物中回收表达产物;或(3)进行编码本发明的蛋白的多肽或多肽组分的多核苷酸的无细胞体外表达,并且回收表达产物;或者通过方法(1)、(2)或(3)的任意组合以获得肽组分的片段,随后将片段结合(例如连接(ligating))以获得肽组分,并且回收肽组分。

[0251] 可以优选通过固相或液相肽合成来合成去免疫化志贺毒素效应子区多肽或本发明的蛋白的多肽或多肽组分。本发明的志贺毒素效应子区多肽和蛋白可以适合地通过标准合成方法生产。因此,可以通过例如这样的方法来合成肽,所述方法包括通过标准固相或液相方法、分步地或通过片段组装来合成肽,并且将最终的肽产物分离并纯化。在该情形中,可以参考WO 1998/11125,或尤其是Fields G等,Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis(Synthetic Peptides,Grant G,ed.,Oxford University Press,U.K.,第2版,2002)以及其中的合成实例。

[0252] 本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和蛋白可以使用在本领域内公知的重

组技术制备(生产和纯化)。通常,通过培养转化或转染有包含编码多核苷酸的载体的宿主细胞并且从细胞培养物中回收多肽来制备多肽的方法被描述于,例如Sambrook J等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,U.S.,1989);Dieffenbach C等,PCR Primer:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.,U.S.,1995)。任何适合的宿主细胞均可以用于生产本发明的志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白。宿主细胞可以是用一种或多种驱动本发明的多肽表达的表达载体稳定或瞬时转染、转化、转导或感染的细胞。此外,可以通过修饰编码本发明的多肽或蛋白的多核苷酸来生产本发明的志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白,这导致改变一个或多个氨基酸或者缺失或插入一个或多个氨基酸,以便实现所需性质,如改变的细胞毒性、改变的细胞生长抑制作用、改变的免疫原性和/或改变的血清半衰期。

[0253] 存在宽泛种类的可以选择用于生产本发明的蛋白的表达系统。例如,用于表达本发明的蛋白的宿主生物体包括原核生物,诸如大肠杆菌和芽胞枯草杆菌(B.subtilis),真核细胞,诸如酵母和丝状真菌(如酿酒酵母(S.cerevisiae)、巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)、泡盛曲霉(A.awamori)和乳酸克鲁维酵母(K.lactis)),藻类(如衣藻(C.reinhardtii)),昆虫细胞系,哺乳动物细胞(如CHO细胞),植物细胞系,和真核生物体,如转基因植物(如拟南芥(A.thaliana)和本生烟草(N.benthamiana))。

[0254] 因此,本发明还提供用于根据以上所述方法并且使用下述来生产本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白的方法:编码本发明的多肽或本发明的蛋白的多肽组分的部分或全部的多核苷酸,包含当被引入到适当的宿主细胞中时能够编码本发明的多肽的部分或全部的本发明的至少一种多核苷酸的表达载体,和/或包含本发明的多核苷酸或表达载体的宿主细胞。

[0255] 当使用重组技术在宿主细胞或无细胞系统中表达多肽或蛋白时,有利的是从其他组分如宿主细胞因子中分离(或纯化)所需的多肽或蛋白,从而获得高纯度的或基本均质的制剂。纯化可以通过在本领域内公知的方法完成,如离心技术,提取技术,层析和分馏技术(例如,通过凝胶过滤的尺寸分离、通过离子交换柱的电荷分离、疏水相互作用层析法、反相层析法、在二氧化硅或阳离子交换树脂如DEAE等上的层析法、层析聚焦、和蛋白A琼脂糖层析法,以用于去除污染物),以及沉淀技术(例如乙醇沉淀或硫酸铵沉淀。任何数量的生物化学纯化技术均可以用于增加本发明的志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白的纯度。在某些实施方案中,本发明的多肽和蛋白可以任选地以同型多聚体形式(即,两个以上相同的本发明的多肽或蛋白的蛋白复合物)纯化。

[0256] 在以下实施例中的是对用于生产本发明的蛋白的方法的非限制性实例的描述,以及对本发明的示例性蛋白的制备的具体但非限制性的方面。

[0257] VII.包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽或蛋白的药物和诊断组合物

[0258] 本发明提供这样的多肽和蛋白,其用于单独地或在药物组合物中与一种或多种另外的治疗剂组合地用于治疗或预防以下更详细描述的病况、疾病、病症、或症状(例如癌症、恶性肿瘤、非恶性肿瘤、生长异常、免疫病症和微生物感染)。本发明还提供药物组合物,其包含本发明的多肽或蛋白或其根据本发明的药用盐或溶剂化物,以及至少一种药用载体、赋形剂、或载体。在某些实施方案中,本发明的药物组合物可以包含本发明的多肽或蛋白的同型多聚体和/或异型多聚体形式。所述药物组合物将可用于治疗、改善、或预防以下更详

细描述的疾病、病况、病症、或症状的方法。预期各个这样的疾病、病况、病症、或症状均为就本发明所述的药物组合物的用途而言的单独的实施方案。本发明还提供用于至少一种如以下更详细描述的本发明所述的治疗方法的药物组合物。

[0259] 如在本文中所使用的，术语“患者”和“受试者”可互换使用，以指代任何生物，通常是脊椎动物如人和动物，其表现出至少一种疾病、病症、或病况的症状、征兆、和/或指征。这些术语包括哺乳动物如灵长类动物、家畜动物(例如牛、马、猪、绵羊、山羊等)、宠物(例如猫、狗等)以及实验动物(例如小鼠、兔、大鼠等)的非限制性实例。

[0260] 如在本文中所使用的，“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、或“治疗(treatment)”以及它们的语法变体是指用于获得有益或所需的临床结果的方法。该术语可以指延缓病况、病症或疾病的发病或发展速度，减轻或缓解与其有关的症状，产生病况的全部或部分消退，或者以上任何的一些组合。对于本发明的目的来说，有益或所需的临床结果包括，但不限于，无论是否是可检测的或不可检测的，症状的减轻或缓解、疾病程度降低、疾病状态的稳定(例如不恶化)、疾病发展的推迟或延缓、疾病状态的改善或缓和、以及康复(无论是部分的或全部的)。“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、或“治疗(treatment)”还可以意指相对于在不接受治疗的情况下的预期存活时间延长存活。需要治疗的受试者(例如人)因此可以是已经遭受所讨论的疾病或病症折磨的受试者。术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、或“治疗(treatment)”包括相对于不存在治疗的情况抑制或减轻病理状态或症状的严重性的增加，并且并非必须意指暗示相关疾病、病症、或病况完全停止。关于肿瘤和/或癌症，治疗包括整体肿瘤负担和/或个体肿瘤尺寸的减小。

[0261] 如在本文中所使用的，术语“防止(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”以及它们的语法变体是指用于预防病患、疾病、或病症的发展或者改变病患、疾病、或病症的病理学的方法。因此，“预防”可以指预防或防止的措施。对于本发明的目的来说，有益或所需的临床结果包括，但不限于，无论是否是可检测的或不可检测的，预防或延缓疾病的症状、进展或发展。需要预防的受试者(例如人)因此可以是尚未遭受所讨论的疾病或病症折磨的受试者。术语“预防”包括相对于不存在治疗的情况延缓疾病的发病，并且并非必须意指暗示相关疾病、病症、或病患的永久性预防。因此在某些情形中病患的“预防(preventing)”或“预防(prevention)”可以是指降低发展病患的风险，或者预防或推迟与该病患有关的症状的发展。

[0262] 如在本文中所使用的，“有效量”或“治疗有效量”是在受试者中产生至少一种所需治疗效果的组合物(例如治疗组合物或药剂)的量或剂量，如预防或治疗目标病患或有益地缓解与该病患有关的症状。最合乎需要的治疗有效量是将会产生由本领域技术人员为需要其的给定受试者选择的具体治疗的所需功效的量。这种量将会根据各种技术人员理解的因素变化，包括但不限于，治疗性化合物的特性(包括活性、药物动力学、药效学、和生物利用度)，受试者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型、疾病阶段、总体身体状况、对给定剂量的响应性、和药物的类型)，药用载体或制剂中载体的性质，以及给药途径。临床和药理学技术的人员将能够通过常规实验确定治疗有效量，即通过监测受试者对施用化合物的响应并且相应地调节剂量(参见，例如，Remington:The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A,编,Mack Publishing Co.,Easton,PA,U.S.,第19版,1995))。

[0263] 本发明的诊断组合物包含本发明的多肽或蛋白和一个或多个检测促进剂。各种检

测促进剂是本领域已知的，诸如同位素、染料、比色测量剂、反差增强剂、荧光剂、生物发光剂和磁性剂。这些试剂可以在任何位置掺入本发明的多肽或蛋白中。所述试剂的掺入可以是通过所述细胞毒性蛋白的氨基酸残基或通过本领域已知的一些连接类型，包括通过接头和/或螯合剂。所述试剂的掺入是以这样的方式：能够在筛选、测定、诊断操作和/或成像技术中检测诊断组合物的存在。

[0264] 当生产或制备本发明的诊断组合物时，本发明的蛋白可以直接地或间接地连接至一个或多个检测促进剂。存在技术人员已知的众多检测促进剂，它们可以可操作地连接至本发明的多肽或蛋白用于信息收集方法，诸如用于针对生物体的疾病、病症或病患的诊断和/或预后应用(参见例如Cai W等，JNucl Med 48:304-10(2007)；Nayak T，Brechbiel M，Bioconjug Chem 20:825-41(2009)；Paudyal P等，Oncol Rep 22:115-9(2009)；Qiao J等，PLoS ONE 6:e18103(2011)；Sano K等，Breast Cancer Res 14:R61(2012))。例如，检测促进剂包括增强图像的造影剂，诸如荧光染料(例如Alexa680、吲哚菁绿和Cy5.5)、同位素和放射性核素，诸如^{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和^{223}R；顺磁离子，诸如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镝(III)、钬(III)或铒(III)；金属，诸如镧(III)、金(III)、铅(II)和铋(III)；超声-反差增强剂，诸如脂质体；不透射线的试剂，诸如钡、镓和铊化合物。通过使用中间官能团，诸如螯合剂如2-苄基DTPA、PAMAM、NOTA、DOTA、TETA、其类似物和前述任一种的功能等同物(参见Leyton J等，Clin Cancer Res 14:7488-96(2008))，可以直接地或间接地掺入检测促进剂。

[0265] 存在技术人员已知的用于将各种检测促进剂掺入、附着和/或缀合至蛋白、特别是免疫球蛋白和免疫球蛋白来源的结构域的众多标准技术(Wu A，Methods 65:139-47(2014))。类似地，存在技术人员已知的众多成像方案，诸如在医学领域中常用的非侵入性体内成像技术，例如：计算机体层摄影术成像(CT扫描)、光学成像(包括直接的、荧光的和生物发光的成像)、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射计算机体层摄影术(SPECT)、超声和x-射线计算机体层摄影术成像(关于综述，参见Kaur S等，CancerLett 315:97-111(2012))。

[0266] 生产或制备包含本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽或蛋白的药物和/或论断组合物

[0267] 任何本发明的多肽和蛋白的药用盐或溶剂化物同样也在本发明的范围内。

[0268] 本发明情形中的术语“溶剂化物”是指在溶质(在本情况下，为根据本发明的多肽化合物或其药用盐)和溶剂之间形成的限定的化学计量的复合物。相关的溶剂可以是，例如，水、乙醇或另一种药用的、通常为小分子有机物种，如，但不限于，乙酸或乳酸。当所讨论的溶剂是水时，这种溶剂化物通常被称为水合物。

[0269] 本发明的多肽和蛋白或其盐可以被配制为为储存或施用而制备的药物组合物，所述药物组合物通常包含在药用载体中的治疗有效量的本发明的化合物或其盐。术语“药用载体”包括任何标准药物载体。用于治疗用途的药用载体是制药领域中公知的，并且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.(A.Gennaro，编，

1985)。如在本文中所使用的,“药用载体”包括任何和所有生理学上可接受的,即相容的,溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂、等渗剂、和吸收延缓剂等。药用载体或稀释剂包括在适用于口服、直肠、鼻或肠胃外(包括皮下、肌内、静脉内、皮内、和经皮)施用的制剂中使用的那些。示例性的药用载体包括无菌水溶液或分散液和用于无菌可注射溶液或分散液的即时制备的无菌粉末。可以在本发明的药物组合物中采用的适合的水性和非水载体的实例包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、和它们的适合的混合物,植物油如橄榄油,以及可注射有机酯如油酸乙酯。例如,通过使用包衣材料如卵磷脂,通过维持分散液情况下所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。在某些实施方案中,载体适用于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。根据所选择的给药途径,可以将所述细胞毒性蛋白或其他药物组分包衣在用于保护化合物免受当通过特定给药途径施用于患者时所述活性细胞毒性蛋白可能会遇到的低pH和其他天然失活条件的作用影响的物质中。

[0270] 本发明的药物组合物的制剂可以以单位剂型方便地提供并且可以通过任何在药学领域内公知的方法制备。以这种形式,将组合物分为含有适合量的活性组分的单位剂量。单位剂型可以是包装的制剂,包装含有离散量的制剂,例如,小包片剂、胶囊、和小药瓶或安瓿瓶中的粉剂。单位剂型还可以是胶囊、扁胶囊(cachet)、或片剂本身,或者其可以是适合数量的这些包装形式中的任何一种。其可以以单剂量可注射形式,例如以笔(pen)的形式提供。可以将组合物配制为用于任何适合的施用途径和方式。皮下或经皮施用方式可以特别适用于在本文中所描述的治疗性蛋白。

[0271] 本发明的药物组合物还可以含有辅助剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌操作,以及通过包含多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等,可以确保防止存在微生物。组合物中的等渗剂,如糖类、氯化钠等,也可以是合乎需要的。此外,通过包含延缓吸收的药剂如单硬脂酸铝和明胶,可以产生可注射药物形式的延长的吸收。

[0272] 本发明的药物组合物还任选地包含药用抗氧化剂。示例性的药用抗氧化剂是:水溶性抗氧化剂如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚等;以及金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0273] 在另一个方面中,本发明提供药物组合物,其包含本发明的不同的多肽和/或蛋白或任何前述各项的酯、盐或酰胺中的一种或组合,以及至少一种药用载体。

[0274] 治疗性组合物在制造和储存条件下通常是无菌和稳定的。组合物可以配制为溶液、微乳液、脂质体、或适合高药物浓度的其他规则结构。载体可以是溶剂或分散介质,包括,例如,水、醇如乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇)、或任何适合的混合物。例如,通过使用包衣如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂,根据本领域内公知的制剂化学,可以维持适当的流动性。在某些实施方案中,等渗剂,例如糖类,多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇,或氯化钠可以是在组合物中合乎需要的。可以通过在组合物中包含延缓吸收的试剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来产生可注射组合物的延长吸收。

[0275] 用于皮内或皮下施用的溶液或悬浮液通常包括下列各项中的一种或多种:无菌稀

释剂如注射用水、盐水溶液、非发挥性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗菌剂如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;缓冲液如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及张力(tonicity)调节剂如,例如,氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱,如盐酸或氢氧化钠,或者具有柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐等的缓冲液调节pH。此类制剂可以封装在安瓿瓶、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小药瓶中。

[0276] 通过以所需的量将本发明的多肽或蛋白以及上述成分中的一种或组合加入适合的溶剂中,当需要时,继之以进行灭菌微过滤,可以制备无菌可注射溶液。通过将活性化合物加入至含有分散介质和其他成分(如上述那些)的无菌赋型剂中,可以制备分散液。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性成分以及来自其无菌过滤溶液的任何另外的所需成分的粉末。

[0277] 当将治疗有效量的本发明的多肽或蛋白设计为通过例如静脉内、皮肤或皮下注射来施用时,粘合剂将会是无热原、肠胃外可接受的水溶液的形式。考虑到适合的pH、等渗性、稳定性等,用于制备肠胃外可接受的蛋白质溶液的方法属于本领域技术。除了粘合剂之外,用于静脉内、皮肤、或皮下注射的优选的药物组合物将含有等渗赋型剂,如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's injection)、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、乳酸林格氏注射液、或在本领域中已知的其他赋型剂。本发明的药物组合物还可以含有稳定剂、防腐剂、缓冲液、抗氧化剂、或对本领域技术人员来说公知的其他添加剂。

[0278] 如在本文中其他地方描述的,本发明的多肽或蛋白或其组合物可以用保护化合物免于快速释放的载体来制备,如受控释放制剂,包括植入物、经皮贴剂、和微囊化递送系统。可以使用生物可降解的、生物相容性聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯、和聚乳酸。许多用于制备这种制剂的方法被授予了专利或是本领域技术人员通常已知的(参见,例如,Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (Robinson J,编,Marcel Dekker,Inc.,NY,U.S.,1978))。

[0279] 在某些实施方案中,可以将本发明的药物组合物配制成确保在体内的所需分布。例如,血脑屏障排除许多大型和/或亲水性化合物。为了将本发明的治疗性化合物或组合物靶向至特定的体内位置,例如,可以将它们配制在可以包含被选择性地运输至特定细胞或器官的一个或多个结构部分的脂质体中,从而增强靶向药物递送。示例性的靶向结构部分包括叶酸或生物素;甘露糖苷;抗体;表面活性剂蛋白A受体;p120联蛋白等。

[0280] 药物组合物包括被设计成用作植入物或微粒系统的胃肠外制剂。植入物的例子是由聚合的或疏水的组分(诸如乳剂、离子交换树脂和可溶性的盐溶液)组成的贮库制剂。微粒系统的例子是微球、微粒、纳米胶囊、纳米球和纳米颗粒(参见例如Honda M等,Int J Nanomedicine 8:495-503(2013);SharmaA等,Biomed Res Int 2013:960821(2013);Ramishetti S,Huang L,Ther Deliv 3:1429-45(2012))。使用对离子敏感的聚合物,诸如,例如,脂质体、泊洛沙姆407和羟磷灰石,可以制备控释制剂。

[0281] VIII.多核苷酸、表达载体和宿主细胞

[0282] 除了本发明的多肽和蛋白以外,编码本发明的多肽和蛋白或其功能部分的多核苷酸也在本发明的范围内。术语“多核苷酸”是术语“核酸”的等同物,二者均包括脱氧核糖核酸(DNAs)的聚合物、核糖核酸(RNAs)的聚合物、利用核苷酸类似物产生的这些DNA或RNA的类似物、以及它们的衍生物、片段和同系物。本发明的多核苷酸可以是单链的、双链的或三

链的。例如,考虑RNA密码子的第三位中可容忍的但是作为不同的RNA密码子编码相同氨基酸的摆动性(wobble)(参见Stothard P,Biotechniques 28:1102-4(2000)),公开的多核苷酸被具体公开为包括所有能够编码示例性细胞毒性蛋白的多核苷酸。

[0283] 在一个方面中,本发明提供编码本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白、或其片段或衍生物的多核苷酸。多核苷酸可以包括,例如,编码与包含所述蛋白的氨基酸序列中的一个的多肽具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%以上的同一性的多肽的核酸序列。本发明还包括包含与编码本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白、或其片段或衍生物的多核苷酸在严格条件下杂交的核苷酸序列,或者任何这种序列的反义序列或互补序列的多核苷酸。

[0284] 本发明的多核苷酸(或去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白)的衍生物或类似物包括,尤其是,具有与本发明的多核苷酸、去免疫化志贺毒素效应子区多肽或蛋白基本同源的区域的多核苷酸(或多肽)分子,例如与相同尺寸的多核苷酸或多肽序列相比,或者当与比对的序列(其中所述比对由本领域中已知的计算机同源性程序进行)相比时,至少约45%、50%、70%、80%、95%、98%、或甚至99%的同一性(并且优选的同一性为80-99%)。示例性的程序是使用默认设置的GAP程序(Wisconsin Sequence Analysis Package,Version 8 for UNIX,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison,WI,U.S.),其使用Smith T,Waterman M,Adv.Appl.Math.2:482-9(1981)的算法。还包括能够与编码本发明的蛋白的序列的互补序列在严格条件下杂交的多核苷酸(参见例如Ausubel F等,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,New York,NY,U.S.,1993)),以及以下。严格条件是本领域技术人员已知的并且可以在Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,NY,U.S.,Ch.Sec.6.3.1-6.3.6(1989))中找到。

[0285] 本发明还提供包含本发明范围内的多核苷酸的表达载体。可以使用本领域内公知的材料和方法将能够编码本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白的多核苷酸插入至包括细菌质粒、病毒载体和噬菌体载体在内的已知载体中以产生表达载体。这种表达载体将包括支持在任何选择的宿主细胞或无细胞表达系统(例如以下实施例中描述的pTxb1和pIVEX 2.3)中产生预期的本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白所需的多核苷酸。用于与特定类型的宿主细胞或无细胞表达系统一起使用的包含具体的多核苷酸的表达载体对本领域普通技术人员来说是公知的,可以是使用常规实验确定的,或者可以是购买的。

[0286] 如在本文中所使用的,术语“表达载体”是指包含一个或多个表达单元的线性或环形的多核苷酸。术语“表达单元”表示编码目标多肽并且能够提供核酸区段在宿主细胞中的表达的多核苷酸区段。表达单元通常包含均处于可操作构型的转录启动子、编码目标多肽的开放阅读框、和转录终止子。表达载体含有一个或多个表达单元。因此,在本发明上下文中,编码包含单个多肽链(例如具有志贺毒素效应子区的遗传重组的scFv)的志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白的表达载体至少包括用于该单个多肽链的表达单元,而编码包含例如两个以上多肽链(例如与毒素效应子区连接的包含V_L结构域的一条链和包含V_H结构域的第二链)的蛋白包括至少两个表达单元,各自用于所述蛋白的两条多肽链中的每一个。对于本发明的多链蛋白的表达,用于每条多肽链的表达单元还可以单独地包含在不同的表达载体

中(例如,可以利用已经向其中引入用于每条多肽链的表达载体的单一宿主细胞实现表达)。

[0287] 能够引导多肽和蛋白的瞬时或稳定表达的表达载体是在本领域内公知的。表达载体通常包括,但不限于下列各项中的一种或多种:异源信号序列或肽、复制起点、一个或多个标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列,其中的每一个均为在本领域内公知的。任选的调节控制序列、整合序列、和可以采用的可用标记物是在本领域中已知的。

[0288] 术语"宿主细胞"是指可以支持表达载体的复制或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,如大肠杆菌,或者真核细胞(例如酵母、昆虫、两栖动物、鸟类、或哺乳动物细胞)。可以使用在本领域中已知的标准技术来实现包含本发明的多核苷酸或能够产生本发明的多肽和/或蛋白的宿主细胞系的创建和分离。

