(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111909278 B
(45)授权公告日 2024.04.09

(21)申请号 202010812476.0

(22)申请日 2015.01.26

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111909278 A

(43)申请公布日 2020.11.10

(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
201580013355.7 2015.01.26

(73)专利权人 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

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张国梁 张莹

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C07K 14/25(2006.01)
C07K 14/245(2006.01)
C12N 9/10(2006.01)
C12N 9/24(2006.01)
C12N 15/31(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 103501818 A,2014.01.08
Johnson N.等.Construction of an epitope vector utilising the diphtheria toxin B-subunit..《FEMS Microbiol Lett .》.1997,第146卷(第1期),全文. (续)

审查员 马静

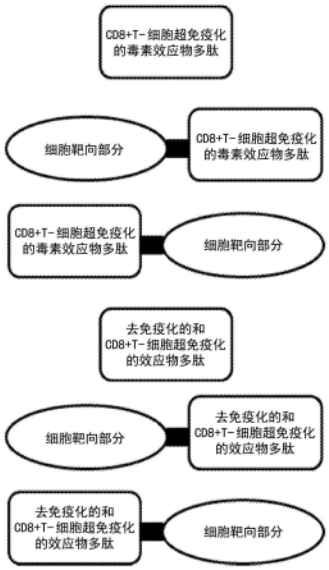
权利要求书2页 说明书121页
序列表126页 附图4页

(54)发明名称

MHC I类表位递送多肽

(57)摘要

本发明涉及将一个或多个CD 8+T-细胞表位递送至细胞的MHC I类呈递途径的T-细胞表位递送多肽,包括包含嵌入的T-细胞表位且被去免疫化的、毒素来源的多肽。本发明提供了靶向细胞的、CD8+T-细胞表位递送分子,其用于细胞毒性向某些细胞(例如,被感染的或恶性的细胞)的靶向递送,用于特定细胞类型的靶向杀死,和治疗多种疾病、病症和病患,包括癌症、免疫病症和微生物感染。本发明还提供了产生能够将一个或多个异源T-细胞表位递送至MHC I类呈递途径的多肽的方法,所述多肽包括这样的多肽:其为1)B-细胞和/或CD4+T-细胞去免疫化的,2)包含嵌入的T-细胞表位,和/或3)包含保留毒素功能的毒素效应物。



CN 111909278 B

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Noakes K L 等.Exploiting retrograde transport of Shiga-like toxin 1 for the delivery of exogenous antigens into the MHC class I presentation pathway.《FEBS Lett . 》.1999,第453卷全文.

1.一种细胞毒性志贺毒素效应物多肽,其包含与亲本野生型志贺毒素A亚基效应物多肽相比的氨基酸置换,其中所述亲本野生型志贺毒素A亚基效应物多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸1至251组成;

其中所述细胞毒性志贺毒素效应物多肽包含嵌入于SEQ ID NO:1的氨基酸残基位置53-61的异源CD8+T细胞表位DILGFDFTL(SEQ ID NO:6),所述氨基酸置换包含V54I,R55L,I57F,P59F,E60T和E61L,和

其中所述氨基酸序列包含在对应于SEQ ID NO:1的位置75的氨基酸残基处的天冬酰胺,在对应于SEQ ID NO:1的位置77的氨基酸残基处的酪氨酸,在对应于SEQ ID NO:1的位置114的氨基酸残基处的酪氨酸,在对应于SEQ ID NO:1的位置167的氨基酸残基处的谷氨酸,在对应于SEQ ID NO:1的位置170的氨基酸残基处的精氨酸,在对应于SEQ ID NO:1的位置176的氨基酸残基处的精氨酸,以及在对应于SEQ ID NO:1的位置203的氨基酸残基处的色氨酸。

2.一种细胞靶向分子,其包含:

(i)结合区域,所述结合区域能够特异性结合物理上偶联至细胞表面的细胞外靶生物分子;和

(ii)权利要求1的细胞毒性志贺毒素效应物多肽。

3.权利要求2的细胞靶向分子,其中所述结合区域融合到所述细胞毒性志贺毒素效应物多肽的羧基端以形成单个连续多肽。

4.权利要求2或3的细胞靶向分子,其中所述结合区域包含免疫球蛋白型结合区域。

5.权利要求4的细胞靶向分子,其中所述免疫球蛋白型结合区域包含抗原结合片段。

6.权利要求4的细胞靶向分子,其中所述免疫球蛋白型结合区域包含选自单结构域抗体片段或单链可变片段的多肽。

7.权利要求4的细胞靶向分子,其中所述免疫球蛋白型结合区域包含抗体可变片段。

8.权利要求4的细胞靶向分子,其中所述免疫球蛋白型结合区域包含选自以下的多肽:互补决定区3片段、受约束的FR3-CDR3-FR4多肽、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结晶蛋白来源的结构域、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、从骆驼科来源的重链抗体结构域(V_HH片段)、从软骨鱼来源的重链抗体结构域、免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR)、V_{NAR}片段或多聚scFv片段。

9.权利要求4的细胞靶向分子,其中所述免疫球蛋白型结合区域包含选自双抗体、三抗体或四抗体的多肽。

10.权利要求4的细胞靶向分子,其中所述免疫球蛋白型结合区域包含选自二价纳米抗体、双特异性串联scFv片段或双特异性微抗体的多肽。

11.权利要求2或3所述的细胞靶向分子,其中所述结合区域能够结合选自以下的细胞外靶生物分子:CD20、CD22、CD40、CD79、CD25、CD30、HER2/neu/ErbB2、EGFR、EpCAM、EphB2、前列腺特异性的膜抗原、Cripto、内皮糖蛋白/CD105、成纤维细胞活化的蛋白、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、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-联蛋白、MUM-1、胱天蛋白酶-8、KIAA0205、HPVE6、SART-1、PRAME、癌胚抗原、前列腺特异性的抗原、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、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/CD244、CD294、CD305、C3AR、FceRIa、半乳凝集素-9、mrp-14、Siglec-8、Siglec-10、CD49d、CD13、CD44、CD54、CD63、CD69、CD123、CD193、TLR4、IgE、CD107a、CD203c、CD14、CD68、CD80、CD86、CD115、F4/80、ILT-3、半乳凝集素-3、CD11a-c、GITRL、MHC II类、CD284/TLR4、CD107/Mac3、CD195/CCR5、HLA-DR、CD16/32、CD282/TLR2、CD11c、CTLA-4、TNFRSF17和任何前述物质的任何免疫原性片段。

12.权利要求11的细胞靶向分子,其中所述结合区域能够结合选自以下的细胞外靶生物分子:HER2/neu/ErbB2、CD38、CD20、CS1/SLAMF7、CTLA-4和TNFRSF17。

13.权利要求2或3所述的细胞靶向分子,其包含接头肽(GxS)n,其中x是1-6,且n是1-30。

14.权利要求13的细胞靶向分子,其中x是4,且n是1。

15.一种药物组合物,其包含:

权利要求2至14中任一项所述的细胞靶向分子;和

药学上可接受的赋形剂或载体。

16.一种编码权利要求2至14中任一项所述的细胞靶向分子的多核苷酸,或由所述多核苷酸的互补序列组成的多核苷酸。

17.一种表达载体,其包含权利要求16的多核苷酸。

18.一种宿主细胞,其包含权利要求16的多核苷酸或权利要求17的表达载体。

19.治疗有效量的权利要求15的药物组合物在制备用于治疗患者的癌症的药物中的用途。

20.权利要求19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。

MHC I类表位递送多肽

[0001] 本申请是申请日为2015年1月26日、发明名称为“MHC I类表位递送多肽”的中国专利申请No.201580013355.7的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般地涉及修饰多肽以引入所述多肽递送异源T-细胞表位用于被脊索动物细胞进行MHC I类呈递的能力的方法和使用这些方法制备的多肽。更具体地,本发明涉及将包含蛋白酶体递送效应物功能的多肽修饰成异源T-细胞表位递送多肽的方法,所述异源T-细胞表位递送多肽与它们的母体分子在它们的免疫原性性能方面的差异是一个或多个T-细胞表位-肽的添加,所述T-细胞表位-肽可以被MHC I类分子识别并被脊索动物细胞的MHC I类系统呈递在细胞表面上。本发明的某些方法涉及通过一个或多个T-细胞表位的引入而修饰多肽以降低抗原性和/或免疫原性的方法。在另一个方面,本发明涉及使用本发明的方法产生的多肽和包含使用本发明的方法产生的多肽的细胞靶向分子。本发明的细胞靶向分子可以用于众多用途,例如,多种疾病、病症和病患(例如,癌症、肿瘤、其它生长异常、免疫病症和微生物感染)的诊断和治疗。

背景技术

[0003] 脊索动物(诸如两栖动物、鸟、鱼、哺乳动物、爬行动物和鲨鱼)的免疫系统不断地针对外源分子扫描细胞外和细胞内环境,试图鉴别特别威胁性的外来分子、细胞和病原体的存在。主要组织相容性(MHC)系统作为适应性免疫系统的组成部分在脊索动物中起作用(Janeway’s Immunobiology(Murphy K,编,Garland Science,第8版,2011))。在脊索动物内,细胞外抗原被MHC II类系统呈递,而细胞内抗原可以被MHC I类系统呈递。

[0004] 通常,外源肽、多肽或蛋白向细胞的施用会导致这些分子由于质膜的物理障碍而不能进入所述细胞中。另外,这些分子经常通过细胞表面上和 /或细胞外环境中的细胞外酶活性降解成较小分子。通过胞吞作用从细胞外环境内化的多肽和蛋白通常通过溶酶体蛋白酶解降解为包括初级内体、次级内体和溶酶体的内吞途径的组成部分。通过吞噬作用从细胞外环境内化的多肽和蛋白通常通过以吞噬溶酶体结束的类似途径降解。

[0005] MHC II类途径呈递从细胞外空间中的分子来源的抗原肽,通常在吞噬作用和被专门抗原呈递细胞加工以后;这些细胞可以是专门抗原呈递细胞或其它抗原呈递细胞,例如,树突细胞(DC)、单核吞噬细胞(MNPC)、某些内皮细胞和B-淋巴细胞(B-细胞)。这些抗原呈递细胞在它们的细胞表面上展示与MHC II类分子形成复合物的某些肽用于被CD4阳性的(CD4+) T-淋巴细胞(T-细胞)识别。另一方面,MHC I类系统在脊索动物的大多数细胞中起作用以呈递来自细胞内空间(通常是细胞溶胶)的抗原肽用于被 CD8+ T-细胞识别。

[0006] MHC I类系统通过提供细胞内抗原的抗原呈递而在免疫系统中起重要作用(Cellular and Molecular Immunology(Abbas A,编,Saunders,第8版, 2014))。认为该过程是在脊索动物中涉及的适应性免疫系统的重要组成部分,所述适应性免疫系统主要用于保护免于赘生性细胞和涉及细胞内病原体的微生物感染;但是,某些受损伤的细胞也可以

通过该过程除去。与 MHC I类分子形成复合物的抗原肽的呈递会将呈递细胞敏化以通过裂解、诱导的细胞凋亡和/或坏死被细胞毒性T-细胞(CTL)靶向杀死。与MHC I 类分子形成复合物的特定肽表位的呈递在刺激和维持针对癌症、肿瘤和细胞内病原体的免疫应答中起重要作用。

[0007] MHC I类系统不断地起作用以加工和在细胞表面上展示各种自身的或非自身的(外来的)细胞内表位和肽或脂质抗原。MHC I类将来自细胞内病原体的外来抗原或转化的细胞信号展示给CD8+效应物T-细胞以引起保护性T-细胞免疫应答。另外,MHC I类系统不断地起作用以呈递自身肽表位以便建立和维持免疫耐受。

[0008] 由MHC I类系统实现的肽表位呈递包括5个主要步骤:1)细胞质肽的产生,2)肽向内质网(ER)的腔的运输,3)与某些肽结合的MHC I类分子的稳定复合物形成,4)那些稳定的肽-MHC I类分子复合物(肽-MHC I类复合物)在细胞表面上的展示,和5)特定CD8+ T-细胞(包括特定CTL)对某些抗原性的、呈递的肽-MHC I类复合物的识别。

[0009] CD8+ T-细胞对呈递的抗原-MHC I类复合物的识别会导致CD8+ T-细胞活化、克隆繁殖和分化成CD8+效应细胞,包括靶向呈递特定表位-MHC I类复合物的破坏细胞的CTL。这会导致特定CD8+效应细胞群体的建立,其中一些可以在身体各处移动以寻找和破坏展示特定表位-MHC I类复合物的细胞。

[0010] MHC I类系统开始于细胞溶质肽。肽在细胞溶胶中的存在可以以多种方式发生。一般而言,MHC I类分子呈递的肽源自细胞内蛋白和多肽的蛋白酶体降解。MHC I类途径可以开始于与抗原加工蛋白(TAP)有关的转运蛋白,所述抗原加工蛋白(TAP)与ER膜有关。TAP将肽从细胞溶胶转移至ER的腔,在此处它们可以然后与空MHC I类分子结合。TAP转移肽,所述肽最常见地具有约8-12个氨基酸残基的大小,但是也包括6-40个氨基酸残基(Koopmann J等人,Eur J Immunol 26:1720-8(1996))。

[0011] MHC I类途径还可以通过特定途径开始于ER的腔,所述特定途径包括将蛋白、多肽或肽运输进细胞溶胶中进行加工并然后通过TAP介导的易位重新返回到ER中。

[0012] 被TAP从细胞溶胶运输进ER的腔中的肽然后可供不同的MHC I类分子结合。在ER的腔中,多组分肽负载机器(其包括TAP)帮助装配稳定的肽-MHC I类分子复合物,并在某些情况下进一步加工肽,特别是通过在被称作修整的过程中切割成最佳大小的肽(参见Mayerhofer P, TampéR,J Mol Biol pii S0022-2835(2014))。在ER中,不同的MHC I类分子使用高度特异性的免疫球蛋白型抗原-结合结构域仅紧密地结合MHC I 类分子对其具有更强亲和力的那些特定肽。然后,肽-MHC I类复合物通过分泌途径运输至质膜用于呈递给细胞外环境和被CD8+ T-细胞识别。

[0013] CD8+ T-细胞对表位-MHC I类复合物的识别启动保护性免疫应答,其最终结束于呈递细胞的死亡(由于一种或多种CTL的细胞毒性活性)。CTL表达具有不同特异性的不同T-细胞受体(TCR)。MHC等位基因是非常易变的,并且由这些多态性赋予的多样性可以以两种方式影响T-细胞的识别:通过影响肽抗原的结合,和通过影响MHC分子和TCR之间的接触区域。响应于CTL通过它的特定细胞表面TCR实现的抗原-MHC I类分子复合物识别,CTL将杀死抗原-MHC I类复合物呈递细胞,主要通过穿孔蛋白和/或颗粒蛋白酶向呈递细胞中的递送所介导的细胞裂解活性。另外, CTL将释放免疫刺激性细胞因子,例如,干扰素γ(IFN-γ)、肿瘤坏死因子α(TNF)、巨噬细胞炎症蛋白-1β(MIP-1β)和白介素诸如IL-17、IL-4和IL-

22。此外,活化的CTL可以无差别地杀死活化它们的近侧表位-MHC I类复合物呈递细胞,不论近侧细胞的存在的肽-MHC I类复合物库(Wiedemann A 等人,Proc Natl Acad Sci USA 103:10985-90(2006))。可以想象这些表位 -MHC I类复合物诱导的免疫应答被治疗剂利用以杀死患者内的某些细胞类型以及使免疫系统对其它近侧细胞敏化。

[0014] MHC I类呈递途径可以被多种治疗剂利用以便诱导期望的免疫应答;但是,开发这样的技术存在几个障碍,包括、例如,穿过细胞质膜递送;逃逸内吞途径和溶酶体的破坏;和通常避免靶向细胞对外来多肽的隔离、修饰和/或破坏(Sahay G等人,J Control Release 145:182-195(2010); Fuchs H等人,Antibodies 2:209-35(2013))。

[0015] 另外,包含多肽的治疗剂(例如基于多肽的生物制品和生物药物)的有效性经常被响应于治疗剂在接受者中产生的不希望的免疫应答削减。基本上所有基于多肽的治疗剂在施用给哺乳动物受试者以后会诱导某种免疫应答水平。不同的免疫应答水平包括低水平、低亲和力和短暂免疫球蛋白-M抗体至高水平、高亲和力免疫球蛋白-G抗体的产生。治疗剂的免疫原性可能在接受者中造成不希望的免疫应答,这会减轻治疗效果、不利地改变药代动力学和/或导致超敏反应、过敏反应、过敏样反应、或输液反应以及其它后果(参见Buttel I等人,Biologicals 39:100-9(2011))。

[0016] 例如,基于多肽的治疗剂可以造成接受者产生针对所述治疗剂中的抗原位点的抗体(有时被称作中和抗体或抗-药物抗体)。产生识别治疗剂的抗体的免疫应答可以导致对治疗剂的作用的免疫学抗性。另外,抗-治疗性抗体与内源性因子之间的交叉反应可以导致不希望的临床结果。

[0017] 基于多肽的治疗剂(其具有源自接受者的远亲物种的多肽序列,诸如当接受者是哺乳动物且多肽序列源自植物或微生物时)倾向于被接受者的免疫系统强势地靶向(关于综述,参见,Sauerborn M等人,Trends Pharmacol Sci 31:53-9(2010))。脊椎动物免疫系统已经适合用先天性和适应性免疫系统识别外来多肽序列。因而,多肽向来自脊椎动物的相同物种的脊椎动物的施用可以被识别为非自身的且引起免疫应答,例如,给人施用包含两个异源人多肽序列的重组接头的多肽。

[0018] 因此,当设计含有多肽的治疗剂时,经常需要尝试使治疗剂的免疫原性最小化以防止和/或减少不希望的免疫应答在接受治疗性处理的受试者中的发生。具体地,靶向治疗剂中可能产生B-细胞和/或T-细胞抗原性和/ 或免疫原性的多肽区域用于除去、抑制和最小化。

[0019] 使用软件可以在给定多肽序列计算机环境中预测B-细胞和T-细胞表位(关于综述,参见,Bryson C等人,BioDrugs 24:1-8(2010))。例如,称作 EpiMatrix(EpiVax,Inc.,Providence,RI,U.S.)的软件被成功地用于预测重组蛋白中的T-细胞免疫原性(De Groot A等人,Dev Biol(Basel)122:171-94(2005);Koren E等人,Clin Immunol 124:26-32(2007))。

[0020] 关于降低含有多肽的治疗剂的免疫原性,已经描述了许多方案,诸如通过截短或突变消除抗原性表位和/或免疫原性表位(Tangri S等人,J Immunol 174:3187-96(2005);Mazor R等人,Proc Natl Acad Sci USA 109:E3597-603(2012);Yumura K等人,Protein Sci 22:213-21(2012))。外来多肽可以被适应性免疫系统通过免疫表位以敏锐特异性识别,所述免疫表位经常存在于多肽表面上的小量离散位点处。但是,抗体-结合亲和力可以

取决于与表位内的小量特定氨基酸的相互作用。因而,多肽中破坏免疫原性表位的关键氨基酸的修饰可以减小免疫原性(Laroche Y等人,Blood 96: 1425-32(2000))。破坏表位识别的修饰包括氨基酸缺失、置换和使用非免疫原性缀合物的表位掩蔽。

[0021] 为了开发基于多肽的治疗剂,合乎需要的是,避免诱导B-细胞介导的免疫应答和中和抗体在患者中的产生,因为它会减小治疗的有效性、改变剂量-效应特性和限制患者可以接受的剂量数(参见Lui W等人,Proc Natl Acad Sci USA 109:11782-7(2012))。

[0022] 因而,合乎需要的是具有产生新颖的T-细胞表位递送多肽的方法,所述T-细胞表位递送多肽可以将一个或多个T-细胞表位递送给细胞的MHC I类呈递途径。还合乎需要的是具有这样的多肽:其在生理条件下可以将 T-细胞表位递送至靶细胞内部以开始合乎需要的T-细胞介导的免疫应答,但是当在细胞外空间中时不会诱导不希望的免疫应答,例如,抑制性抗体的产生。因而,合乎需要的是具有这样的T-细胞表位递送多肽:其中添加了一个或多个CD8+ T-细胞表位,且消除了一个或多个B-细胞和/或CD4+T-细胞表位。

[0023] 还合乎需要的是具有靶向细胞的、CD8+ T-细胞表位递送分子,其用于将细胞毒性靶向递送至特定细胞类型,例如,被感染的或恶性的细胞。另外,合乎需要的是具有靶向细胞的、CD8+ T-细胞表位递送分子,其表现出减小的B-细胞免疫原性。一旦由靶向细胞的分子递送的T-细胞免疫原性肽被呈递至靶细胞的表面,T-细胞表位可以发出信号通过活化接受者的自身免疫系统募集CD8+ T-细胞来破坏呈递细胞。另外,由靶细胞的展示的T-细胞表位-MHC I类复合物活化的CD8+ T-细胞可以刺激更宽的免疫应答和改变微环境(例如通过在肿瘤或被感染的组织部位中释放细胞因子),使得其它免疫细胞(例如效应物T-细胞)可以被募集至局部区域。