[0289] 在本发明的范围内的去免疫化志贺毒素效应子区多肽和/或蛋白可以是在本文中所描述的多肽和蛋白的变体或衍生物,其是这样产生的:通过改变一个或多个氨基酸或者缺失或插入一个或多个氨基酸来修饰编码多肽和/或蛋白的多核苷酸以可以使其更适用于实现所需性质,如通过宿主细胞的更优的表达。

[0290] IX.递送装置和试剂盒

[0291] 在某些实施方案中,本发明涉及一种装置,其包含用于递送给受试者的本发明的物质的一种或多种组合物,诸如药物组合物。因而,包含本发明的一种或多种化合物的递送装置可以用于通过多种递送方法给患者施用本发明的物质的组合物,所述递送方法包括:静脉内、皮下、肌肉内或腹膜内注射;口服施用;透皮施用;肺或透粘膜施用;通过植入物、渗透泵、筒或微量泵施用;或通过本领域技术人员公知的其它方式。

[0292] 试剂盒也在本发明范围内,所述试剂盒包含本发明的物质的至少一种组合物和任选的包装和使用说明书。试剂盒可用于药物施用和/或诊断信息收集。本发明的试剂盒可以任选地包含至少一种另外的试剂(例如,标准品、标志物等)。试剂盒典型地包括标签,所述标签指示试剂盒的内容物的预期用途。所述试剂盒还可以包含用于检测在样品中或在受试者中的细胞类型(例如肿瘤细胞)或用于诊断患者是否属于对利用如本文中所述的本发明的化合物、组合物或有关方法的治疗策略做出应答的群体的试剂和其它工具。

[0293] X.使用去免疫化志贺毒素效应子区多肽或蛋白或其药物组合物和/或诊断组合物的方法

[0294] 通常,本发明的一个目的是提供药理学上有活性的试剂、以及包含它们的组合物,它们可以用于预防和/或治疗疾病、病症和病患,诸如某些癌症、肿瘤、生长异常、免疫病症、或在本文中提及的其它病理学状况。因此,本发明提供了使用本发明的多肽、蛋白和药物组合物的方法,其用于靶向杀伤细胞,用于将另外的外源物质递送进被靶向的细胞中,用于标记被靶向的细胞的内部,用于收集诊断信息,和用于治疗如本文中所述的疾病、病症和病患。

[0295] 具体地,本发明的一个目的是提供这样的药理学上有活性的试剂、组合物和/或方法,其与本领域目前已知的试剂、组合物和/或方法相比具有某些优点。因此,本发明提供了使用具有特定的多肽序列的多肽和蛋白及其药物组合物的方法。例如,在SEQ ID NO:4-59中的任一个多肽序列可以具体地用作在下述方法中使用的蛋白的组分。

[0296] 本发明提供了杀伤细胞的方法,所述方法包括下述步骤:使体外或体内细胞与本

发明的多肽、蛋白或药物组合物接触。在使一个或多个细胞与要求保护的物质的组合物之一接触以后，本发明的多肽、蛋白和药物组合物可以用于杀伤特定细胞类型。在某些实施方案中，本发明的细胞毒性多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀伤不同细胞类型的混合物中的特定细胞类型，诸如包含癌细胞、受感染的细胞和/或血液细胞的混合物。在某些实施方案中，本发明的细胞毒性多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀伤不同细胞类型的混合物中的癌细胞。在某些实施方案中，本发明的细胞毒性多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀伤不同细胞类型的混合物中的特定细胞类型，诸如移植前组织。在某些实施方案中，本发明的多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀伤细胞类型的混合物中的特定细胞类型，诸如用于治疗目的的施用前组织材料。在某些实施方案中，本发明的多肽、蛋白或药物组合物可以用于选择性地杀伤被病毒或微生物感染的细胞，或以其它方式选择性地杀伤表达特定细胞外靶标生物分子(诸如细胞表面生物分子)的细胞。本发明的多肽、蛋白和药物组合物具有多种应用，包括，例如，用于从体外或体内组织除去不希望的细胞类型，用于调节免疫应答以治疗移植物抗宿主病，用作抗病毒剂，用作抗寄生虫剂，和用于净化移植组织的不希望的细胞类型。

[0297] 在某些实施方案中，当施用给受试者中(诸如需要治疗的患者中)的体外或体内细胞群体时，本发明的细胞毒性多肽、蛋白或药物组合物(单独地或与其它化合物或药物组合物组合地)可以表现出有效的细胞杀伤活性。通过使用高亲和力结合区使酶活性志贺毒素区域的递送靶向特定的细胞型，可以将该有效的细胞杀伤活性限于特异性地和选择性地杀伤生物体内的特定细胞类型，诸如某些癌细胞、赘生性细胞、恶性细胞、非恶性肿瘤细胞或受感染的细胞。

[0298] 本发明提供了一种杀伤有此需要的患者中的细胞的方法，所述方法包括下述步骤：给所述患者施用至少一种本发明的细胞毒性多肽或蛋白或其药物组合物。

[0299] 本发明的细胞毒性多肽、蛋白或其药物组合物的某些实施方案可以用于通过靶向被发现与癌症或肿瘤细胞物理上关联的细胞外生物分子而杀伤患者中的癌细胞。术语“癌细胞”或“癌性细胞”表示以异常加速的方式生长和分裂的各种赘生性细胞，且是技术人员显而易见的。术语“肿瘤细胞”包括恶性的和非恶性的细胞。通常，癌症和/或肿瘤可以定义为适合治疗和/或预防的疾病、病症或病患。由癌细胞和/或肿瘤细胞构成的癌症和肿瘤(恶性的或非恶性的)是技术人员显而易见的。赘生性细胞经常与以下一种或多种相关：失调的生长、分化的缺失、局部组织侵入、血管生成和转移。

[0300] 本发明的细胞毒性多肽或蛋白或其药物组合物的某些实施方案可以用于通过靶向被发现与免疫细胞物理上关联的细胞外生物分子而杀伤患者中的免疫细胞(无论是健康的还是恶性的)。

[0301] 本发明的细胞毒性多肽或蛋白或其药物组合物的某些实施方案可以用于通过靶向被发现与受感染的细胞物理上关联的细胞外生物分子而杀伤患者中受感染的细胞。

[0302] 为了以下目的利用本发明的蛋白或其药物组合物是在本发明范围内：净化患者细胞群体(例如骨髓)的被感染的、恶性的、肿瘤性的、或在其它方面不希望的T-细胞和/或B-细胞，然后将除去了T-细胞和/或B-细胞的物质重新输入患者中(参见例如，van Heeckeren W等，Br J Haematol 132:42-55(2006)；(参见例如，Alpdogan O，van den Brink M，Semin Oncol 39:629-42(2012))。

[0303] 为了以下目的利用本发明的蛋白或其药物组合物是在本发明范围内:从取自患者的分离的细胞群体离体除去T细胞和/或B细胞。在一个非限制性实施例中,本发明的蛋白可以用在用于预防器官和/或组织移植排斥的方法中,其中在移植之前用本发明的细胞毒性蛋白或其药物组合物灌注供体器官或组织,以便净化器官的不需要的供体T-细胞和/或B-细胞(参见例如Alpdogan O,van den Brink M,Semin Oncol 39:629-42(2012))。

[0304] 为了以下目的利用本发明的蛋白或其药物组合物也是在本发明范围内:从供体细胞群体除去T-细胞和/或B-细胞作为要接受骨髓和/或干细胞移植的患者中针对移植物抗宿主病和耐受性诱导的预防(参见例如,van Heeckeren W等,Br J Haematol 132:42-55(2006);(参见例如,Alpdogan O,van den Brink M,Semin Oncol 39:629-42(2012))。

[0305] 本发明的细胞毒性多肽或蛋白或其药物组合物的某些实施方案可以用于通过靶向被发现与受感染的细胞物理上关联的细胞外生物分子而杀伤患者中受感染的细胞。

[0306] 另外,本发明提供了治疗患者中疾病、病症或病患的方法,所述方法包括下述步骤:给有此需要的患者施用治疗有效量的至少一种本发明的细胞毒性多肽或蛋白或其药物组合物。可以使用该方法治疗的预见到的疾病、病症和病患包括癌症、恶性肿瘤、非恶性肿瘤、生长异常、免疫病症和微生物感染。“治疗上有效剂量”的本发明的化合物的施用可以导致疾病症状的严重程度的降低,无疾病症状阶段的频率和持续时间的增加,或由疾病折磨而导致的损害或残疾的预防。

[0307] 本发明的化合物的治疗有效量将取决于施用途径、所治疗的哺乳动物的类型、和在考虑中的特定患者的体格特征。这些因素以及它们与确定这种量的关系是医学领域的技术从业人员众所周知的。这种量和施用方法可以进行调节以实现最佳效力,并且可以取决于医学领域的技术人员众所周知的因素,如重量、饮食、并存的药物和其它因素。最适用于人类用途的剂量大小和定量施用方案可以由通过本发明得到的结果指导,并且可以在适当地设计的临床试验中确认。通过常规方式,在实验动物中以低剂量开始并且然后在监测效果的同时增加剂量、以及系统性地改变给药方案,可以确定有效剂量和治疗方案。当为给定受试者确定最佳剂量时,临床医师可以考虑许多因素。这样的考虑因素是技术人员已知的。

[0308] 可接受的施用途径可以表示在本领域中已知的任何施用途径,包括但不限于气雾剂、肠内、鼻、眼、口服、肠胃外、直肠、阴道或透皮(例如,乳膏、凝胶或软膏的局部施用,或借助于透皮贴剂)。“肠胃外施用”典型地与在预期作用部位处的注射有关或与预期作用部位连通,包括眶下、输注、动脉内、囊内、心内、真皮内、肌肉内、腹膜内、肺内、椎管内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、囊下、皮下、透粘膜或经气管施用。

[0309] 关于本发明的药物组合物的施用,剂量范围通常将为约0.0001-100毫克/千克(mg/kg)宿主体重,并且更通常为0.01-5mg/kg宿主体重。示例性剂量可以是0.25mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重或在1-10mg/kg的范围内。一个示例性的治疗方案是每天一次或两次施用,或每周一次或两次施用,每两周一次,每三周一次,每四周一次,每月一次,每两个月或三个月一次或者每三至六个月一次。剂量可以由熟练的健康护理专业人员根据需要选择并重新调节以使对于特定患者而言的治疗益处最大化。

[0310] 本发明的药物组合物典型地将会在多种情形下施用给相同患者。单次剂量之间的间隔可以是,例如,2-5天、每周、每月、每两个月或三个月、每六个月、或每年。基于调节受试

者或患者中的血液水平或其它标志物，施用之间的间隔也可以是不规律的。本发明的化合物的剂量方案包括1mg/kg体重或3mg/kg体重的静脉内施用，其中将化合物每两至四周施用一次达六个剂量，然后以3mg/kg体重或1mg/kg体重每三个月施用一次。

[0311] 使用本领域已知的多种方法中的一种或多种，可以经由一种或多种施用途径施用本发明的药物组合物。如技术人员将会理解的，施用的途径和/或模式将会根据期望的结果而变化。本发明的多肽、蛋白和其药物组合物的施用途径包括，例如静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其它肠胃外施用途径，例如，通过注射或输注。在其它实施方案中，本发明的多肽、蛋白或药物组合物可以通过非肠胃外途径施用，诸如局部、表皮或粘膜施用途径，例如，鼻内地、口服地、阴道地、直肠地、舌下地或局部地。

[0312] 利用本领域已知的多种医疗装置中的一种或多种，可以施用本发明的治疗性多肽、蛋白或药物组合物。例如，在一个实施方案中，可以利用无针皮下注射装置施用本发明的药物组合物。在本领域中具有可用于本发明的众所周知的植入物和模块的例子，包括例如，用于受控速率递送的可植入微量输液泵；用于穿过皮肤施用的装置；用于以精确的输注速率递送的输液泵；用于连续药物递送的可变流可植入输注装置；以及渗透药物递送系统。这些和其它这样的植入物、递送系统、和模块是本领域技术人员已知的。

[0313] 本发明的多肽、蛋白或药物组合物可以单独施用或者与一种或多种其它治疗剂或诊断剂联合施用。联合治疗可以包括与至少一种其它治疗剂组合的本发明的细胞毒性蛋白或其药物组合物，所述其它治疗剂基于待治疗的特定患者、疾病或病患而选择。其它这样的药剂的例子包括，尤其是，细胞毒性的抗癌剂或化学治疗剂、抗炎或抗增殖剂、抗微生物或抗病毒剂、生长因子、细胞因子、镇痛药、治疗活性的小分子或多肽、单链抗体、经典抗体或其片段、或调节一个或多个信号传导途径的核酸分子、以及在治疗性或预防性处理方案中互补的或在其它方面有益的类似调节治疗剂。

[0314] 用本发明的多肽、蛋白或药物组合物对患者的治疗优选地导致被靶向的细胞的细胞死亡和/或被靶向的细胞的生长抑制。这样，本发明的细胞毒性蛋白和包含它们的药物组合物将可用在治疗多种病理学病症(其中杀伤或除去靶细胞可能是有益的，例如尤其是癌症、肿瘤、其他生长异常、免疫病症和受感染的细胞)的方法中。本发明提供了用于抑制细胞增殖和治疗细胞病症(包括瘤形成、过度活跃的B-细胞和过度活跃的T-细胞)的方法。

[0315] 在某些实施方案中，本发明的多肽、蛋白和药物组合物可以用于治疗或预防癌症、肿瘤(恶性的和非恶性的)、生长异常、免疫病症和微生物感染。在另一个方面，以上离体方法可以与以上体内方法组合以提供治疗或预防骨髓移植接受者中的排斥的方法和用于实现免疫耐受的方法。

[0316] 在某些实施方案中，本发明提供了治疗哺乳动物受试者(诸如人)中的恶性病或肿瘤和其它血细胞相关癌症的方法，所述方法包括下述步骤：给有此需要的受试者施用治疗有效量的本发明的细胞毒性蛋白或药物组合物。

[0317] 本发明的细胞毒性多肽、蛋白和药物组合物具有多种用途，包括，例如，用于除去不希望的T-细胞，用于调节免疫应答以治疗移植物抗宿主病，用作抗病毒剂，用作抗微生物剂，和用于净化移植组织的不希望的细胞类型。本发明的细胞毒性多肽、蛋白和药物组合物通常是抗肿瘤剂——意味着它们能够通过抑制癌症或肿瘤细胞的生长和/或造成癌症或肿瘤细胞的死亡而治疗和/或预防肿瘤或恶性细胞的发育、成熟或传播。

[0318] 在某些实施方案中，本发明的多肽、蛋白或药物组合物用于治疗B-细胞-浆细胞-或抗体-介导的疾病或病症，诸如例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、人免疫缺陷病毒相关的淋巴瘤、淀粉样变性、溶血性尿毒性综合征、多动脉炎、脓毒性休克、克罗恩病、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、溃疡性结肠炎、银屑病、哮喘、舍格伦综合征、移植物抗宿主病、移植排斥、糖尿病、血管炎、硬皮病和系统性红斑狼疮。

[0319] 在另一个方面，本发明的多肽、蛋白和药物组合物的某些实施方案是抗微生物剂——意味着它们能够治疗和/或预防微生物致病感染(诸如由病毒、细菌、真菌、朊病毒或原生动物造成)的获得、发展或后果。

[0320] 提供对由T-细胞和/或B-细胞介导的疾病或病患的预防或治疗的方法在本发明的范围内，所述预防或治疗包括向由此需要的患者施用本发明的细胞毒性蛋白或其药物组合物，用于杀伤所述患者中的T-细胞或B-细胞的目的。该用法与准备或调理患者用于骨髓移植、干细胞移植、组织移植或器官移植相容，而无论移植的物质的来源，例如人或非人来源。

[0321] 提供通过用本发明的细胞毒性多肽、蛋白或药物组合物对宿主T细胞的靶向性细胞杀伤而用于预防或治疗宿主抗移植物病的骨髓接受体在本发明的范围内。

[0322] 本发明的细胞毒性多肽、蛋白和药物组合物可以用在治疗癌症的方法中，所述方法包括：给有此需要的患者施用治疗有效量的本发明的细胞毒性多肽、蛋白或药物组合物。在本发明的方法的某些实施方案中，正在治疗的癌症选自由下述组成的组：骨癌(诸如多发性骨髓瘤或尤因肉瘤)、乳腺癌、中枢/周围神经系统癌症(诸如脑癌、神经纤维瘤病或胶质母细胞瘤)、胃肠癌(诸如胃癌或结直肠癌)、生殖细胞癌(诸如卵巢癌和睾丸癌、腺癌(诸如胰腺癌、甲状旁腺癌、嗜铬细胞瘤、唾液腺癌或甲状腺癌)、头颈癌(诸如鼻咽癌、口癌或咽癌)、血液学癌症(诸如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤)、肾-尿道癌(诸如肾癌和膀胱癌)、肝癌、肺/胸膜癌(诸如间皮瘤、小细胞肺癌或非小细胞肺癌)、前列腺癌、肉瘤(诸如血管肉瘤、纤维肉瘤、卡波西氏肉瘤或滑膜肉瘤)、皮肤癌(诸如基底细胞癌、鳞状细胞癌或黑素瘤)和子宫癌。

[0323] 本发明的多肽、蛋白和药物组合物可以用在治疗免疫病症的方法中，所述方法包括：给有此需要的患者施用治疗有效量的本发明的细胞毒性蛋白或药物组合物。在本发明的方法的某些实施方案中，所述免疫病症与炎症有关，所述炎症与选自由以下组成的组的疾病有关：淀粉样变性、强直性脊柱炎、哮喘、克罗恩病、糖尿病、移植排斥、移植物抗宿主病、桥本甲状腺炎、溶血性尿毒性综合征、HIV相关的疾病、红斑狼疮、多发性硬化、多动脉炎、银屑病、银屑病关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、脓毒性休克、舍格伦综合征、溃疡性结肠炎和血管炎。

[0324] 在本发明的某些实施方案中是使用本发明的多肽或蛋白作为药物组合物或药物的组分，所述药物组合物或药物用于治疗或预防癌症、肿瘤、其他生长异常、免疫病症和/或微生物感染。例如，可以用这样的药物治疗在患者的皮肤上呈现的免疫病症，以尝试减少炎症，。在另一个实施例中，可以用这样的药物治疗皮肤肿瘤，以尝试减小肿瘤大小或完全消除肿瘤。

[0325] 有益的临床作用可以通过这样的治疗方案获得：所述治疗方案涉及向同一名受试者相继施用多种本发明的细胞毒性蛋白，其中，每种细胞毒性蛋白包含在不同区域去免疫化的志贺毒素效应子区，以避免或减少发展针对来自涉及相同治疗剂的连续施用的治疗方

案的单种细胞毒性蛋白的持久的免疫应答。

[0326] 本发明的某些细胞毒性多肽、蛋白和药物组合物可以用在分子神经外科应用中，诸如免疫损伤(immunolesioning)和神经元示踪(关于综述，参见Wiley R,Lappi D,Adv Drug Deliv Rev 55:1043-54(2003))。例如，可以从各种配体(诸如神经递质和神经肽)选择或衍生出靶向结构域，其通过结合神经元表面受体(诸如神经元回路特异性的G-蛋白连接的受体)而靶向特定神经元细胞类型。类似地，所述靶向结构域可以选自或源自结合神经元表面受体的抗体。因为志贺毒素稳健地指导它们自身的逆向轴突运输，本发明的某些细胞毒性蛋白可以用于杀伤在远离细胞体的细胞毒性蛋白注射部位处表达所述细胞外靶标的神经元(参见Llewellyn-Smith I等,J Neurosci Methods 103:83-90(2000))。这些神经元细胞类型特异性的靶向细胞毒性多肽和蛋白用在神经科学研究中，诸如用于阐明感觉的机制(参见例如Mishra S,Hoon M,Science 340:968-71(2013))，和建立神经变性疾病(诸如帕金森病和阿尔茨海默病)的模型系统(参见例如Hamlin A等,PLoS One e53472(2013))。

[0327] 在本发明的某些实施方案中是使用本发明的多肽、蛋白、药物组合物和/或诊断组合物标记或检测赘生性细胞和/或免疫细胞型的内部的方法。基于本发明的某些多肽、蛋白和药物组合物进入特定细胞类型并通过逆向细胞内运输在细胞内按路线发送的能力，特定细胞类型的内部区室被标记以用于检测。这可以在患者内在原位细胞上执行，或在从生物体取出的细胞和组织(例如活组织检查材料)上执行。

[0328] 为了关于疾病、病患和/或病症的信息收集的目的，在本发明的某些实施方案中是使用本发明的多肽、蛋白、药物组合物和/或诊断组合物检测细胞类型的存在的方法。所述方法包括使细胞与诊断足够量的细胞毒性分子接触以通过测定或诊断技术检测所述细胞毒性分子。短语“诊断足够量”表示为了信息收集目的通过利用的特定测定或诊断技术提供充分检测和准确测量的量。通常，对于完整生物体内诊断应用而言，诊断足够量是每位受试者在0.1mg至100mg本发明的检测促进剂连接的蛋白/千克受试者之间的非累积剂量。典型地，在这些信息收集方法中使用的本发明的多肽或蛋白的量将尽可能地低，前提条件是，它仍然是诊断足够量。例如，对于在生物体中的体内检测，施用给受试者的本发明的多肽、蛋白或药物组合物的量将可行地尽可能地低。

[0329] 与检测促进剂组合的本发明的多肽和蛋白的细胞型特异性的靶向提供检测细胞并获取其图像的方式，所述细胞与本发明的分子的结合区的细胞外靶标生物分子物理上关联。使用本发明的多肽或蛋白对细胞的成像可以通过本领域已知的任意合适的技术在体外或在体内执行。使用本领域已知的各种方法，包括生物体的全身成像或使用取自生物体的离体样品，可以收集诊断信息。本文中使用的术语样品表示任意数目的物品，但不限于，流体诸如血液、尿、血清、淋巴液、唾液、肛门分泌物、阴道分泌物和精液，以及通过活组织检查操作得到的组织。例如，通过技术诸如磁共振成像(MRI)、光学方法(诸如直接的、荧光的和生物发光的成像)、正电子发射断层摄影术(PET)、单光子发射计算机体层摄影术(SPECT)、超声、x-射线计算机体层摄影术和前述技术的组合，多种检测促进剂可以用于非侵入性体内肿瘤成像(关于综述，参见Kaur S等,Cancer Lett 315:97-111(2012))。

[0330] 在本发明的某些实施方案中是使用本发明的多肽、蛋白或药物组合物作为诊断组合物来标记或检测癌症、肿瘤和/或免疫细胞型的内部的方法(例如，参见Koyama Y等,Clin

Cancer Res 13:2936-45(2007);Ogawa M等,Cancer Res 69:1268-72(2009);Yang L等,Small 5:235-43(2009))。基于本发明的某些多肽、蛋白和药物组合物进入特定细胞类型并通过逆向细胞内运输在细胞内按路线发送的能力,特定细胞类型的内部区室被标记用于检测。这可以在患者内在原位细胞上执行,或在从生物体取出的细胞和组织(例如活组织检查材料)上执行。

[0331] 本发明的诊断组合物可以用于将疾病、病症或病患表征为本发明的有关药物组合物潜在地可治疗的。本发明的物质的某些组合物可以用于确定患者是否属于对利用如本文中所述的本发明的化合物、组合物或有关方法的治疗策略做出应答或非常适合使用本发明的递送装置的组。

[0332] 可以在检测出疾病(例如癌症)以后使用本发明的诊断组合物,以便更好地表征它,诸如以监测远距离转移、异质性和癌症进展阶段。疾病病症或感染的表型评估可以帮助在做出治疗决策的过程中的预后和预测。在疾病复发中,本发明的某些方法可以用于确定是局部还是全身问题。

[0333] 本发明的诊断组合物可以用于评估对治疗剂的应答,无论治疗剂的类型,例如小分子药物、生物药物或基于细胞的疗法。例如,本发明的诊断的某些实施方案可以用于测量肿瘤大小的变化、抗原阳性细胞群体(包括数目和分布)的变化、或监测已经施用给患者的疗法所靶向的抗原以外的标志物(参见Smith-Jones P等,Nat.Biotechnol 22:701-6(2004);Evans M等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.108:9578-82(2011))。

[0334] 用于检测细胞型的存在的方法的某些实施方案可以用于收集关于疾病、病症和病患的信息,所述疾病、病症和病患诸如,例如,骨癌(诸如多发性骨髓瘤或尤因肉瘤)、乳腺癌、中枢/周围神经系统癌症(诸如脑癌、神经纤维瘤病或胶质母细胞瘤)、胃肠癌(诸如胃癌或结直肠癌)、生殖细胞癌(诸如卵巢癌和睾丸癌、腺癌(诸如胰腺癌、甲状旁腺癌、嗜铬细胞瘤、唾液腺癌或甲状腺癌)、头颈癌(诸如鼻咽癌、口癌或咽癌)、血液学癌症(诸如白血病、淋巴瘤或骨髓瘤)、肾-尿道癌(诸如肾癌和膀胱癌)、肝癌、肺/胸膜癌(诸如间皮瘤、小细胞肺癌或非小细胞肺癌)、前列腺癌、肉瘤(诸如血管肉瘤、纤维肉瘤、卡波西氏肉瘤或滑膜肉瘤)、皮肤癌(诸如基底细胞癌、鳞状细胞癌或黑素瘤)、子宫癌、AIDS、淀粉样变性、强直性脊柱炎、哮喘、孤独症、心脏发生(cardiogenesis)、克罗恩病、糖尿病、红斑(erythematosus)、胃炎、移植物排斥、移植物抗宿主病、格雷夫斯病(Grave's disease)、桥本甲状腺炎、溶血性尿毒症综合征、HIV-相关的疾病、红斑狼疮、淋巴增生性障碍(lymphoproliferative disorders)、多发性硬化、重症肌无力、神经炎症、多动脉炎、银屑病、银屑病关节炎、类风湿性关节炎、硬皮病、脓毒性休克、舍格伦综合征、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus)、溃疡性结肠炎、血管炎、细胞增殖、炎症、白细胞激活、白细胞粘附、白细胞趋化性、白细胞成熟、白细胞迁移、神经元分化、急性淋巴母细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia)(ALL)、T急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤(ALL)、急性髓性白血病、急性髓样白血病(acute myeloid leukemia)(AML)、B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、B细胞幼淋巴细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)(BL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML-BP)、慢性髓样白血病(CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡型淋巴瘤(follicular lymphoma)、毛细胞白血病(hairy cell leukemia)(HCL)、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma)(HL)、血管内大B细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病(lymphomatoid

granulomatosis)、淋巴质浆细胞淋巴瘤(lymphoplasmacytic lymphoma)、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma)、多发性骨髓瘤(MM)、天然杀伤细胞白血病、结节边缘B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、浆细胞白血病、浆细胞瘤(plasmacytoma)、原发性渗出性淋巴瘤(primary effusion lymphoma)、幼淋巴细胞白血病(pro-lymphocytic leukemia)、早幼粒细胞性白血病(promyelocytic leukemia)、小淋巴细胞淋巴瘤、脾边缘带淋巴瘤(splenic marginal zone lymphoma)、T-细胞淋巴瘤(TCL)、重链疾病(heavy chain disease)、单克隆丙种球蛋白病(monoclonal gammopathy)、单克隆免疫球蛋白沉积病、骨髓增生异常综合征(myelodusplastic syndromes)(MDS)、郁积型多发性骨髓瘤(smoldering multiple myeloma)和Waldenstrom巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)。

[0335] 在某些实施方案中,本发明的多肽和蛋白或其药物组合物用于诊断和治疗二者,或仅用于诊断。

[0336] 本发明的多肽具有作为免疫物质用于引发针对特定表位的免疫应答的应用,所述应用基于在所选表位区中的一个或多个破坏。本发明的多肽可以用作免疫物质用于施用给哺乳动物和/或用在展示筛选中以产生识别志贺毒素的免疫球蛋白结构域。

[0337] 下述选择性的细胞毒性蛋白的非限制性实施例进一步举例说明了本发明,所述选择性的细胞毒性蛋白包含来源于志贺毒素家族成员的A亚基的去免疫化志贺毒素效应子区和能够结合与特定细胞型物理连接的细胞外靶标生物分子的结合区。

实施例

[0338] 以下实施例证实了本发明的某些实施方案。但是,应当理解,这些实施例仅仅用于解释目的,且不意图、也不应当解释为对本发明的条件和范围的一概限制。除了另外详细描述以外,使用本领域技术人员众所周知的且常规的标准技术进行以下实施例中的实验。

[0339] 为了改善志贺毒素-来源的多肽区以用于在哺乳动物中的治疗和诊断应用,将在整个毒素效应子区的预测的B细胞表位系统性破坏,目的是减弱哺乳动物B细胞介导的免疫应答。分析表示多种志贺毒素的A亚基的氨基酸序列,以鉴定推定的抗原性和/或免疫原性表位。使用计算机工具来预测B细胞和T细胞表位,包括考虑公众可获得的蛋白数据库结构数据。表位预测凭经验验证。实验检测多种去免疫化志贺毒素效应子多肽失去天然志贺毒素A亚基中存在的表位并且保留志贺毒素效应子功能。将作为多种细胞毒性蛋白的组分的示例性的去免疫化志贺毒素效应子多肽的生物学活性与包含非去免疫化志贺毒素效应子多肽的细胞毒性蛋白(本文称为“野生型”或“WT”)进行比较。

[0340] 下述去免疫化志贺毒素效应子多肽的实例证明了作为多种细胞毒性蛋白的组分保留了志贺毒素效应子功能。所述示例性的细胞毒性蛋白结合由被靶向的细胞型表达的靶标生物分子并且进入该被靶向的细胞。与包含野生型志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白相似,该内在化的细胞毒性蛋白有效地提供路线将它们的去免疫化志贺毒素效应子区运送到细胞质,以使核糖体失活,并且随后引起被靶向的细胞的凋亡性死亡。此外,下述实施例证明了在志贺毒素效应子区多肽中可以组合多个表位破坏,以降低本发明的细胞毒性蛋白的整体抗原性和/或免疫原性同时保留有效的细胞毒性。

[0341] 实施例1.预测志贺毒素A亚基中的免疫原性和抗原性表位

[0342] 在志贺毒素A亚基内的抗原性和/或免疫原性位点从未被系统地绘出。利用计算机方法预测多种志贺毒素A亚基中的抗原性和/或免疫原性表位。在生物信息学(in silico)中预测具有引发哺乳动物免疫系统中的应答的B细胞表位和CD4+T细胞表位二者。

[0343] 由ProImmune Inc.(Sarasota,FL,U.S.)的志贺样毒素A链(PDB ID:1DM0_A)多肽序列和3D结构数据,使用它们的REVEAL®系统预测志贺样毒素1成熟的A亚基(SLT-1A;SEQ ID NO:1)的线性B细胞表位。

[0344] 平行地,使用BcePred网络服务器(Saha S,Raghava G,Lecture Notes in Comput Sci 3239:197-204(2004))、Bepipred线性表位预测(Larsen J等,Immunome Res 2:2(2006))和ElliPro抗体表位预测(Haste Andersen P等,Protein Sci 15:2558-67(2006);Ponomarenko J,Bourne P,BMC Struct Biol 7:64(2007)),由志贺毒素的A亚基(StxA;SEQ ID NO:2)、志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A;SEQ ID NO:1)和志贺样毒素2的A亚基(Stx2A;SEQ ID NO:3)的氨基酸序列预测B-细胞表位。各种计算方法揭示了三种原型志贺毒素A亚基中的B-细胞表位区域的类似预测(表1-3)。

[0345] 表1.志贺样毒素1(SEQ ID NO:1)的成熟的天然A亚基的B-细胞表位预测

[0346]

天然定位的氨基酸位置			
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

[0347] 表2.志贺毒素(SEQ ID NO:2)的成熟的天然A亚基的B-细胞表位预测

[0348]

天然定位的氨基酸位置			
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

[0349] 表3.志贺样毒素2(SEQ ID NO:3)的成熟的天然A亚基的B-细胞表位预测

[0350]

天然定位的氨基酸位置		
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

[0351] 先前的序列比对研究基于蓖麻毒蛋白中被中和抗体结合的表位预测志贺毒素A亚基中可能是抗原性和/或免疫原性的免疫表位区(Lebeda F,Olson M,Int J Biol Macromol 24:19-26(1999);Zemla A,Ecale Zhou C,Bioinform Biol Insights 2:5-13(2008))。预测在StxA中大约残基90-107处和Stx2A中大约残基112-129处可能存在保守免疫原性表位(Zemla A,Ecale Zhou C,Bioinform Biol Insights 2:5-13(2008))。然而,由于在植物毒素蓖麻毒蛋白与细菌志贺毒素之间的关键差异,诸如,例如,在蓖麻毒蛋白与志贺毒素之间的大量的序列变异性,在志贺毒素的A亚基中缺少N端α螺旋,并且,与蓖麻毒蛋白相比,志贺毒素中预测的区域更短,且溶剂暴露性较小,公认该预测是不可靠的((Fraser M等,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))。

[0352] 据说由美国国立变态反应和传染病研究所(National Institutes of Allergy and Infectious Diseases of the U.S.,NIAID)主办的免疫表位数据库(Immune Epitope Database,IEDB)会提供志贺毒素的所有实验性地表征的B-细胞和T-细胞表位。目前,IEDB仅提供了唯一的单一志贺毒素A亚基(Stx2dA)的单个表位:IEDB鉴定号为110493,其为实验确定的不连续的B细胞表位,包含氨基酸42-49、96-100和245-260(Smith M等,Infect Immun 77:2730-40(2009))。

[0353] 在下述实施例中,破坏SLT-1A中由多于一种方法鉴定的九个预测的B细胞表位区(表4)。

[0354] 表4.原型志贺毒素A亚基共有的九个推定的B细胞表位区

[0355]

表位区	天然定位的氨基酸位置		
	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

[0356] 另外,使用Epitopia网络服务器分析志贺毒素A亚基,以预测B细胞表位和免疫原性残基(Rubinstein N等,BMC Bioinformatics 10:287(2009))。使用Epitopia,基于线性氨基酸残基片段中大部分氨基酸残基的Epitopia评分为4或5(“高”),鉴定SLT-1A中预测是免疫原性的线性氨基酸残基。Epitopia分析预测的免疫原性区域在SLT-1A的氨基酸残基1-15(以下称为表位区0,参见表5,同上)。基于Epitopia分析,SLT-1A的免疫原性表位区2(参见表4)可能包括位置49。基于Epitopia分析,SLT-1A的免疫原性表位区3(参见表4)可能包括位置53并且延伸至大约位置62-66(以下称为表位区3*,参见表5,同上),SLT-1A中的表位区4(参见表4)可能包括位置94(以下称为表位区4*,参见表5,同上),并且SLT-1A中的表位区6(参见表4)可能包括位置179并且延伸至大约位置188-190(以下称为表位区6*,参见表5,同上)。注意星号B细胞表位区全部完全包括它们各自与相同的数字标识符重叠的区域。

[0357] 比较这十个表位区(#0-9),以与预测的CD4+T细胞表位重合。通过ProImmune Inc.(Sarasota,FL,U.S.)进行的REVEAL™免疫原性系统(IS)T细胞测定预测志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)的T细胞表位。该测定使用来自主题蛋白的多种重合肽序列,来检测由来自耗尽CD8+T-细胞的健康捐赠者细胞样品的CD4+T-细胞对任何免疫应答的引起。在这13个预测的B细胞表位区中,它们全部与至少一种预测的CD4+T细胞表位重合(表5)。在下述实施例中,表5中所有预测的B细胞表位区都单独地或组合地被破坏或删除。

[0358] 表5.具有重合的预测的CD4+T细胞表位的预测的B细胞表位区

[0359]

表位区	天然定位的氨基酸位置	
	B-细胞表位区	T-细胞表位 (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

[0360] 实施例2.志贺毒素效应子多肽的去免疫化

[0361] 在来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)的志贺毒素效应子多肽的推定的B细胞和T细胞表位中进行缺失和/或氨基酸置换。除了破坏预测的表位的所述点突变之外,一些构建体包含一个或多个对志贺毒素效应子酶活性或细胞毒性没有明显作用的点突变,诸如例如,SLT-1A中的R223A,SLT-1A中的C242S,和/或SLT-1A中的C261S。

[0362] 在该实施例中,志贺毒素效应子多肽区来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)。将编码SLT-1A的氨基酸1-251的多核苷酸用作模板,以产生多种编码多种具有预测的B细胞表位的一个或多个破坏的志贺毒素效应子多肽的多核苷酸。由这些多核苷酸表达包含一个或多个表位破坏的志贺毒素效应子多肽,以研究哪些破坏可能更有效地使本发明的细胞毒性蛋白情形中的多种志贺毒素效应子多肽去免疫化。

[0363] 将SLT-1A的羧基端截短为SEQ ID NO:1的氨基酸1-251去除了最后两个B细胞表位区(表5,#8和#9)、最后两个CD4+T细胞表位区(表5,#8和#9)以及由ElliPro预测的评分最高的不连续的B细胞表位(289-293)。另外,在位置251的阶段可能破坏包含推定的B细胞和T细胞表位的第七表位区(表5)。

[0364] 使用本领域已知的方法,在包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-251的截短的志贺毒素效应子多肽中产生合理选择的氨基酸置换(参见表6)。表位区#0(参见表5),进行至少七种不同的氨基酸置换并检测(参见表6)。在表位区#0,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置1的赖氨酸突变成甲硫氨酸(K1M)。在表位区#0,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置4的苏氨酸突变成异亮氨酸(T4I)。在表位区#0,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置8的丝氨酸突变成异亮氨酸(S8I)。在表位区#0,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置9的苏氨酸突变成异亮氨酸(T9I)和缬氨酸(T9V)。在表位区#0,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID

NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置11的赖氨酸突变成丙氨酸(K11A)和组氨酸(K11H)。通过Epitopia网络服务器预测表位区#0中突变的下面五个氨基酸残基是溶剂暴露的:K1,T4,S8,T9和K11。

[0365] 在表位区#1(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置33的丝氨酸突变成异亮氨酸(S33I)。

[0366] 在表位区#2(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)中的位置45的丝氨酸突变成缬氨酸(S45V)和异亮氨酸(S45I)。在表位区#2(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)中的位置47的天冬氨酸突变成甘氨酸(D47G)。在表位区#2(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)中的位置48的天冬酰胺突变成缬氨酸(N48V)和苯丙氨酸(N48F)。

[0367] 在表位区#3*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置53的天冬氨酸突变成丙氨酸(D53A)、甘氨酸(D53G)和天冬酰胺(D53N)。通过Epitopia网络服务器预测D53是溶剂暴露的,并且具有5或"高"的免疫原性规格值。在表位区#3和#3*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A业基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A业基(SEQ ID NO:2)中的位置55的精氨酸突变成丙氨酸(R55A)、缬氨酸(R55V)和亮氨酸(R55L)。在表位区#3和#3*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置58的天冬氨酸突变成丙氨酸(D58A)、缬氨酸(D58V)和苯丙氨酸(D58F)。在表位区#3和#3*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置59的脯氨酸突变成丙氨酸(P59A)。在表位区#3和#3*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置60的谷氨酸突变成异亮氨酸(E60I)、苏氨酸(E60T)和精氨酸(E60R)。在表位区#3和#3*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置61的谷氨酸突变成丙氨酸(E61A)、缬氨酸(E61V)和亮氨酸(E61L)。在表位区#3中#3*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置62的甘氨酸突变成丙氨酸(G62A)。

[0368] 在表位区#4*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置94的天冬氨酸突变成丙氨酸(D94A)。通过Epitopia网络服务器预测该D94残基是溶剂暴露的,并且具有5或"高"的免疫原性规格值。在表位区#4和#4*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置96的丝氨酸突变成异亮氨酸(S96I)。在表位区#4和#4*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置109的丝氨酸突变成缬氨酸(S109V)。在表位区#4和#4*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置110的甘氨酸突变成丙氨酸(G110A)。在表位区#4和#4*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置112的丝氨酸突变成缬氨酸(S112V)。

[0369] 在表位区#5(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置147的甘氨酸突变成丙氨酸(G147A)。

[0370] 在表位区6*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置179的精氨酸突变成丙氨酸(R179A)。由Epitopia网络服务器预测该R179残基是暴露的,并且具有5或“高”的免疫原性值。在表位区#6和#6*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置180的苏氨酸突变成甘氨酸(T180G)。在表位区#6和#6*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置181的苏氨酸突变成异亮氨酸(T181I)。在表位区#6和#6*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置183的天冬氨酸突变成丙氨酸(D183A)和突变成甘氨酸(D183G)。在表位区#6和#6*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置184的天冬氨酸突变成丙氨酸(D184A)或苯丙氨酸(D184F)。在表位区#6和#6*(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置185的亮氨酸突变成缬氨酸(L185V)。在表位区#6和#6*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置186的丝氨酸突变成丙氨酸(S186A)和突变成苯丙氨酸(S186F)。在表位区#6和#6*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置187的甘氨酸突变成丙氨酸(G187A)。在表位区#6和#6*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置188的精氨酸突变成丙氨酸(R188A)和突变成亮氨酸(R188L)。在表位区#6和#6*,天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置189的丝氨酸突变成丙氨酸(S189A)。

[0371] 在表位区#7(参见表5),天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置248的精氨酸突变成丙氨酸(R248A)。在表位区#7,天然位于志贺样毒素1的成熟的A业基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置251的精氨酸突变成丙氨酸(R251A)。

[0372] 天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置49的亮氨酸突变成丙氨酸(L49A)。通过Epitopia网络服务器预测该L49残基是溶剂暴露的,并且具有4的免疫原性值。天然位于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的位置205的精氨酸突变成丙氨酸(R205A)。通过Epitopia网络服务器预测该R205残基是溶剂暴露的,并且具有5或“高”的免疫原性值。

[0373] 表6.示例性的志贺毒素效应子多肽中的氨基酸置换

[0374]

破坏的表位区	天然定位的氨基酸位置		
	置换	B-细胞表位区	T-细胞表位区
0	K1M	1-15	
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

[0375]

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	免疫原性残基	
7	R248A	243-257	236-258
7	R251A	243-257	236-258

[0376] 作为具有靶向细胞的结合区的推定的细胞毒性蛋白的组分，检测包含氨基酸置换的志贺毒素效应子多肽。该细胞毒性蛋白包含连接在一起形成融合蛋白的免疫球蛋白型结合区和志贺毒素效应子区。这些推定的细胞毒性融合蛋白通过用本领域已知的细菌系统表达编码它们的多核苷酸而产生。

[0377] 实施例3.凭经验检测去免疫化志贺毒素效应子多肽保留一种或多种志贺毒素效应子功能

[0378] 凭经验检测多种去免疫化志贺毒素效应子区多肽的酶活性和细胞毒性的保留。

[0379] 在志贺毒素效应子多肽作为细胞毒性蛋白的组分的情形中，使用核糖体抑制检测志贺毒素效应子多肽在去免疫化后酶活性的保留。在某些实施方案中，该实施例的细胞毒性蛋白的全长编码轻链以编码Strep-tag® II的多核苷酸起始或结束，以促进检测和纯化。

[0380] 使用TNT®快速偶联转录/翻译试剂盒(TNT®Quick Coupled Transcription/Translation kit,L1170 Promega Madison,WI,U.S.)，使用无细胞体外蛋白翻译测定，确定了去免疫化细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。所述试剂盒包括荧光素酶T7对照DNA(L4821 Promega Madison,WI,U.S.)和TNT®Quick Master Mix。根据生产商的说明书准备核糖体活性反应。在适当的缓冲液中制备一系列待测蛋白(其包含突变的志贺毒素效应子多肽区)的10倍稀释液，并且为每个稀释液产生一系列相同的TNT反应混合物组分。将在稀释系列中的每个样品与TNT反应混合物中的每一个以及荧光素酶T7对照DNA合并。将试验

样品在30摄氏度(℃)温育1.5小时。在温育之后,将荧光素酶测定试剂(E1483 Promega,Madison,WI,U.S.)加入所有试验样品,并且根据生产商的说明书通过发光测量荧光素酶蛋白翻译的量。通过总蛋白的对数转化浓度相对于相对发光单位的非线性回归分析,确定翻译抑制的水平。使用统计软件(GraphPad Prism,San Diego,CA,U.S.),使用Prism软件在标题剂量-响应-抑制下的log(抑制剂)相对于响应(三参数)的函数[Y=底部+((顶部-底部)/(1+10^(X-LogIC$_{50}$)))]计算每个样品的半最大抑制浓度(IC$_{50}$)值。为每种包含去免疫化志贺毒素效应子多肽区的蛋白和包含没有内部表位破坏的野生型志贺毒素效应子区的对照蛋白计算IC$_{50}$值。

[0381] 如在表7中所指出的,本发明的示例性的志贺毒素效应子多肽区表现出核糖体抑制。如在表7中报道的,表现出在野生型SLT-1A对照构建体的10倍内的IC$_{50}$的、包含置换的构建体被认为表现出与野生型相当的核糖体抑制活性;表现出在野生型SLT-1A对照的10倍-100倍之间的IC$_{50}$的构建体被认为表现出较野生型减弱的活性;并且表现出大于野生型SLT-1A对照的100倍的IC$_{50}$的构建体认为被严重消弱或是没有活性的(严重消弱的/没有活性)。