[0024] 另外,合乎需要的是具有产生新颖的T-细胞表位递送多肽的方法,所述多肽源自毒素,仍然保留亲本毒素多肽的某些生物学效应或功能,诸如促进细胞内化、指导亚细胞按路线发送和/或毒素酶活性。另外,合乎需要的是具有工程改造毒素来源的多肽的方法,其中用T-细胞表位替代B-细胞表位作为实现以下两个目的的方式:减小产生不希望的免疫应答的多肽的可能性,和增加诱导合乎需要的T-细胞应答的可能性,所中T-细胞应答针对内化包含毒素多肽的分子的那些靶向细胞。

发明内容

[0025] 本发明提供了T-细胞表位递送多肽(在本文中被称作“CD8+ T-细胞超免疫化的”)的多个实施方案,它们作为某些靶向细胞的分子的组分具有递送T-细胞表位用于被脊索动物内的有核靶细胞呈递的能力。本发明还提供了去免疫化的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽的多个实施方案,它们在哺乳动物中具有降低的关于B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位的抗原性和/或免疫原性潜力(在本文中被称作“B-细胞和/或CD4+ T-细胞去免疫化的”)。本发明还提供了细胞靶向、CD8+ T-细胞表位递送分子的多个实施方案,它们用于将细胞毒性靶向递送至特定细胞类型,例如,脊索动物内被感染的或恶性的细胞。

[0026] 另外,本发明提供了产生新颖多肽的方法的实施方案,所述多肽能够将一个或多个异源T-细胞表位递送至细胞的MHC I类呈递途径。本发明还提供了通过同时减小B-细胞和/或CD4+ T-细胞免疫原性的可能性并同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的可能性而产生多肽变体的方法的多个实施方案。本发明还提供了产生新颖多肽的方法的某些实施方案,所

述多肽能够将一个或多个异源T-细胞表位递送至细胞的MHC I类呈递途径,其中所述开始多肽包含毒素效应物区域,且使用本发明的方法产生的某些多肽会产生保留毒素效应物功能(例如,酶活性和细胞毒性)的多肽。

[0027] 本发明的多肽可以是CD8+ T-细胞超免疫化的或去免疫化的或二者。本发明的去免疫化的多肽可以是B-细胞表位去免疫化的或T-细胞去免疫化的或二者。本发明的T-细胞去免疫化的多肽可以是CD4+ T-细胞去免疫化的或CD8+ T-细胞去免疫化的或二者。本发明的多肽的某些实施方案包含一个或多个异源T-细胞表位。在本发明的多肽的某些其它实施方案中,所述一个或多个异源T-细胞表位是CD8+ T-细胞表位。

[0028] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含嵌入的或插入的异源T-细胞表位,其中所述多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述多肽的细胞的蛋白酶体。在某些其它实施方案中,本发明的多肽还包含毒素来源的多肽,其能够按路线发送至存在所述毒素来源的多肽的细胞的亚细胞区室,所述亚细胞区室选自由以下组成的组:细胞溶胶、内质网和溶酶体。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含嵌入或插入毒素来源的多肽中的异源T-细胞表位。

[0029] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含含有毒素效应物多肽的毒素来源的多肽,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽源自选自由以下组成的组的毒素:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、 bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。

[0030] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251或SEQ ID NO:45的氨基酸2-389 来源的毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0031] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含嵌入的或插入的异源CD8+ T- 细胞表位,其中所述多肽能够将T-细胞表位从存在所述多肽的细胞的早期内体区室细胞内递送至MHC I类分子。在某些其它实施方案中,所述多肽还包含毒素来源的多肽,所述毒素来源的多肽能够按路线发送至存在所述多肽的细胞的亚细胞区室,所述亚细胞区室选自由以下组成的组:细胞溶胶、内质网和溶酶体。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含在毒素来源的多肽中的异源CD8+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含含有毒素效应物多肽的毒素来源的多肽,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx 毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些实施方案中,本发明

的多肽包含从 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251或SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0032] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含异源CD8+ T-细胞表位,其中所述多肽能够细胞内递送T-细胞表位用于由MHC I类分子呈递在存在所述多肽的细胞的表面上。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含毒素来源的多肽,所述毒素来源的多肽能够按路线发送至存在所述毒素来源的多肽的细胞的亚细胞区室,所述亚细胞区室选自由以下组成的组:细胞溶胶、内质网和溶酶体。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含在毒素来源的多肽中的异源CD8+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含含有毒素效应物多肽的毒素来源的多肽,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251或SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0033] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含与异源CD8+ T-细胞表位有关的蛋白酶体递送效应物多肽,且能够细胞内递送T-细胞表位用于被MHC I 类分子呈递在存在所述多肽的细胞的表面上。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含志贺毒素效应物多肽,其中所述异源CD8+ T-细胞表位没有直接融合至所述志贺毒素效应物多肽的氨基端。在某些其它实施方案中,本发明的多肽还包含嵌入或插入B-细胞表位中的第二T-细胞表位。在某些其它实施方案中,本发明的多肽还包含毒素来源的多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽还包含含有毒素效应物多肽的毒素来源的多肽,所述毒素效应物多肽包含蛋白酶体递送效应物多肽和第二T-细胞表位。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含含有毒素效应物多肽的毒素来源的多肽,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251或SEQ ID NO:45的

氨基酸2-389来源的毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0034] 在本发明的方法的某些实施方案中是增加多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述多肽能够细胞内按路线发送至存在所述多肽的细胞的亚细胞区室,所述亚细胞区室选自由以下组成的组:细胞溶胶、内质网和溶酶体;所述方法包括下述步骤:将异源CD8+ T-细胞表位嵌入或插入所述多肽中。在某些其它实施方案中,所述方法包括嵌入或插入步骤,其中嵌入或插入内源性B-细胞表位、内源性CD4+ T-细胞表位和/或多肽的催化结构域。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含毒素效应物多肽,所述毒素效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的蛋白酶体,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,嵌入或插入步骤会产生这样的毒素效应物多肽:除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的MHC I类分子以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0035] 在本发明的方法的某些实施方案中是增加多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述多肽的细胞的蛋白酶体,所述方法包括下述步骤:将异源CD8+ T-细胞表位嵌入或插入所述多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含毒素效应物多肽,所述毒素效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的蛋白酶体,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,嵌入或插入步骤会产生这样的毒素效应物多肽:除了将 T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的MHC I类分子以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0036] 在本发明的方法的某些实施方案中是增加多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述多肽的细胞的MHC I类分子,所述方法包括下述步骤:将异源CD8+T-细胞表位嵌入或插入所述多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含毒素效应物多肽,所述毒素效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的蛋白酶体,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,嵌入或插入步骤会产生这样的毒素效应物多肽:除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的MHC I类分子以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0037] 在本发明的方法的某些实施方案中是产生T-细胞表位递送分子的方法,所述T-细胞表位递送分子能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至所述分子存在于其中的

细胞的细胞溶胶、内质网和/或溶酶体,所述方法包括下述步骤:使异源T-细胞表位与多肽结合,所述多肽能够按路线发送至存在所述多肽的细胞的亚细胞区室,所述亚细胞区室选自由以下组成的组:细胞溶胶、内质网和溶酶体。在所述方法的某些其它实施方案中,所述结合由将异源T-细胞表位嵌入或插入内源性B-细胞表位、内源性CD4+ T-细胞表位和/或所述分子的催化结构域中组成。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含毒素效应物多肽,所述毒素效应物多肽能够将T- 细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶、内质网和/或溶酶体,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,嵌入或插入步骤会产生这样的毒素效应物多肽:除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶、内质网和/ 或溶酶体以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0038] 在本发明的方法的某些实施方案中是产生CD8+ T-细胞表位递送分子的方法,所述CD8+ T-细胞表位递送分子能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述递送分子的细胞的蛋白酶体,所述方法包括下述步骤:将异源CD8+ T-细胞表位嵌入或插入蛋白酶体递送效应物多肽,所述蛋白酶体递送效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述蛋白酶体递送效应物多肽的细胞的蛋白酶体。在所述方法的某些其它实施方案中,所述结合由将异源T-细胞表位嵌入或插入内源性 B-细胞表位、内源性CD4+ T-细胞表位和/或所述分子的催化结构域组成。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含毒素效应物多肽,除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的蛋白酶体以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0039] 在本发明的方法的某些实施方案中是产生CD8+ T-细胞表位递送分子的方法,所述CD8+ T-细胞表位递送分子能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述递送分子的细胞的MHC I类分子,所述方法包括下述步骤:将异源CD8+ T-细胞表位嵌入或插入蛋白酶体递送效应物多肽,所述蛋白酶体递送效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述蛋白酶体递送效应物多肽的细胞的MHC I类分子。在所述方法的某些其它实施方案中,所述结合由将异源T-细胞表位嵌入或插入内源性B-细胞表位、内源性CD4+ T-细胞表位和/或所述分子的催化结构域组成。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含含有蛋白酶体递送效应物多肽的毒素效应物多肽,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的MHC I类分子以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0040] 在本发明的方法的某些实施方案中是产生CD8+ T-细胞表位递送分子的方法,所述CD8+ T-细胞表位递送分子当存在于细胞中时能够递送T- 细胞表位用于由MHC I类分子呈递,所述方法包括下述步骤:将异源CD8+T-细胞表位嵌入或插入蛋白酶体递送效应物多肽,所述蛋白酶体递送效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述蛋白酶体递送效应物多肽的细胞的蛋白酶体。在所述方法的某些其它实施方案中,所述

结合由将异源T-细胞表位嵌入或插入内源性B-细胞表位、内源性CD4+ T-细胞表位和/或所述分子的催化结构域组成。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含含有蛋白酶体递送效应物多肽的毒素效应物多肽,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的MHC I类分子以外,所述毒素效应物多肽还能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0041] 在本发明的方法的某些实施方案中是产生CD8+ T-细胞表位递送分子的方法,所述CD8+ T-细胞表位递送分子当存在于细胞中时能够递送T- 细胞表位用于由MHC I类分子呈递,所述方法包括下述步骤:将异源CD8+T-细胞表位嵌入或插入蛋白酶体递送效应物多肽,所述蛋白酶体递送效应物多肽能够将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述蛋白酶体递送效应物多肽的细胞的MHC I类分子。在所述方法的某些其它实施方案中,所述结合由将异源T-细胞表位嵌入或插入内源性B-细胞表位、内源性CD4+ T-细胞表位和/或所述分子的催化结构域组成。在所述方法的某些其它实施方案中,所述方法的多肽源自毒素。在所述方法的某些其它实施方案中,所述多肽包含含有蛋白酶体递送效应物多肽的毒素效应物多肽,且所述方法包括将异源T-细胞表位嵌入或插入毒素效应物多肽中。在所述方法的某些其它实施方案中,除了将T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述毒素效应物多肽的细胞的MHC I类分子以外,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。

[0042] 在某些实施方案中,本发明的去免疫化的多肽包含破坏内源性B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位的异源T-细胞表位。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含毒素来源的多肽。在某些其它实施方案中,所述异源 CD8+ T-细胞表位是在毒素来源的多肽中。在某些其它实施方案中,本发明的毒素来源的多肽包含毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素效应物多肽中。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、 Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从白喉毒素家族的至少一个成员的A 和B亚基来源的氨基酸序列的白喉毒素效应物多肽,其中所述白喉毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:SEQ ID NO:39 的3-10、SEQ ID NO:39的33-43、SEQ ID NO:39的71-77、SEQ ID NO:39的125-131、SEQ ID NO:39的138-146、SEQ ID NO:39的165-175和SEQ ID NO:39的185-191;且其中所述白喉毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述白喉毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的白喉毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基来源的氨基酸序列的志贺毒素效应物多肽,其中所述志贺毒素效应物多肽包含选自由以下组成的

天然定位的氨基酸的组的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或 CD4+ T-细胞表位区域的破坏:B-细胞表位区域: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;和SEQ ID NO:3的210-218;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,和CD4+ T-细胞表位区域:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的4-33,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的34-78,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的77-103,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的128-168,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的160-183,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的236-258,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的 274-293;且其中所述志贺毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述志贺毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251 来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0043] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含破坏内源性B-细胞表位和/或内源性CD4+ T-细胞表位的异源CD8+ T-细胞表位,其中所述多肽能够将 CD8+ T-细胞表位从早期内体区室细胞内递送至存在所述多肽的细胞的蛋白酶体。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含毒素来源的多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素来源的多肽中。在某些其它实施方案中,本发明的毒素来源的多肽包含毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素效应物多肽中。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix 毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase 细胞毒素。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从白喉毒素家族的至少一个成员的A和B亚基来源的氨基酸序列的白喉毒素效应物多肽,其中所述白喉毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:SEQ ID NO:39的3-10、SEQ ID NO:39的33-43、SEQ ID NO:39的71-77、SEQ ID NO:39的125-131、SEQ ID NO:39的138-146、SEQ ID NO:39的165-175和SEQ ID NO:39的185-191;且其中所述白喉毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述白喉毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的白喉毒素效应物多肽。在

某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基来源的氨基酸序列的志贺毒素效应物多肽,其中所述志贺毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:B-细胞表位区域: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;和SEQ ID NO:3的210-218;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,和CD4+ T-细胞表位区域:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的 4-33,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的34-78,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的77-103,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的128-168,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的160-183,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的236-258,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的274-293;且其中所述志贺毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述志贺毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0044] 在某些实施方案中,本发明的去免疫化的多肽包含破坏内源性B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位的异源CD8+ T-细胞表位,其中所述多肽能够将CD8+ T-细胞表位从存在所述多肽的细胞的早期内体区室细胞内递送至 MHC I类分子。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含毒素来源的多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素来源的多肽中。在某些其它实施方案中,本发明的毒素来源的多肽包含毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素效应物多肽中。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从白喉毒素家族的至少一个成员的A和B亚基来源的氨基酸序列的白喉毒素效应物多肽,其中所述白喉毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或 CD4+ T-细胞表位区域的破坏:SEQ ID NO:39的3-10、SEQ ID NO:39的 33-43、SEQ ID NO:39的71-77、SEQ ID NO:39的125-131、SEQ ID NO:39 的138-146、SEQ ID NO:39的165-175和SEQ ID NO:39的185-191;且其中所述白喉毒

素效应物多肽能够按路线发送至存在所述白喉毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的白喉毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基来源的氨基酸序列的志贺毒素效应物多肽,其中所述志贺毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的志贺毒素A 亚基氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:B-细胞表位区域: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;和SEQ ID NO:3的210-218;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,和CD4+ T-细胞表位区域:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的4-33,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的34-78,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的77-103,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的128-168,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的160-183,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的236-258,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的274-293;且其中所述志贺毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述志贺毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0045] 在某些实施方案中,本发明的去免疫化的多肽包含破坏内源性B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位的异源CD8+ T-细胞表位,其中所述多肽能够细胞内递送CD 8+ T-细胞表位用于由MHC I类分子呈递在存在所述多肽的细胞的表面上。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含毒素来源的多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素来源的多肽中。在某些其它实施方案中,本发明的毒素来源的多肽包含毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素效应物多肽中。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从白喉毒素家族的至少一个成员的A和B亚基来源的氨基酸序列的白喉毒素效应物多肽,其中所述白喉毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或 CD4+ T-细胞表位区域的破坏:SEQ ID NO:39的

3-10、SEQ ID NO:39的 33-43、SEQ ID NO:39的71-77、SEQ ID NO:39的125-131、SEQ ID NO:39的138-146、SEQ ID NO:39的165-175和SEQ ID NO:39的185-191;且其中所述白喉毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述白喉毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的白喉毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基来源的氨基酸序列的志贺毒素效应物多肽,其中所述志贺毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的志贺毒素A 亚基氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:B-细胞表位区域: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;和SEQ ID NO:3的210-218;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,和CD4+ T-细胞表位区域:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的4-33,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的34-78,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的77-103,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的128-168,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的160-183,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的 236-258,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的274-293;且其中所述志贺毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述志贺毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0046] 在某些实施方案中,本发明的去免疫化的多肽包含蛋白酶体递送效应物多肽,其包含破坏内源性B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位的第一异源T-细胞表位,其中所述蛋白酶体递送效应物多肽连接至第二CD8+ T- 细胞表位;且所述多肽能够细胞内递送第二CD8+ T-细胞表位用于由MHC I类分子呈递在存在所述多肽的细胞的表面上。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含毒素来源的多肽。在某些其它实施方案中,所述异源 CD8+ T-细胞表位是在毒素来源的多肽中。在某些其它实施方案中,本发明的毒素来源的多肽包含毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述异源CD8+ T-细胞表位是在毒素效应物多肽中。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽能够表现出一种或多种毒素效应物功能。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从选自由以下组成的组的毒素来源的毒素效应物多肽:ABx毒素、核糖体灭活蛋白毒素、相思豆毒蛋白、炭疽毒素、 Aspf1、bouganin、异株泻根毒蛋白、cholix毒素、密蛋白、白喉毒素、白树毒蛋白、热不稳定的肠毒素、丝林霉素、百日咳毒素、美洲商陆抗病毒蛋白、美丽天人菊内酯、假单胞菌外毒素A、局限曲菌素、蓖麻毒蛋白、肥皂草毒蛋白、sarcin、志贺毒素和subtilase细胞毒素。在某些其它实施方案中,所述

毒素效应物多肽是包含从白喉毒素家族的至少一个成员的A 和B亚基来源的氨基酸序列的白喉毒素效应物多肽,其中所述白喉毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:SEQ ID NO:39 的3-10、SEQ ID NO:39的33-43、SEQ ID NO:39的71-77、SEQ ID NO:39的125-131、SEQ ID NO:39的138-146、SEQ ID NO:39的165-175和SEQ ID NO:39的185-191;且其中所述白喉毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述白喉毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:45的氨基酸2-389来源的白喉毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述毒素效应物多肽是包含从志贺毒素家族的至少一个成员的A亚基来源的氨基酸序列的志贺毒素效应物多肽,其中所述志贺毒素效应物多肽包含选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的志贺毒素A亚基氨基酸序列的至少一个B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏:B-细胞表位区域: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;和SEQ ID NO:3的210-218;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,和CD4+ T-细胞表位区域:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的4-33,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的34-78,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的77-103,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的128-168,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的160-183,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的236-258,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的 274-293;且其中所述志贺毒素效应物多肽能够按路线发送至存在所述志贺毒素效应物多肽的细胞的细胞溶胶区室。在某些实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸75-251 来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含从SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-241来源的志贺毒素效应物多肽。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-251。在某些其它实施方案中,所述志贺毒素效应物多肽源自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的氨基酸1-261。

[0047] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的B-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至所述多肽的T-细胞表位的一个或多个氨基酸残基破坏B-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的一个或多个步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在 B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0048] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的B-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:鉴别多肽中的B-细胞表位;和用添加至多肽的T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的B-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的一个或多个步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步

骤。

[0049] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的B-细胞免疫原性、同时增加所述多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏B-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的一个或多个步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0050] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的B-细胞免疫原性、同时增加所述多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:鉴别多肽中的CD4+ T-细胞表位;和用添加至多肽的CD8+T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的一个或多个步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在B-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0051] 在本发明的方法的某些实施方案中是用于降低多肽中的CD4+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的CD8+ T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0052] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的CD4+ T- 细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:鉴别多肽中的CD4+ T-细胞表位;和用添加至多肽的CD8+ T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T- 细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0053] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的CD4+ T- 细胞免疫原性、同时增加所述多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T-细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+T-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0054] 在本发明的方法的某些实施方案中是一种用于降低多肽中的CD4+ T- 细胞免疫原性、同时增加所述多肽的CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:鉴别多肽中的CD4+ T-细胞表位;和用添加至多肽的 CD8+ T-细胞表位中的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T- 细胞表位中产生一个或多个氨基酸置换的步骤。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括一个或多个在CD4+ T-细胞表位中产生一个或多个氨基酸插入的步骤。

[0055] 本发明的多肽的某些实施方案提供了通过本发明的任意方法生产的多肽。

[0056] 在某些实施方案中,本发明的多肽包含SEQ ID NO:11-43或46-48中的任一个或基本上由SEQ ID NO:11-43或46-48中的任一个组成。

[0057] 在某些实施方案中,本发明的靶向细胞的分子包含细胞靶向部分或试剂和本发明的任意多肽。在某些其它实施方案中,所述靶向细胞的分子还包含结合区域,所述结合区域包含一个或多个多肽且能够特异性结合至少一种细胞外靶生物分子。在某些其它实施方案中,所述结合区域包含选自由以下组成的组的多肽:含有互补决定区3(CDR3)片段的FR3-CDR3-FR4 (FR3-CDR3-FR4)多肽、单结构域抗体片段(sdAb)、纳米抗体(nanobody)、从骆驼科来源的重链抗体结构域(V_HH片段)、从软骨鱼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、经工程改造的抗体模拟物和任何前述物质的保留结合功能性的任何遗传操作的相应物。在本发明的靶向细胞的分子的某些其它实施方案中,其中在将所述靶向细胞的分子施用给与结合区域的细胞外靶生物分子物理上连接的细胞时,所述靶向细胞的分子能够造成所述细胞的死亡。在本发明的靶向细胞的分子的某些其它实施方案中,其中在将所述靶向细胞的分子施用给第一细胞群体(其成员与结合区域的细胞外靶生物分子物理上连接)和第二细胞群体(其成员不与所述结合区域的任何细胞外靶生物分子物理上连接)以后,所述靶向细胞的分子对所述第一细胞群体的成员的细胞毒性效应是相对于所述第二细胞群体的成员的至少3倍。在本发明的靶向细胞的分子的某些其它实施方案中,所述结合区域能够结合选自由以下组成的组的细胞外靶生物分子:CD20、CD22、CD40、CD79、 CD25、CD30、HER2/neu/ErbB2、EGFR、EpCAM、EphB2、前列腺特异性的膜抗原、Cripto、内皮糖蛋白、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、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-联蛋白、MUM-1、胱天蛋白酶-8、KIAA0205、 HPVE6、SART-1、PRAME、癌胚抗原、前列腺特异性的抗原、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、FceRIa、半乳凝集素-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、半乳凝集素-3、CD11a-c、GITRL、MHC II类、CD284-TLR4、 CD107-Mac3、CD195-CCR5、HLA-DR、CD16/32、CD282-TLR2、CD11c 和任何前述物质的任何免疫原性片段。在本发明的靶向细胞的分子的某些其它实施方案中,所述靶向细胞的分子还包含KDEL家族的成员的羧基端内质网保留/回收信号基序。在某些其它实施方案中,所述羧基端内质网保留/回收信号基序选自由以下组成的组:KDEL(SEQ ID NO:61)、HDEF(SEQ ID NO:62)、HDEL(SEQ ID NO:63)、RDEF(SEQ ID