[0382] 表7.示例性志贺毒素效应子多肽的核糖体抑制活性

[0383]

表位区	置换	体外核糖体抑制(IC$_{50}$)
0	K1M,K11A	与野生型相当
0	S8I	与野生型相当
0	T9I	与野生型相当
1	S33I	与野生型相当
2	S45I	与野生型相当
3*	D53A	与野生型相当
3&3*	R55A	与野生型相当
3&3*	D58A	与野生型相当
3&3*	D58F	与野生型相当
3&3*	P59A	与野生型相当
3&3*	E60I	与野生型相当
3&3*	E60R	与野生型相当
3&3*	E61A	与野生型相当
3&3*	G62A	与野生型相当
4&4*	D94A,S96I	与野生型相当
6*	R179A	严重消弱的/没有活性
6&6*	D183A	与野生型相当
6&6*	D184A	与野生型相当
6&6*	D184F	与野生型相当
6&6*	R188A	与野生型相当
6&6*	D183A,D184A,R188A	与野生型相当
-	R205A	与野生型相当

[0384] 在志贺毒素效应子多肽作为具有能够特异性且高亲和力结合靶细胞(即,“靶标表达细胞”或“靶标生物分子阳性细胞”)表达的且与靶细胞的细胞表面物理偶联的细胞外靶

标生物分子的结合区的细胞毒性蛋白的组分的情形中，使用靶细胞杀伤测定，检测多种示例性的志贺毒素效应子多肽在去免疫化后的细胞毒性活性的保留。与不表达细胞毒性蛋白结合区的靶标生物分子的细胞比较，使用靶标表达细胞确定去免疫化细胞毒性蛋白的细胞毒性水平。

[0385] 将靶标表达细胞铺板(对于贴壁细胞，$2x10^3$个细胞/孔，在蛋白添加前一天铺板；或对于悬浮细胞，$7.5x10^3$个细胞/孔，在蛋白添加同一天铺板)在384-孔平板内的20μL细胞培养基中。在适当的缓冲液中制备每种待试蛋白(其包含突变的志贺毒素效应子多肽区)的一系列10倍稀释液，然后将5μL稀释液或缓冲液对照添加到细胞中。将仅含有培养基的对照孔用于基线校正。将细胞样品与蛋白或仅缓冲液一起在37℃和在5％二氧化碳(CO_2)气氛下温育3天。根据生产商的说明书，使用CellTiter-Glo®发光细胞存活力测定)CellTiter-Glo®Luminescent Cell Viability Assay,G7573 Promega Madison,WI,U.S.)使用发光读出确定总细胞存活或生存力百分比。

[0386] 使用下述方程式计算实验孔的生存力百分比：(试验RLU-平均培养基RLU)/(平均细胞RLU-平均培养基RLU)*100。在Prism(GraphPad Prism,San Diego,CA,U.S.)中绘制Log多肽浓度相对于生存力百分比，并使用log(抑制剂)相对于响应(3参数)分析来确定试验的蛋白的半最大细胞毒性浓度(CD_{50})值。计算包含去免疫化志贺毒素效应子多肽的每种蛋白和没有内部表位破坏的野生型对照蛋白的CD_{50}。

[0387] 示例性志贺毒素效应子多肽区的细胞毒性显示在表8中。如表8所报告的，表现出在野生型SLT-1A对照构建体的10倍内的CD_{50}的包含置换的构建体被认为表现出与野生型相当的细胞毒性；表现出野生型SLT-1A对照的10倍-100倍之间的CD_{50}的构建体被认为表现出较野生型减弱的细胞毒性；并且表现出大于野生型SLT-1A对照的100倍的CD_{50}的构建体被认为是严重消弱的/没有活性的。

[0388] 表8.示例性志贺毒素效应子多肽的细胞毒性活性

[0389]

表位区	置换	细胞毒性(CD_{50})
0	K1M，K11A	与野生型相当
0	S8I	与野生型相当
0	T9I	减毒的
1	S33I	与野生型相当
2	S45I	与野生型相当

[0390]

3*	D53A	与野生型相当
3 & 3*	R55A	与野生型相当
3 & 3*	D58A	与野生型相当
3 & 3*	D58F	与野生型相当
3 & 3*	P59A	与野生型相当
3 & 3*	E60I	与野生型相当
3 & 3*	E60R	与野生型相当
3 & 3*	E61A	与野生型相当
3 & 3*	G62A	与野生型相当
4 & 4*	D94A，S96I	减毒的
6*	R179A	严重消弱的/没有活性
6 & 6*	D183A	与野生型相当
6 & 6*	D184A	与野生型相当
6 & 6*	D184F	减毒的
6 & 6*	R188A	与野生型相当
6 & 6*	D183A，D184A，R188A	与野生型相当
-	R205A	与野生型相当

[0391] 术语“成功的”用于意指在预测的表位区中的一个或多个氨基酸残基置换产生保留一种或多种志贺毒素效应子功能的志贺毒素效应子区多肽。组合在同一个表位区(#6&6*)分别是成功的三个置换(D183A、D184A和R188A)，产生保留与野生型相当的志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽(D183A/D184A/R188A)(表7和8)。这些结果表明，在志贺毒素效应子多肽的同一个表位区中的一些成功的氨基酸置换可以组合，以产生具有更大的整体表位破坏性的表位破坏，同时仍然保留显著水平的一种或多种志贺毒素效应子功能。类似地，两个表位区#0和#4&4*成功地耐受在它们各自的区域内的多个氨基酸置换(表7和8:K1M/K11A和D94A/S96I)。强化了下述观点:在同一个表位区的多个示例性的置换可以组合，以产生具有更大整体表位破坏性的表位破坏，同时仍然保留显著水平的一种或多种志贺毒素效应子功能。

[0392] 另外，使用本文实施例中所述的方法，检测其他志贺毒素效应子区多肽的志贺毒素效应子功能和表位破坏，其中所述志贺毒素效应子区多肽在单一预测的B细胞表位区中包含多个氨基酸置换。所检测的区域是存在于志贺样毒素1的成熟的A亚基(SEQ ID NO:1)和志贺毒素的成熟的A亚基(SEQ ID NO:2)中的下述天然位置排列的区域:4-12,43-52,53-61,104-112和180-188。在包含含有SLT-1A(SEQ ID NO:1)的残基1-251的志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白的情形中，以多种组合产生这些单一区域、多个置换的构建体。这些构建体保留与野生型SLT-1A效应子构建体相当的核糖体抑制，并且针对靶细胞是有选择性细胞毒性的。这些构建体在单一区域中包含与其他氨基酸置换不同组合的下述氨基酸置换:区域4-12:T4I,T9V和K11H;区域43-52:S45V,D47G,N48V,N48F和L49A;区域53-61:D53G,D53N,

R55V,R55L,D58V,E60T,E61V和E61L;区域104-112:S109V,G110A和S112V;区域180-188:T180G,T181I,D183G,L185V,S186F和R188L。另外,这些构建体的蛋白质印迹分析表明一种或多种可以识别野生型SLT-1A的抗体(实施例4中所述的mAb1,pAb1和pAb2)对每种构建体的减少的或消除的识别。

[0393] 另外,通过置换R248A或R251破坏表位区#7,对核糖体抑制活性或细胞毒性没有任何明显的作用。可以将R248A或R251A成功地引入到上述示例性的志贺毒素效应子区多肽中,而不改变核糖体抑制或细胞毒性。

[0394] 将上文提及的个体表位破坏以及新的破坏组合,产生包含两个以上表位区的破坏的志贺毒素效应子多肽的多种组合(表9),然后凭检验检验志贺毒素效应子功能的保留,如在该实施例中所述。表9列出了在单个表位区中或在多至五个不同的表位区中具有氨基酸置换组合的构建体所展示的活性(使用前述术语)。

[0395] 表9.在去免疫化志贺毒素效应子多肽和细胞毒性蛋白中的多表位区氨基酸置换组合

[0396]

破坏的表位区	置换	核糖体抑制	细胞毒性
3/3*，4/4*	E60I，G110A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，5	E60I，G147A	与野生型相当	与野生型相当
2，6/6*	S45I，R188A	与野生型相当	与野生型相当

[0397]

1，4/4*，5	S33I，G110A，G147A	与野生型相当	与野生型相当
2，4/4*，5	S45I，G110A,G147A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5	D58A，G110A，G147A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5	E60I，G110A，G147A	与野生型相当	与野生型相当
2，3/3*，4/*4，5	S45I，D58A，E60I，G110A，G147A	与野生型相当	与野生型相当
2，3/3*，4/*4，5	S45I，D58A，E60I，G62A，G110A，G147A	与野生型相当	减毒的
2，4/4*，5，6/6*	S45I，G110A，G147A，D183A，D184A，R188A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5，6/6*	D58A，G110A，G147A，S186A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5，6/6*	D58A，G110A，G147A，G187A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5，6/6*	D58A，G110A，G147A，R188A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5，6/6*	D58A，G110A，G147A，S189A	与野生型相当	与野生型相当
3/3*，4/*4，5，6/6*	D58A，G110A，G147A，S186A，R188A	与野生型相当	减毒的
3/3*，4/*4，5，6/6*	D58A，G110A，G147A，G187A，R188A	与野生型相当	减毒的
1，2，3/3*，4/*4，5	S33I，S45I，D58A，G110A，G147A	与野生型相当	与野生型相当
2，3/3*，4/*4，5，6/6*	S45I，D58A，E60I，G110A，G147A，D183A，D184A，R188A	与野生型相当	减毒的
2，3/3*，4/*4，5，6/6*	S45I，D58A，E60I，G62A，G110A，G147A，D183A，D184A，R188A	与野生型相当	减毒的

[0398] 这些结果一般表明，如果不是全部成功的氨基酸置换(意味着凭经验表明保留志贺毒素效应子功能并预测破坏表位的任意置换)，则志贺毒素效应子多肽的一个表位区中的大部分可以与不同表位区的大部分(如果不是全部其他的成功的氨基酸置换)组合，以形成多个表位区被破坏同时仍然保留至少一种志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。

[0399] 实施例4.凭经验检测去免疫化志贺毒素效应子多肽的抗原性和/或免疫原性表位的破坏

[0400] 进行实验检测，以基于由已知的抗体识别的凭检验验证的表位来证实B细胞表位的破坏。在变性条件下进行蛋白质印迹分析，以确定表位破坏。在更天然的蛋白折叠条件下

(即,非变性条件下)进行酶联免疫吸附测定(ELISA)分析,以确定表位破坏。

[0401] 将包含Streptag®II和野生型志贺毒素效应子多肽区或去免疫化志贺毒素效应子多肽区的细胞毒性蛋白以相等的量上样到两块(replicate)4-20%十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶(Lonza,Basel,CH)上,并在变性条件下电泳。得到的凝胶通过考马斯染色进行分析,或用iBlot®(LifTechnologies,Carlsbad,CA,U.S.)系统按照制造商的使用说明转移到聚乙烯基二氟化物(PVDF)膜上。得到的膜在标准条件下用下述抗体进行探测:兔多克隆α-NWSHPQFEK(SEQ ID NO:134)(A00626,Genscript,Piscataway,NJ,U.S.),其识别多肽NWSHPQFEK(SEQ ID NO:134)(还称为Streptag®II),小鼠单克隆α-StxA(抗SLT-1A mAb1或mAb1)(BEI NR-867 BEI Resources,Manassas,VA,U.S.),兔多克隆抗体α-SLT-1A(抗-SLT-1ApAb1或pAb1)(Harlan Laboratories,Inc.Indianapolis,IN,U.S.,定制抗体制备,针对SLT-1A氨基酸1-251),和兔多克隆抗体α-SLT-1A(抗-SLT-1A pAb2或pAb2)(Genscript,Piscataway,NJ,U.S.,定制抗体制备),其针对肽RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:135)和HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:136)。肽序列RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:135)跨越推定的B细胞表位区#3(表5),并且肽序列HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:136)位于SLT-1A和StxA的214-223。使用标准标间检测膜结合的抗体,并且,当合适时,使用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的二级抗体(山羊抗-兔-HRP或山羊抗-小鼠-HRP,Thermo Scientific,Rockford,IL,U.S.)检测。图2-5显示蛋白质印迹,其中凝胶和/或膜的泳道编号,并且图例用相同的各自的编号表示,其中志贺毒素效应子区包含在上样到每个泳道中的蛋白中。

[0402] D58A置换成功地破坏了多克隆α-SLT-1A pAb2识别的表位中的一个(图2)。类似地,D58A/G110A/G147A三联置换和S33I/S45I/D58A/G110A/G147A五联置换突变体表现出α-SLT-1A pAb2识别的至少一个表位的强破坏(图3;图4)和α-SLT-1ApAb1识别的至少一个表位的部分破坏(图3)。

[0403] S45I/G110A/G147A和S33I/G110A/G147A三联置换突变体表现出对α-SLT-1A pAb1识别的至少一个表位的部分破坏(图3)。S45I/G110A/G147A三联突变体强烈破坏单克隆抗体mAb1识别的表位,并且部分破坏多克隆α-SLT-1A pAb2识别的表位(图3;图4)。D58A/G110A/G147A三联突变体非常有效地破坏单克隆抗体mAb1识别的表位和多克隆α-SLT-1A pAb2识别的至少一个表位(图3;图4)。

[0404] D183A/D184A/R188A三联突变体表现出对单克隆抗体mAb1识别的表位的非常有效的破坏(图5)。D58A/G110/G147A/R188A四联突变体非常有效地破坏单克隆抗体mAb1识别的表位和多克隆α-SLT-1A pAb2识别的至少一个表位,并且部分破坏α-SLT-1A pAb1识别的至少一个表位(图5)。

[0405] 可能的是,在D58A/G110A/G147A三联突变体、S45I/G110A/G147A三联突变体和D58A/G110A/G147A/R188A四联突变体中破坏的表位(一个由mAb1识别,其他由pAb2识别)更可能存在于两个不连续的区域中。因此,D58A/G110A/G147A三联突变体、S45I/G110A/G147A三联突变体和D58A/G110A/G147A/R188A四联置换突变体分别包含凭检验验证具有同时被破坏的至少两个不同表位的去免疫化志贺毒素效应子区多肽。

[0406] 类似地,可能的是,在D58A/G110A/G147A三联突变体、S45I/G110A/G147A三联突变体、S33I/G110A/G147A三联突变体、D58A/G110A/G147A/R188A四联突变体和S33I/S45I/D58A/G110A/G147A五联突变体中被破坏的某些优势表位(由pAb1和pAb2识别的表位)更可

能存在于至少两个不连续的区域中。因此，D58A/G110A/G147A三联突变体、S45I/G110A/G147A三联突变体、S33I/G110A/G147A三联突变体、D58A/G110A/G147A/R188A四联突变体和S33I/S45I/D58A/G110A/G147A五联突变体可能包含凭检验验证具有同时被破坏的至少两个不同表位的去免疫化志贺毒素效应子区多肽。

[0407] 使用标准ELISA测量mAb1识别细胞毒性蛋白情形中具有多个被破坏的表位区的去免疫化志贺毒素效应子区的能力。该细胞毒性蛋白结合其scFv结合区的靶标生物分子。将Nunc MaxiSorp®平板的孔(在磷酸缓冲盐水(1X PBS)(Hyclone Brand,Fisher Scientific,Waltham,MA,U.S.)中)用该细胞毒性蛋白的结合区的重组人靶蛋白包被。将平板在4℃温育过夜。将孔用1X PBS 0.05％吐温-20(PBS-T)洗涤，然后通过用在PBS-T中的3％牛奶在室温温育孔1小时而封闭非特异性的结合。将包含Streptag®II和去免疫化志贺毒素效应子区(D58A/G110A/G147A/R188A)的细胞毒性蛋白以确定高于结合解离长度(K_D)的浓度加入到孔中。作为阳性对照和野生型活性的参比，向孔中加入相同浓度的包含野生型志贺毒素效应子区和Streptag®II的细胞毒性蛋白。

[0408] 将平板在室温温育一小时，以允许在非变性条件下细胞毒性蛋白结合。用PBS-T洗涤孔，然后用PBS-T或小鼠单克隆抗体抗-SLT-1A mAb1在室温温育一小时。在PBS-T中洗涤孔，然后用检测抗体温育：针对Streptag®II的HRP--缀合的抗体或抗-小鼠-HR-缀合的抗体。在PBS-T中洗涤孔，然后用Pierce TMB Ultra(Thermo Scientific Inc.,Rockford,IL,U.S.)温育。用250mM盐酸(HCl)终止反应。通过测量设置为450纳米(nm)波长的光的吸光度(Abs)的平板读取装置检测HRP活性的产物。通过减去用PBS而不是任何志贺毒素构建体温育的包被的封闭的孔的吸光度值，针对背景校正测量的吸光度值。

[0409] 两种细胞毒性蛋白结合scFv的人、重组蛋白、靶标生物分子，如通过针对Streptag®II抗体的刚吸光度值测量的(图6)。包含去免疫化志贺毒素效应子区(D58A/G110A/G147A/R188A)的细胞毒性蛋白不被单克隆抗体抗-SLT-1AmAb1识别(图6)。包含野生型志贺毒素效应子多肽的阳性对照细胞毒性蛋白被抗体抗-SLT-1AmAb1结合(图6)。这些结果表明，被抗-SLT-1A mAb1识别的表位存在于天然折叠的野生型志贺毒素效应子区中，但是在天然折叠的去免疫化志贺毒素效应子区中，该表位被突变组合D58A/G110A/G147A/R188A破坏。

[0410] 实施例5.预测志贺毒素效应子多肽中抗原性和/或免疫原性表位的破坏

[0411] 使用具有下述的BcePred网络服务器：具有下述默认设置的灵活性读数：亲水性2，可及性2，暴露的表面2.4，抗原性倾向性1.8，灵活性1.9，turns 1.9，极性2.3，和合并的1.9(Saha S,Raghava G,Lecture Notes in Comput Sci 3239:197-204(2004))，检验实施例4中进行的每种置换(目的是使志贺毒素效应子多肽去免疫化，同时保留志贺毒素效应子功能)是否消除包含所述置换的表位区中预测的B细胞表位。表10显示分析中存在的置换和最后一列中的B细胞表位预测的结果。注意，通过具有默认设置的BcePred灵活性方法没有预测到野生型SLT-1A中的表位区s#0(1-15)和#7(243-257)。通过BcePred灵活性方法，检测的置换(参见表6)没有从头产生任何预测的B细胞表位(参见例如，表10)，包括表位区#0中的K1M，S8I，T9I，K11A；表位区#4*中的D94A；和表位区#4与4*中的S96I。另外，关于使用BcePred计算方法分析的其他置换的结果列在表10中，其不是凭经验检测的。

[0412] 表10.氨基酸置换后的B细胞表位预测

表位区 #	天然定位的氨基酸位置		
	B 细胞表位区	置换	通过 BcePred 的 B 细胞表位
0	1-15	K1M	没有变化
0	1-15	T4I	没有变化
0	1-15	S8I	没有变化
0	1-15	T9V	没有变化
0	1-15	T9I	没有变化
0	1-15	K11A	没有变化
0	1-15	K11H	没有变化
1	27-37	S33I	消除
1	27-37	S45V	消除
2	39-48	S45I	消除
2	39-48 (StxA)	T45I	消除
2	39-48	D47G	没有变化
2	39-48	N48V	没有变化
2	39-48	N48F	没有变化
3*	53-66	D53A	没有变化
3*	53-66	D53G	没有变化
3*	53-66	D53N	没有变化
3 & 3*	55-66	R55A	没有变化
3 & 3*	55-66	R55V	没有变化

[0413]

[0414]

3 & 3*	55-66	R55L	没有变化
3 & 3*	55-66	D58A	消除
3 & 3*	55-66	D58F	消除
3 & 3*	55-66	P59A	消除
3 & 3*	55-66	P59F	消除
3 & 3*	55-66	E60I	消除
3 & 3*	55-66	E60T	消除
3 & 3*	55-66	E60R	没有变化
3 & 3*	55-66	E61A	消除
3 & 3*	55-66	E61V	消除
3 & 3*	55-66	E61L	消除
3 & 3*	55-66	G62A	消除
4*	94-115	D94A	没有变化
4 & 4*	96-115	S96I	没有变化
4 & 4*	96-115	S109V	消除
4 & 4*	96-115	G110A	消除
4 & 4*	96-115	S112V	消除
5	141-153	G147A	消除
6*	179-190	R179A	没有变化
6 & 6*	180-190	T180G	没有变化
6 & 6*	180-190	T181I	没有变化
6 & 6*	180-190	D183A	没有变化
6 & 6*	180-190	D183G	没有变化
6& 6*	180-190	D184A	消除
6& 6*	180-190	D184F	消除
6& 6*	180-190	L185V	消除
6& 6*	180-190	S186A	消除
6& 6*	180-190	S186F	消除
6& 6*	180-190	G187A	消除
6& 6*	180-190	R188A	消除
6& 6*	180-190	R188L	消除
6& 6*	180-190	S189A	消除
7	243-257	S247I	消除
7	243-257	R248A	消除

[0415]

7	243-257	R251A	消除
8	254-268	D264A	消除
8	254-268	G265A	消除
8	262-278 (SLT-2A)	G264A	消除
9	285-293	T286A	消除
9	285-293	T286I	消除

[0416] 与SLT-1A D58A相比,SLT-1A野生型的蛋白质印迹分析(图2)表明BcePred计算灵活性方法准确预测B细胞表位存在于SLT-1A的位置55-66(表1),并且还准确预测了通过D58A置换对该表位区的破坏(表10)。

[0417] 实施例6.使用哺乳动物模型,与野生型志贺毒素效应子多肽相比,凭检验检测去免疫化志贺毒素效应子多肽的相对免疫原性

[0418] 在本实施例中,使用人免疫系统的哺乳动物模型,确定本发明的去免疫化细胞毒性蛋白与未去免疫化细胞毒性蛋白相比的相对免疫原性。使用哺乳动物免疫系统的鼠模型比较包含示例性的去免疫化志贺毒素效应子多肽的示例性细胞毒性蛋白与包含仅具有野生型序列的志贺毒素效应子区的亲本细胞毒性蛋白的相对免疫原性。由于细菌来源的志贺毒素效应子区多肽是哺乳动物的外源(或非自身的)分子结构,预测野生型志贺毒素效应子多肽将展现某种水平的免疫原性。使用小鼠确定的非哺乳动物蛋白的相对免疫原性通常指示该蛋白对所有哺乳动物的相对免疫原性。

[0419] 使用溶液中的ELISA测定来确定特异性针对下述不同细胞毒性蛋白样品的血清鼠抗体的相对量:包含野生型志贺毒素效应子多肽(SLT-1A的氨基酸1-251)或示例性去免疫化志贺毒素效应子区多肽(SLT-1A的氨基酸1-251,具有特定的氨基酸置换)的细胞毒性蛋白。将雌性BALB/c小鼠随机分组,形成每组六只小鼠的各个组。首先,在暴露于细胞毒性蛋白之前,从每只小鼠采集血清样品。接着,将组中的每只小鼠通过腹膜内注射施用每剂量0.25mg/kg的细胞毒性蛋白(包含野生型(SLT-1A的氨基酸1-251)或示例性的去免疫化志贺毒素效应子区(SLT-1A的氨基酸1-251,包含D58A/G110A/G147A/R188A)),每周三次,持续两周,在十二天内共六次注射。在细胞毒性蛋白施用过程中和之后,从所有组的小鼠收集鼠血清,以使用溶液中ELISA测定观察抗-“施用的蛋白”的水平。

[0420] 如下述进行溶液中的抗-“细胞毒性蛋白”ELISA测定。将与用于在小鼠组中注射的相同的细胞毒性蛋白在溶液中与来自该组的小鼠的血清在4℃温育过夜,然后使用用适当的靶标蛋白包被的ELISA平板孔捕获免疫复合物(由与血清中任何诱导的抗体结合的细胞毒性蛋白组成)。使用辣根过氧化物酶缀合的、抗-小鼠IgG、二级抗体检测包含鼠IgGs的捕获的免疫复合物。将ELISA平板显色,以检测辣根过氧化物酶活性,并且使用平板读数仪,在450nm检测辣根过氧化物酶活性或“ELISA信号”。将“ELISA信号”或“ELISA值”计算为减去背景信号(如使用“无血清”阴性对照测量的)后的吸光度值。对于该溶液中ELISA测定和设置,较大的ELISA值表示更强的免疫应答(抗体诱导)。

[0421] 通过该溶液中ELISA测定,在通过注射暴露于细胞毒性蛋白之前,任意组中没有小鼠检测到具有识别任一种细胞毒性蛋白的预先形成的血清抗体。因此,使用溶液中ELISA测定,在这些小鼠中抗-“细胞毒性蛋白”抗体的任意施用后检测表示诱导的从头抗体形成,这

在施用后发生。

[0422] 对于该实施例的相对免疫原性研究，在ELISA测定中使用与注射到小鼠组中的相同的细胞毒性蛋白，以捕获来自该组小鼠的血清抗体。换言之，在ELISA测定中，在来自“野生型志贺毒素效应子区”组的小鼠的血清中存在的抗体用包含野生型志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白捕获，并且在ELISA测定中，在来自“去免疫化志贺毒素效应子区多肽”组的小鼠的血清中存在的抗体用包含示例性去免疫化志贺毒素效应子区多肽(D58A/G110A/G147A/R188A)的示例性细胞毒性蛋白捕获。

[0423] 在第15天(施用第六次剂量后3天)和第22天(施用第六次剂量后10天)，通过上述溶液中ELISA测定测量抗-“细胞毒性蛋白”IgG反应(图7)。在图7中，符号表示个体小鼠：实心符号表示施用包含野生型志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白的小鼠，空心符号表示施用包含去免疫化志贺毒素效应子区多肽的示例性细胞毒性蛋白的小鼠。在图7中，竖直线分别表示每个组的平均IgG反应信号。

[0424] 在第15和22天，如通过ELISA信号所示，在施用了包含野生型志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白的组中的小鼠具有比施用了包含去免疫化志贺毒素效应子区(D58A/G110A/G147A/R188A)的细胞毒性蛋白的组中的小鼠更高幅度的抗体反应(图7)。“去免疫化志贺毒素效应子区多肽”组的平均ELISA信号(定量抗体反应)是“野生型志贺毒素效应子区”组的25％(第15天)和39％(第22天)。基于t检验(p值小于0.005)，“去免疫化志贺毒素效应子区多肽”组与“野生型志贺毒素效应子区”组之间的ELISA信号差异是统计学显著的。施用0.9Abs单位的名义吸光度值截点表示“强”抗体反应，在“野生型志贺毒素效应子区”组中的6/6(100％)只小鼠在第15或22天具有强抗体反应，而在“去免疫化志贺毒素效应子区多肽”组中仅有3/6(50％)只小鼠具有强抗体反应。

[0425] 包含去免疫化志贺毒素效应子区多肽(D58A/G110A/G147A/R188A)的示例性细胞毒性蛋白在哺乳动物模型中表现出降低的免疫原性(图7)。与“野生型志贺毒素效应子区”组相比，在“去免疫化志贺毒素效应子区多肽”组中的小鼠中，抗体诱导总量的减少，以及在该组中诱导有效的抗体反应的小鼠数量的减少，表明去免疫化志贺毒素效应子区多肽(D58A/G110A/G147A/R188A)成功地被去免疫化(即，在哺乳动物中具有降低的免疫原性潜力)，并且包含其的示例性的细胞毒性蛋白是去免疫化细胞毒性蛋白(即，在哺乳动物中具有降低的免疫原性潜力)。

[0426] 该示例性去免疫化细胞毒性蛋白包含含有四个不同的B细胞表位区破坏同时保留三种以上志贺毒素效应子功能的志贺毒素效应子区多肽，所述三种以上志贺毒素效应子功能为：催化核糖体抑制，细胞内按路线发送，和细胞毒性(表9)。另外，该细胞毒性蛋白的去免疫化志贺毒素效应子区多肽显示具有被mAb1、pAb2和pAb1识别的破坏的表位(通过蛋白质印迹)(图5)和被mAb1识别的破坏的表位(通过ELISA测定)(图6)。因此，该示例性的细胞毒性蛋白是包含去免疫化志贺毒素效应子区多肽的去免疫化细胞毒性蛋白，其具有降低的针对哺乳动物免疫系统的抗原性和免疫原性。通过在相同的或另外的预测的B细胞表位区引入另外的突变，可以进一步降低该示例性细胞毒性蛋白的抗原性和/或免疫原性。另外，在已经破坏的B细胞表位区中相同的或不同的位置的备选置换将导致降低的相对免疫原性。

[0427] 以相似的方式检测多种示例性去免疫化志贺毒素效应子区多肽或包含多种去免

疫化志贺毒素效应子多肽区的示例性细胞毒性蛋白的相对免疫原性。使用本文所述的或技术人员已知的动物模型和测定，将某些示例性的去免疫化志贺毒素效应子区多肽，包括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)，and 6.(1-251:K1M/K11A/S33I/S45I/R55A/D58A/P59A/E60I/E61A/G62A/G110A/G147A/D183A/D184/R188A/R205A)，和SEQ ID NOs:4-52，与仅包含野生型氨基酸序列的志贺毒素效应子多肽和/或包含野生型志贺毒素效应子多肽区的亲本细胞毒性蛋白比较。

[0428] 在该实施例中，小鼠静脉内施用去免疫化形式或野生型形式，以7天的时间间隔施用4次。从注射的小鼠采集血液样品，并且通过ELISA测定检测针对细胞毒性蛋白和/或志贺毒素效应子多肽的反应性。与包含仅含有野生型氨基酸序列的志贺毒素效应子区多肽的分子相比，将在注射了特定的示例性去免疫化志贺毒素效应子多肽或包含其的细胞毒性蛋白的小鼠中测量相对减少的免疫原性反应。

[0429] 包含含有多个B细胞表位区破坏的示例性去免疫化志贺毒素效应子区多肽的某些示例性去免疫化细胞毒性蛋白将保留显著水平的一种或多种志贺毒素效应子功能:催化核糖体抑制，细胞内按路线发送，和细胞毒性，并且，在蛋白质印迹和/或ELISA测定二者中，具有减少的被预先形成的识别抗-志贺样毒素A亚基抗体的抗体的识别。这些包含具有多个B细胞表位区破坏的去免疫化志贺毒素效应子区多肽的示例性细胞毒性蛋白是具有降低的抗原性和/或免疫原性的去免疫化志贺毒素效应子区多肽。

[0430] 总结

[0431] 前述实施例证明了志贺毒素效应子区多肽内的B细胞表位区可以通过氨基酸置换破坏，并且导致抗原性和免疫原性二者的降低。表11中总结了在保留至少一种志贺毒素功能的细胞毒性蛋白的情形中在志贺毒素效应子区多肽的预测的表位区内的氨基酸残基置换。除了置换R179A干扰两种以上志贺毒素效应子功能之外，所有的示例性置换导致功能上保留高细胞毒性的志贺毒素效应子区，其具有一个或多个B细胞表位的同时破坏。

[0432] 表11.B细胞表位区中保留志贺毒素效应子功能的置换的总结

[0433]

天然定位的氨基酸位置				
B 细胞表位区	置换	表位预测	核糖体抑制	细胞毒性
0: 1-15	K1M/K11A	没有变化	是	是
0: 1-15	S8I	没有变化	是	是
0: 1-15	T9I	没有变化	是	是
1: 27-37	S33I	消除	是	是
2: 39-48	S45I	消除	是	是
3*: 53-66	D53A	没有变化	是	是
3/3*: 55-66	R55A	没有变化	是	是
3/3*: 55-66	D58A	消除	是	是
3/3*: 55-66	D58F	消除	是	是
3/3*: 55-66	P59A	消除	是	是
3/3*: 55-66	E60I	消除	是	是
3/3*: 55-66	E60R	没有变化	是	是
3/3*: 55-66	E61A	消除	是	是
3/3*: 55-66	G62A	消除	是	是
4*: 94-115	D94A/S96I	没有变化	是	是
6: 180-190	D183A	没有变化	是	是
6: 180-190	D184A	消除	是	是
6: 180-190	D184F	消除	是	是
6: 180-190	R188A	消除	是	是
6: 180-190	D183A/ D184A/ R188A	消除	是	是
免疫原性残基	R205A	消除	是	是
3/3*，4/4*	E60I/ G110A	消除	是	是
3/3*，5	E60I/ G147A	消除	是	是
2，6/6*	S45I/R188A	消除	是	是
1，4/4*，5	S33I/ G110A/	消除	是	是

[0434]

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

[0435] 尽管有推理预测成功的置换的挑战，本文实施例中提供的数据提供了相信某些氨基酸置换可能成功地降低抗原性和/或免疫原性同时保持显著的志贺毒素效应子功能的理由。例如，当用某些其他氨基酸置换时，在本文显示为成功耐受置换的特定氨基酸位置的置换(表11)更可能成功地用于保留至少一种志贺毒素效应子功能。关于在组合多个单个氨基酸置换(预测破坏表位区并且保留细胞毒性)时包含志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白保

留细胞毒性的证明表明成功的单个氨基酸置换通常可以与不同表位区的其他成功的氨基酸置换组合,以产生保留显著的志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。类似地,关于包含在相同表位区内具有多个单个氨基酸置换的志贺毒素效应子区的细胞毒性蛋白保留酶活性的证明(表9;表11)表明在相同表位区中的成功的单个氨基酸置换通常可以与在相同表位区中的其他单个氨基酸置换组合,以产生保留显著志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。包含在相同表位区内具有多个单个氨基酸置换的志贺毒素效应子区多肽的细胞毒性蛋白保留细胞毒性的事实(表9;表11)表明在表位区中的成功的单个氨基酸置换可以与同一表位区中其他单个氨基酸置换组合,以产生保留显著的志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。

[0436] 经验数据证明某些置换(K1M,S8I,T9I,K11A,S33I,S45I,D53A,R55A,D58A,D58F,P59A,E60I,E60R,E61A,G62A,D94A,S96I,G110A,G147A,D183A,D184A,D184F,R188A,R205A,和/或它们的组合)和某些位置(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,和251)耐受置换,同时保留显著水平的至少一种志贺毒素效应子功能的活性。该经验数据表明可以用于产生保留显著的志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽的某些其他表位破坏性置换和表位破坏性置换的组合。可以预测还将耐受置换成保守功能组的氨基酸残基的其他氨基酸置换。例如,技术人员已知与下述任一种相似的其他置换也能够破坏表位,同时保持至少一种志贺毒素效应子功能: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,或R251A。具体地,与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,或R251A类似的置换成保守氨基酸残基的氨基酸置换具有相同的作用。相似的保守氨基酸置换的实例包括K1置换成A,G,V,L,I,F和H;T4I置换成A,G,V,L,F,M和S;S8置换成A,G,V,L,F和M;T9置换成A,G,L,F,M和S;K11置换成G,V,L,I,F和M;S33置换成A,G,V,L,F和M;S45置换成A,G,L,F和M;T45置换成A,G,V,L,I,F和M;D47置换成A,V,L,I,F,S和Q;N48置换成A,G,L,I和M;L49置换成G;D53置换成V,L,I,F,S和Q;R55置换成G,I,F,M,Q,S,K和H;D58置换成G,V,L,I,S和Q;P59置换成G;E60置换成A,G,V,F,S,Q,N,D和M;E61置换成G,I,F,S,Q,N,D,M和R;D94置换成G,V,L,I,F,S和Q;S96置换成A,G,V,L,F和M;S109置换成A,G,I,L,F和M;T109置换成A,G,V,I,L,F和M;S112置换成A,G,L,I,F和M;T180置换成A,V,L,I,F,M和S;T181置换成A,G,V,L,F,M和S;D183置换成V,L,I,F,S和Q;D184置换成G,V,L,I,S和Q;L185置换成A和G;S186置换成G,V,I,L,F和M;R188置换成G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;S189置换成G,V,I,L,F和M;R204置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;R205置换成A,G,V,L,I,F,M,Q,S,K和H;S247置换成A,G,V,I,L,F和M;Y247置换成A,G,V,L,I和F,R248置换成G,V,L和I;R250置换成A,G,V,L,I和F;以及R251置换成G,V,L和I。

[0437] 去除电荷、极性和/或减短侧链长度的氨基酸置换也将能够破坏表位,同时保持至少一种志贺毒素效应子功能。例如,用A,G,V,L,I,P,C,M,F,S,D,N,Q,H和K置换氨基酸残基

K1,T4,S8,T9,K11,S33,S45,D47,N48,L49,D53,R55,157,D58,P59,E60,E61,G62,D94,S96,S109,T109,G110,S112,G147,T180,T181,D183,D184,L185,S186,G187,R188,S189,R205,R248,或R251,以使侧链电荷被去除,极性被去除,和/或侧链长度被减短。具体地,下述氨基酸置换将能够破坏表位,同时保持至少一种志贺毒素效应子功能:D47,D53,D58,D94,D183,D184,D264置换成A,G,V,L,I,S和N;E60或E61置换成A,G,L,V,I,S,N,L,D和M;G62,G110,G147,G187,或G265置换成A;K 1或K11置换成A,G,L,V,I,F,C,M,P,S,T,N,H和Q;L49或L185置换成A和G;N48置换成A,G,V,L和I;R55,R188,R205,R247,R248,R250或R251置换成A,G,L,V,I,S,Q,K,M,F和H;S33,S45,S96,S109,S112,S186,或S189置换成A,G,V和L,以及T4,T9,T45,T109,T180,T181,T286置换成A,G,V,L,I,M和F。

[0438] 另外,在志贺毒素效应子多肽的一个表位区的破坏表位同时保留显著的志贺毒素效应子功能的氨基酸置换通常预测可与相同或不同表位区的破坏表位同时保留显著的志贺毒素效应子功能的其他氨基酸置换组合,以形成具有多个被破坏的表位区同时仍然保留显著水平的志贺毒素效应子功能的去免疫化志贺毒素效应子多肽。例如,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,和/或R205A可以组合,其中可能地与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,和/或R205A组合,以产生本发明的去免疫化志贺毒素效应子区多肽。

[0439] 实施例7.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和特异性针对CD20的结合区的细胞毒性蛋白(与SLT-1A融合的αCD20)

[0440] 在该实施例中,所述志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含前述实施例中所述的一个或多个去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区αCD20-抗原来源于识别人CD20的免疫球蛋白型结构域(参见例如,Haisma等,Blood 92:184-90(1999);Geng S等,Cell Mol Immunol 3:439-43(2006);Olafesn T等,Protein Eng Des Sel 23:243-9(2010)),其包含能够结合CD20的细胞外部分的免疫球蛋白型结合区。CD20在多个癌细胞型上表达,诸如,流入,B细胞淋巴瘤细胞、毛细胞白血病细胞、B细胞慢性淋巴细胞白血病变性和黑素瘤细胞。另外,CD20是用于治疗某些涉及过度活跃的B-细胞的自身免疫疾病、病症和病患的治疗剂的有吸引力的靶标。

[0441] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的构建、生产和纯化

[0442] 将免疫球蛋白型结合区αCD20和志贺毒素效应子区(诸如,例如,SEQ ID NOs:4-52)连接在一起。例如,通过表达编码αCD20-抗原-结合蛋白SLT-1A::αCD20(参见,例如,SEQ ID NOs:53,54,55和56)的多核苷酸来生产融合蛋白。使用如在以前的实施例中所述的或技术人员已知的细菌的和/或无细胞的蛋白翻译系统完成SLT-1A::αCD20细胞毒性蛋白的表达。

[0443] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的体外特征

[0444] 通过基于荧光的流式细胞计量术测定,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对CD20+细胞和CD20-细胞的结合特性,即最大特异性结合(B_{max})和平衡结合常数(K_D)。SLT-1A::αCD20对CD20+细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM范围内的K_D,而在该测定中不存在与CD20-细胞的显著结合。

[0445] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::αCD20细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。在该无细胞测定中SLT-1A::αCD20对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0446] 使用CD20+细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的细胞毒性

[0447] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定，使用CD20+细胞确定了SLT-1A::αCD20的细胞毒性特征。另外，通过相同的一般细胞杀伤测定，使用CD20-细胞作为CD20+细胞的对比，确定了SLT-1A::αCD20的选择性细胞毒性特征。对于CD20+细胞(取决于细胞系)，本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达CD20的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达CD20的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0448] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0449] 如实施例4和6所述，使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型，相对于野生型志贺毒素效应子区多肽，确定SLT-1A::αCD20的相对去免疫化。

[0450] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的体内效应

[0451] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20对赘生性细胞的体内效应。使用多个小鼠品系试验细胞毒性蛋白在静脉内施用以后对小鼠中的异种移植物肿瘤的效应，所述异种移植物肿瘤由向这些小鼠注射在它们的细胞表面上表达CD20的人赘生性细胞产生。

[0452] 实施例8.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和特异性针对HER2的结合区的细胞毒性蛋白(“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”)

[0453] 在本实施例中，志贺毒素效应子区源自如上所述的志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)，并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换。免疫球蛋白型结合区是来源于骆驼科抗体(V_HH)蛋白5F7的单结构域可变区的αHER2 V_HH，如在美国专利申请公开2011/0059090中所述。

[0454] 细胞毒性蛋白“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”的构建、生产和纯化

[0455] 将免疫球蛋白型结合区和志贺毒素效应子区连接在一起以形成融合蛋白(例如，参见，SEQ ID NOs:57,58,和59)。在该实施例中，可以将编码从蛋白5F7来源的αHER2-V_HH可变区的多核苷酸与本领域已知的编码接头的多核苷酸在框架内和与编码志贺毒素效应子区(其包含SEQ ID NOs:4-52的氨基酸)的多核苷酸在框架内克隆。产生“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”细胞毒性蛋白的变体，使得所述结合区任选地位于志贺毒素效应子区的氨基端附近，且任选地包含KDEL家族的羧基端内质网信号基序。使用如在前述实施例中所述的细菌的和/或无细胞的蛋白翻译系统，完成“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”细胞毒性蛋白变体的表达。

[0456] 确定细胞毒性蛋白“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”的体外特征

[0457] 通过基于荧光的流式细胞计量术测定，确定本实施例的细胞毒性蛋白对HER2+细胞和HER2-细胞的结合特性。“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”变体对HER2+细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI，具有在0.01-100nM的范围内的K_D，而在该测定中不存在与HER2-细胞的显著结合。

[0458] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成

的抑制作用是显著的。在该无细胞测定中“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”变体对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0459] 使用HER2+细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”的细胞毒性

[0460] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用HER2+细胞确定“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”变体的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用HER2-细胞作为HER2+细胞的对比,确定“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”的选择性细胞毒性特征。对于HER2+细胞(取决于细胞系),本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达HER2的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达HER2的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0461] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0462] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志贺毒素效应子区多肽,确定与SLT-1A融合的αHER2-V_HH的相对去免疫化。

[0463] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白与SLT-1A融合的αHER2-V_HH的体内效应

[0464] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白与SLT-1A融合的αHER2-V_HH对赘生性细胞的体内效应。使用多个小鼠品系试验细胞毒性蛋白在静脉内施用以后对小鼠中的异种移植物肿瘤的效应,所述异种移植物肿瘤由向这些小鼠注射在它们的细胞表面上表达HER2的人赘生性细胞产生。

[0465] 实施例9.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于抗体αEB抗原的结合区的细胞毒性蛋白

[0466] 在本实施例中,志贺毒素效应子区是源自如上所述的志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区αEB抗原来源于针对EB抗原的单克隆抗体(Fang C等,J Immunol Methods 287:21-30(2004)),其包含能够结合被EB病毒感染的人细胞或表达EB抗原的转化细胞的免疫球蛋白型结合区。所述EB抗原在多个细胞类型上表达,诸如被EB病毒感染的细胞和癌细胞(例如淋巴瘤和鼻咽癌细胞)。另外,EB感染与其它疾病(例如,多发性硬化)有关。

[0467] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αEB::KDEL的构建、生产和纯化

[0468] 将免疫球蛋白型结合区αEB-抗原和志贺毒素效应子区连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成蛋白。例如,通过表达编码αEB-抗原-结合蛋白SLT-1A::αEB::KDEL的多核苷酸来生产融合蛋白。使用如在前述实施例中所述的细菌的和/或无细胞的蛋白翻译系统,完成SLT-1A::αEB::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0469] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEB::KDEL的体外特征

[0470] 通过基于荧光的流式细胞计量术测定,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对EB抗原阳性细胞和EB抗原阴性细胞的结合特性。SLT-1A::αEB::KDEL对EB抗原阳性细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM的范围内的K_D,而在该测定中不存在与EB抗原阴性细胞的显著结合。

[0471] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::αEB::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制

作用是显著的。在该无细胞测定中SLT-1A::αEB::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0472] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEB::KDEL的细胞毒性

[0473] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用EB抗原阳性细胞确定SLT-1A::αEB::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用EB抗原阴性细胞作为EB抗原阳性细胞的对比,确定SLT-1A::αEB::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于EB抗原阳性细胞(取决于细胞系),本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达EB抗原的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达EB抗原的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0474] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0475] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志贺毒素效应子区多肽,确定SLT-1A::αEB::KDEL的相对去免疫化。

[0476] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEB::KDEL的体内效应

[0477] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEB::KDEL对赘生性细胞的体内效应。使用多个小鼠品系试验细胞毒性蛋白在静脉内施用以后对小鼠中的异种移植物肿瘤的效应,所述异种移植物肿瘤由向这些小鼠注射在它们的细胞表面上表达EB抗原的人赘生性细胞产生。