NO:64)、RDEL (SEQ ID NO:65)、WDEL(SEQ ID NO:66)、YDEL(SEQ ID NO:67)、HEEF(SEQ ID NO:68)、HEEL(SEQ ID NO:69)、KEEL(SEQ ID NO:70)、REEL (SEQ ID NO:71)、KAEL(SEQ ID NO:72)、KCEL(SEQ ID NO:73)、KFEL(SEQ ID NO:74)、KGEL(SEQ ID NO:75)、KHEL(SEQ ID NO:76)、KLEL (SEQ ID NO:77)、KNEL(SEQ ID NO:78)、KQEL(SEQ ID NO:79)、KREL(SEQ ID NO:80)、KSEL(SEQ ID NO:81)、KVEL(SEQ ID NO:82)、KWEL (SEQ ID NO:83)、KYEL(SEQ ID NO:84)、KEDL(SEQ ID NO:85)、KIEL(SEQ ID NO:86)、DKEL(SEQ ID NO:87)、FDEL(SEQ ID NO:88)、KDEF (SEQ ID NO:89)、KKEL(SEQ ID NO:90)、HADL(SEQ ID NO:91)、HAEL(SEQ ID NO:92)、HIEL(SEQ ID NO:93)、HNEL(SEQ ID NO:94)、HTEL (SEQ ID NO:95)、KTEL(SEQ ID NO:96)、HVEL(SEQ ID NO:97)、NDEL(SEQ ID NO:98)、QDEL(SEQ ID NO:99)、REDL(SEQ ID NO:100)、RNEL (SEQ ID NO:101)、RTDL(SEQ ID NO:102)、RTEL(SEQ ID NO:103)、SDEL(SEQ ID NO:104)、TDEL(SEQ ID NO:105)和SKEL(SEQ ID NO:106)。

[0058] 在本发明的某些实施方案中,在将本发明的靶向细胞的分子施用给与细胞毒性蛋白的细胞靶向部分的细胞外靶生物分子物理上连接的细胞时,所述细胞毒性蛋白能够造成所述细胞的死亡。

[0059] 在本发明的某些实施方案中,在将本发明的靶向细胞的分子施用给就细胞外靶生物分子的存在而言两个不同细胞类型群体后,相对于与靶向细胞的分子的细胞靶向部分的细胞外靶生物分子没有物理上连接的细胞类型,所述靶向细胞的分子能够以至少3倍的CD_{50}或小于CD_{50}造成与细胞靶向部分或试剂的结合区域的细胞外靶生物分子物理上连接的细胞类型的细胞死亡。

[0060] 在某些实施方案中,本发明的靶向细胞的分子包含SEQ ID NO:49-60 的氨基酸序列中的任一个的多肽或基本上由所述多肽组成。

[0061] 在某些其它实施方案中,本发明的多肽包含减少或消除毒素来源的多肽的催化活性、但是保留至少一种其它毒素效应物功能的突变。在某些实施方案中,本发明的靶向细胞的分子还包含从具有酶活性的毒素效应物多肽来源的毒素效应物多肽,其与天然存在的毒素相比包含突变,所述突变改变所述毒素效应物多肽的酶活性。在某些其它实施方案中,所述突变选自减少或消除毒素效应物多肽的细胞毒性的至少一个氨基酸残基缺失、插入或置换。在某些实施方案中,本发明的靶向细胞的分子包含志贺毒素效应物区域,该区域进一步包含相对于白喉毒素家族的成员的天然存在的A 亚基的突变,所述突变改变白喉毒素效应物区域的酶活性,所述突变选自至少一个氨基酸残基缺失或置换,例如,H21A、Y27A、W50A、Y54A、 Y65A、E148A和W153A。在某些实施方案中,本发明的靶向细胞的分子包含志贺毒素效应物区域,该区域进一步包含相对于志贺毒素家族的成员的天然存在的A亚基的突变,所述突变改变志贺毒素效应物区域的酶活性,所述突变选自至少一个氨基酸残基缺失或置换,例如,SEQ ID NO:1、 SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3中的A231E、R75A、Y77S、Y114S、E167D、R170A、R176K和/或W203A。

[0062] 本发明还提供了药物组合物,其包含本发明的多肽和/或靶向细胞的分子和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体;和这样的多肽、靶向细胞的分子或包含前述多肽或靶向细胞的分子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。本发明的某些实施方案是药物组合物,其包含本发明的任意多肽和/或本发明的任意靶向细胞的分子;和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体。

[0063] 除了本发明的多肽、靶向细胞的分子、蛋白和组合物以外，能够编码多肽(其包含本发明的多肽、或包含本发明的多肽的靶向细胞的分子或蛋白)的多核苷酸是在本发明范围内，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。

[0064] 另外，本发明提供了选择性地杀死细胞的方法，所述方法包括下述步骤：使细胞与本发明的靶向细胞的分子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发生在体外。在某些其它实施方案中，所述接触细胞的步骤发生在体内。

[0065] 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包含本发明的多肽的组合物、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，要使用本发明的该方法治疗的疾病、病症或病患选自由以下组成的组：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以下组成的组：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、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。

[0066] 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多肽的组合物、包含前述多肽的多肽和/或靶向细胞的分子、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。

[0067] 本发明的靶向细胞的分子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生物分子物理上连接的细胞中。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靶向细胞的分子、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靶向细胞的分子，其中所述靶细胞与本发明的蛋白的细胞外靶生物分子物理上连接。

[0068] 在本发明的某些实施方案中是本发明的化合物(例如多肽或靶向细胞的分子)和/或本发明的组合物(例如药物组合物)在疾病、病症或病患的诊断、预后或表征中的用途。

[0069] 在本发明的某些实施方案中是诊断组合物，其包含本发明的多肽和/ 或包含前述多肽的靶向细胞的分子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。

[0070] 在本发明的某些实施方案中是使用本发明的靶向细胞的分子和/或诊断组合物检测细胞的方法，所述方法包括下述步骤：使细胞与所述靶向细胞的分子和/或诊断组合物接触，和检测所述靶向细胞的分子和/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。

[0071] 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,并然后检测本发明的蛋白在体外或在体内的存在。收集的信息可以关于与本发明的靶向细胞的分子的结合区域的细胞外靶标物理上连接的细胞的存在,且可以用在疾病、病症或病患的诊断、预后、表征和/或治疗中。本发明的某些化合物(例如多肽和靶向细胞的分子)、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。

[0072] 本发明的多肽的某些实施方案和本发明的靶向细胞的分子可以用作免疫原或用作免疫原的组分用于脊索动物的免疫和/或疫苗接种。

[0073] 对于某些实施方案,本发明的方法用于“播种”于脊索动物内的组织部位,所述方法包括下述步骤:给脊索动物施用本发明的靶向细胞的分子、本发明的药物组合物或本发明的诊断组合物。在某些其它实施方案中,本发明的用于“播种”于组织部位的方法是用于“播种”于包含恶性的、患病的或发炎的组织的组织部位。在某些其它实施方案中,本发明的用于“播种”于组织部位的方法是用于“播种”于包含选自由以下组成的组的组织的组织部位:患病组织、肿瘤块、癌性生长、肿瘤、感染的组织或异常细胞块。在某些其它实施方案中,本发明的用于“播种”于组织部位的方法包括给脊索动物施用本发明的靶向细胞的分子、本发明的药物组合物或包含异源T- 细胞表位的本发明的诊断组合物,所述异源T-细胞表位选自由以下组成的组:MHC I类复合物中的靶向细胞的分子的靶细胞非天然地呈递的肽、非天然地存在于靶细胞表达的任何蛋白内的肽、非天然地存在于靶细胞的蛋白质组内的肽、非天然地存在于要被播种的部位的细胞外微环境中的肽和非天然地存在于要靶向的肿瘤块或感染的组织部位中的肽。

[0074] 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。

[0075] 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。

附图说明

[0076] 图1本发明的示例性的CD8+T-细胞超免疫化的多肽和靶向细胞的分子的总布置的示意图;显示了示例性的呈递T-细胞表位的效应物多肽(包括B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的变体和包含它们的细胞靶向分子)的总布置。

[0077] 图2通过T细胞超免疫化的毒素效应物多肽保留核糖体灭活、催化活性;表明将T-细胞表位嵌入毒素效应物多肽的B-细胞表位区域中不会显著地损害催化活性。两种示例性的白喉毒素来源的多肽(其包含嵌入B- 细胞表位区域中的T-细胞表位)表现出与野生型白喉毒素相当的核糖体灭活水平。

[0078] 图3靶向细胞的细胞毒性蛋白的蛋白质印迹分析,所述细胞毒性蛋白包含T-细胞

超免疫化的毒素效应物多肽,所述多肽具有被不同T-细胞表位破坏的B-细胞表位区域;通过蛋白质印迹分析表明将T-细胞表位嵌入或插入B-细胞表位区域中会破坏各种抗-SLT-1A抗体所识别的表位。

[0079] 图4靶向细胞的细胞毒性蛋白的蛋白质印迹分析,所述细胞毒性蛋白包含T-细胞超免疫化的毒素效应物多肽,所述多肽具有被不同T-细胞表位破坏的不同B-细胞表位区域;通过蛋白质印迹分析表明将T-细胞表位嵌入各个B-细胞表位区域中会破坏各种抗-SLT-1A抗体所识别的表位。

[0080] 图5 T-细胞表位-肽/MHC I类复合物的细胞表面呈递的结果的流式细胞术叠加:用靶向细胞的蛋白(各自包含毒素效应物多肽,所述多肽包含嵌入的破坏B-细胞表位区域的T-细胞表位)处理过的细胞展示嵌入的表位;显示了接受不同处理的细胞的集合的流式细胞计数分析的结果的叠加:未处理,用本发明的示例性的靶向细胞的蛋白处理,用外源表位-肽和 PLE处理,和仅用外源表位-肽处理。用本发明的三种示例性的靶向细胞的蛋白(各自包含去免疫化的志贺毒素效应物多肽,所述多肽包含嵌入的破坏B-细胞表位区域的T-细胞表位)处理的细胞在它们的细胞表面上展示嵌入的与MHC分子形成复合物的表位-肽。

具体实施方式

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] 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)。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 术语“氨基酸残基”或“氨基酸”包括对掺入蛋白、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。

[0088] 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8-羟-2,7,10-三氨基癸酸 (hypusine)、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：

[0089] 表A.氨基酸命名法

[0090]

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

[0091]

谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
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

[0092] 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不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))。

[0093] 本文中使用的术语“表达”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。

[0094] 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域的简写。符号“α”用于表示免疫球蛋白型结合区域的功能特性,这基于它与该符号后的生物分子结合的能力。

[0095] 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。

[0096] 就本发明的目的而言,短语“源自”是指,所述多肽区域包含最初在蛋白中发现的氨基酸序列,且其现在可能包含相对于原始序列的添加、缺失、截短或其它改变,使得总功能和结构是基本上保守的。

[0097] 就本发明的目的而言,术语“效应物”是指提供生物活性,诸如细胞毒性、生物信号传递、酶促催化、亚细胞按路线发送、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。

[0098] 如本文中使用的,关于多聚体毒素(例如,ABx毒素)的术语“亚基”和“链”互换使用。

[0099] 就本发明的目的而言,短语“CD8+ T-细胞超免疫化的”是指,当存在于活脊索动物内的有核脊索动物细胞中时,关于CD8+ T-细胞抗原性或免疫原性,所述分子具有增加的抗原性和/或免疫原性潜力。通常,CD8+ T- 细胞免疫的分子由于固有特性或作为靶向细胞的分子的组分能够细胞内化至有核脊索动物细胞的早期内体区室。

[0100] 就本发明的目的而言,短语“B-细胞和/或CD4+ T-细胞去免疫化的”是指,在施用给哺乳动物以后,关于B-细胞抗原性或免疫原性和/或CD4+ T- 细胞抗原性或免疫原性,所述分子具有降低的抗原性和/或免疫原性潜力。

[0101] 就本发明的目的而言,术语“蛋白酶体递送效应物”是指这样的分子:其提供在细胞内定位至亚细胞区室的生物活性,所述亚细胞区室能够导致蛋白酶体递送效应分子的蛋白酶体降解。通常,该蛋白酶体递送生物活性可以从早期内体区室中的蛋白酶体递送效应分子的最初亚细胞位置来确定;但是,它还可以更早地确定,例如,从细胞外开始位置(其包括进入细胞中和穿过细胞的内体区室),例如,在内吞进入该细胞以后。可替换地,在某些实施方案中,在蛋白酶体递送效应物多肽被内化和到达能够导致它的蛋白酶体降解的区室之前,蛋白酶体递送效应物生物活性可能不包括穿过细胞的任何内体区室。技术人员使用本领域已知的技术可以测定给定的分子提供蛋白酶体递送效应物功能的能力。

[0102] 关于本发明的多肽的T-细胞表位或T-细胞表位肽组分,术语“异源”表示这样的表位或肽序列:其最初不存在于要修饰的多肽中,但是其已经使用本发明的方法添加至所述多肽,无论是通过如本文中所述的嵌入、融合、插入和/或氨基酸置换的方法添加,还是通过任意其它工程化方式添加。结果是修饰的多肽,其包含对于原始的未修饰的多肽而言外来的T-细胞表位,即所述T-细胞表位不存在于原始多肽中。

[0103] 关于多肽中B-细胞表位或CD4+ T-细胞表位,术语“内源性”表示在通过本发明的方法修饰之前已经存在于所述多肽中的表位。

[0104] 如本文中使用的,关于多肽内的多肽区域或部件,术语“破坏”表示所述区域内或组成所述部件的至少一个氨基酸的改变。氨基酸改变包括多种突变,例如,改变多肽的氨基酸序列的缺失、反转、插入或置换。氨基酸改变也包括化学变化,例如,氨基酸官能团中的一个或多个原子的改变或一个或多个原子向氨基酸官能团的添加。

[0105] 关于本发明的多肽的T-细胞表位或T-细胞表位肽组分的短语“与……结合”是指,T-细胞表位和所述多肽物理地连接在一起,无论是通过共价键还是非共价键,例如,嵌入或插入在所述多肽内、与所述多肽融合和/ 或化学地缀合至所述多肽。

[0106] 关于要求保护的发明,术语“结合”是指制备两个彼此结合的分子或使两个分子彼此结合的动作。

[0107] 关于本发明的多肽的T-细胞表位或T-细胞表位肽组分,术语“嵌入”及其语法变体表示用不同的氨基酸对多肽区域内的一个或多个氨基酸的内部替换,以便产生共享相同氨基酸残基总数的新多肽序列。因而,术语嵌入不包括任何另外氨基酸、肽或多肽组分与开始多肽的任何外部末端融合,也不包括任何另外氨基酸残基的任何另外内部插入,而是仅包括对现有氨基酸的置换。所述内部替换可以仅仅通过氨基酸残基置换或通过一系列置换、缺失、插入和/或反转而实现。如果使用一个或多个氨基酸的插入,那么必须在插入点后面删除相等数目的近侧氨基酸以产生嵌入的T-细胞表位。这不同于关于本发明的多肽中的T-细胞表位使用的术语“插入”,所述术语“插入”而是表示具有增加的长度的多肽,所述长度等于插入的T- 细胞表位的长度。插入包括前述情况,即使所述多肽的不在插入点近侧的其它区域被删除以随后减小最终多肽的总长度。

[0108] 关于本发明的多肽的T-细胞表位或T-细胞表位肽组分,术语“融合”及其语法变体表示4、5、6个或更多个氨基酸向多肽的氨基端或羧基端的外部添加,以便产生具有比原始多肽更大数目的氨基酸残基的新多肽。融合的T-细胞表位包括4、5、6个或更多个氨基酸向氨基端或羧基端的添加,即使将所述多肽的其它区域删除以随后减小最终多肽的总长度,只要所述新多肽保留原始多肽的效应物功能,例如,蛋白酶体递送效应物功能。

[0109] 本文中使用的术语“毒素效应物多肽”是指这样的多肽:其包含毒素来源的效应物区域,所述区域足以提供所述多肽的来源毒素中存在的一种或多种生物活性。

[0110] 本文中使用的术语“T-细胞表位递送”是指,分子提供在细胞内定位至亚细胞区室的生物活性,所述亚细胞区室能够导致携带T-细胞表位的多肽区域的蛋白酶体降解。通常,该蛋白酶体递送生物活性可以从早期内体区室中的T-细胞表位递送分子的最初亚细胞位置来确定;但是,它还可以更早地确定,例如,从细胞外开始位置(其包括进入细胞中和穿过细胞的内体区室),例如,在内吞进入该细胞以后。可替换地,在某些实施方案中,在T-细胞表位递送分子被内化和到达能够将T-细胞表位递送至蛋白酶体用于降解成T-细胞表位肽的区室之前,T-细胞表位递送活性可能不包括穿过细胞的任何内体区室。通过观察递送的T-细胞表位在细胞(T-细胞表位递送分子已经内化在其中)的细胞表面上的MHC呈递,可以测定有效T- 细胞表位递送功能。

[0111] 本文中使用的毒素效应物功能或活性可以尤其包括促进细胞内化、促进内体逃逸、指导细胞内按路线发送至亚细胞区室、催化功能、底物结合、诱导细胞的细胞凋亡、造成白细胞郁滞和细胞毒性。

[0112] 本文中使用的毒素来源的多肽效应物功能的保留表示,如通过具有再现性的适当定量测定所测量的,与野生型多肽(WT)对照相当的毒素效应物功能活性水平。例如,技术人员已知的多种测定可以用于测量毒素效应物多肽的酶活性和/或细胞内按路线发送。在以下情况下保留了本发明的多肽的酶促多肽效应物毒素功能:在相同测定中在相同条件下它的酶活性与野生型多肽(WT)相当。

[0113] 关于细胞毒性蛋白的细胞毒性活性,术语“选择性的细胞毒性”表示靶向细胞群体和非靶向的旁观者细胞群体之间的相对细胞毒性水平,其可以被表示为靶向细胞类型的半数最大细胞毒性浓度(CD_{50})与非靶向的细胞类型的CD_{50}之比,以显示靶向细胞类型的细胞杀伤的优先性。

[0114] 引言

[0115] 本发明提供了产生多肽和细胞靶向分子的方法,所述多肽和细胞靶向分子能够将T-细胞表位肽递送至靶细胞的MHC I类系统用于细胞表面呈递。本发明还提供了使用本发明的方法制备的示例性T-细胞表位递送多肽,其能够将异源T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类系统用于细胞表面呈递。使用本发明的方法建立的多肽,例如T-细胞表位递送多肽和CD8+T-细胞超免疫化的多肽,可以用作多种分子和组合物(例如细胞毒性的治疗剂、治疗剂递送剂和诊断分子)的组分。

[0116] 另外,本发明提供了如下产生多肽变体的方法:同时减小B-细胞抗原性和/或免疫原性的可能性,同时在多肽内的重叠位置处提供异源T-细胞表位用于通过MHC I类呈递增加T-细胞免疫原性的可能性。本发明还提供了使用本发明的方法制备的示例性的B-细胞表位去免疫化的、T-细胞表位递送多肽,其能够将异源T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类系统用于细胞表面呈递。使用本发明的方法产生的多肽,例如B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的T-细胞表位递送多肽、CD8+ T-细胞超免疫化的和CD4+T-细胞去免疫化的多肽,可以用作多种分子和组合物(例如细胞毒性的治疗剂、治疗剂递送剂和诊断分子)的组分。

[0117] I.CD8+ T-细胞超免疫化的多肽的一般结构

[0118] 本发明包括工程改造包含多个蛋白酶体递送效应物多肽区域的多肽以包含一个或多个异源T-细胞表位;且其中在将所述多肽递送至真核细胞的早期内体区室后,所述多肽能够在细胞内定位至亚细胞区室并进入所述细胞的MHC I类系统,所述亚细胞区室足以将一个或多个异源T-细胞表位递送至蛋白酶体用于降解。尽管蛋白酶体递送效应物多肽可以来自任何来源,在某些实施方案中,本发明的多肽源自从天然存在的蛋白毒素来源的多种蛋白酶体递送效应物多肽。

[0119] A.被工程改造成包含一个或多个异源T-细胞表位和一个蛋白酶体递送效应物多肽的多肽

[0120] 本发明预见到多种多肽作为用于通过一个或多个异源T-细胞表位的嵌入、融合和/或插入而修饰成本发明的多肽的起始点的用途。这些源多肽应当表现出或预期会表现出蛋白酶体递送效应物能力。