[0478] 实施例10.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于抗体α利什曼原虫-抗原的细胞毒性蛋白

[0479] 在本实施例中,志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区α利什曼原虫抗原来源于使用本领域已知的技术制备的抗体,所述抗体针对存在于携带细胞内锥虫原生动物的人细胞上的细胞表面利什曼原虫抗原(参见Silveira T等,Int J Parasitol 31:1451-8(2001);Kenner J等,J Cutan Pathol 26:130-6(1999);Berman J and Dwyer,Clin Exp Immunol 44:342-348(1981))。

[0480] 细胞毒性蛋白SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的构建、生产和纯化

[0481] 将免疫球蛋白型结合区α利什曼原虫抗原和志贺毒素效应子区连接在一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成蛋白。例如,通过表达编码利什曼原虫抗原结合蛋白SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的多核苷酸产生融合蛋白。SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL细胞毒性蛋白的表达使用前面实施例所述的细菌和/或无细胞蛋白翻译系统实现。

[0482] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的体外特征

[0483] 通过基于荧光的流式细胞计量术,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对利什曼原虫抗原阳性细胞和利什曼原虫抗原阴性细胞的结合特征。SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL对利什曼原虫抗原阳性细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM的范围内的K_D,而在该测定中不存在与利什曼原虫抗原阴性细胞的显著结合。

[0484] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。在该无细胞测定中SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0485] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的细胞毒性

[0486] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用利什曼原虫抗原阳性细胞确定SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用利什曼原虫抗原阴性细胞作为利什曼原虫抗原阳性细胞的对比,确定SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于利什曼原虫抗原阳性细胞(取决于细胞系),本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达利什曼原虫抗原的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达利什曼原虫抗原的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0487] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0488] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志贺毒素效应子区多肽,确定SLT-1A::α利什曼原虫::KDEL的相对去免疫化。

[0489] 实施例11.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于免疫球蛋白型结合区α神经降压肽受体的结合区的细胞毒性蛋白

[0490] 在本实施例中,志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区α神经降压肽受体来源于DARPin™(GenBank登记号:2P2C_R)或结合人神经降压肽受体的单克隆抗体(Ovigne J等,Neuropeptides 32:247-56(1998))。神经降压肽受体由多种癌细胞表达,诸如乳腺癌、结肠癌、肺癌、黑素瘤和胰腺癌细胞。

[0491] 细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的构建、生产和纯化

[0492] 将免疫球蛋白型结合区α神经降压肽R和志贺毒素效应子区连接在一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成蛋白。例如,通过表达编码神经降压肽受体结合蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的多核苷酸产生融合蛋白。SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL细胞毒性蛋白的表达使用前面实施例所述的细菌和/或无细胞蛋白翻译系统实现。

[0493] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的体外特征

[0494] 通过基于荧光的流式细胞计量术,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对神经降压肽受体阳性细胞和神经降压肽受体阴性细胞的结合特征。SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL对神经降压肽受体阳性细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM的范围内的K_D,而在该测定中不存在与神经降压肽受体阴性细胞的显著结合。

[0495] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。在该无细胞测定中SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0496] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的细胞毒性

[0497] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用神经降压肽受体阳性细胞确定SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用神经降压肽受体阴性细胞作为神经降压肽受体阳性细胞的对比,确定SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于神经降压肽受体阳性细胞(取决于细胞系),本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达神经降压肽受体的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达神经降压肽受体的细胞的大

约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0498] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0499] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志贺毒素效应子区多肽,确定SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的相对去免疫化。

[0500] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的体内效应

[0501] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL对赘生性细胞的体内效应。使用多个小鼠品系试验细胞毒性蛋白在静脉内施用以后对小鼠中的异种移植的肿瘤的效应,所述小鼠中的异种移植的肿瘤通过向这些小鼠注射人赘生性细胞(所述细胞在它们细胞表面上表达神经降压肽受体)而产生。

[0502] 实施例12.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于免疫球蛋白型结合区αEGFR的结合区的细胞毒性蛋白

[0503] 在本实施例中,志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。结合区αEGFR来源于AdNectin™(GenBank登记号:3QWQ_B)、Affibody™(GenBank登记号:2KZI_A;美国专利8,598,113)或抗体,它们都与一种或多种人表皮生长因子受体结合。表皮生长因子受体的表达与人癌细胞相关,诸如,例如,肺癌细胞、乳腺癌细胞和结肠癌细胞。

[0504] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的构建、生产和纯化

[0505] 将免疫球蛋白型结合区αEGFR与志贺毒素效应子区连接在一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成蛋白。例如,通过表达编码EGFR结合蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的多核苷酸产生融合蛋白。SLT-1A::αEGFR::KDEL细胞毒性蛋白的表达使用前面实施例所述的细菌和/或无细胞蛋白翻译系统实现。

[0506] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的体外特征

[0507] 通过基于荧光的流式细胞计量术,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对EGFR+细胞和EGFR-细胞的结合特征。SLT-1A::αEGFR::KDEL对EGFR+细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM的范围内的K_D,而在该测定中不存在与EGFR-细胞的显著结合。

[0508] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::αEGFR::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。在该无细胞测定中SLT-1A::αEGFR::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0509] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的细胞毒性

[0510] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用EGFR+细胞确定SLT-1A::αEGFR::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用利EGFR-细胞作为利什曼原虫抗原阳性细胞的对比,确定SLT-1A::αEGFR::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于EGFR+细胞(取决于细胞系),本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达EGFR的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达EGFR的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0511] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0512] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志

贺毒素效应子区多肽,确定SLT-1A::αEGFR::KDEL的相对去免疫化。

[0513] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的体内效应

[0514] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL对赘生性细胞的体内效应。使用多个小鼠品系试验细胞毒性蛋白在静脉内施用以后对小鼠中的异种移植的肿瘤的效应,所述小鼠中的异种移植的肿瘤通过向这些小鼠注射人赘生性细胞(所述细胞在它们细胞表面上表达EGFR(s))而产生。

[0515] 实施例13.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于抗体αCCR5的结合区的细胞毒性蛋白

[0516] 在本实施例中,志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区αCCR5来源于针对人CCR5(CD195)的单克隆抗体(Bernstone L等,Hybridoma 31:7-19(2012))。CCR5主要在T细胞、巨噬细胞、树突细胞和小胶质细胞上表达。另外,CCR5在人免疫缺陷病毒(HIV)的发病机制和传播中起作用。

[0517] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL的构建、生产和纯化

[0518] 将免疫球蛋白型结合区αCCR5与志贺毒素效应子区连接在一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成蛋白。例如,通过表达编码αCCR5-结合蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL的多核苷酸产生融合蛋白。SLT-1A::αCCR5::KDEL细胞毒性蛋白的表达使用前面实施例所述的细菌和/或无细胞蛋白翻译系统实现。

[0519] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5的体外特征

[0520] 通过基于荧光的流式细胞计量术,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对CCR5+细胞和CCR5-细胞的结合特征。SLT-1A::αCCR5::KDEL对CCR5+阳性细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM的范围内的K_D,而在该测定中不存在与CCR5-细胞的显著结合。

[0521] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::αCCR5::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。SLT-1A::αCCR5::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0522] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5的细胞毒性

[0523] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用CCR5+细胞确定SLT-1A::αCCR5::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用CCR5-细胞作为CCR5+细胞的对比,确定SLT-1A::αCCR5::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于CCR5+细胞(取决于细胞系),本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达CCR5的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达CCR5的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0524] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0525] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志贺毒素效应子区多肽,确定SLT-1A::αCCR5::KDEL的相对去免疫化。

[0526] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL的体内效应

[0527] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL对从耗尽来自供体物质的T细胞的体内效应(参见Tsirigotis P等,Immunotherapy 4:407-24(2012))。使用非人灵

长动物确定SLT-1A::αCCR5的体内效应。当用SLT-1A::αCCR5::KDEL预处理捐赠的器官时，在肾移植后，在恒河猴(rhesus macaques)中分析移植物抗宿主疾病(参见Weaver T等，Nat Med 15:746-9(2009))。在肠胃外施用不同剂量的SLT-1A::αCCR5::KDEL以后，观察到食蟹猴灵长类动物中外周血T淋巴细胞的体内消耗。如下试验SLT-1A::αCCR5::KDEL的阻断HIV感染的用途:给非人灵长类动物施用急性剂量的SLT-1A::αCCR5::KDEL，以便在暴露于猿猴免疫缺陷病毒(SIV)时严格耗尽循环T-细胞(参见Sellier P等，PLoS One 5:e10570(2010))。

[0528] 实施例14.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于抗-Env免疫球蛋白结构域的结合区的细胞毒性蛋白

[0529] 在本实施例中，志贺毒素效应子区是来源于志贺毒素的A亚基(StxA)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区αEnv来源于现有的结合HIV包膜糖蛋白(Env)的抗体，诸如GP41，GP120，GP140或GP160(参见，例如Chen W等，J Mol Bio 382:779-89(2008)；Chen W等，Expert Opin Biol Ther 13:657-71(2013)；van den Kerkhof T等，Retrovirology 10:102(2013))，或来源于用标准技术产生的抗体(参见Prabakaran等，Front Microbiol 3:277(2012))。Env是在HIV复制过程中也在被展示在HIV-感染的细胞的细胞表面上的HIV表面蛋白。尽管Env在受感染的细胞中主要在胞内体区室中表达，足够量的Env可以存在于要被本发明的非常有效的细胞毒性蛋白靶向的细胞表面上。另外，靶向Env的细胞毒性蛋白可能结合HIV病毒粒子并在病毒粒子与宿主细胞的融合过程中进入新感染的细胞。

[0530] 因为HIV表现出高突变率，优选的是使用结合Env的功能受限部分的免疫球蛋白结构域，诸如结合来自多个HIV毒株的Env的宽泛中和抗体所证实的(van den Kerkhof T等，Retrovirology 10:102(2013))。因为认为在受感染的细胞的表面上存在的Env呈递空间上受限的表位(Chen W等，J Virol 88:1125-39(2014))，优选的是，使用小于100kD且理想地小于25kD的结合区，诸如sdAb或V_HH结构域。

[0531] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的构建、生产和纯化

[0532] 将免疫球蛋白型结合区αEnv和志贺毒素效应子区连接在一起，并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成细胞毒性蛋白。例如，通过表达编码αEnv-结合蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的多核苷酸来生产融合蛋白。SLT-1A::αEnv::KDEL细胞毒性蛋白的表达使用前面实施例所述的细菌和/或无细胞蛋白翻译系统实现。

[0533] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的体外特征

[0534] 通过基于荧光的流式细胞计量术，确定了本实施例的细胞毒性蛋白对Env+细胞和Env-细胞的结合特征。SLT-1A::αEnv::KDEL对Env+阳性细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI，具有在0.01-100nM的范围内的KD，而在该测定中不存在与Env-细胞的显著结合。

[0535] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::αEnv::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。在该无细胞测定中SLT-1A::αEnv::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0536] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的细胞毒性

[0537] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用Env+细胞确定SLT-1A::αEnv::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用Env-细胞作为Env+细胞的对比,确定SLT-1A::αEnv::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于Env+细胞(取决于细胞系)和/或用于感染细胞使其成为Env+的HIV毒株,本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达Env的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达Env的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0538] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0539] 如实施例4和6所述,使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型,相对于野生型志贺毒素效应子区多肽,确定SLT-1A::αEnv::KDEL的相对去免疫化。

[0540] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的体内效应

[0541] 通过向感染了猿猴免疫缺陷病毒(SIV)的非人灵长动物施用SLT-1A::αEnv::KDEL检测SLT-1A::αEnv::KDEL抑制HIV感染的应用(参见Sellier P等,PLoS One 5:e10570(2010))。

[0542] 实施例15.包含去免疫化志贺毒素效应子多肽和来源于抗体αUL18的结合区的细胞毒性蛋白

[0543] 在本实施例中,志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)并且包含一个或多个前述实施例所述的去免疫化氨基酸置换的去免疫化志贺毒素效应子多肽。免疫球蛋白型结合区αUL18来源于使用本领域已知的技术产生的针对细胞表面巨细胞病毒蛋白UL18的抗体,所述细胞表面巨细胞病毒蛋白UL18存在于感染了巨细胞病毒的人细胞上(Yang Z,Bjorkman P,Proc Natl Acad Sci USA 105:10095-100(2008))。人巨细胞病毒感染与多种癌症和炎性病症相关。

[0544] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的构建、生产和纯化

[0545] 将免疫球蛋白型结合区αUL18与志贺毒素效应子区连接在一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:60)以形成蛋白。例如,通过表达编码αUL18-结合蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的多核苷酸产生融合蛋白。SLT-1A::αUL18::KDEL细胞毒性蛋白的表达使用前面实施例所述的细菌和/或无细胞蛋白翻译系统实现。

[0546] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的体外特征

[0547] 通过基于荧光的流式细胞计量术,确定了本实施例的细胞毒性蛋白对巨细胞病毒蛋白UL18阳性细胞和巨细胞病毒蛋白UL18阴性细胞的结合特征。SLT-1A::αUL18::KDEL对巨细胞病毒蛋白UL18阳性细胞B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100nM的范围内的K_D,而在该测定中不存在与巨细胞病毒蛋白UL18阴性细胞的显著结合。

[0548] 在如上面在前述实施例中所述的无细胞体外蛋白翻译中确定了SLT-1A::αUL18::KDEL细胞毒性蛋白的核糖体灭活能力。本实施例的细胞毒性蛋白对无细胞蛋白合成的抑制作用是显著的。SLT-1A::αUL18::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0549] 使用细胞杀伤测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的细胞毒性

[0550] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀伤测定使用巨细胞病毒蛋白UL18阳性细胞确定SLT-1A::αUL18::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀伤测定,使用巨细胞病毒蛋白UL18阴性细胞作为巨细胞病毒蛋白UL18阳性细胞的对比,确定SLT-1A::αUL18::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于巨细胞病毒蛋白UL18阳性细胞(取决于

细胞系)，本实施例的细胞毒性蛋白的CD_{50}是大约0.01-100nM。所述细胞毒性蛋白对于不在细胞表面上表达巨细胞病毒蛋白UL18的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达巨细胞病毒蛋白UL18的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。

[0551] 确定抗原性和/或免疫原性的降低

[0552] 如实施例4和6所述，使用蛋白质印迹分析、ELISA分析和鼠模型，相对于野生型志贺毒素效应子区多肽，确定SLT-1A::αUL18::KDEL的相对去免疫化。

[0553] 实施例16.靶向不同细胞型的去免疫化细胞毒性蛋白

[0554] 在本实施例中，志贺毒素效应子区是来源于志贺样毒素1的A亚基(SLT-1A)、志贺毒素的A亚基(StxA)和/或志贺样毒素2的A亚基(SLT-2A)并且具有破坏的B细胞表位区的任意组合的去免疫化志贺毒素效应子多肽。结合区来源于这样的免疫球蛋白结构域：其来自选自表12的第1列的分子，且其结合在表12的第2列中指示的细胞外靶标生物分子。使用本领域已知的试剂和技术，任选地产生具有羧基端KDEL型信号基序和/或检测促进剂的该实施例的示例性细胞毒性蛋白。如在前述实施例中所述，使用表达适当的细胞外靶标生物分子的细胞，检测本实施例的示例性细胞毒性蛋白。例如，可以使用本实施例的示例性蛋白诊断和治疗在表12的第3列中所示的疾病、病患和/或病症。

[0555] 表12.细胞毒性蛋白用于细胞靶向的不同结合区

[0556]

结合区的来源	细胞外靶标	应用
阿仑珠单抗(alemtuzumab)	CD52	B-细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和B-细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
巴利昔单抗（basiliximab）	CD25	T-细胞病症，诸如器官移植排斥的预防，和一些B-细胞谱系癌症
brentuximab	CD30	血液学癌症、B-细胞相关的免疫病症和T-细胞相关的免疫病症
卡妥索单抗(catumaxomab)	EpCAM	多种癌症，诸如卵巢癌、恶性腹水、胃癌
西妥昔单抗(cetuximab)	EGFR	多种癌症，诸如结直肠癌和头颈癌
达克珠单抗(daclizumab)	CD25	B-细胞谱系癌症和T-细胞病症，诸如器官移植物的排斥
daratumumab	CD38	血液学癌症、B-细胞相关的免疫病症和T细胞相关的免

[0557]

		疫病症
dinutuximab	神经节苷脂 GD2	多种癌症，诸如乳腺癌、骨髓癌和神经母细胞瘤
依法珠单抗(efalizumab)	LFA-1 (CD11a)	自身免疫病症，诸如银屑病
厄妥索单抗(ertumaxomab)	HER2/neu	多种癌症和肿瘤，诸如乳腺癌和结直肠癌
吉妥珠单抗(gemtuzumab)	CD33	骨髓癌或免疫病症
替伊莫单抗(ibritumomab)	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
依匹木单抗(ipilimumab)	CD152	T-细胞相关的病症和多种癌症，诸如白血病，黑素瘤
莫罗单抗(muromonab)	CD3	器官移植排斥的预防
那他珠单抗（natalizumab）	整联蛋白 α4	自身免疫病症，诸如多发性硬化和和克罗恩病
obinutuzumab	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
ocaratuzumab	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
奥瑞珠单抗(ocrelizumab)	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
ofatumumab	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
帕利珠单抗(palivizumab)	呼吸道合胞病毒的 F 蛋白	治疗呼吸道合胞病毒
帕尼单抗(panitumumab)	EGFR	多种癌症，诸如结直肠癌和头颈癌
帕妥珠单抗(pertuzumab)	HER2/neu	多种癌症和肿瘤，诸如乳腺癌和结直肠癌
pro 140	CCR5	HIV 感染和 T-细胞病症
雷莫芦单抗(ramucirumab)	VEGFR2	多种癌症和癌症相关的病症，诸如实体瘤
利妥昔单抗(rituximab)	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
托珠单抗(tocilizumab)或 atlizumab	IL-6 受体	自身免疫病症，诸如类风湿性关节炎
托西莫单抗 (tositumomab)	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
曲妥珠单抗(trastuzumab)	HER2/neu	多种癌症和肿瘤，诸如乳腺

[0558]

		癌和结直肠癌
乌妥昔单抗(ublituximab)	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
维多珠单抗(vedolizumab)	整联蛋白 α4β7	自身免疫病症，诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎
CD20 结合性 scFv(s) Geng S 等，*Cell Mol Immunol* 3: 439-43 (2006)；Olafesn T 等，*Protein Eng Des Sel* 23: 243-9 (2010)	CD20	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
CD22 结合性 scFv(s) Kawas S 等，*MAbs* 3: 479-86 (2011)	CD22	B 细胞癌症或 B 细胞相关的免疫病症
CD25 结合性 scFv(s) Muramatsu H 等，*Cancer Lett* 225: 225-36 (2005)	CD25	多种 B-细胞谱系的癌症和与 T-细胞有关的免疫病症
CD30 结合性单克隆抗体 Klimka A 等，*Br J Cancer* 83: 252-60 (2000)	CD30	B 细胞癌症或 B-细胞/T-细胞相关的免疫病症
CD33 结合性单克隆抗体 Benedict C 等，*J Immunol Methods* 201: 223-31 (1997)	CD33	骨髓癌或免疫病症
CD38 结合性免疫球蛋白结构域 U.S.专利 8,153,765	CD38	血液学癌症、B 细胞相关的免疫病症和 T 细胞相关的免疫病症
CD40 结合性 scFv(s) Ellmark P 等，*Immunology* 106: 456-63 (2002)	CD40	多种癌症和免疫病症
CD52 结合性单克隆抗体 U.S.专利 7,910,104 B2	CD52	B 细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B 细胞相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
CD56 结合性单克隆抗体 Shin J 等，*Hybridoma* 18: 521-7 (1999)	CD56	免疫病症和多种癌症，诸如肺癌、梅克尔细胞癌（Merkel cell carcinoma）、骨髓瘤
CD79 结合性单克隆抗体 Zhang L 等，*Ther Immunol* 2: 191-202 (1995)	CD79	B 细胞癌症或 B 细胞相关的免疫病症
CD248 结合性 scFv(s) Zhao A 等，*J Immunol Methods* 363: 221-32 (2011)	CD248	多种癌症，诸如抑制血管生成
EpCAM 结合性单克隆抗体	EpCAM	多种癌症，诸如卵巢癌、恶性腹水、胃癌

[0559]

Schanzer J 等，*J Immunother* 29: 477-88 (2006)		
PSMA 结合性单克隆抗体 Frigerio B 等，*Eur J Cancer* 49: 2223-32 (2013)	PSMA	前列腺癌
Eph-B2 结合性单克隆抗体 Abéngozar M 等，*Blood* 119: 4565-76 (2012)	Eph-B2	用于多种癌症诸如结直肠癌和前列腺癌
内皮因子结合性单克隆抗体 Völkel T 等，*Biochim Biophys Res Acta* 1663: 158-66 (2004)	内皮因子	多种癌症，诸如乳腺癌和结直肠癌
FAP 结合性单克隆抗体 Zhang J 等，*FASEB J* 27: 581-9 (2013)	FAP	多种癌症，诸如肉瘤和骨癌
CEA 结合性抗体和 scFv(s) Neumaier M 等，*Cancer Res* 50: 2128-34 (1990)；Pavoni E 等，*BMC Cancer* 6: 4 (2006)；Yazaki P 等，*Nucl Med Biol* 35: 151-8 (2008)；Zhao J 等，*Oncol Res* 17: 217-22 (2008)	CEA	多种癌症，诸如胃肠癌、胰腺癌、肺癌和乳腺癌
CD24 结合性单克隆抗体 Kristiansen G 等，*Lab Invest* 90: 1102-16 (2010)	CD24	多种癌症，诸如膀胱癌
LewisY 抗原结合性 scFv(s) Power B 等，*Protein Sci* 12: 734-47 (2003)；monoclonal 抗体 BR96 Feridani A 等，*Cytometry* 71: 361-70 (2007)	LewisY 抗原	多种癌症，诸如宫颈癌和子宫癌
阿达木单抗(adalimumab)	TNF-α	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎、克罗恩病、斑块状银屑病、银屑病关节炎、强直性脊柱炎、青少年特发性关节炎、新生儿溶血病
阿非莫单抗(afelimomab)	TNF-α	多种癌症和免疫病症
ald518	IL-6	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎
安芦珠单抗(anrukinzumab)	IL-13	多种癌症和免疫病症

[0560]