[0121] 进入MHC I类途径的肽表位的主要来源是从细胞溶质分子的蛋白酶体降解产生的肽。但是,ER-定位的分子(诸如病毒糖蛋白和转化的细胞糖蛋白)也可以通过不同途径被MHC I类系统展示。尽管该通向MHC I 类呈递的替代途径开始于ER中,所述肽的多肽或蛋白来源被运输至细胞溶胶用于由蛋白酶体进行蛋白酶解加工,然后由TAP运输至ER的腔用于肽负载到MHC I类分子上。作为该替代途径的基础的确切机制是不清楚的,但是可能涉及ER-相关的降解(ERAD)-型监视系统以检测错误折叠的蛋白、“有缺陷的核糖体产物”和模仿前述物质的结构。该ERAD-型系统将某些多肽和蛋白运输至细胞溶胶中的蛋白酶体进行降解,这可以导致细胞溶质抗原肽的产生。另外,关于各种毒素的细胞内按路线发送的研究提示,到达细胞溶胶或内质网对于将T-细胞表位递送进MHC I类途径中而言是足够的。

[0122] 因此,已知或发现定位至和/或指导它们自身细胞内运输至细胞溶胶和 /或内质网的多肽和蛋白代表一类分子,所述分子预期包含一个或多个表现出蛋白酶体递送功能的蛋白酶体递送效应物多肽区域。某些蛋白和多肽,例如,某些毒素,表现出从内体区室逃逸进细胞溶胶中由此避免溶酶体降解的能力。因而,已知或发现逃离内体区室并到达细胞溶胶的多肽和蛋白被包括在上述分子类别中。所述多肽或蛋白运至细胞溶胶或ER的确切途径是无关的,只要所述多肽或蛋白最终到达允许接近蛋白酶体的亚细胞位置。

[0123] 另外,某些分子在定位至溶酶体以后能够到达细胞的蛋白酶体。例如,直接引入细胞的细胞溶胶中的外源蛋白(诸如由单核细胞增生李斯特菌 (Listeria monocytogenes)分泌的李斯特菌溶血素和其它蛋白)可以进入 MHC I类途径并在MHC I类复合物中呈递用于被效应物T-细胞识别 (Villanueva M等人,J Immunol 155:5227-33(1995))。另外,溶酶体蛋白酶解(包括吞噬溶酶体蛋白酶解)可以产生这样的抗原肽:其在被称作交叉呈递的过程中转移进细胞溶胶中并进入MHC I类途径用于细胞表面呈递,所述过程可能已经从规范ERAD系统进化(Gagnon E等人,Cell 110:119-31(2002))。因而,已知或发现定位至溶酶体的某些多肽和蛋白可以是表现出蛋白酶体递送功能的、具有蛋白酶体递送效应物区域的多肽的合适来源。

[0124] 技术人员使用本领域已知的测定,可以确定蛋白性分子从早期内体区室的开始位置细胞内地按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER和/或溶酶体区室的能力。然后,技术人员使用本领域已知的标准技术可以映射和分离源多肽或蛋白(例如,毒素)的蛋白酶体递送效应物多肽区域。

[0125] 1.从毒素来源的蛋白酶体递送效应物多肽

[0126] 本发明预见到从毒素来源的多种多肽作为蛋白酶体递送效应物区域的用途。因为关于它们的细胞内按路线发送行为的知识财富,许多毒素代表蛋白酶体递送效应物多肽的最佳来源。

[0127] 许多天然存在的蛋白性毒素具有高度进化的结构,所述结构为了指导在脊椎动物宿主细胞中的细胞内按路线发送(包括通过内体逃逸和逆向运输途径)经过优化。

[0128] 众多毒素表现出内体逃逸性能,通常通过孔形成(Mandal M等人, Biochim Biophys Acta 1563:7-17(2002))。例如,白喉毒素和植物II型核糖体灭活蛋白如蓖麻毒蛋白可以从内体逃逸(Murphy S等人,Biochim Biophys Acta 1824:34-43(2006);Slominska-Wojewodzka M,Sandvig K,Antibodies2:236-269(2013);Walsh M等人,Virulence 4:774-84(2013))。使用本领域已知的测定,例如,使用用辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、荧光团如 Alexa 488和毒素来源的多肽的报告物测定(参见例如Bartz R等人,Biochem J 435:475-87(2011);Gilabert-Oriol R等人,Toxins 6:1644-66 (2014)),可以直接地测量和定量从内体区室(包括溶酶体)逃逸。

[0129] 许多毒素指导它们自身在脊椎动物宿主细胞中的细胞内按路线发送。例如,许多毒素的中毒途径可以描述为多步过程,其包括:1)毒素细胞内化进宿主细胞中,2)毒素通过一个或多个亚细胞区室的细胞内按路线发送,和3)毒素的催化部分随后定位至细胞溶胶,在此处宿主因子底物被酶促地修改。例如,该过程描述了炭疽致死因子、霍乱毒素、白喉毒素、百日咳毒素、假单胞菌外毒素和II型核糖体灭活蛋白如蓖麻毒蛋白和志贺毒素的中毒途径。

[0130] 类似地,重组毒素、经修饰的毒素结构和经工程改造的从毒素来源的多肽可以保留这些相同的性能。例如,经工程改造的从白喉毒素(DT)、炭疽致死因子(LF)毒素和假单胞菌外毒素A(PE)来源的重组多肽已经被用作递送媒介物用于将多肽从细胞外空间移动至细胞溶胶。具有从早期内体区室细胞内地按路线发送至细胞溶胶或ER的固有能力的任何蛋白毒素代表可以用于本发明的目的的蛋白酶体递送效应物多肽的来源,诸如用于修饰的开始组分或作为用于映射其中的较小蛋白酶体递送效应物区域的来源。

[0131] 对于许多靶向真核细胞的毒素,毒性是涉及细胞溶胶中的底物的酶促机制的结果(参见表I)。这些毒素已经进化出这样的毒素结构:其具有将它们的全毒素的酶活性多肽区域递送至细胞溶胶的能力。这些毒素的酶促区域可以用作用于产生本发明的多肽的开始组分。

[0132] 表I.蛋白酶体递送效应物多肽的示例性蛋白毒素来源

[0133]

蛋白毒素	**底物- 亚细胞位置**
相思豆毒蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
炭疽致死因子	MAPKK - 细胞溶胶
Aspf1	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
Bouganin	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
异株泻根毒蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
Cholix 毒素	异源三聚体 G 蛋白- 细胞溶胶
辛纳毒蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
密蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
Clavin	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
艰难梭菌(*C. difficile*)TcdA	Ras GTP 酶- 细胞溶胶
艰难梭菌 TcdA	Rho GTP 酶- 细胞溶胶
产气荚膜梭菌(*C. perfringens*)iota	Rho GTP 酶- 细胞溶胶
细胞致死性膨胀	DNA - 细胞核
石竹素	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
白喉毒素	延伸因子-2 (EF2) - 细胞溶胶
Ebulins	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
白树毒蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
Gigantin	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
热不稳定的肠毒素	异源三聚体 G 蛋白- 细胞溶胶

[0134]

玉米 RIP	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
丝林霉素	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
链霉黑素	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
百日咳毒素	异源三聚体 G 蛋白- 细胞溶胶
PD-L	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
PAP	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
*假单胞菌属*毒素	延伸因子-2 (EF2) - 细胞溶胶
美丽天人菊内酯	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
局限曲菌素	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
蓖麻毒蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
肥皂草毒蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
Sarcins	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
志贺毒素	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶
Subtilase 细胞毒素	内质伴侣- ER
天花粉蛋白	sarcin-蓖麻毒蛋白环- 细胞溶胶

[0135] 两个具有重叠成员的毒素超家族中的毒素非常适合用在本发明中：ABx毒素和核糖体毒素。

[0136] ABx毒素能够进入真核细胞和按路线发送至细胞溶胶以攻击它们的分子靶标。类似地,核糖体毒素能够进入真核细胞和按路线发送至细胞溶胶以灭活核糖体。Abx毒素和核糖体毒素超家族的成员是鉴别用于本发明中的毒素来源的多肽和蛋白酶体递送效应物多肽的适当来源。

[0137] ABx毒素(其也被称作二元毒素)存在于细菌、真菌和植物中。ABx 毒素形成一个毒素超家族,所述毒素共享两个或更多个具有不同功能的多肽链的结构组构,被称作A和B亚基。x代表ABx家族的成员的全毒素中的B亚基的数目,例如,AB_1代表白喉毒素,且AB_5代表志贺毒素。 AB5毒素超家族包含4个主要家族:cholix毒素(Ct或Ctx)、百日咳毒素 (Ptx)、志贺毒素(Stx)和Subtilase细胞毒素(SubAB)。AB5毒素的细胞毒性机制涉及它们的A亚基在中毒的真核宿主细胞内向细胞溶胶或ER的亚细胞按路线发送,在所述位置处催化性A亚基作用于它们的酶底物,所述酶底物代表多种宿主细胞蛋白(参见表I)。

[0138] 白喉毒素通过真核延伸因子-2(EF2)的催化性ADP-核糖基化破坏蛋白合成。白喉毒素由催化性A亚基和B亚基组成,其含有一个磷脂双层易位效应物结构域和一个靶向细胞的结合结构域。在白喉毒素中毒过程中,白喉毒素可以细胞内地按路线发送它们的催化结构域至真核细胞的细胞溶胶,可能通过内体逃逸(Murphy J,Toxins(Basel)3:294-308(2011))。该内体逃逸机制可以与其它毒素(例如,炭疽致死因子和水肿因子)共享,并且许多不同毒素表现出内体逃逸的一般能力,所述毒素包括、例如,某些艰难梭菌毒素、白树毒

蛋白、李斯特菌溶素、PE、蓖麻毒蛋白和肥皂草毒蛋白(参见例如Varkouhi A等人,J Control Release 151:220-8(2010); Murphy J,Toxins(Basel)3:294-308(2011))。

[0139] 具体地,灭活细胞溶胶中的核糖体的毒素可用于鉴别用在本发明中的蛋白酶体递送效应物多肽。这些毒素包含同时提供靶向细胞溶胶的效应物功能和细胞毒性的核糖体毒性的毒素效应物功能的多肽区域。

[0140] 关于要求保护的发明,短语"核糖体毒性的毒素效应物多肽"表示从蛋白来源的多肽,包括天然存在的核糖体毒素和合成的核糖体毒素,其能够完成体外核糖体灭活、体外和/或体内蛋白合成抑制、细胞毒性、和/或白细胞郁滞。通常,核糖体毒性的毒素效应物多肽源自天然存在的蛋白毒素或通过人干预改变的或工程改造的毒素-样结构。但是,其它多肽,例如,非天然地存在于毒素或合成多肽中的天然存在的酶促结构域,是在本文中使用的该术语的范围内(参见例如Newton D等人,Blood 97:528-35(2001); De Lorenzo C等人,FEBS Lett 581:296-300(2007);De Lorenzo C,D'Alessio G,Curr Pharm Biotechnol 9:210-4(2008);Menzel C等人,Blood 111:3830-7 (2008))。因而,核糖体毒性的毒素效应物多肽可以源自合成的或经工程改造的具有增加的或减少的核糖体毒性的蛋白构建体和/或已经以其它方式改变以具有非天然特性的天然存在的蛋白。

[0141] 核糖体毒性的毒素效应物多肽可以源自来自不同门(例如,藻类、细菌、真菌、植物和动物)的蛋白的核糖体毒性结构域。例如,从多种核糖体毒素来源的多肽已经通过化学缀合或重组蛋白质工程与免疫球蛋白结构域或受体配体连接或融合,希望产生细胞类型特异性的细胞毒性的治疗剂(Pastan I等人,Annu Rev Biochem 61:331-54(1992);Foss F等人,Curr Top Microbiol Immunol 234:63-81(1998);Olsnes S,Toxicon 44:361-70(2004); Pastan I,等人,Nat Rev Cancer 6:559-65(2006);Lacadena J等人,FEMS Microbiol Rev 31:212-37(2007);de Virgilio M等人,Toxins 2:2699-737 (2011); Walsh M,Virulence 4:774-84(2013);Weidle U等人,Cancer Genomics Proteomics 11:25-38(2014))。

[0142] 核糖体毒性的毒素效应物多肽可以源自蛋白核糖体毒素的核糖体灭活蛋白(RIP)超家族的成员的催化结构域(de Virgilio M等人,Toxins 2: 2699-737(2011);Lapadula W等人,PLoS ONE 8:e72825(2013);Walsh M,Virulence 4:774-84(2013))。RIP是在藻类、细菌、真菌和植物中表达的核糖体毒性蛋白,其在亚化学计量浓度经常是真核和原核蛋白合成的有效抑制剂(参见Stirpe,F,Biochem J 202:279-80(1982))。多种RIP被视作用在用于治疗癌症的治疗剂中的毒素效应物多肽序列的有前途的来源(参见 Pastan I,等人,Nat Rev Cancer 6:559-65(2006);Fracasso G等人,Ribosome-inactivating protein-containing conjugates for therapeutic use, Toxic Plant Proteins 18,第225-63页(编者Lord J,Hartley,M.Berlin,Heidelberg:Springer-Verlag,2010);de Virgilio M等人,Toxins 2:2699-737 (2011);Puri M等人,Drug Discov Today 17:774-83(2012); Walsh M,Virulence 4:774-84(2013))。

[0143] 在重组细胞毒性多肽中最常用的核糖体毒素包括白喉毒素、假单胞菌外毒素A、蓖麻毒蛋白、α-帚曲毒蛋白、肥皂草毒蛋白和白树毒蛋白 (参见Shapira A,Benhar I,Toxins 2:2519-83(2010);Yu C等人,Cancer Res 69:8987-95(2009);Fuenmayor J,Montaño R,Cancers 3:3370-93(2011);Weldon,FEBS J 278:4683-700(2011);Carreras-SangráN等

人,Protein Eng Des Sel 25:425-35(2012);Lyu M等人,Methods Enzymol 502:167-214(2012);Antignani,Toxins 5:1486-502(2013);Lin H等人,Anticancer Agents Med Chem 13:1259-66(2013);Polito L等人,Toxins 5:1698-722(2013); Walsh M,Virulence 4:774-84(2013))。这些核糖体毒素通常归类为核糖体灭活蛋白(RIP),并且共享通过攻击sarcin-蓖麻毒蛋白环(SRL)或结合SRL 的核糖体功能所需的蛋白而灭活真核核糖体的一般细胞毒性机制。

[0144] SRL结构在三个系统发生组古细菌(Archea)、细菌和真核(Eukarya) 之间是高度保守的,使得原核和真核核糖体共享SRL核糖体结构(Gutell R 等人,Nucleic Acids Res 21:3055-74(1993);Szewczak A,Moore P,J Mol Biol 247:81-98(1995);Glück A,Wool I,J Mol Biol 256:838-48(1996); Seggerson K,Moore P,RNA 4:1203-15(1998); Correll C等人,J Mol Biol 292:275-87(1999))。来自不同门的多个物种的SRL可以重叠在具有高精确度的晶体结构电子密度图上(Ban N等人,Science 11:905-20(2000); Gabashvili I等人,Cell 100:537-49(2000))。SRL是最大的普遍保守的核糖体序列,其通过延伸因子(诸如EF-Tu、EF-G、EF1和EF2)的合作形成对于核糖体易位功能而言重要的保守二级结构(Voorhees R等人,Science 330:835-8(2010);Shi X等人,J Mol Biol 419:125-38(2012);Chen K等人, PLoS One 8:e66446(2013))。SRL(sarcin-蓖麻毒蛋白环)因为是真菌核糖体毒素sarcin和植物II型RIP蓖麻毒蛋白的共有靶标而得名。

[0145] RIP超家族包括干扰核糖体易位功能的RIP、真菌核糖体毒素和细菌核糖体毒素(参见表B;Brigotti M等人,Biochem J 257:723-7(1989))。大多数RIP(如相思豆毒蛋白、白树毒蛋白、蓖麻毒蛋白和肥皂草毒蛋白)将核糖体的大rRNA的普遍保守的sarcin/蓖麻毒蛋白环(SRL)中的特定腺嘌呤(例如动物中的A4324,真菌中的A3027,和原核生物中的A2660)不可逆地脱嘌呤化。大多数真菌核糖体毒素(如α-帚曲毒蛋白)不可逆地切割 SRL中的特定键(例如动物中在G4325和A4326之间的键,真菌中在G3028 和A3029之间的键,和原核生物中在G2661和A2662之间的键)以通过破坏核糖体催化地抑制蛋白合成(Martínez-Ruiz A等人,Toxicon 37:1549-63 (1999);Lacadena J等人,FEMS Microbiol Rev 31:212-37(2007);Tan Q等人,J Biotechnol 139:156-62(2009))。细菌蛋白核糖体毒素Ct、DT和PE 被归类在RIP超家族中,因为它们可以通过催化地破坏核糖体功能而抑制蛋白合成并仅用少量毒素分子有效地诱导细胞凋亡。

[0146] RIP通过一个共同特征来定义:通过经由核糖体RNA(rRNA)N-糖苷酶活性破坏核糖体而在体外抑制翻译的能力。在2013年之前,已经描述了超过100种RIP(Walsh M,Virulence 4:774-84(2013))。大多数RIP将真核和原核核糖体的大rRNA的普遍保守的sarcin/蓖麻毒蛋白环(SRL)中的特定腺嘌呤残基脱嘌呤化。已经在以下科中发现了最高数目的RIP:石竹科(Caryophyllaceae)、接骨木科(Sambucaceae)、葫芦科(Cucurbitaceae)、大戟科(Euphorbiaceae)、商陆科(Phytolaccaceae)和禾本科(Poaceae)。

[0147] 基于它们的结构,将RIP家族的成员分类成至少3类。I型RIP(例如白树毒蛋白、丝瓜素、PAP、肥皂草毒蛋白和天花粉蛋白)是包含酶促结构域且缺少关联的靶向结构域的单体蛋白。II型RIP(例如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白、志贺毒素)是具有酶促A亚基和靶向B亚基的多亚基异聚体蛋白,通常属于二元ABx毒素(Ho M,等人,Proc Natl Acad Sci USA 106:20276-81(2009))。III型RIP(例如大麦JIP60 RIP和玉米b-32 RIP)被合成为酶原,其

需要广泛蛋白水解加工才能活化(Peumans W等人, FASEB J 15:1493-1506(2001);Mak A等人,Nucleic Acids Res 35:6259-67(2007))。

[0148] 尽管在RIP家族的成员之间存在低序列同源性(<50％同一性),它们的催化结构域共享保守的三级结构,所述三级结构是可重叠的,使得在核糖体的脱嘌呤化中涉及的关键残基可被鉴别(de Virgilio M等人,Toxins 2: 2699-737(2011);Walsh M,Virulence 4:774-84(2013))。例如,蓖麻毒蛋白和志贺毒素的催化结构域是使用晶体学数据可重叠的,尽管它们的A-链亚基具有18％序列同一性(Fraser M等人,Nat Struct Biol 1:59-64(1994))。

[0149] 许多酶和多肽效应物区域已经用于产生免疫毒素的细胞毒性组分,所述免疫毒素是例如白树毒蛋白、肥皂草毒蛋白、美洲商陆抗病毒蛋白 (PAP)、异株泻根毒蛋白、bouganin、木鳖子苷、石竹素、木鳖根蛋白、栝楼素、丝瓜素、局限曲菌素、丝林霉素、α-帚曲毒蛋白、Onconase®、胰腺核糖核酸酶、Bax、嗜酸性粒细胞来源的神经毒素和血管生成素。具体地,已经使用从RIP来源的多肽产生有效的细胞毒性免疫毒素:蓖麻毒蛋白、白树毒蛋白、肥皂草毒蛋白、木鳖子苷和PAP(Pasqualucci L等人, Haematologica 80:546-56(1995))。

[0150] 在它们各自的中毒过程中,霍乱毒素、蓖麻毒蛋白和志贺毒素都亚细胞地按路线发送至ER,在此处它们的催化结构域然后释放并转移至细胞溶胶。这些毒素可以利用宿主细胞的展开蛋白机制和ERAD系统向宿主细胞发出输出它们的催化结构域进入细胞溶胶中的信号(参见Spooner R, Lord J,Curr Top Microbiol Immunol 357:190-40(2012))。

[0151] 技术人员使用本领域已知的技术可以测定给定分子在细胞内按路线发送至特定亚细胞区室的能力。这包括本领域中的普通技术:其可以将目标分子定位至以下亚细胞区室中的任一个:细胞溶胶、ER和溶酶体。

[0152] 关于要求保护的发明,短语“靶向细胞溶胶的毒素效应物多肽”表示从蛋白来源的多肽,包括天然存在的核糖体毒素和合成的核糖体毒素,其能够在细胞内化以后细胞内地按路线发送至细胞溶胶。通常,靶向细胞溶质的毒素效应物区域源自天然存在的蛋白毒素或通过人干预改变的或工程改造的毒素-样结构,但是,其它多肽,例如,计算设计的多肽,是在本文中使用的术语的范围内(参见例如Newton D等人,Blood 97:528-35(2001); De Lorenzo C等人,FEBS Lett 581:296-300(2007);De Lorenzo C,D’Alessio G,Curr Pharm Biotechnol 9:210-4(2008);Menzel C等人,Blood 111:3830-7 (2008))。因而,靶向细胞溶质的毒素效应物区域可以源自合成的或经工程改造的具有增加的或减少的核糖体毒性的蛋白构建体和/或已经以其它方式改变以具有非天然特性的天然存在的蛋白。技术人员使用本领域已知的技术可以测定给定的分子提供靶向细胞溶胶的毒素效应物功能的能力。

[0153] 本发明的靶向细胞溶质的毒素效应物区域可以源自核糖体毒性的毒素效应物多肽,且经常重叠或完全包含核糖体毒性的毒素效应物多肽。

[0154] 2.从其它多肽区域或非蛋白性物质来源的蛋白酶体递送效应物多肽

[0155] 除了毒素来源的分子以外,存在众多适合用于递送至蛋白酶体的蛋白性分子,它们具有在细胞内定位至和/或指导它们自身细胞内按路线发送至细胞溶胶、ER或任意其它亚细胞区室的固有能力。这些多肽中的任一种可以直接使用或衍生成用在本发明中的蛋白酶体递送效应物多肽,只要保留固有的亚细胞定位效应物功能。

[0156] 例如,已知众多分子(包括众多天然存在的蛋白和多肽)在被内吞进细胞中以后能够通过众多机制逃离内体区室,所述机制包括孔形成、脂质双层融合和质子海绵效应(参见例如Varkouhi A等人,J Control Release 151: 220-8(2010))。具有内体逃逸功能的非毒素来源的分子的非限制性例子包括:病毒剂如血凝素HA2;脊椎动物来源的多肽和肽如人降钙素来源的肽、牛朊病毒蛋白和甜箭肽;合成的生物模拟物肽;和具有内体破坏能力的聚合物(参见例如Varkouhi A等人,J Control Release 151:220-8(2010))。使用本领域已知的测定,例如,使用用辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、荧光团如Alexa 488和毒素来源的多肽的报告物测定(参见例如Bartz R等人,Biochem J 435:475-87(2011);Gilabert-Oriol R等人,Toxins 6:1644-66 (2014)),可以直接地测量和定量从内体区室(包括溶酶体)的逃逸。

[0157] 其它例子是定位至特定细胞内区室的分子。大多数包含内质保留/回收信号基序(例如KDEL(SEQ ID NO:61))的多肽可以定位至来自细胞内不同区室的真核细胞ER。

[0158] 技术人员使用本领域已知的测定,可以确定多肽从早期内体区室的开始位置在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER和/或溶酶体区室的能力。然后,技术人员使用本领域已知的标准技术可以映射和分离源多肽或蛋白(例如,毒素)的蛋白酶体递送效应物多肽区域。

[0159] 3.经工程改造成包含一个或多个异源T-细胞表位和一个蛋白酶体递送效应物多肽的多肽

[0160] 一旦得到蛋白酶体递送效应物多肽,使用本发明的方法可以将它工程改造成本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽。使用本发明的方法,将一个或多个T-细胞表位嵌入、融合、或插入任何蛋白酶体递送效应物多肽,例如,按路线发送至细胞溶胶的毒素效应物多肽(其可以包括核糖体毒性的毒素效应物多肽),以便产生本发明的多肽,其开始于早期内体区室,能够将T-细胞表位递送至蛋白酶体用于进入 MHC I类途径和随后的MHC I类呈递。

[0161] 技术人员使用本文所述的方法和/或本领域已知的技术(参见下面实施例),可以测定给定分子的将T-细胞表位递送至蛋白酶体用于进入细胞的 MHC I类途径的能力。类似地,技术人员使用本文所述的方法和/或本领域已知的技术,可以测定给定分子将T-细胞表位从初级内体区室递送至蛋白酶体的能力。

[0162] 技术人员使用本文所述的方法和/或本领域已知的技术(参见下面实施例),可以测定给定分子将T-细胞表位从初级内体区室递送至MHC I类分子用于呈递在细胞表面上的能力。类似地,技术人员使用本文所述的方法和/或本领域已知的技术,可以测定给定分子将T-细胞表位从初级内体区室递送至MHC I类分子的能力。

[0163] 不要求使用本发明的方法修饰的蛋白酶体递送效应物多肽在通过本发明的方法修饰之前或之后能够诱导或促进细胞内化。为了制备本发明的细胞靶向分子,使用本领域已知的标准技术,可以使本发明的多肽与技术人员已知的其它组分连接以便提供所需的细胞靶向功能和/或细胞内化功能。

[0164] B.异源T-细胞表位

[0165] 本发明的多肽和细胞靶向分子各自包含一个或多个异源T-细胞表位。T-细胞表位是包含抗原的分子结构,且可以由肽或线性氨基酸序列表示。异源T-细胞表位是不存在

于源多肽或开始蛋白酶体递送效应物多肽中的表位,所述源多肽或开始蛋白酶体递送效应物多肽使用本发明的方法进行修饰以便产生本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽。

[0166] 通过技术人员已知的众多方法,可以将异源T-细胞表位肽掺入源多肽中,所述方法包括、例如,在源多肽内产生一个或多个氨基酸置换的方法,使一个或多个氨基酸与源多肽融合的方法,将一个或多个氨基酸插入源多肽中的方法,将肽连接至源多肽的方法,和/或前述方法的组合。结果是包含一个或多个异源T-细胞表位的源多肽的修饰变体。

[0167] 尽管预见到任何T-细胞表位用作本发明的异源T-细胞表位,但是可以基于合乎需要的性能来选择某些表位。一个目的是产生CD8+ T-细胞超免疫化的多肽,这意味着,异源T-细胞表位是高免疫原性的,且当与MHC I类分子形成复合物展示在细胞表面上时可以在体内引起稳健的免疫应答。在本发明的多肽的某些实施方案中,一个或多个异源T-细胞表位是 CD8+ T-细胞表位。

[0168] T-细胞表位可以源自许多来源,包括蛋白的肽组分和从已知或被证实能够引起哺乳动物免疫应答的蛋白来源的肽。可以从各种天然存在的蛋白产生或衍生出T-细胞表位。T-细胞表位可以源自对于哺乳动物而言外来的各种天然存在的蛋白,例如,微生物的蛋白。具体地,传染性微生物可以含有众多具有已知的抗原性的和/或免疫原性的性质或亚区域或表位的蛋白。T-细胞表位可以源自突变的人蛋白和/或由恶性人细胞异常地表达的人蛋白。

[0169] T-细胞表位可以选自或源自许多已知能够引起哺乳动物免疫应答的来源分子,包括肽、蛋白的肽组分和从蛋白来源的肽。例如,具有哺乳动物宿主的细胞内病原体的蛋白是T-细胞表位的来源。存在众多具有充分研究的抗原性蛋白或肽的细胞内病原体,诸如病毒、细菌、真菌和单细胞真核生物。从人病毒或其它细胞内病原体(例如,细菌如分枝杆菌属、真菌如弓形虫属和原生生物如锥虫)可以选择或鉴别T-细胞表位。

[0170] 例如,存在许多已知的来自人病毒的病毒蛋白的免疫原性病毒肽组分。已经将众多人T-细胞表位映射至来自甲型流感病毒的蛋白内的肽,诸如蛋白HA糖蛋白FE17、S139/1、CH65、CO5、血凝素1(HA1)、血凝素 2(HA2)、非结构蛋白1和2(NS1和NS 2)、基质蛋白1和2(M1和M2)、核蛋白(NP)、神经氨酸酶(NA))中的肽,并且这些肽中的许多已经被证实会引起人免疫应答,诸如通过使用离体测定(参见例如Assarsson E等人,J Virol 82:12241-51(2008);Alexander J等人,Hum Immunol 71:468-74(2010);Wang M等人,PLoS One 5:e10533(2010);Wu J等人,Clin Infect Dis 51:1184-91(2010);Tan P等人,人Vaccin 7:402-9(2011);Grant E等人,Immunol Cell Biol 91:184-94(2013);Terajima M等人,Virol J 10:244 (2013))。类似地,已经将众多人T-细胞表位映射至来自人巨细胞病毒(HCMV)的蛋白的肽组分,诸如蛋白pp65(UL83)、UL128-131、立即早期 1(IE-1;UL123)、糖蛋白B、tegument蛋白中的肽,并且这些肽中的许多已经被证实会引起人免疫应答,诸如通过使用离体测定(Schoppel K等人,J Infect Dis 175:533-44(1997);Elkington R等人,J Virol 77:5226-40(2003); Gibson L等人,J Immunol 172:2256-64(2004);Ryckman B等人,J Virol 82: 60-70(2008);Sacre K等人,J Virol 82:10143-52(2008))。

[0171] 尽管任何T-细胞表位可以用在本发明的组合物和方法中,某些T-细胞表位基于它们的已知的和/或根据经验确定的特征可以是优选的。

[0172] 在许多物种中,MHC基因编码多种MHC-I分子变体。因为MHC I 类蛋白多态性可以影响CD8+ T-细胞对抗原-MHC I类复合物的识别,基于关于某些MHC I类多态性的知识和/或某些抗原-MHC I类复合物被不同基因型的T-细胞识别的能力,可以选择异源T-细胞表位。

[0173] 存在这样的明确定义的肽-表位:其已知是免疫原性的、MHC I类限制的和/或与特定人白细胞抗原(HLA)变体匹配。对于在人类中或涉及人靶细胞的应用,技术人员使用本领域已知的标准技术可以选择或鉴别HLA-I 类-限制的表位。肽的结合人MHC I类分子的能力,可以用于预测假定的 T-细胞表位的免疫原性潜力。使用软件工具,可以将肽的结合人MHC I 类分子的能力评分。基于在某些人群中更流行的等位基因编码的HLA变体的肽选择性,可以选择T-细胞表位用作本发明的异源T-细胞表位组分。例如,人群对于MHC I类分子的α链而言是多态的,且可变的等位基因由HLA基因编码。某些T-细胞表位可以被特定HLA分子更有效地呈递,例如,由HLA-A等位基因集合HLA-A2和HLA-A3编码的通常存在的HLA 变体。

[0174] 当选择T-细胞表位用作本发明的异源T-细胞表位组分时,可以考虑在MHC I类分子的表位选择过程中的许多因子,所述因子可以影响表位产生和向接受MHC I类分子的运输,例如,靶细胞中的以下因子的表位特异性:蛋白酶体、ERAAP/ERAP1、tapasin和TAPs can(参见例如Akram A,Inman R,Clin Immunol 143:99-115(2012))。

[0175] 当选择T-细胞表位用作本发明的异源T-细胞表位组分时,可以选择最佳地匹配存在于要靶向的细胞类型或细胞群体中的MHC I类分子的表位-肽。不同的MHC I类分子表现出与特定肽序列的优先结合,且特定肽 -MHC I类变体复合物被效应物T-细胞的TCR特异性地识别。技术人员可以使用关于MHC I类分子特异性和TCR特异性的知识以优化在本发明中使用的异源T-细胞表位的选择。

[0176] 另外,用于MHC I类呈递的多个免疫原性T-细胞表位可以嵌入相同多肽组分中用于多个T-细胞表位的同时靶向递送。

[0177] C.蛋白酶体递送效应物多肽,其包含一个或多个被嵌入或插入以破坏内源性B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域的异源T-细胞表位

[0178] 尽管使用蛋白酶体递送效应物多肽作为治疗剂组分具有吸引力,但是许多多肽当施用给脊椎动物时在细胞外空间中是免疫原性的。蛋白治疗剂中不希望的免疫原性已经导致降低的效力、不能预见的药代动力学和不希望的限制剂量和重复施用的免疫应答。在将治疗剂去免疫化的努力中,一个主要挑战是沉默或破坏多肽效应物结构域(例如它的靶向细胞溶质的结构域)内的免疫原性表位,同时保留期望的多肽效应物功能,例如,蛋白酶体递送。另外,一个重大挑战是,通过多肽结构中的氨基酸置换来破坏免疫表位,同时保留它的功能,并同时添加一个或多个在被靶细胞进行细胞内化、加工和细胞表面呈递之前不会被免疫系统识别的T-细胞表位。解决该挑战能够产生表现出期望的CD8+ T-细胞免疫原性、同时降低不希望的B-细胞和CD4+ T-细胞免疫原性的多肽——在本文中被称作“CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的”分子或“递送T-细胞表位的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的”分子。

[0179] II.包含本发明的递送T-细胞表位的、CD8+ T-细胞超免疫化的多肽的细胞靶向分子的一般结构

[0180] 本发明的多肽可以偶联至众多其它多肽、试剂和部分以产生细胞靶向分子,例如,本发明的细胞毒性的、靶向细胞的蛋白。使用本发明的包含蛋白酶体递送效应物多肽的T-细胞表位,并添加细胞靶向组分,例如,能够表现出与细胞外靶生物分子(其物理上偶联至特定细胞类型的表面) 的高亲和力结合的结合区域,可以构建细胞毒性的多肽和蛋白。另外,本发明的B-细胞表位去免疫化的多肽(无论是有毒的还是无毒的)可以用作用于施用给哺乳动物的众多有用分子的组分。

[0181] A.包含含有异源T-细胞表位的蛋白酶体效应物多肽的细胞靶向分子

[0182] 本发明包括细胞靶向分子,各自包含:1)靶向细胞的结合区域和2)本发明的蛋白酶体递送效应物多肽,其包含异源T-细胞表位。

[0183] 细胞靶向部分

[0184] 本发明的某些分子包含与细胞靶向部分连接的本发明的T-细胞超免疫化的蛋白酶体递送效应物多肽,所述细胞靶向部分包含能够特异性结合细胞外靶生物分子的结合区域。在某些实施方案中,本发明的分子包含单个多肽或蛋白,使得T-细胞超免疫化的蛋白酶体递送效应物多肽和靶向细胞的结合区域融合到一起以形成连续的多肽链或靶向细胞的融合蛋白。

[0185] 本发明的细胞靶向分子的细胞靶向部分包含这样的分子结构:当与本发明的多肽连接时,其各自能够使所述细胞靶向分子与特定细胞紧密靠近,这基于在那些特定细胞的表面上的分子相互作用。细胞靶向部分包括结合细胞表面靶标的配体和多肽。

[0186] 一类细胞靶向部分是蛋白性结合区域。本发明的细胞靶向分子的结合区域包含一个或多个能够选择性地和特异性结合细胞外靶生物分子的多肽。结合区域可以包含一个或多个不同的多肽部分,诸如配体(无论是合成的还是天然存在的配体)及其衍生物、免疫球蛋白来源的结构域、合成地工程改造的支架(作为免疫球蛋白结构域的替代物)等。蛋白性结合区域在本发明的细胞靶向分子中的应用允许产生这样的细胞靶向分子:其为单链的细胞靶向蛋白。

[0187] 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、经工程改造的抗体衍生物和经工程改造的抗体替代物。

[0188] 根据一个具体的、但是非限制性的方面,本发明的细胞靶向分子的结合区域包含保留对细胞外靶生物分子(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本发明的细胞靶向分子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(在括弧中指示替代名称)B-细胞活化因子(BAFF、 APRIL)、集落刺激因子(CSF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、干扰素、白介素(诸如IL-2、IL-6和IL-23)、神经生长因子(NGF)、血小板来源的生长因子、转化生长因子(TGF)和肿瘤坏死因子(TNF)。

[0189] 根据某些其它实施方案,所述结合区域包含能够结合细胞外靶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。

[0190] 根据一个具体的、但是非限制性的方面,所述结合区域可以包含免疫球蛋白型结合区域。本文中使用的术语“免疫球蛋白型结合区域”表示能够结合一个或多个靶生物分子(诸如抗原或表位)的多肽区域。结合区域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域通常源自抗体或抗体样结构;但是,预见到来自其它来源的替代支架在该术语的范围内。

[0191] 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 个反平行的β链排列为两个形成夹心-样结构的β片。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-集合)、恒定的(IgC或 C-集合)或中间的(IgI或I-集合)。一些Ig结构域可能与互补性决定区(CDR) 有关,所述互补性决定区(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(HGNC)提供了含有Ig- 样结构域的家族的成员的清单。

[0192] 免疫球蛋白型结合区域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域的产生中的关联性,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可能。

[0193] 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域。在某些实施方案中,免疫球蛋白型结合区域源自免疫球蛋白结合区域,诸如能够结合细胞外靶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域包含经工程改造的多肽,所述经工程改造的多肽并非源自任何免疫球蛋白结构域,而是通过提供对细胞外靶生物分子的高亲和力结合而象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。

[0194] 还存在众多现有技术中的结合区域,其可用于将多肽靶向特定细胞类型(通过它们的高亲和力结合特性)。在某些实施方案中,本发明蛋白的结合区域选自单结构域抗体结构域(sdAb)、纳米抗体、从骆驼科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(IgNAR)、V_{NAR}片段、单链可变(scFv)片段、多聚化scFv片段(双体、三体、四体)、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_L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(Fcab)、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相应物(参见Saerens D等人,Curr.Opin.Pharmacol 8: 600-8(2008);Dimitrov D,MAbs 1:26-8(2009);Weiner L,Cell 148:1081-4(2012);Ahmad Z等人,Clin Dev Immunol 2012:980250(2012))。

[0195] 根据某些其它实施方案,所述结合区域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。对于本发明的细胞靶向蛋白的

某些实施方案,所述结合区域选自由以下组成的组: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相应物 (Wörn A,Plückthun A,J Mol Biol 305:989-1010(2001);Xu L等人,Chem Biol 9:933-42(2002);Wikman M等人,Protein Eng Des Sel 17:455-62(2004);Binz H等人,Nat Biotechnol 23:1257-68(2005);Hey T等人,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等人,J Biol Chem 285:12096(2010);Zoller F等人,Molecules 16:2467-85(2011))。

[0196] 任何以上结合区域可以用作本发明的组分,只要所述结合区域组分对细胞外靶生物分子具有10^{-5}至10^{-12}摩尔/升、优选地小于200纳摩尔(nM) 的解离常数。

[0197] 本发明的某些细胞靶向分子包含与细胞外靶生物分子特异性结合区域连接的本发明的多肽,所述细胞外靶生物分子特异性结合区域包含一个或多个能够选择性地和特异性结合细胞外靶生物分子的多肽。可以基于众多标准来选择细胞外靶生物分子。

[0198] 细胞靶向部分的细胞外靶生物分子

[0199] 本发明的细胞靶向分子的某些结合区域包含这样的多肽区域:其能够特异性结合细胞外靶生物分子,优选地其物理上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。

[0200] 术语“靶生物分子”表示这样的生物分子,通常是通过翻译后修饰(诸如糖基化)而修饰的蛋白或蛋白:其能够被结合区域结合以将蛋白靶向至生物体内的特定细胞类型或位置。细胞外靶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,细胞外靶生物分子在与本发明的靶向细胞的分子相互作用以后被内源性地内化或容易地被迫内化。

[0201] 就本发明的目的而言,关于修饰靶生物分子,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。

[0202] 关于本发明,当用于描述靶生物分子时,短语“物理上连接”是指将靶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上连接。例如,细胞外靶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)。

[0203] 可以基于众多标准(诸如它们的靶生物分子的细胞类型特异性的表达和/或它们的靶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靶向细胞的分子的结合区域。例如,本发明的某些细胞毒性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它地表达的细胞表面靶标结合至细胞表面。

[0204] 认为所有有核的脊椎动物细胞能够使用MHC I类系统呈递细胞内肽表位。因而,本发明的靶向细胞的分子的细胞外靶生物分子原则上可以靶向任何有核的脊椎动物细胞用于将T-细胞表位递送进MHC I类呈递途径中。

[0205] 本发明的靶向细胞的分子的结合区域的细胞外靶生物分子可以包括过比例地或排它地存在于癌细胞、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。

[0206] 技术人员使用本领域已知的技术可以将本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽连接至多种其它分子以靶向与细胞物理上连接的特定细胞外靶生物分子和促进靶细胞内化。例如,本发明的多肽可以连接至更容易内吞(例如,通过受体介导的胞吞作用)的细胞表面受体靶向分子或连接至通过细胞表面机制(例如,促进网格蛋白包被的小窝装配、磷脂层变形和/或管内陷)促进细胞内化的分子。使用技术人员已知的测定,可以确定靶标结合以后细胞靶向部分的促进细胞内化的能力。

[0207] KDEL家族的成员的内质网保留/回收信号基序

[0208] 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。

[0209] 羧基端赖氨酸-天冬酰胺-谷氨酸-亮氨酸(KDEL(SEQ ID NO:61))序列是真核细胞中的可溶性蛋白的一种规范的、内质网保留和回收信号基序,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(公开为SEQ ID NO:61的“KDEL”)-样基序,诸如HDEL(SEQ ID NO:63)、RDEL(SEQ ID NO:65)、WDEL(SEQ ID NO:66)、YDEL(SEQ ID NO:67)、HEEL(SEQ ID NO:69)、KEEL(SEQ ID NO:70)、REEL(SEQ ID NO:71)、KFEL (SEQ ID NO:74)、KIEL(SEQ ID NO:86)、DKEL(SEQ ID NO:87)、KKEL(SEQ ID NO:90)、HNEL(SEQ ID NO:94)、HTEL(SEQ ID NO:95)、KTEL (SEQ ID NO:96)和HVEL(SEQ ID NO:97),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保留者(Munro S,Pelham H,Cell 48:899-907(1987);Raykhel I等人,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(Raykhel,J Cell Biol 179:1193-204(2007))。另外的KDEL信号基序包括ALEDEL(SEQ ID NO:107)、HAEDEL(SEQ ID NO:108)、HLEDEL(SEQ ID NO:109)、KLEDEL(SEQ ID NO:110)、IRSDEL(SEQ ID NO:111)、ERSTEL(SEQ ID NO:112)和RPSTEL(SEQ ID NO:113)(Alanen H等人,J Mol 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等人, Nucleic Acids Res 34:D227-30(2006))。