或 ima-638		
briakinumab	IL-12，IL-23	多种癌症和免疫病症，诸如银屑病，类风湿性关节炎，炎性肠疾病，多发性硬化
brodalumab	IL-17	多种癌症和免疫病症，诸如炎性疾病
卡那奴单抗(canakinumab)	IL-1	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎
赛妥珠单抗(certolizumab)	TNF-α	多种癌症和免疫病症，诸如克罗恩病
非扎奴单抗(fezakinumab)	IL-22	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎、银屑病
ganitumab	IGF-I	多种癌症
戈利木单抗(golimumab)	TNF-α	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎，银屑病关节炎，强直性脊柱炎
英夫利昔单抗(infliximab)	TNF-α	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎，强直性脊柱炎，银屑病关节炎，银屑病，克罗恩病，溃疡性结肠炎
ixekizumab	IL-17A	多种癌症和免疫病症，诸如自身免疫疾病
美泊利单抗(mepolizumab)	IL-5	多种癌症和免疫病症，诸如B细胞癌症
奈瑞莫单抗(nerelimomab)	TNF-α	多种癌症和免疫病症
olokizumab	IL6	多种癌症和免疫病症
ozoralizumab	TNF-α	炎症
perakizumab	IL17A	多种癌症和免疫病症，诸如关节炎
placulumab	人 TNF	多种癌症和免疫病症
sarilumab	IL6	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎，强直性脊柱炎
siltuximab	IL-6	多种癌症和免疫病症
sirukumab	IL-6	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎
tabalumab	BAFF	B细胞癌症
ticilimumab或曲美母单抗(tremelimumab)	CTLA-4	多种癌症
tildrakizumab	IL23	免疫学介导的炎性病症
tnx-650	IL-13	多种癌症和免疫病症，诸如B细胞癌症
托西珠单抗(tocilizumab)或	IL-6 受体	多种癌症和免疫病症，诸如

[0561]

atlizumab		类风湿性关节炎
优斯它单抗(ustekinumab)	IL-12，IL-23	多种癌症和免疫病症，诸如多发性硬化，银屑病，银屑病关节炎
多种生长因子：VEGF，EGF1，EGF2，FGF	VEGFR，EGFR，FGFR	多种癌症，诸如乳腺癌和结肠癌，并且抑制血管形成
多种细胞因子: IL-2，IL-6，IL-23，CCL2，BAFFs，TNFs，RANKL	IL-2R，IL-6R，IL-23R，CD80/CD86，TNFRSF13/TNFRSF17，TNFR	多种免疫病症和癌症
从患者样品鉴别出的广泛中和抗体 Prabakaran等，*Front Microbiol* 3: 277 (2012)	流感表面抗原，例如，血凝素和流感基质蛋白 2	病毒感染
从患者样品鉴别出的广泛中和抗体 Prabakaran 等，*Front Microbiol* 3: 277 (2012)	冠状病毒(Coronavirus) 表面抗原	病毒感染
从患者样品鉴别出的广泛中和抗体 Prabakaran 等，*Front Microbiol* 3: 277 (2012)	亨尼帕病毒（Henipaviruses）表面抗原	病毒感染

[0562] 尽管已经通过举例说明的方式描述了本发明的一些实施方案，显而易见，可以利用许多修改、变化和改编以及利用在本领域技术人员范围内的众多等同或替代方案实施本发明，而不背离本发明的精神或超出权利要求的范围。

[0563] 所有出版物、专利和专利申请通过引用整体并入本文，达到如同明确地且单独地指出每篇单独的出版物、专利或专利申请通过引用整体并入的程度。美国临时专利申请系列号61/777,130、61/932,000、61/951,110、61/951,121、62/010,918和62/049,325的公开内容各自通过引用整体并入本文。国际PCT专利申请WO 2014164680和WO 2014164693的公开内容各自通过引用整体并入本文。关于在本文中引用的氨基酸和核苷酸序列的来自GenBank(国家生物技术信息中心，美国)的所有可电子获得的生物序列信息的完整公开内容各自通过引用整体并入本文。

[0564]

序列表		
ID 编号	文字说明	生物学序列
SEQ ID NO:1	志贺样毒素 1 亚基 A (SLT-1A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA RMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO:2	志贺毒素亚基 A (StxA)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA RMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO:3	志贺样毒素 2 亚基 A (SLT-2A)	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG NYISLNVRGLDPYSERFNHLRLI MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL QRIADLERTGMQIGRHSLVGSY LDLMEFRGRSMTRASSRAMLRF VTVIAEALRFRQIQRGFRPALSE ASPLYTMTAQDVDLTLNWGRIS NVLPEYRGEEGVRIGRISFNSLS AILGSVAVILNCHSTGSYSVRSV SQKQKTECQIVGDRAAIKVNNV LWEANTIAALLNRKPQDLTEPN Q
SEQ ID NO:4	去免疫化的 SLT- 1A (KIM)	MEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R

[0565]

SEQ ID NO:5	去免疫化的 SLT- 1A (S8I)	KEFTLDFITAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:6	去免疫化的 SLT- 1A (T9I)	KEFTLDFSIAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:7	去免疫化的 SLT- 1A(K11A)	KEFTLDFSTAATYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:8	去免疫化的 SLT- 1A (S33I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISIGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:9	去免疫化的 SLT- 1A (S45I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD

[0566]

		DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:10	去免疫化的 SLT- 1A (D53A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVAVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:11	去免疫化的 SLT- 1A (R55A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVAGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:12	去免疫化的 SLT- 1A (D58A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:13	去免疫化的 SLT- 1A (D58F)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIFPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:14	去免疫化的 SLT- 1A (P59A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDAEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF

[0567]

		ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:15	去免疫化的 SLT- 1A (E60I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPIEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:16	去免疫化的 SLT- 1A (E60R)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPREGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:17	去免疫化的 SLT- 1A(E61A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEAGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:18	去免疫化的 SLT- 1A (G62A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEARFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R

[0568]

SEQ ID NO:19	去免疫化的 SLT- 1A (D94A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF AAFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:20	去免疫化的 SLT- 1A (S96I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFIHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:21	去免疫化的 SLT- 1A(G110A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:22	去免疫化的 SLT- 1A(G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R

[0569]

SEQ ID NO:23	去免疫化的 SLT-1A(R179A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFATTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO:24	去免疫化的 SLT-1A(D183A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLADLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO:25	去免疫化的 SLT-1A(D184A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDALSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO:26	去免疫化的 SLT-1A(D184F)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDFLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO:27	去免疫化的 SLT-1A(S186A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD

[0570]

		DLAGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:28	去免疫化的 SLT-1A(G187A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSARSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:29	去免疫化的 SLT-1A(R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:30	去免疫化的 SLT-1A(S189A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRAYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:31	去免疫化的 SLT- 1A (R205A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG ALSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:32	去免疫化的 SLT-1A(K1M, K11A)	MEFTLDFSTAATYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF

[0571]

		ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:33	去免疫化的 SLT-1A(S45I, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:34	去免疫化的 SLT-1A(E60I, G110A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPIEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:35	去免疫化的 SLT-1A(E60I, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPIEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:36	去免疫化的 SLT- 1A (D94A, S96I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF AAFIHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R

[0572]

SEQ ID NO:37	去免疫化的 SLT-1A(S33I,G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISIGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:38	去免疫化的 SLT-1A(S45I,G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:39	去免疫化的 SLT-1A(D58A,G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:40	去免疫化的 SLT-1A(E60I,G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPIEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:41	去免疫化的 SLT-1A(D183A,D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLA

[0573]

		ALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:42	去免疫化的 SLT-1A(D58A,G110A, G147A, S186A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLAGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:43	去免疫化的 SLT-1A(D58A,G110A, G147A,G187A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSARSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:44	去免疫化的 SLT-1A(D58A,G110A, G147A,R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:45	去免疫化的 SLT-1A(D58A, G110A, G147A, S189A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRAYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:46	去免疫化的 SLT- 1A (S45I D58A E60I G110A G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIAPIEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF

[0574]

		ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:47	去免疫化的 SLT-1A(D58A,G110A, G147A, S186A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLAGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:48	去免疫化的 SLT-1A(D58A,G110A, G147A,G187A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSAASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:49	去免疫化的 SLT-1A(S33I, S45I, D58A,G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:50	去免疫化的 SLT-1A(S45I G110A G147A,D183A, D184A,R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLA ALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R

[0575]

SEQ ID NO:51	去免疫化的 SLT- 1A (S45I D58A E60I G110A G147A, D183A,D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIAPIEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLA ALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:52	去免疫化的 SLT- 1A (S45I D58A E60I G62A G110A G147A, D183A, D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGD NLFAVDVRGIAPIEARFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSATSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLA ALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA R
SEQ ID NO:53	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1A 变体 #1 融合的 αCD20	MQVQLQQPGAELVKPGASVKM SCKTSGYTFTSYNVHWVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKF KGKATLTADKSSSTVYMQLSSL TSEDSAVYYCARSNYYGSSYV WFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGS GKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASP GEKVTMTCRASSSVSYMDWYQ QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWISNPPTFGAGTKLE LKEFPKPSTPPGSSGGAPKEFTL DFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPL QTISIGGTSLLMIDSGIGDNLFAV DVRGIAPEEGRFNNLRLIVERNN LYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGR SYVMTAEDVDLTLNWGRLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:54	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1 A 变体#2 融合的 αCD20	MQVQLVQSGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK FKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARAQLRPNYW YFDVWGAGTTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIV LSQSPAILSASPGEKVTMTCRAS SSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIY

[0576]

		ATSNLASGVPARFSGSGSGTSYS LTISRVEAEDAATYYCQQWISNP PTFGAGTKLELKGGGGSGGKEF TLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGT PLQTISIGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSATSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLS GRSYVMTAEDVDLTLNWGRLS SVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN AILGSVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:55	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1 A 变体#3 融合的 αCD20	MQVQLQQPGAELVKPGASVKM SCKASGYTFTSYNMHWVKQTP GRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQK FKGKATLTADKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARSTYYGGDW YFNVWGAGTTVTVSAGSTSGSG KPGSGEGSTKGQIVLSQSPAILS ASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKEFPKPSTPPGSSGGAPKEF TLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGT PLQTISIGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSATSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLS GRSYVMTAEDVDLTLNWGRLS SVLPDYHGQDSVRVGRISFGSIN AILGSVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO:56	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1A 变体#4 融合的 αCD20	MQVQLQQPGAELVKPGASVKM SCKTSGYTFTSYNVHWVKQTPG QGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKF KGKATLTADKSSSTVYMQLSSL TSEDSAVYYCARSNYYGSSYV WFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGS GKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASP GEKVTMTCRASSSVSYMDWYQ QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDA ATYYCQQWISNPPTFGAGTKLE LKEFPKPSTPPGSSGGAPGILGFV FTLKEFTLDFSTAKTYVDSLNVI RSAIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGI GDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNL RLIVERNNLYVTGFVNRTNNVF YRFADFSHVTFPGTTAVTLSADS SYTTLQRVAGISRTGMQINRHSL TTSYLDLMSHSATSLTQSVARA

[0577]

		MLRFVTVTAEALRFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVG RISFGSINAILGSVALILNCHHHA SAVAR
SEQ ID NO:57	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1A 变体#1 融合的抗-HER2-V_HH	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGITFSINTMGWYRQAPGK QRELVALISSIGDTYYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYCKRFRTAAQGTDYWG QGTQVTVSSAHHSEDPSSKAPK APKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIR SAIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIG DNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSADSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSATSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHAS AVAR
SEQ ID NO:58	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1A 变体#2 融合的抗 -HER2-V_HH	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIG DNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSADSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSATSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHAS AVAREFPKPSTPPGSSGGAPMEV QLVESGGGLVQAGGSLRLSCAA SGITFSINTMGWYRQAPGKQRE LVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCKRFRTAAQGTDYWGQGT QVTVSS
SEQ ID NO:59	细胞毒性蛋白: 与去免疫化的 SLT-1A 变体#3 融合的抗-HER2-V_HH (aHER2-V_HH::SLT-1A::KDEL)	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGITFSINTMGWYRQAPGK QRELVALISSIGDTYYADSVKGR FTISRDNAKNTVYLQMNSLKPE DTAVYYCKRFRTAAQGTDYWG QGTQVTVSSEFPKPSTPPGSSGG APKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIR SAIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIG DNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSADSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSATSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN

[0578]

		WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHAS AVARKDEL

序列表

<110> 分子模板公司

<120> 用于哺乳动物中的去免疫化志贺毒素A亚基效应子多肽

<130> 14-09PCT

<140>
<141>

<150> PCT/US2015/012970
<151> 2015-01-26

<150> 62/049,325
<151> 2014-09-11

<150> 61/932,000
<151> 2014-01-27

<160> 136

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 293
<212> PRT
[0001] <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<220>
<223> 志贺样毒素1亚基A (SLT-1A)

<400> 1

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95
```

```
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205
```

[0002]

```
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu
                245                 250                 255

Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His
            260                 265                 270

Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg
        275                 280                 285

Arg Thr Ile Ser Ser
    290
```

<210> 2
<211> 293
<212> PRT
<213> 痢疾志贺氏菌（Shigella dysenteriae）

<220>
<223> 志贺毒素亚基A (StxA)

<400> 2
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

[0003] His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile

210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu
245 250 255

Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His
260 265 270

Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg
275 280 285

Arg Thr Ile Ser Ser
290

<210> 3
<211> 297
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

[0004] <220>
<223> 志贺样毒素2亚基A (SLT-2A)

<400> 3
Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Ser Ile Arg Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Gly Asn Ile Ser
20 25 30

Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn
35 40 45

Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe
50 55 60

Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
65 70 75 80

Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser
85 90 95

His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu
130 135 140

Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr
180 185 190

Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val
195 200 205

[0005] Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser
210 215 220

Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn
225 230 235 240

Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Arg Ser Val Ser Gln Lys Gln
245 250 255

Lys Thr Glu Cys Gln Ile Val Gly Asp Arg Ala Ala Ile Lys Val Asn
260 265 270

Asn Val Leu Trp Glu Ala Asn Thr Ile Ala Ala Leu Leu Asn Arg Lys
275 280 285

Pro Gln Asp Leu Thr Glu Pro Asn Gln
290 295

<210> 4
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (K1M)

<400> 4

```
Met Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205
```

[0006]

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 5
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S8I)

<400> 5
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ile Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

[0007]

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

```
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240
```

[0008]

```
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 6
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (T9I)

<400> 6

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Ile Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                   10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45
```

```
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160
```

[0009]

```
Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 7
<211> 251
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (K11A)

<400> 7

[0010]

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Ala Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
            180                 185                 190
```

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 8
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S33I)

[0011]

<400> 8
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

[0012]

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 9
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S45I)

<400> 9
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

[0013]

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 10
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D53A)

<400> 10
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Ala Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

[0014]

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 11
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
[0015] 多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (R55A)

<400> 11
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Ala Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

```
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205
```

[0016]

```
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 12
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A)

<400> 12

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                   10                  15
```

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

[0017] Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg

245 250

<210> 13
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58F)

<400> 13
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

[0018] Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Phe Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 14
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

[0019] <220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (P59A)

<400> 14
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Ala Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser

85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

[0020] Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 15
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (E60I)

<400> 15
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser

1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Ile Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
[0021] 115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 16
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (E60R)

<400> 16
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

[0022]

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Arg Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 17
<211> 251
<212> PRT
[0023] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (E61A)

<400> 17
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Ala Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

[0024]

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 18
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (G62A)

<400> 18

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Ala Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110
```

[0025]

```
Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220
```

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 19
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D94A)

<400> 19
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

[0026]

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Ala Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

```
His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

[0027]

<210> 20
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S96I)

<400> 20

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                   10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60
```

```
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ile
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175
```

[0028]

```
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
            180                 185                 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 21
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (G110A)

<400> 21

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95
```

[0029]

```
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205
```

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 22
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (G147A)

<400> 22
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

[0030]

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

[0031]

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 23
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (R179A)

<400> 23
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

[0032]

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 24
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D183A)

<400> 24
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

[0033] Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 25
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D184A)

<400> 25
[0034] Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met

115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

[0035] Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 26
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D184F)

<400> 26
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn

35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
[0036] 145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 27
<211> 251

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S186A)

<400> 27

[0037]

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 28
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (G187A)

[0038]

<400> 28
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

[0039]

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 29
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (R188A)

<400> 29
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

[0040]

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 30
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S189A)

<400> 30

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

[0041]

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 31
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
[0042] 多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (R205A)

<400> 31
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

```
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Ala Leu Ser Ser
        195                 200                 205
```

[0043]

```
Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 32
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (K1M, K11A)

<400> 32

```
Met Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Ala Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                   10                  15
```

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

[0044]

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 33
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S45I, R188A)

<400> 33
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

[0045]

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 34
<211> 251
<212> PRT
[0046] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (E60I, G110A)

<400> 34
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Ile Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

[0047] Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 35
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (E60I, G147A)

<400> 35

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Ile Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

[0048] Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 36
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D94A, S96I)

<400> 36
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

[0049] Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Ala Phe Ile
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg

145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

[0050]
<210> 37
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S33I, G110A, G147A)

<400> 37
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
[0051] 180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 38
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>

<223> 去免疫化SLT-1A (S45I, G110A, G147A)

<400> 38

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220
```

[0052]

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 39
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A)

<400> 39
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

[0053]

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

```
His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

[0054]

<210> 40
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (E60I, G110A, G147A)

<400> 40

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                   10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Ile Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60
```

```
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175
```

[0055]

```
Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
            180                 185                 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 41
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D183A, D184A, R188A)

<400> 41

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                  10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
    50                  55                  60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65                  70                  75                  80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
                85                  90                  95
```

[0056]

```
His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
            100                 105                 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
        115                 120                 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205
```

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 42
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A, S186A)

<400> 42
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

[0057]

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

```
Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
    130                 135                 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145                 150                 155                 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
                165                 170                 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
        195                 200                 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
    210                 215                 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225                 230                 235                 240
```

[0058]

```
Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
                245                 250
```

<210> 43
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A, G187A)

<400> 43

```
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1               5                   10                  15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
            20                  25                  30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
        35                  40                  45
```

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

[0059]

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 44
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A, R188A)

<400> 44
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

[0060]

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 45
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A, S189A)

[0061]

<400> 45
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

[0062]

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 46
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S45I D58A E60I G110A G147A)

<400> 46
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Ile Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

[0063] His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 47

<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A, S186A, R188A)

<400> 47
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

[0064] Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Val Met

180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 48
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

[0065] <220>
<223> 去免疫化SLT-1A (D58A, G110A, G147A, G187A, R188A)

<400> 48
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser

100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
[0066] 210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 49
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S33I, S45I, D58A, G110A, G147A)

<400> 49
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser

20 25 30

Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

[0067] Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 50
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S45I G110A G147A, D183A,
D184A, R188A)

<400> 50
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
[0068] 50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg

165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 51
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

[0069]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S45I D58A E60I G110A G147A,
D183A, D184A, R188A)

<400> 51
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Ile Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

[0070]

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 52
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 去免疫化SLT-1A (S45I D58A E60I G62A G110A
G147A, D183A, D184A, R188A)

<400> 52

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Ile Glu Ala Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser
100 105 110

[0071]

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

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

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
225 230 235 240

Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 53
<211> 512
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#1
融合的alpha-CD20

<400> 53
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

[0072]

Tyr Asn Val His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Trp Phe Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser
115 120 125

Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser
130 135 140

```
Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
145                 150                 155                 160

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Gln
                165                 170                 175

Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu
            180                 185                 190

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
        195                 200                 205

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
    210                 215                 220

Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
225                 230                 235                 240

Lys Leu Glu Leu Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser
                245                 250                 255
```

[0073]

```
Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys
            260                 265                 270

Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro
        275                 280                 285

Leu Gln Thr Ile Ser Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser
    290                 295                 300

Gly Ile Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro
305                 310                 315                 320

Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn
                325                 330                 335

Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg
            340                 345                 350

Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr
        355                 360                 365
```

Leu Ser Ala Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile
370 375 380

Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr
385 390 395 400

Leu Asp Leu Met Ser His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala
405 410 415

Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe
420 425 430

Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly
435 440 445

Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp
450 455 460

Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val
465 470 475 480

[0074]

Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser
485 490 495

Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg
500 505 510

<210> 54
<211> 511
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#2
融合的alpha-CD20

<400> 54
Met Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

```
Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
        35                  40                  45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys
    50                  55                  60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65                  70                  75                  80

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

Cys Ala Arg Ala Gln Leu Arg Pro Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
            100                 105                 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        115                 120                 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
    130                 135                 140
```

[0075]

```
Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala
145                 150                 155                 160

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val
                165                 170                 175

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro
            180                 185                 190

Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
        195                 200                 205

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val
    210                 215                 220

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn
225                 230                 235                 240

Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly
                245                 250                 255
```

Gly Ser Gly Gly Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr
260 265 270

Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu
275 280 285

Gln Thr Ile Ser Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly
290 295 300

Ile Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu
305 310 315 320

Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu
325 330 335

Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe
340 345 350

Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu
355 360 365

[0076] Ser Ala Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser
370 375 380

Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu
385 390 395 400

Asp Leu Met Ser His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg
405 410 415

Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg
420 425 430

Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg
435 440 445

Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly
450 455 460

Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg
465 470 475 480

Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val

485 490 495

Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg
500 505 510

<210> 55
<211> 513
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#3
融合的alpha-CD20

<400> 55
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

[0077]

Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp
100 105 110

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Ser Gly Ser
115 120 125

Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Val Leu
130 135 140

Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr
145 150 155 160

Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln
165 170 175

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

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

Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr
210 215 220

Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly
245 250 255

[0078] Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
260 265 270

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
275 280 285

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
290 295 300

Ser Gly Ile Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala
305 310 315 320

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
325 330 335

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr
340 345 350

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
355 360 365

Thr Leu Ser Ala Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly

370 375 380

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser
385 390 395 400

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val
405 410 415

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
420 425 430

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser
435 440 445

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
450 455 460

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser
465 470 475 480

[0079] Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly
485 490 495

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala
500 505 510

Arg

<210> 56
<211> 521
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#4
融合的alpha-CD20

<400> 56
Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser
20 25 30

Tyr Asn Val His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Phe Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Trp Phe Phe Asp
100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser
115 120 125

[0080] Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser
130 135 140

Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
145 150 155 160

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Gln
165 170 175

Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu
180 185 190

Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
195 200 205

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
210 215 220

Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr
225 230 235 240

Lys Leu Glu Leu Lys Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser

245 250 255

Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Lys Glu
260 265 270

Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn
275 280 285

Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ile Gly
290 295 300

Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn Leu Phe
305 310 315 320

Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn
325 330 335

Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val
340 345 350

[0081] Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val
355 360 365

Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser Ser Tyr
370 375 380

Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile
385 390 395 400

Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser
405 410 415

Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val
420 425 430

Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe
435 440 445

Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala
450 455 460

Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu
465 470 475 480

Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe
485 490 495

Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys
500 505 510

His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg
515 520

<210> 57
<211> 385
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#1
融合的抗-HER2-VHH

<400> 57
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
[0082] 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

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

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

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

Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala His His Ser Glu Asp Pro Ser Ser

115 120 125

Lys Ala Pro Lys Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
130 135 140

Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
145 150 155 160

Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
165 170 175

Ser Gly Ile Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala
180 185 190

Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
195 200 205

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr
210 215 220

[0083]
Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
225 230 235 240

Thr Leu Ser Ala Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser
260 265 270

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val
275 280 285

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
290 295 300

Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser
305 310 315 320

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
325 330 335

Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser
340 345 350

Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly
355 360 365

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala
370 375 380

Arg
385

<210> 58
<211> 387
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#2
融合的抗-HER2-VHH

<400> 58
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
[0084] 1 5 10 15

Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
20 25 30

Ser Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ile Gly Asp
35 40 45

Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Ala Pro Glu Glu Gly Arg
50 55 60

Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
65 70 75 80

Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
85 90 95

Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Ala Asp
100 105 110

Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly

115 120 125

Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
130 135 140

Ser His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
145 150 155 160

Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
165 170 175

Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
180 185 190

Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
195 200 205

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
210 215 220

Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
[0085] 225 230 235 240

Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg Glu Phe Pro Lys
245 250 255

Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Met Glu Val Gln
260 265 270

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg
275 280 285

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly
290 295 300

Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Leu Ile
305 310 315 320

Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe
325 330 335

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn
340 345 350

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Arg Phe Arg
355 360 365

Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
370 375 380

Val Ser Ser
385

<210> 59
<211> 390
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：与去免疫化SLT-1A变体#3
融合的抗-HER2-VHH (alpha-HER2-VHH::SLT-1A::KDEL)

<400> 59
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
[0086] 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

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

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

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

Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro

115 120 125

Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr
130 135 140

Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly
145 150 155 160

Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ile Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile
165 170 175

Asp Ser Gly Ile Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile
180 185 190

Ala Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg
195 200 205

Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe
210 215 220

[0087] Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala
225 230 235 240

Val Thr Leu Ser Ala Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala
245 250 255

Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr
260 265 270

Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Ala Thr Ser Leu Thr Gln Ser
275 280 285

Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu
290 295 300

Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu
305 310 315 320

Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu
325 330 335

Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp
340 345 350

Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu
355 360 365

Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val
370 375 380

Ala Arg Lys Asp Glu Leu
385 390

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 60
Lys Asp Glu Leu
1

[0088]

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 61
His Asp Glu Phe
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 62
His Asp Glu Leu
1

<210> 63

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 63
Arg Asp Glu Phe
1

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 64
Arg Asp Glu Leu
1

[0089]

<210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 65
Trp Asp Glu Leu
1

<210> 66
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 66
Tyr Asp Glu Leu
1

<210> 67
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 67
His Glu Glu Phe
1

<210> 68
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 68
His Glu Glu Leu
1

<210> 69
<211> 4
[0090] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 69
Lys Glu Glu Leu
1

<210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 70
Arg Glu Glu Leu
1

<210> 71
<211> 4
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 71
Lys Ala Glu Leu
1

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 72
Lys Cys Glu Leu
1

<210> 73
<211> 4
<212> PRT
[0091] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 73
Lys Phe Glu Leu
1

<210> 74
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 74
Lys Gly Glu Leu
1

<210> 75
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 75
Lys His Glu Leu
1

<210> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 76
Lys Leu Glu Leu
1

<210> 77
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0092]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 77
Lys Asn Glu Leu
1

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 78
Lys Gln Glu Leu
1

<210> 79
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 79
Lys Arg Glu Leu
1

<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 80
Lys Ser Glu Leu
1

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0093] <220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 81
Lys Val Glu Leu
1

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 82
Lys Trp Glu Leu
1

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 83
Lys Tyr Glu Leu
1

<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 84
Lys Glu Asp Leu
1

<210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0094] <223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 85
Lys Ile Glu Leu
1

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 86
Asp Lys Glu Leu
1

<210> 87
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的

肽

<400> 87
Phe Asp Glu Leu
1

<210> 88
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 88
Lys Asp Glu Phe
1

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

[0095]

<400> 89
Lys Lys Glu Leu
1

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 90
His Ala Asp Leu
1

<210> 91
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 91
His Ala Glu Leu
1

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 92
His Ile Glu Leu
1

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

[0096]

<400> 93
His Asn Glu Leu
1

<210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 94
His Thr Glu Leu
1

<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 95
Lys Thr Glu Leu
1

<210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 96
His Val Glu Leu
1

<210> 97
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

[0097] <400> 97
Asn Asp Glu Leu
1

<210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 98
Gln Asp Glu Leu
1

<210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 99

Arg Glu Asp Leu
1

<210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 100
Arg Asn Glu Leu
1

<210> 101
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 101
[0098] Arg Thr Asp Leu
1

<210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 102
Arg Thr Glu Leu
1

<210> 103
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 103
Ser Asp Glu Leu

1

<210> 104
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 104
Thr Asp Glu Leu
1

<210> 105
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 105
Ser Lys Glu Leu
[0099] 1

<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 106
Ala Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 107
His Ala Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 108
His Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 109
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 109
Lys Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

[0100]

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 110
Ile Arg Ser Asp Glu Leu
1 5

<210> 111
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 111
Glu Arg Ser Thr Glu Leu
1 5

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 112
Arg Pro Ser Thr Glu Leu
1 5

<210> 113
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 113
Ala Ser Gly Gly Pro Glu
1 5

[0101]

<210> 114
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(6)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(11)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15)..(16)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(21)

<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (25)..(26)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(31)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(36)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(41)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(46)
<223> 可以存在或可以不存在

[0102]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(51)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(52)
<223> 该区域可以包含1-10 'Gly(2-4)Ser' 重复单位，其中一些位置可以不存在

<400> 114

```
Ala Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
            20                  25                  30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        35                  40                  45

Gly Gly Gly Ser Ala Met
    50
```

<210> 115
<211> 210

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(6)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(13)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(20)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(27)
<223> 可以存在或可以不存在

[0103] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(34)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(41)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(48)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(55)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(62)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (65)..(69)
<223> 可以存在或可以不存在

[0104]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(76)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(83)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(90)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(97)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(104)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(111)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(118)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (121)..(125)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (128)..(132)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (135)..(139)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (142)..(146)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (149)..(153)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (156)..(160)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (163)..(167)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (170)..(174)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (177)..(181)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (184)..(188)
<223> 可以存在或可以不存在

[0105]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (191)..(195)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (198)..(202)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (205)..(209)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(210)
<223> 该序列可以包含1-30 '(Gly)X-Ser'重复单位，
其中X表示1-6，并且其中一些位置可以不存在

<400> 115

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
50 55 60

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
65 70 75 80

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

[0106] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
195 200 205

Gly Ser
210

<210> 116
<211> 210
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(6)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(13)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(20)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(27)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(34)
<223> 可以存在或可以不存在

[0107]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(41)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(48)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(55)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (58)..(62)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (65)..(69)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(76)

<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(83)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(90)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(97)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (100)..(104)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (107)..(111)
<223> 可以存在或可以不存在

[0108]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(118)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (121)..(125)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (128)..(132)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (135)..(139)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (142)..(146)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (149)..(153)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (156)..(160)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (163)..(167)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (170)..(174)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (177)..(181)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (184)..(188)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (191)..(195)
[0109] <223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (198)..(202)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (205)..(209)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(210)
<223> 该序列可以包含1-30 '(Ser)X-Gly'重复单位，
其中X表示1-6，并且其中一些位置可以不存在

<400> 116
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser

35 40 45

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly
100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
115 120 125

Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
130 135 140

[0110] Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
145 150 155 160

Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
165 170 175

Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
180 185 190

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
195 200 205

Ser Gly
210

<210> 117
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(150)
<223> 该序列可以包含1-30 'Gly-Gly-Gly- Gly-Ser'重复单位，
其中一些位置可以不存在

<400> 117
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75 80

[0111]

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150

<210> 118
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(30)
<223> 可以存在或可以不存在，其中一些位置
可以不存在

<400> 118
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

<210> 119
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 119
Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

[0112]

<210> 120
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 120
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 121
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 121
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 122
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 122
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 123
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0113]

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 123
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
1 5 10

<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 124
Ser Arg Ser Ser Gly
1 5

<210> 125
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 125
Ser Gly Ser Ser Cys
1 5

<210> 126
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 126
Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser
1 5 10 15

Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met
20 25

<210> 127
<211> 15
[0114] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 127
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 128
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 129
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 129
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 130
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

[0115]

<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 131
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 132
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 132
Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 133
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 133
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 134
[0116] Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 135
Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn
1 5 10

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成的
肽

<400> 136
His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
[0117] 1 5 10

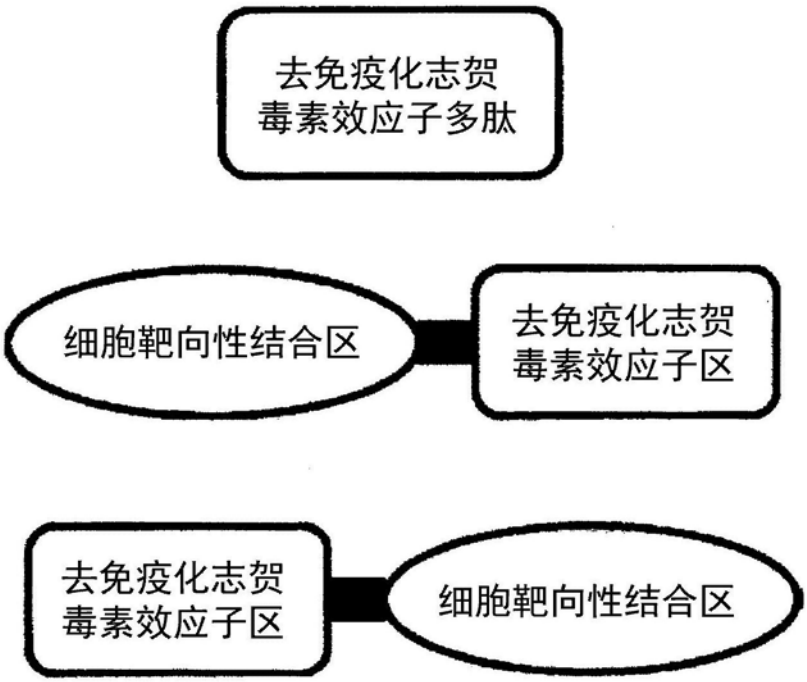

去免疫化志贺
毒素效应子多肽
细胞靶向性结合区
去免疫化志贺
毒素效应子区
去免疫化志贺
毒素效应子区
细胞靶向性结合区

图1

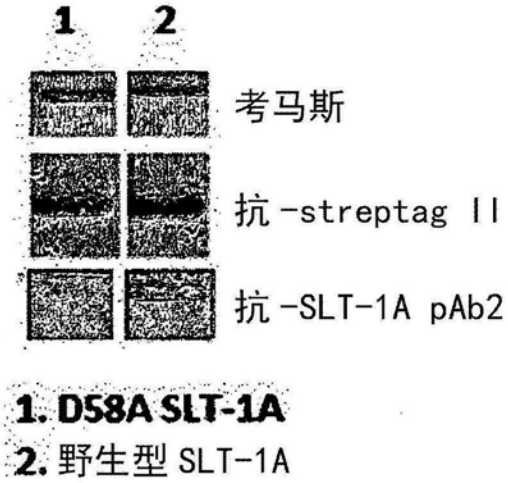

1
2
考马斯
抗-streptag II
抗-SLT-1A pAb2
1. D58A SLT-1A
2. 野生型 SLT-1A

图2

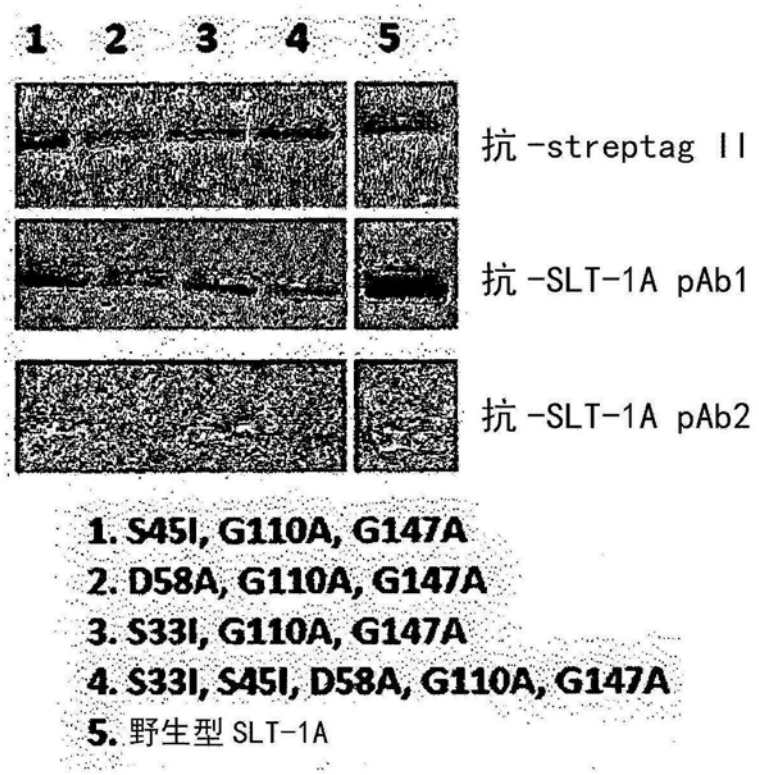

1 2 3 4 5
抗-streptag II
抗-SLT-1A pAb1
抗-SLT-1A pAb2
1. S45I, G110A, G147A
2. D58A, G110A, G147A
3. S33I, G110A, G147A
4. S33I, S45I, D58A, G110A, G147A
5. 野生型 SLT-1A

图3

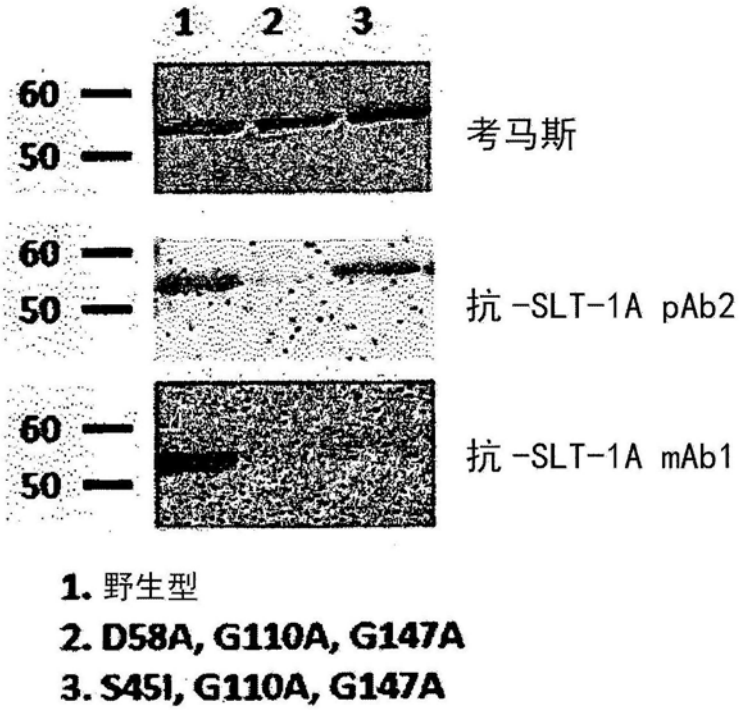

1 2 3
60
50
考马斯
抗-SLT-1A pAb2
抗-SLT-1A mAb1
1. 野生型
2. D58A, G110A, G147A
3. S45I, G110A, G147A

图4

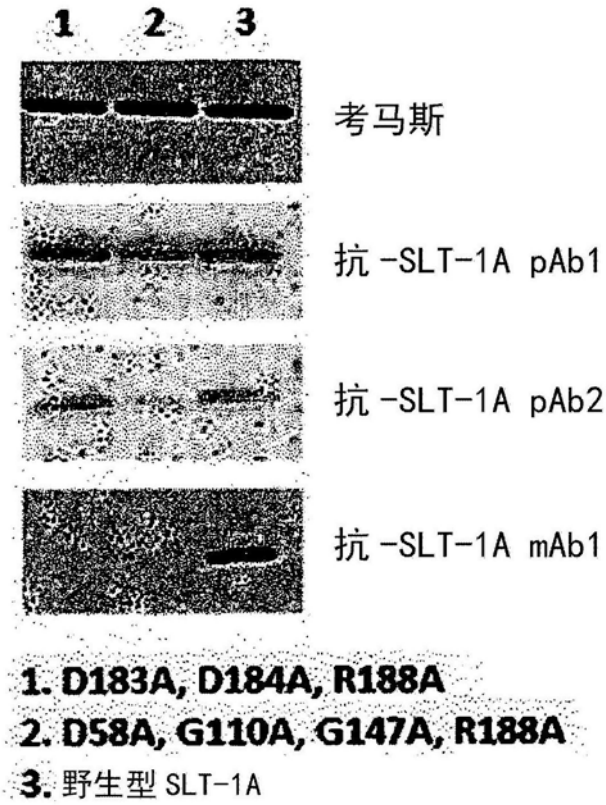

1 2 3
考马斯
抗 -SLT-1A pAb1
抗 -SLT-1A pAb2
抗 -SLT-1A mAb1
1. D183A, D184A, R188A
2. D58A, G110A, G147A, R188A
3. 野生型 SLT-1A

图5

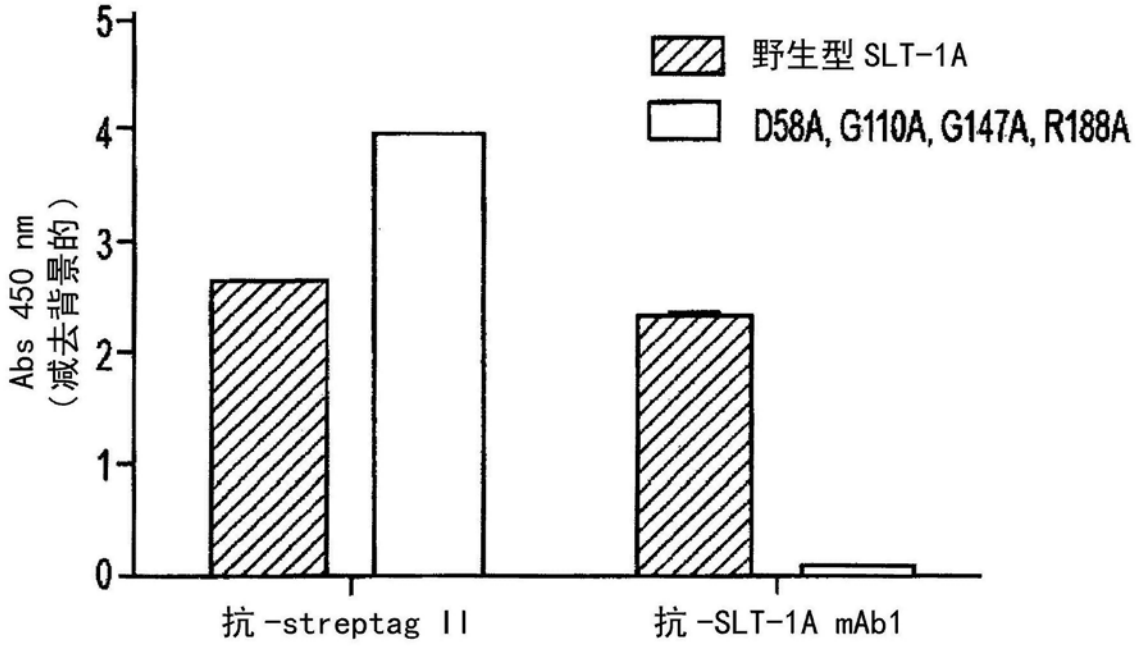

Abs 450 nm
(减去背景的)
0
1
2
3
4
5
野生型 SLT-1A
D58A, G110A, G147A, R188A
抗 -streptag II
抗 -SLT-1A mAb1

图6

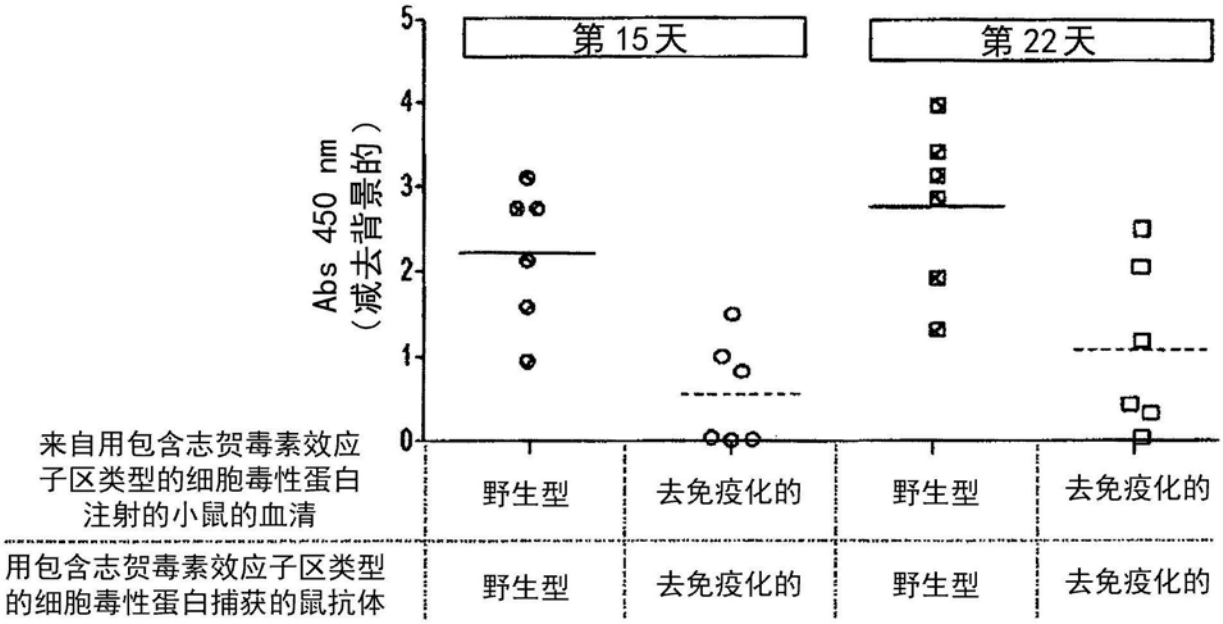

第15天
第22天
Abs 450 nm
（减去背景的）
5
4
3
2
1
0
来自用包含志贺毒素效应子区类型的细胞毒性蛋白注射的小鼠的血清
用包含志贺毒素效应子区类型的细胞毒性蛋白捕获的鼠抗体
野生型
去免疫化的
野生型
去免疫化的
野生型
去免疫化的
野生型
去免疫化的

图7