[0210] 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等人,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等人,EMBO J.9:3153-62(1990);Schutze M等人, EMBO J.13:1696-1705(1994))。

[0211] 就本发明的目的而言,KDEL家族的成员包括合成信号基序,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;参见例如,Raykhel I等人,J Cell Biol 179:1193-204(2007)。

[0212] 作为本发明的多肽和细胞靶向分子的某些实施方案的组分,KDEL-型信号基序在多肽或细胞靶向蛋白内物理地定位、朝向或排列,使得它是在羧基端。

[0213] 为了本发明的目的,T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和靶向细胞的结合区域相对于彼此或整个靶向细胞的融合蛋白的N-端和C-端的具体顺序或取向不是固定的(参见例如图1)。

[0214] 本发明的细胞靶向分子的一般结构是模块的,因此多种不同的靶向细胞的结合区域可以与多种CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的多肽一起使用以提供多种细胞外靶生物分子的不同靶向并从而提供细胞毒性的靶向、白细胞郁滞和/或外源物质向多种不同细胞类型的递送。不会导致T-细胞表位呈递和/或不具有细胞毒性(由于不适当的亚细胞按路线发送)的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽仍然可以用作用于将外源物质递送进细胞中的靶向细胞的分子的组分,例如,T-细胞表位或抗原。

[0215] III.连接本发明的多肽组分和/或它们的亚组分的接头

[0216] 本发明的各个细胞靶向部分、多肽和/或蛋白组分,例如靶向细胞的结合区域和CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,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。结合区域的各个多肽亚组分,例如重链可变区(V_H)、轻链可变区(V_L)、CDR和/或ABR区域,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(参见例如Weisser N,Hall J,Biotechnol Adv 27:502-20(2009);Chen X等人,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。

[0217] 合适的接头通常是允许本发明的每个多肽组分以特定三维结构折叠的那些接头,所述特定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生产的多肽组分。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,诸如各种非蛋白性的碳链,无论是分支的还是环状的(参见例如Chen X等人,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。

[0218] 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,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,例如,选择所述接头所期望的一种或多种性质(参见例如Chen X等人,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013))。

[0219] 合适的接头可以是非蛋白性的,例如,化学接头(参见例如Dosio F等人,Toxins 3:848-83(2011);Feld J等人,Oncotarget 4:397-412(2013))。本领域已知的各种非蛋白性的接头可以用于将细胞靶向部分连接至CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽组分,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部分(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等人,Bioconjugate Chem 1:264-8(1990);Pasqualucci L等人,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等人,Chembiochem Jul 18(2014);Tian F等人,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:(4-碘乙酰基)-氨基苯甲酸-N-琥珀酰亚胺基酯,硫代乙酸-S-(N-琥珀酰亚胺基)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),4-(2-吡啶基二硫基)-戊酸-N-琥珀酰亚胺基酯(SPP),4-(N- 马来酰亚胺基甲基)环已烷甲酸琥珀酰亚胺基酯(SMCC或MCC),(4-碘乙酰基)-氨基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺基酯,4-琥珀酰亚胺基-氧基羰基-α-(2-吡啶基二硫基)甲苯,-6-(α-甲基-α-(吡啶基二硫醇)-甲苯酰氨基)已酸磺基琥珀酰亚胺基酯,3-(-2-吡啶基二硫基)-丙酸-N-琥珀酰亚胺基酯(SPDP),6(3(-(-2-吡啶基二硫基)-丙酰氨基)已酸琥珀酰亚胺基酯,6(3(-(-2-吡啶基二硫基)-丙酰氨基)已酸磺基琥珀酰亚胺基酯,马来酰亚胺基已酰基(MC),马来酰亚胺基已酰基-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-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS),α-烷基衍生物, sulfoNHS-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,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等人,Eur J Biochem 147:197-206(1985);Thorpe P等人, Cancer Res 47:5924-31(1987);Thorpe P等人,Cancer Res 48:6396-403(1988);Grossbard M等人,Blood 79:576-85(1992);Lui C等人,Proc Natl Acad Sci USA 93:8618-23(1996);Doronina S等人,Nat Biotechnol 21:778-84(2003);Feld J等人,Oncotarget 4:397-412(2013))。

[0220] 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等人,Toxins 3:848-83(2011); Chen X等人,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013);Feld J等人, Oncotarget 4:397-412(2013))。

[0221] 可以选择蛋白性的接头用于掺入本发明的重组融合细胞靶向分子中。对于本发明的重组融合细胞靶向蛋白,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 Eng 15:871-9(2002);Kreitman R,AAPS J 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,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等人.Proc Natl Acad Sci U.S.A.85:5879-83(1988);Pastan I等人,Annu Rev Med 58:

221-37(2007);Li J等人,Cell Immunol 118:85-99(1989); Cumber A等人.Bioconj Chem 3:397-401(1992);Friedman P等人,Cancer Res 53:334-9(1993);Whitlow M等人,Protein Engineering 6:989-95(1993); Siegall C等人,J Immunol 152:2377-84(1994);Newton等人.Biochemistry 35:545-53(1996);Ladurner等人.J Mol Biol 273:330-7(1997);Kreitman R 等人,Leuk Lymphoma 52:82-6(2011);美国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:114))、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:115)。

[0222] 基于期望的性能可以选择蛋白性的接头。记住特定特征的技术人员可以选择蛋白性的接头,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,基于柔性、刚度和/或切割性可以选择蛋白性的接头(参见例如Chen X等人,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等人,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(以形成同多聚体)或不同多肽或蛋白之间(以形成杂多聚体)的分子间相互作用。例如,可以选择蛋白性的接头,其允许本发明的细胞靶向蛋白的多肽组分之间的期望的非共价相互作用,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(参见例如美国 4,946,778)。

[0223] 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,例如,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸(参见例如Bird R等人,Science 242:423-6 (1988);Friedman P等人,Cancer Res 53:334-9(1993);Siegall C等人,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:116)、$(S_xG)_n$(SEQ ID NO:117)、 $(GGGGS)_n$(SEQ ID NO:118)和$(G)_n$(SEQ ID NO:119),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:120)、GSTSGSGKSSEGKG(SEQ ID NO:121)、GSTSGSGKSSEGSGSTKG(SEQ ID NO:122)、GSTSGSGKPGSGEGSTKG(SEQ ID NO:123)、EGKSSGSGSESKEF(SEQ ID NO:124)、SRSSG(SEQ ID NO:125)和SGSSC(SEQ ID NO:126)。

[0224] 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等人,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。

[0225] 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等人,Toxins 3:848-83(2011);Chen X 等人,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等人,Bioconjug Chem 17: 144-24(2006);Erickson H等人,Cancer Res 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等人,Cancer Res 48:4469-76(1998);The J等人,J

Immunol Methods 110:101-9(1998);参见Chen X等人, 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、细胞内的区室的蛋白酶敏感,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:127)。

[0226] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,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。在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,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。

[0227] 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等人,Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-69(2013))。

[0228] 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,例如,Zarling D等人,J Immunol 124:913-20(1980);Jung S,Moroi M, Biochem Biophys Acta 761:152-62(1983);Bouizar Z等人,Eur J Biochem 155:141-7(1986);Park L等人,J Biol Chem 261:205-10(1986);Browning J,Ribolini A,J Immunol 143:1859-67(1989);Joshi S,Burrows R,J Biol Chem 265:14518-25(1990))。

[0229] 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区室内的解离。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、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靶向细胞的分子的组分(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WelhönerH等人,J Biol Chem 266: 4309-14(1991);Fattom A等人,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,例如,肿瘤组织的pH低于健康组织中的pH(参见例如美国5,612,474)。

[0230] 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等人,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靶向细胞的分子的组分(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等人,Pept Proc Eur Pept Symp,第16版,Brunfeldt K,编,105-110(1981);Senter等人,Photochem Photobiol 42:231-7(1985);Yen等人,Makromol Chem 190:69-82(1989);Goldmacher V 等人,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靶向细胞的分子(其被设计成用于治疗可以使用纤维光学暴露于光的疾病、病症和病患)中具有特定用途。

[0231] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,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,将靶向细胞的结合区域连接至 CD8+ T-细胞超免疫化的和/或

B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽(参见例如Chen X等人,Adv Drug Deliv Rev 65:1357-69(2013);Behrens C,Liu B, MAbs 6:46-53(2014)。

[0232] 在本发明的靶向细胞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,例如,15- 残基$(Gly4Ser)_3$肽(SEQ ID NO:128)。可以用于形成非共价多价结构的合适 scFv接头包括GGS、GGGS(SEQ ID NO:129)、GGGGS(SEQ ID NO:130)、 GGGGSGGG(SEQ ID NO:131)、GGSGGGG(SEQ ID NO:132)、GSTSGGGSGGGSGGGGSS(SEQ ID NO:133)和 GSTSGSGKPGSSEGSTKG(SEQ ID NO:134)(Plückthun A,Pack P, Immunotechnology 3:83-105(1997);Atwell J等人,Protein Eng 12:597-604 (1999);Wu A等人,Protein Eng 14:1025-33(2001);Yazaki P等人,J Immunol Methods 253:195-208(2001);Carmichael J等人,J Mol Biol 326: 341-51(2003);Arndt M等人,FEBS Lett 578:257-61(2004);Bie C等人, World J Hepatol 2:185-91(2010))。

[0233] 用于连接本发明的细胞靶向分子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细胞靶向部分的结合能力、CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的多肽组分的细胞内化和/或当通过适当测定(包括本文描述的测定)测量适当的期望的毒素效应物功能时。

[0234] 关于本发明的细胞靶向分子的目的,靶向细胞的结合区域和CD8+ T- 细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽区域相对于彼此或整个细胞靶向分子的具体顺序或取向没有固定(参见例如图1)。本发明的多肽和细胞靶向分子的组分可以以任意顺序排列,前提条件是,期望的细胞靶向部分和T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的效应物多肽区域的活性没有消除。在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,细胞靶向部分、CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的多肽和/或内质网保留/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。

[0235] IV.递送T-细胞表位的、CD8+ T-细胞超免疫化的多肽和包含它们的靶向细胞的融合蛋白的具体结构变化的例子

[0236] 可以产生T-细胞超免疫化的多肽,其具有递送T-细胞表位用于靶细胞的MHC I类呈递的能力,大体而言,通过将T-细胞表位添加至任何蛋白酶体递送效应物多肽。通过用重叠的异源T-细胞表位替换蛋白酶体递送效应物多肽内的任意B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中的一个或多个氨基酸残基,可以产生本发明的T-细胞超免疫化的多肽的B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的亚变体。可以产生细胞靶向分子,其具有递送CD8+ T-细胞表位用于靶细胞的MHC I类呈递的能力,大体而言,通过将本发明的任何CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽连接至细胞靶向部分,只要得到的分子具有至少由本发明的多肽、细胞靶向部分或它们一起的结构组合提供的细胞内化能力。

[0237] 通过使用毒素来源的、蛋白酶体递送效应物多肽,可以产生CD8+ T- 细胞超免疫化的多肽,其具有递送CD8+ T-细胞表位用于靶细胞的MHC I 类呈递的能力。类似地,通过用重叠的异源CD8+ T-细胞表位替换毒素来源的、蛋白酶体递送效应物多肽中的任何B-细胞表位区域的一个或多个氨基酸残基,可以产生本发明的B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的、CD8+ T- 细胞超免疫化的多肽。

[0238] 本发明的某些T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽包含通过异源T-细胞表位的添加对至少一个假定的B-细胞表位区域的破坏,以便降低所述多肽施用给哺乳动物以后的抗原性和/或免疫原性潜力。本文中关于B-细胞表位区域使用的术语“破坏”表示B-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的删除、两个或更多个氨基酸的反转(其中被反转的氨基酸中的至少一个是在B-细胞表位区域中)、B-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的插入、或B-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的突变。突变引起的B-细胞表位区域破坏包括用非标准的氨基酸和/或非天然的氨基酸进行的氨基酸置换。受破坏影响的区域中的氨基酸残基的数目优选地是2 或更多、3或更多、4或更多、5或更多、6或更多、7或更多诸如此类,直到8、9、10、11、12、或更多个氨基酸残基。

[0239] 通过参考序列表中提供的天然志贺毒素A亚基或原型白喉毒素A亚基的具体氨基酸位置,在本文中指示某些B-细胞表位区域和破坏,注意,天然存在的毒素A亚基可能包含在它们的氨基端处含有约22个氨基酸的信号序列的前体形式,所述信号序列被除去以产生成熟的毒素A亚基且是技术人员可识别的。

[0240] 本发明的某些T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽包含通过添加异源T-细胞表位对至少一个假定的CD4+ T-细胞表位区域的破坏,以便降低所述多肽施用给哺乳动物以后的CD4+ T-细胞抗原性和/或免疫原性潜力。本文中关于CD4+ T-细胞表位区域使用的术语“破坏”表示CD4+ T-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的删除、两个或更多个氨基酸的反转(其中被反转的氨基酸中的至少一个是在CD4+ T-细胞表位中)、CD4+ T-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的插入、或CD4+ T-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的突变。突变引起的CD4+ T-细胞表位区域破坏包括用非标准的氨基酸和/或非天然的氨基酸进行的氨基酸置换。受破坏影响的区域中的氨基酸残基的数目优选地是2或更多、3或更多、4 或更多、5或更多、6或更多、7或更多诸如此类,直到8、9、10、11、 12、或更多个氨基酸残基。

[0241] 通过参考序列表中提供的天然志贺毒素A亚基或原型白喉毒素A亚基的具体氨基酸位置,在本文中指示某些CD4+ T-细胞表位区域和破坏,注意,天然存在的毒素A亚基可能包含在它们的氨基端处含有约22个氨基酸的信号序列的前体形式,所述信号序列被除去以产生成熟的毒素A亚基且是技术人员可识别的。

[0242] 1.志贺毒素来源的、呈递CD8+ T-细胞表位的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽

[0243] 志贺毒素家族的蛋白毒素由在结构上和在功能上相关的多种天然存在的毒素组成,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享相同的总结构和作用机理(Engedal,N等人,Microbial Biotech 4:32-46 (2011))。例如,Stx、SLT-1和SLT-2在无细胞系统中表现出不能辨别的酶活性(Head S等人,J Biol Chem 266:3617-21(1991);Tesh V等人,Infect Immun 61:3392-402(1993);Brigotti M等人,Toxicon 35:1431-1437(1997))。

[0244] 志贺毒素家族包括从痢疾志贺菌(S.dysenteriae)血清型1中分离的真志贺毒素(Stx),从肠出血性大肠杆菌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相差仅一个残基,并且二者都已经被称作佛罗细胞毒素或Vero细胞毒素(VT)(O'Brien, Curr Top Microbiol Immunol 180:65-94(1992))。尽管SLT1和SLT2变体在氨基酸序列水平上彼此仅有约53-60%的相似性,但是它们共享志贺毒素家族的成员共有的酶活性和细胞毒性的机制(Johannes,Nat Rev Microbiol 8:105-16(2010))。已经描述了超过39种不同的志贺毒素,诸如定义的亚型 Stx1a、Stx1c、Stx1d和Stx2a-g(Scheutz F等人,J Clin Microbiol 50: 2951-63(2012))。志贺毒素家族的成员并不天然地限于任何细菌物种,因为编码志贺毒素的基因可以经由水平基因转移在细菌物种之间扩散(Strauch E等人,Infect Immun 69:7588-95(2001);Zhaxybayeva O,Doolittle W,Curr Biol 21:R242-6(2011))。作为物种间转移的一个例子,在从患者分离的溶血不动杆菌(A.haemolyticus)的菌株中发现了志贺毒素(Grotiuz G等人,J Clin Microbiol 44:3838-41(2006))。一旦编码志贺毒素的多核苷酸进入新的亚种或物种,则假定志贺毒素氨基酸序列能够由于遗传漂变和/或选择压力而形成轻微的序列变化,同时仍然保持志贺毒素家族的成员共有的细胞毒性机制(参见Scheutz,J Clin Microbiol 50:2951-63(2012))。

[0245] 就本发明的目的而言,短语"志贺毒素效应物区域"表示从志贺毒素家族的成员的志贺毒素A亚基来源的多肽区域,其能够表现出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、催化地灭活核糖体、实现细胞毒性和实现细胞生长抑制作用。

[0246] 就本发明的目的而言,志贺毒素效应物功能是从志贺毒素A亚基来源的多肽区域赋予的生物活性。志贺毒素效应物功能的非限制性例子包括细胞内化、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例子包括核糖体灭活、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。RIP可以将核酸、多核苷、多核苷酸、rRNA、ssDNA、dsDNA、mRNA(和聚腺苷酸)和病毒核酸脱嘌呤化(Barbieri L等人,Biochem J 286:1-4(1992);Barbieri L等人,Nature 372: 624(1994);Ling J等人,FEBS Lett 345:143-6(1994);Barbieri L等人,Biochem J 319:507-13(1996);Roncuzzi L,Gasperi-Campani A,FEBS Lett 392:16-20(1996);Stirpe F等人,FEBS Lett 382:309-12(1996);Barbieri L等人,Nucleic Acids Res 25:518-22(1997);Wang P,Tumer N,Nucleic Acids Res 27:1900-5(1999);Barbieri L等人,Biochim Biophys Acta 1480:258-66(2000);Barbieri L等人,J Biochem 128:883-9(2000);Bagga S等人,J Biol Chem 278:4813-20(2003);Picard D等人,J Biol Chem 280:20069-75(2005))。一些RIP表现出抗病毒活性和超氧化物歧化酶活性(Erice A等人, Antimicrob Agents Chemother 37:835-8(1993);Au T等人,FEBS Lett 471:169-72(2000);Parikh B,Tumer N,Mini Rev Med Chem 4:523-43(2004); Sharma N等人,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。关于志贺毒素效应物活性的测定可以测量各种活性,例如,蛋白合成抑制活性、脱嘌呤化活性、细胞生长的抑制、细胞毒性、超螺旋的DNA松弛活性和/或核酸酶活性。

[0247] 本文中使用的"志贺毒素效应物功能的保留"表示,通过具有再现性的适当定量测定所测得的与野生型志贺毒素效应物多肽对照相当的志贺毒素功能活性水平。关于核糖体抑制,志贺毒素效应物功能表现出10,000pM 或更小的IC_{50}。关于在靶阳性细胞杀死测定中

的细胞毒性,志贺毒素效应物功能表现出1,000nM或更小的CD_{50},取决于细胞类型和它对适当的细胞外靶生物分子的表达。

[0248] 本文中使用的“显著的”志贺毒素效应物功能的保留表示,通过具有再现性的适当定量测定所测得的与野生型志贺毒素效应物多肽对照相当的志贺毒素功能活性水平。关于体外核糖体抑制,显著的志贺毒素效应物功能表现出300pM或更小的IC_{50},取决于核糖体的来源(例如细菌、古细菌或真核生物(藻类、真菌、植物或动物))。与催化上无活性的SLT-1A 1-251 双重突变体(Y77S,E167D)的100,000pM的近似IC_{50}相比,这是显著更大的抑制。关于在实验室细胞培养物中在靶阳性细胞杀死测定中的细胞毒性,显著的志贺毒素效应物功能表现出100、50或30nM或更小的CD_{50},取决于细胞系和它对适当的细胞外靶生物分子的表达。与没有靶向细胞的结合区域的单独SLT-1A组分(其具有100-10,000nM的CD_{50},取决于细胞系)相比,这是对适当靶细胞系显著更大的细胞毒性。

[0249] 对于有些样品,由于不能收集准确曲线拟合所需的数据点,IC_{50}或 CD_{50}的准确值可能是不可得到的。当确定显著的志贺毒素效应物功能活性时,不应当考虑不准确的IC_{50}和/或CD_{50}值。如在来自示例性志贺毒素效应物功能测定(例如,在实施例中描述的测定)的数据的分析中所述,不足以准确地拟合曲线的数据不应当考虑为实际志贺毒素效应物功能的代表。例如,如果在给定样品的浓度系列分别没有发生大于50%的核糖体抑制或细胞死亡,在理论上不可以确定IC_{50}和CD_{50}。

[0250] 检测志贺毒素效应物功能活性的失败可能是由于不适当的表达、多肽折叠和/或多肽稳定性,而不是细胞进入、亚细胞按路线发送和/或酶活性的缺乏。关于志贺毒素效应物功能的测定可能不需要许多本发明的多肽来测量显著量的志贺毒素效应物功能活性。就根据经验确定低或无效应物功能的根本原因与蛋白表达或稳定性有关而言,本领域技术人员可以能够使用本领域已知的蛋白化学和分子工程改造技术来补偿这样的因素,使得志贺毒素功能效应物活性可以恢复和测量。作为例子,通过使用不同的表达控制序列可以补偿不适当的基于细胞的表达;不适当的多肽折叠和/或稳定性可能受益于稳定化末端序列或使蛋白的三维结构稳定化的非效应物区域中的补偿突变等。当关于各个志贺毒素功能的新测定变得可得到时,可以针对那些志贺毒素效应物功能的任何水平分析CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽,诸如是在野生型志贺毒素效应物多肽的活性1000倍或100倍或更小内,或表现出与功能敲除的志贺毒素效应物多肽相比3倍至30倍或更大活性。

[0251] 通过在细胞毒性测定(例如,基于T-细胞表位呈递或基于涉及细胞溶胶和/或ER靶底物的毒素效应物功能的细胞毒性测定)中观察细胞毒性,仅仅可以推论出充分亚细胞按路线发送。

[0252] 应当指出,即使志贺毒素效应物多肽的细胞毒性相对于野生型下降,但是在实践中,使用减弱的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽的应用可能与使用野生型志贺毒素效应物多肽的那些相比同样有效或更有效,因为降低的抗原性和/或免疫原性可能抵消降低的细胞毒性,例如,通过允许更高的剂量、更多重复施用或长期施用。野生型志贺毒素效应物多肽是非常有效的,能够杀死,仅一个分子到达细胞溶胶或可能40个分子被内化。CD8+ T-细胞超免疫化的和 /或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽(与野生型志贺毒素效应物多肽相比,其具有甚至相

当大地降低的志贺毒素效应物功能,例如,亚细胞按路线发送或细胞毒性)对于基于靶向细胞杀死和/或特定细胞检测的应用而言可能仍然是足够有效的。

[0253] 本发明的某些实施方案提供了包含志贺毒素效应物多肽的多肽,所述志贺毒素效应物多肽包含从志贺毒素家族的成员的A亚基来源的氨基酸序列,所述志贺毒素效应物区域包含本文中(参见例如表2、3和4)提供的至少一个天然地定位的B-细胞表位区域的破坏。在某些实施方案中,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽可以包含含有选自由以下组成的天然定位的氨基酸的组的氨基酸序列的至少一个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))或基本上由其组成:SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的B-细胞表位区域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;和SEQ ID NO:3的210-218;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,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的CD4+ T-细胞表位区域4-33,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的34-78,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的77-103,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的128-168,SEQ ID NO:1 或SEQ ID NO:2的160-183,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的236-258,和SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的274-293;或保守的志贺毒素效应物多肽和/或非天然的志贺毒素效应物多肽序列中的等同位置。

[0254] 本发明的某些实施方案提供了包含志贺毒素效应物多肽的多肽,所述志贺毒素效应物多肽包含从志贺毒素家族的成员的A亚基来源的氨基酸序列,所述志贺毒素效应物区域包含本文中提供的至少一个天然地定位的 CD4+ T-细胞表位区域(参见例如表2、3和4)的破坏。在某些实施方案中,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽可以包含全长志贺毒素A亚基(例如SLT-1A(SEQ ID NO:1)、StxA(SEQ ID NO:2)或SLT-2A(SEQ ID NO:3))或基本上由其组成,所述全长志贺毒素A亚基包含选自由以下氨基酸组成的天然定位的氨基酸集合的氨基酸序列的至少一个破坏:4-33、34-78、77-103、128-168、 160-183、236-258和274-293;或保守的志贺毒素效应物多肽和/或非天然的志贺毒素效应物多肽序列中的等同位置。

[0255] 在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应物多肽可以包含截短的志贺毒素A亚基或基本上由其组成。志贺毒素A亚基的截短可能导致整个 B-细胞表位区域的删除,而不影响毒素效应物催化活性和细胞毒性。表现出显著酶活性的最小志贺毒素A亚基片段是由StxA的残基75-247组成的多肽(Al-Jaufy,Infect Immun 62:956-60(1994))。将SLT-1A、StxA或SLT-2A 的羧基端截短至氨基酸1-251会除去两个预测的B-细胞表位区域、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。将SLT-1A、StxA或SLT-2A的氨基端截短至75-293会除去至少三个预测的B-细胞表位区域和三个预测的CD4+ T-细胞表位。将SLT-1A、StxA或 SLT-2A的氨基端和羧基端截短至75-251会删除至少五个预测的B-细胞表位区域、四个假定的CD4+ T-细胞表位、和一个预测的不连续的B-细胞表位。

[0256] 在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应物多肽可能包含全长或截短的志贺毒素A亚基或基本上由其组成,所述全长或截短的志贺毒素A 亚基在提供的B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中具有至少一个突变,例如缺失、插入、反转或置换。在某些其它实施方案中,所述多肽包含破坏,所述破坏包含在B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域内的至少一个氨基酸的缺失。在某些其它实施方案中,所述多肽包含破坏,所述破坏包含至少一个氨基酸在B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域内的插入。在某些其它实施方案中,所述多肽包含破坏,所述破坏包含氨基酸的反转,其中至少一个反转的氨基酸是在B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域内。在某些其它实施方案中,所述多肽包含破坏,所述破坏包含突变,诸如一个氨基酸置换为一个非标准氨基酸或一个具有化学修饰的侧链的氨基酸。在实施例中提供了氨基酸置换的众多例子。

[0257] 在其它实施方案中,本发明的志贺毒素效应物多肽包含比全长志贺毒素A亚基更短的截短的志贺毒素A亚基或基本上由其组成,其中在实施例(参见表2、3和/或4)所提供的天然地定位的B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。

[0258] 本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽可以小于全长A亚基,例如,由来自氨基酸位置77-239(SLT-1A(SEQ ID NO:1)或StxA(SEQ ID NO:2))的多肽区域或在志贺毒素家族的成员的其它A亚基中的等同区域(例如(SEQ ID NO:3)的 77-238)组成。例如,在本发明的某些实施方案中,从SLT-1A来源的志贺毒素效应物多肽可以源自SEQ ID NO:1的氨基酸75-251、SEQ ID NO:1的氨基酸1-241、SEQ ID NO:1的氨基酸1-251或SEQ ID NO:1的氨基酸 1-261,其中在实施例(表2、3和/或4)所提供的内源性B-细胞和/或CD4+ T- 细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。类似地,从StxA来源的CD8+T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物区域可以包含SEQ ID NO:2的氨基酸75-251、SEQ ID NO:2的氨基酸 1-241、SEQ ID NO:2的氨基酸1-251或SEQ ID NO:2的氨基酸1-261或基本上由其组成,其中在实施例(表2、3和/或4)所提供的至少一个内源性 B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。另外,从 SLT-2来源的志贺毒素效应物区域可以包含SEQ ID NO:3的氨基酸 75-251、SEQ ID NO:3的氨基酸1-241、SEQ ID NO:3的氨基酸1-251或 SEQ ID NO:3的氨基酸1-261或基本上由其组成,其中在实施例(表2、3 和/或4)所提供的至少一个B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。

[0259] 本发明的细胞靶向分子的某些实施方案各自包含CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽,其保留志贺毒素效应物功能,但是其可能为了非细胞毒性的功能(例如,实现白细胞郁滞、外源物质的递送和/或细胞类型的检测)通过突变一个或多个对于酶活性而言的关键残基从细胞毒性的母体分子工程改造成具有减少的或消除的细胞毒性的多肽。

[0260] 对于某些实施方案,本发明的多肽包含志贺毒素效应物多肽。对于某些实施方案,本发明的多肽包含SEQ ID NO:11-43的多肽之一或基本上由其组成。

[0261] 对于某些实施方案,本发明的靶向细胞的分子是包含志贺毒素效应物多肽的细胞毒性蛋白。对于某些实施方案,本发明的靶向细胞的分子包含 SEQ ID NO:49-54的多肽之一或基本上由其组成。

[0262] 2.白喉毒素来源的、CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化

的多肽

[0263] 就本发明的目的而言,短语“白喉毒素效应物区域”表示从白喉毒素家族的成员的白喉毒素来源的多肽区域,其能够表现出至少一种白喉毒素功能。白喉毒素功能包括,例如,细胞进入、内体逃逸、指导亚细胞按路线发送、催化地灭活核糖体、实现细胞毒性和实现细胞生长抑制作用。

[0264] 就本发明的目的而言,白喉毒素效应物功能是从白喉毒素来源的多肽区域赋予的生物活性。白喉毒素效应物功能的非限制性例子包括细胞内化、亚细胞按路线发送、催化活性和细胞毒性。白喉毒素催化活性的非限制性例子包括核糖体灭活、蛋白合成抑制和ADP-核糖基化。已经在体外和在体内观察到白喉毒素催化活性。关于白喉毒素效应物活性的测定可以测量各种活性,例如,蛋白合成抑制活性、ADP-核糖基化、细胞生长的抑制和/或细胞毒性。通过在细胞毒性测定(例如,基于T-细胞表位呈递或基于涉及细胞溶胶和/或ER靶底物的毒素效应物功能的细胞毒性测定)中观察细胞毒性,仅仅可以推论出充分亚细胞按路线发送。

[0265] 应当指出,即使白喉毒素效应物多肽的毒素效应物活性相对于野生型下降,但是在实践中,使用减弱的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物多肽的应用可能与使用具有野生型活性水平的白喉毒素效应物多肽的那些相比同样有效或更有效,因为降低的抗原性和/或免疫原性可能抵消降低的细胞毒性,例如,通过允许更高的剂量、更多重复施用或长期施用。仅仅表现出亚细胞按路线发送的效应物活性的白喉毒素效应物多肽适合用在基于靶向细胞CD8+ T-细胞表位递送的应用中。

[0266] 本发明的某些实施方案提供了包含白喉毒素效应物多肽的多肽,所述白喉毒素效应物多肽包含从白喉毒素家族的成员的A亚基来源的氨基酸序列,所述白喉毒素效应物区域包含本文中(参见例如表5)提供的至少一个天然地定位的B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域的破坏。在某些实施方案中,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物多肽可以包含SEQ ID NO:45的氨基酸2-389的多肽或基本上由其组成,所述多肽包含选自由以下氨基酸组成的天然定位的氨基酸集合的氨基酸序列的至少一个破坏:SEQ ID NO:44的3-10、SEQ ID NO:44的15-31、SEQ ID NO:44的32-54;SEQ ID NO:44的33-43、SEQ ID NO:44的71-77、SEQ ID NO:44的93-113、SEQ ID NO:44的125-131、SEQ ID NO:44的138-146、SEQ ID NO:44的141-167、SEQ ID NO:44的165-175、SEQ ID NO:45的182-201、SEQ ID NO:44的185-191和SEQ ID NO:45的 225-238;或保守的白喉毒素效应物多肽和/或非天然的白喉毒素效应物多肽序列中的等同位置。

[0267] 任选地,本发明的白喉毒素效应物多肽与野生型相比可以包含一个或多个突变(例如置换、缺失、插入或反转),只要在实施例(参见表5)所提供的至少一个天然地定位的B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中破坏至少一个氨基酸。在本发明的某些实施方案中,通过众所周知的宿主细胞转化、转染、感染或诱导的方法,或通过与白喉毒素效应物多肽连接的靶向细胞的结合区域所介导的内化,所述CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物多肽与天然存在的白喉毒素A 亚基具有足够的序列同一性以在进入细胞中以后保留细胞毒性。

[0268] 白喉毒素A亚基中对于酶活性和/或细胞毒性而言最关键的残基已经映射至下述残基-位置:组氨酸-21、酪氨酸-27、甘氨酸-52、色氨酸-50、酪氨酸-54、酪氨酸-65、谷氨酸-

148和色氨酸-153(Tweten R等人,J Biol Chem 260:10392-4(1985);Wilson B等人,J Biol Chem 269:23296-301(1994);Bell C,Eisenberg D,Biochemistry 36:481-8(1997);Cummings M等人,Proteins 31:282-98(1998);Keyvani K等人,Life Sci 64:1719-24(1999); Dolan K等人,Biochemistry 39:8266-75(2000);Zdanovskaia M等人,Res Micrbiol 151:557-62(2000);Kahn K,Bruice T,J Am Chem Soc 123:11960-9 (2001);Malito E等人,Proc Natl Acad Sci USA 109:5229-34(2012))。使用本领域众所周知的许多测定中的任意一种或多种,可以测量本发明的细胞毒性的细胞靶向分子的造成细胞死亡的能力,例如它的细胞毒性。

[0269] 在本发明的某些实施方案中,所述多肽包含CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物,所述白喉毒素效应物包含SEQ ID NO:45的氨基酸2或氨基酸2-389或基本上由其组成,其中在实施例(表5)所提供的天然地定位的B-细胞表位和/或CD4+ T-细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。

[0270] 对于某些实施方案,本发明的多肽包含白喉毒素效应物多肽。对于某些实施方案,本发明的多肽包含SEQ ID NO:46-48的多肽之一或基本上由其组成。

[0271] 对于某些实施方案,本发明的细胞靶向分子是包含白喉毒素效应物多肽的细胞毒性蛋白。对于某些实施方案,本发明的靶向细胞的分子包含 SEQ ID NO:55-60的多肽之一或基本上由其组成。

[0272] 对于某些实施方案,本发明的多肽包含SEQ ID NO:11-43或46-48的多肽中的任一种或基本上由其组成。

[0273] 本发明的细胞靶向分子各自包含至少一种与细胞靶向部分连接的T- 细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,所述细胞靶向部分可以特异性结合与细胞物理结合的至少一种细胞外靶生物分子,诸如在细胞表面上表达的靶生物分子。该一般结构是模块化的,因为任何数目的不同细胞靶向部分可以连接至本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/ 或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽。

[0274] 使用本发明的多肽和靶向细胞的分子的片段、变体和/或衍生物是在本发明范围内,所述片段、变体和/或衍生物含有针对靶生物分子的任何细胞外部分的功能结合位点,且甚至更优选地能够以高亲和力(例如如K_D所证实的)结合靶生物分子。可以置换以10^{-5}至10^{-12}摩尔/升、优选地小于200nM 的解离常数(K_D)结合靶生物分子的细胞外部分的任何细胞靶向部分,用于制备本发明的细胞靶向分子和用在本发明的方法中。

[0275] VI.本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的多肽序列的变化和包含它们的细胞靶向分子

[0276] 技术人员会认识到,可以对本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和细胞靶向分子和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,通过维持毒素效应物区域的总结构和功能以及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。

[0277] 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。表位标签和部分的非限制性例子是甲壳质结合蛋白结构域、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。

[0278] 在某些以上实施方案中,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B- 细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或细胞靶向蛋白的多肽序列被一个或多个引入多肽区域中的保守氨基酸置换改变,只要在本文所提供的至少一个天然地定位的B-细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。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(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)的氨基酸残基的置换(参见,例如,以下表C)。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现型上沉默的置换相关的其它信息,参见,例如,Bowie J等人,Science 247:1306-10(1990)。

[0279] 表C.保守氨基酸置换的例子

[0280]

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	F	E	D	D	G
S	N		M		T	L		Y	G	H	G	E	K
T			V			V			H	K	N	G	P
									I	N	P	H	Q
									L	Q	S	K	R
									M	R	T	N	S
									R	S	V	Q	T
									T	T		R	
									V			S	
									W			P	
									Y			T	

[0281] 在表C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以下的: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。

[0282] 另外的保守氨基酸置换包括以下的: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。

[0283] 在某些实施方案中,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或细胞靶向分子(例如靶向细胞的蛋白) 可以包含本发明的多肽区域的功能片段或变体,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。

[0284] 在某些实施方案中,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或细胞靶向分子可以包含本发明的多肽区域的功能片段或变体,所述功能片段或变体与本文列举的多肽序列相比最多具有20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个氨基酸置换,只要它保留实施例(表2、3、4和/或5)所提供的天然地定位的B-细胞和/或 CD4+ T-细胞表位区域中的至少一个氨基酸的破坏,且只要所述多肽或蛋白保留单独的T-细胞表位递送功能性和/或作为治疗和/或诊断组合物的组分。作为如下实现的改变本发明的靶向细胞的蛋白的多肽的结果,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和/或细胞靶向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(诸如在结合区域或CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽区域内),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。本发明的B-细胞表位去免疫化的和 CD8+ T-细胞超免疫化的多肽和/或细胞靶向蛋白还可以具有或没有信号序列。

[0285] 因此,在某些实施方案中,本发明的志贺毒素效应物或白喉毒素效应物多肽包含与天然存在的毒素(例如,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),或白喉毒素催化结构域(SEQ ID NO:44))具有至少55%、60%、65%、70%、 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5%或99.7%总序列同一性的氨基酸序列或基本上由其组成。在某些实施方案中,本发明的去免疫化的志贺毒素效应物或白喉毒素效应物多肽包含与天然存在的毒素具有至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、 98%、99%、99.5%或99.7%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(表2、3、4和/或5)所提供的至少一个天然地定位的B-细胞和/或CD4+ T-细胞表位区域中破坏了至少一个氨基酸。

[0286] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,可以突变、插入或删除一个或多个氨基酸残基,以便增加CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的毒素效应物多肽区域的酶活性。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))。

[0287] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,可以突变或删除一个或多个氨基酸残基以便减少或消除CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的毒素效应物多肽区域的催化和/或细胞毒性活性。例如,通过突变或截短可以减少或消除志贺毒素家族或白喉毒素家族的成员的A亚基的催化和/或细胞毒性活性。

[0288] 在本发明的某些实施方案中,已经改变核糖体毒素效应物区域,使得它不再支持体外核糖体的催化灭活。但是,在本发明范围内也预见到修饰核糖体毒性效应物区域以减少或消除核糖体毒性的其它方式。例如,某些突变可以使核糖体毒性效应物区域不能结合它的核糖体底物,尽管维持通过体外测定可观察的催化能力,而其它突变可以使核糖体毒性区域不能靶向核糖体内的特定核糖核酸序列,尽管维持对体外裸核酸的催化能力(参见例如Alford S等人,BMC Biochem 10:9(2009);Alvarez-García E等人, Biochim Biophys Act 1814:1377-82(2011);Wong Y等人,PLoS One 7:e49608(2012))。

[0289] 在DT中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,组氨酸-21、酪氨酸-27、甘氨酸-52、色氨酸-50、酪氨酸-54、酪氨酸 -65、谷氨酸-148和色氨酸-153(Tweten R等人,J Biol Chem 260:10392-4 (1985);Wilson B等人,J Biol Chem 269:23296-301(1994);Bell C,Eisenberg D,Biochemistry 36:481-8(1997);Cummings M等人,Proteins 31:282-98 (1998);Keyvani K等人,Life Sci 64:1719-24(1999);Dolan K等人,Biochemistry 39:8266-75(2000);Zdanovskaia M等人,Res Micrbiol 151: 557-62 (2000);Kahn K,Bruice T,J Am Chem Soc 123:11960-9(2001); Malito E等人,Proc Natl Acad Sci USA 109:5229-34(2012))。cholix毒素中的谷氨酸-581与DT中的谷氨酸-148一起是保守的(JørgensenR等人, EMBO Rep 9:802-9(2008)),且因而,预测cholix毒素中的谷氨酸-581的突变会降低cholix毒素的酶活性。

[0290] 在PE中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,色氨酸-417、组氨酸-426、组氨酸-440、甘氨酸-441、精氨酸-485、色氨酸-458、色氨酸-466、酪氨酸-470、酪氨酸-481、谷氨酸-546、精氨酸-551、谷氨酸-553和色氨酸-558(Douglas C,Collier R,J Bacteriol 169: 4967-71(1987);Wilson B,Colliver R,Curr Top Microbiol Immunol 175:27-41(1992));Beattie B等人,Biochemistry 35:15134-42(1996);Roberts T,Merrill A,Biochem J 367:601-8(2002);Yates S等人,Biochem J 385:667-75 (2005);JørgensenR等人,EMBO Rep 9:802-9(2008))。在cholix毒素中的谷氨酸-574和谷氨酸-581分别与PE中的谷氨酸-546和谷氨酸-553一起是保守的(JørgensenR等人,EMBO Rep 9:802-9(2008)),且因而,预测cholix 毒素中的谷氨酸-574和/或谷氨酸-581的突变会降低cholix毒素的酶活性。

[0291] 因为cholix毒素、DT、PE和其它有关酶的催化结构域是可重叠的 (JørgensenR,等人,J Biol Chem 283:10671-8(2008)),通过技术人员已知的序列比对方法可以在有关的多肽序列中预测催化活性所需的氨基酸残基。

[0292] 关于催化残基,已经充分地研究了RIP家族的几个成员。例如,大多数RIP家族成员共享五个对于催化而言关键的氨基酸残基,例如,在催化结构域的氨基端附近的两个酪氨酸、在催化结构域的中央附近的谷氨酸和精氨酸、和在催化结构域的羧基端附近的色氨酸(Lebeda F,Olson M,Int J Biol Macromol 24:19-26(1999);Mlsna D等人,Protein Sci 2:429-35(1993);de Virgilio M等人,Toxins 2:2699-737(2011);Walsh M,Virulence 4:774-84 (2013)))。因为RIP家族的成员的催化结构域是可重叠的,通过技术人员已知的序列比对方法,可以在RIP家族的未研究的和/或新的成员中预测催化活性所需的氨基酸残基(参见例如Husain J等人,FEBS Lett 342:154-8(1994);Ren J等人,Structure 2:7-16(1994);Lebeda F,Olson M,Int J Biol Macromol 24:19-26(1999);Ma Q等人,Acta

Crystallogr D Biol Crystallogr 56:185-6(2000);Savino C等人,FEBS Lett 470:239-43(2000);Robertus J, Monzingo A,Mini Rev Med Chem 4:477-86(2004);Mishra V等人,J Biol Chem 280:20712-21(2005);Zhou C等人,Bioinformatics 21:3089-96(2005);Lubelli C等人,Anal Biochem 355:102-9(2006);Touloupakis E等人,FEBS J 273:2684-92(2006);Hou X等人,BMC Struct Biol 7:29(2007);Meyer A等人,Biochem Biophys Res Commun 364:195-200(2007);Ruggiero A等人, Protein Pept Lett 14:97-100(2007);Wang T等人,Amino Acids 34:239-43(2008))。

[0293] 在相思豆毒蛋白的A亚基中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-74、酪氨酸-113、谷氨酸-164、精氨酸-167和色氨酸-198(Hung C等人,Eur J Biochem 219:83-7(1994);Chen J等人, Protein Eng 10:827-33(1997);Xie L等人,Eur J Biochem 268:5723-33(2001))。

[0294] 在charybdin中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,缬氨酸-79、酪氨酸-117、谷氨酸-167和精氨酸-170(Touloupakis E等人,FEBS J 273:2684-92(2006))。

[0295] 在辛纳毒蛋白的A亚基中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-75、酪氨酸-115、谷氨酸-167、精氨酸-170和色氨酸-201(Hung C等人,Eur J Biochem 219:83-7(1994);Chen J等人,Protein Eng 10:827-33(1997))。

[0296] 在八棱丝瓜蛋白中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-70、谷氨酸-85、酪氨酸-110、谷氨酸-159和精氨酸-162 (Hou X等人,BMC Struct Biol 7:29(2007))。

[0297] 在丝瓜素中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-71、谷氨酸-86、酪氨酸-111、谷氨酸-160和精氨酸-163(Ma Q等人,Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56:185-6(2000))。

[0298] 在玉米RIP中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-79、酪氨酸-115、谷氨酸-167、精氨酸-170和色氨酸-201 (Robertus J,Monzingo A,Mini Rev Med Chem 4:477-86(2004);Yang Y等人,J Mol Biol 395:897-907(2009))。

[0299] 在PD-L中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如, PDL-1中的酪氨酸-72、酪氨酸-122、谷氨酸-175、精氨酸-178和色氨酸 -207(Ruggiero A等人,Biopolymers 91:1135-42(2009))。

[0300] 在槲寄生RIP的A亚基中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-66、苯丙氨酸-75、酪氨酸-110、谷氨酸-159、精氨酸-162、谷氨酸-166、精氨酸-169和色氨酸-193(Langer M等人,Biochem Biophys Res Commun 264:944-8(1999);Mishra V等人,Act Crystallogr D Biol Crystallogr 60:2295-2304(2004);Mishra V等人,J Biol Chem 280: 20712-21(2005);Wacker R等人,J Pept Sci 11:289-302(2005))。

[0301] 在美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)中,存在几个对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,赖氨酸-48、酪氨酸-49、精氨酸-67、精氨酸-68、天冬酰胺-69、天冬酰胺-70、酪氨酸-72、苯丙氨酸-90、天冬酰胺-91、天冬氨酸盐-92、精氨酸-122、酪氨酸-123、谷氨酸-176、精氨酸-179、色氨酸 -208和赖氨酸-210(Rajamohan F等人,J Biol Chem 275:3382-90(2000); Rajamohan F等人,Biochemistry 40:9104-14(2001))。

[0302] 在蓖麻毒蛋白的A链中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,精氨酸-48、酪氨酸-80、天冬酰胺-122、酪氨酸-123、谷氨酸-177、精氨酸-180、丝氨酸-203、天冬酰胺-209、色氨酸-211、甘氨酸-212、精氨酸-213、丝氨酸-215和异亮氨酸-252(Frankel A等人,Mol Cell Biol 9:415-20(1989);Schlossman D等人,Mol Cell Biol 9:5012-21(1989);Gould J等人,Mol Gen Genet 230:91-90(1991);Ready M等人, Proteins 10:270-8(1991);Rutenber E等人,Proteins 10:240-50(1991);Monzingo A,Robertus,J,J Mol Biol 227:1136-45(1992);Day P等人,Biochemistry 35:11098-103(1996);Marsden C等人,Eur J Biochem 27: 153-62(2004);Pang Y等人,PLoS One 6:e17883(2011))。在蓖麻毒蛋白中,存在几个已知当被删除时会损害蓖麻毒蛋白的催化活性的氨基酸残基,例如,N24、F25、A28、V29、Y81、V82、V83、G84、E146、 E147、A148、I149、S168、F169、I170、I171、C172、I173、Q174、 M175、I176、S177、E178、A179、A180、R181、F182、Q183、Y184、D202、P203、I206、T207、N210、S211、W212和G213(Munishkin A,Wool I,J Biol Chem 270:30581-7(1995);Berrondo M,Gray J,Proteins 79: 2844-60(2011))。

[0303] 在肥皂草毒蛋白中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-16、酪氨酸-72、酪氨酸-120、谷氨酸-176、精氨酸 -179和色氨酸-208(Bagga S等人,J Biol Chem 278:4813-20(2003);Zarovni N等人,Canc Gene Ther 14:165-73(2007);Lombardi A等人,FASEB J 24:253-65(2010))。另外,可以包括信号肽以减小催化活性(Marshall R等人, Plant J 65:218-29(2011))。

[0304] 在天花粉蛋白中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-70、酪氨酸-111、谷氨酸-160、精氨酸-163、赖氨酸 -173、精氨酸-174、赖氨酸-177和色氨酸-192(Wong等人,Eur J Biochem 221:787-91(1994);Li等人,Protein Eng 12:999-1004(1999);Yan等人,Toxicon 37:961-72(1999);Ding等人,Protein Eng 16:351-6(2003);Guo Q等人,Protein Eng 16:391-6(2003);Chan D等人,Nucleic Acid Res 35:1660-72(2007))。

[0305] 真菌核糖体毒素酶促地靶向与RIP家族的成员相同的普遍保守的SRL 核糖体结构,且大多数真菌核糖体毒素共享RNA酶T1型催化结构域序列和二级结构(Lacadena J等人,FEMS Microbiol Rev 31:212-37(2007))。大多数真菌核糖体毒素和有关的酶共享三个高度保守的氨基酸残基(用于催化)、两个组氨酸残基和一个谷氨酸残基(例如RNA酶T1中的组氨酸-40、谷氨酸-58和组氨酸-92)。DSKKP基序(SEQ ID NO:135)经常存在于真菌核糖体毒素中以特异性结合SRL(Kao R,Davies J,J Biol Chem 274:12576-82(1999))。因为真菌核糖体毒素催化结构域是可重叠的,使用技术人员已知的一种或多种序列比对方法,可以在未研究的和/或新的真菌核糖体毒素中预测催化活性所需的氨基酸残基。

[0306] 对于Aspf1,16个氨基酸残基(位置7-22)的内部删除严重地损害它的核糖核酸裂解活性和细胞毒性(Garcià-Ortega L等人,FEBS J 272:2536-44 (2005))。

[0307] 在丝林霉素中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,天冬酰胺-7、组氨酸-49、谷氨酸-95、赖氨酸-111、精氨酸-120和组氨酸-136(Kao R等人,Mol Microbiol 29:1019-27(1998);Kao R,Davies J,FEBS Lett 466:87-90(2000))。

[0308] 在局限曲菌素中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,酪氨酸-47、组氨酸-49、谷氨酸-95、赖氨酸-110、赖氨酸 -111、赖氨酸-113、精氨酸-120和组氨

酸-136(Nayak S,Batra J, Biochemistry 36:13693-9(1997);Nayak S等人,Biochemistry 40:9115-24(2001);Plantinga M等人,Biochemistry 50:3004-13(2011))。

[0309] 在α-帚曲毒蛋白中,存在几个已知对于催化活性而言重要的氨基酸残基,例如,色氨酸-48、组氨酸-49、组氨酸-50、色氨酸-51、天冬酰胺 -54、异亮氨酸-69、谷氨酸-95、谷氨酸-96、赖氨酸-11、赖氨酸-112、赖氨酸-114、精氨酸-121、组氨酸-136、组氨酸-137、赖氨酸-145(Lacadena J等人,Biochem J 309:581-6(1995);Lacadena J等人,Proteins 37:474-84(1999);Martínez-Ruiz A等人,Toxicon 37:1549-63(1999);de Antonio C等人,Proteins 41:350-61(2000);Masip M等人,Eur J Biochem 268:6190-6 (2001))。

[0310] 通过突变或截短可以改变、减少或消除志贺毒素家族成员的A亚基的细胞毒性。已经证实标记为酪氨酸-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的催化活性而言是重要的 (Hovde C等人,Proc Natl Acad Sci USA 85:2568-72(1988);Deresiewicz R 等人,Biochemistry 31:3272-80(1992);Deresiewicz R等人,Mol Gen Genet241:467-73(1993);Ohmura M等人,Microb Pathog 15:169-76(1993);Cao C等人,Microbiol Immunol 38:441-7(1994);Suhan M,Hovde C,Infect Immun 66:5252-9(1998))。在无细胞核糖体灭活测定中将谷氨酸-167和精氨酸-170突变会消除Slt-I A1的酶活性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。在使用内质网中Slt-I A1的从头表达的另一个方案中,将谷氨酸-167和精氨酸-170突变会在该表达水平消除Slt-I A1片段细胞毒性(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。截短分析证实,StxA的残基75-268的片段仍然保留显著的体外酶活性(Haddad,J Bacteriol 175: 4970-8(1993))。通过细胞溶胶中的从头表达,含有残基1-239的Slt-I A1 的截短片段显示出显著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,因为它不能逆转移至细胞溶胶(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。

[0311] 在志贺毒素A亚基中对酶活性和/或细胞毒性而言最关键的残基被映射至以下残基位置: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等(Di,Toxicon 57:535-39(2011))。具体地,含有谷氨酸-E167-至-赖氨酸和精氨酸-176-至-赖氨酸突变的Stx2A 的双突变构建体被完全灭活;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,将Stx1A截短至1-239或1-240会降低它的细胞毒性,并且类似地,将Stx2A截短至保守疏水残基会降低它的细胞毒性。在志贺毒素A亚基中对于结合真核核糖体和/或真核核糖体抑制而言最关键的残基已经映射至以下残基-位置: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等(McCluskey A等人, PLoS One 7:e31191(2012)。

[0312] 志贺样毒素1A亚基截短体是催化活性的,能够在体外酶促灭活核糖体,并且当在细胞内表达时是细胞毒性的(LaPointe,J Biol Chem 280: 23310-18(2005))。表现出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))。尽管据报道保留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(Al-Jaufy,Infect Immun 62:956-60(1994)),在真核细胞内从头表达的StxA截短体仅需要直到残基240以到达细胞溶胶并且造成核糖体的催化灭活(LaPointe,J Biol Chem 280:23310-18(2005))。

[0313] 在从SLT-1A(SEQ ID NO:1)或StxA(SEQ ID NO:2)来源的本发明的 CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽s和/或细胞靶向分子的某些实施方案中,这些变化包括位置 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 处的谷氨酸、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。对于技术人员而言,基于现有技术,这种置换的例子将是已知的,诸如位置75处的天冬酰胺置换为丙氨酸、位置77处的酪氨酸置换为丝氨酸、位置114处的酪氨酸置换为丝氨酸、位置167处的谷氨酸置换为谷氨酸、位置170处的精氨酸置换为丙氨酸、位置176处的精氨酸置换为赖氨酸、和/或位置203处的色氨酸置换为丙氨酸。增强或减小志贺毒素酶活性和/或细胞毒性的其它突变是在本发明范围内,且可以使用本文中公开的众所周知的技术和测定来确定。

[0314] 本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或细胞靶向分子可以任选地缀合至一种或多种另外的试剂,所述另外的试剂可以包括本领域已知的治疗剂和/或诊断剂,包括如本文中所述的这样的试剂。

[0315] V.本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的一般功能和包含它们的靶向细胞的分子

[0316] 本发明描述了多种CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,所述多肽可以用作多种物质组合物(诸如靶向细胞的细胞毒性分子和诊断组合物)的组分。具体地,CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽具有作为多种蛋白治疗剂(例如,免疫毒素和配体-毒素融合物)的组分的用途,所述蛋白治疗剂用于特定细胞类型的靶向杀死用于治疗多种疾病,包括癌症、免疫病症和微生物感染。

[0317] 通过添加细胞靶向部分,可以将本发明的任何CD8+ T-细胞超免疫化的多肽工程改造成潜在有用的、治疗性的、靶向细胞的分子,所述细胞靶向部分靶向细胞内化至脊索动物(例如,两栖动物、鸟、鱼、哺乳动物、爬行动物或鲨鱼)内的特定细胞类型。类似地,通过添加细胞靶向部分,可以将本发明的任何B-细胞表位去免疫化的多肽工程改造成潜在有用的、治疗性的、靶向细胞的分子,所述细胞靶向部分靶向细胞内化至脊索动物内的特定细胞类型。本发明提供了多种细胞毒性的细胞靶向分子,其包含在功能上与结合区域结合的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+T-细胞去免疫化的多肽以实现细胞靶向,使得细胞毒性的细胞靶向分子选择性地递送T-细胞表位、杀死特定细胞类型、抑制特定细胞类型的生长、将外源物质递送给特定细胞类型和/或检测特定细胞类型。该系统是模块化的,因为任何数目的不同结合区域可以用于给不同细胞类型靶向本发明的任何CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,包括。

[0318] MHC I类复合物对T-细胞免疫原性表位肽的呈递靶向呈递细胞用于通过CTL介导的细胞裂解进行杀死。通过将MHC I类肽工程改造成靶细胞-内化治疗剂的蛋白酶体递送效应物多肽组分,可以通过利用脊椎动物靶细胞的内源性MHC I类途径完成靶向递送和免疫刺激性抗原的呈递。靶向细胞对免疫刺激性非自身抗原(例如,已知的具有高免疫原性的病毒表位-肽)的呈递可以给其它免疫细胞发出破坏靶细胞的信号并募集更多的免疫细胞到生物体内的靶细胞位置。

[0319] 因而,使用本发明的方法可以将已经有细胞毒性分子(例如包含细胞毒性的毒素效应物区域的潜在治疗剂)工程改造成更有细胞毒性分子和/ 或具有通过效应物T-细胞运

行的另外细胞毒性机制。这些多种细胞毒性机制可以彼此补偿(诸如通过提供直接靶细胞杀死和间接(CTL-介导的)细胞杀死、冗余地彼此支持(诸如在没有其它存在下提供一种细胞杀死机制)和/ 或保护免于治疗剂抗性的发展(通过将抗性限于恶性的或受感染的细胞演化的更少可能的情形,以同时阻断两种不同的细胞杀死机制)。

[0320] 另外,通过嵌入T-细胞表位和灭活母体分子的酶活性(用嵌入的T- 细胞表位或独立地通过其它方式诸如突变或截短),可以将其细胞毒性依赖于毒素和/或酶促区域的亲本细胞毒性分子工程改造成为仅通过T-细胞表位细胞溶质递送和呈递而具有细胞毒性。该方案会在添加另一种细胞毒性机制的同时除去一种细胞毒性机制,并向局部区域添加免疫刺激的能力。此外,通过在母体分子的酶促结构域中嵌入T-细胞表位使得产生异源T-细胞表位的序列变化减少或消除酶活性,可以将其细胞毒性依赖于毒素和/或酶促区域的亲本细胞毒性分子工程改造成为仅通过T-细胞表位细胞溶质递送和呈递而具有细胞毒性。这允许将酶促细胞毒性的分子(其具有内化进细胞中并按路线发送至细胞溶胶的能力)一步修饰成无酶促活性的、细胞毒性分子,其依赖于T-细胞表位蛋白酶体递送和呈递来实现细胞毒性和局部的免疫刺激。

[0321] A.用于细胞表面上的MHC I类呈递的T-细胞表位的递送

[0322] 本发明的某些CD8+ T-细胞超免疫化的多肽和细胞靶向分子的一种功能是递送一个或多个T-细胞表位用于细胞的MHC I类呈递。外源T-细胞表位肽向靶细胞的MHC I类系统的递送可以用于诱导靶细胞呈递与细胞表面上的MHC I类分子结合的T-细胞表位肽,这随后导致CD8+效应物 T-细胞的活化以攻击靶细胞。

[0323] 本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽和细胞靶向分子的某些实施方案能够将一个或多个T-细胞表位递送至靶细胞的蛋白酶体。递送的T-细胞表位然后被蛋白水解加工和通过靶细胞的外表面上的MHC I类途径而呈递。

[0324] 本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽和细胞靶向分子的这些T-细胞表位呈递功能的应用是巨大的。哺乳动物生物体中的每个有核细胞可以能够在它们的细胞外表面上进行与MHC I类分子形成复合物的免疫原性T- 细胞表位肽的MHC I类途径呈递。另外,T-细胞表位识别的敏感性如此精密,以致于仅需要呈递几个MHC-I肽复合物—即使单个复合物的呈递可以足以被效应物T-细胞识别(Sykulev Y等人,Immunity 4:565-71(1996))。

[0325] 为了使异源T-细胞表位呈递在靶细胞表面上,递送异源T-细胞表位- 肽的多肽必须被靶细胞中的蛋白酶体降解,使得包含T-细胞表位的肽片段产生并被运输至ER的腔用于加载到MHC I类分子上。

[0326] 另外,CD8+ T-细胞超免疫化的多肽必须首先到达靶细胞的内部,并然后与靶细胞中的蛋白酶体发生接触。为了将本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽递送至靶细胞的内部,本发明的细胞靶向分子必须能够靶细胞内化。一旦本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽被内化为细胞靶向分子的组分,CD8+ T-细胞超免疫化的多肽通常保留在早期内体区室(例如,内吞囊泡)中。CD8+ T-细胞超免疫化的多肽然后必须与至少一个完整的、异源T-细胞表位一起到达靶细胞的蛋白酶体。

[0327] 通过本领域技术人员已知的多种标准方法,可以检测和监测这些功能。例如,使用多种体外和体内测定,包括,例如,MHC I类/肽复合物的直接检测/可视化、测量异源T-细胞表位肽对MHC I类分子的结合亲合力和/或通过监测CTL应答测量靶细胞上的MHC I类-表位

肽复合物呈递的功能后果,可以研究本发明的靶向细胞的分子递送T-细胞表位肽并驱动靶细胞的MHC I类系统对表位肽的呈递的能力。

[0328] 用于监测本发明的多肽和分子的这种功能的某些测定涉及在体外或离体直接检测特定MHC I类/肽抗原复合物。用于肽-MHC I类复合物的直接可视化和定量的常见方法涉及技术人员已知的多种免疫检测试剂。例如,可以开发特异性的单克隆抗体来识别特定MHC/I类/肽抗原复合物 (Porgador A等人,Immunity 6:715-26(1997))。类似地,可溶性的多聚体T 细胞受体诸如TCR-STAR试剂(Altor,Mirmar,FL,U.S.)可以用于直接显示或量化特定MHC I/抗原复合物(Zhu X等人,J Immunol 176:3223-32(2006))。这些特异性的mAb或可溶性的多聚体T-细胞受体可以与多种检测方法(包括、例如免疫组织化学、流式细胞计量术和酶联免疫测定 (ELISA))一起使用。

[0329] 用于直接鉴别和定量MHC I/肽复合物的一种替代方法涉及质谱法分析,例如,ProPresent Antigen Presentation Assay(ProImmune,Inc., Sarasota,FL,U.S.),其中从细胞表面提取肽-MCH I类复合物,然后通过测序质谱法纯化和鉴别所述肽(Falk K等人,Nature 351:290-6(1991))。

[0330] 用于监测本发明的多肽和分子的T-细胞表位递送和MHC I类呈递功能的某些测定涉及计算和/或实验方法以监测MHC I类和肽结合和稳定性。几种软件程序可供技术人员使用,用于预测表位肽对MHC I类等位基因的结合应答,例如,The Immune Epitope Database and Analysis Resource (IEDB)Analysis Resource MHC-I结合预测Consensus tool(Kim Y等人,Nucleic Acid Res 40:W525-30(2012)。几种实验性测定已经常规地应用,例如,细胞表面结合测定和/或表面等离子体共振测定,以定量和/或对比结合动力学(Miles K等人,Mol Immunol 48:728-32(2011))。另外,已经开发了其它MHC-肽结合测定(例如,来自ProImmmune,Inc.的MHC-肽结合测定),与已知的对照对比,其基于肽的稳定给定MHC I类等位基因的三元 MHC-肽复合物的能力的量度。

[0331] 可替换地,通过监测对特定复合物的细胞毒性T细胞(CTL)应答,可以执行细胞表面上的MHC I类/肽抗原复合物呈递的后果的测量。这些测量包括用MHC I类四聚体或五聚体试剂直接标记CTL。四聚体或五聚体直接结合以特定特异性的T细胞受体,取决于主要组织相容性复合物 (MHC)等位基因和肽组合。另外,通常测定ELISA或酶联免疫斑点(ELIspot) 对释放的细胞因子(诸如干扰素γ或白介素)的定量以鉴别特定CTL应答。使用许多测定,包括经典的51铬(Cr)释放测定或替代性的非放射性的细胞毒性测定(例如,CytoTox96® 非放射性的试剂盒和 CellTox™CellTiter-GLO® 试剂盒,可得自Promega Corp.,Madison,WI, U.S.)、Granzyme B ELISpot、Caspase Assays或LAMP-1易位流式细胞计数测定,可以测量CTL的细胞毒性能力。为了特异性地监测靶细胞的杀死,二乙酸羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE)可以用于容易地和快速地标记目标细胞群体用于体外或体内研究以监测表位特异性的CSFE标记的靶细胞的杀死(Durward M等人,J Vis Exp 45 pii 2250(2010))。

[0332] 可以如下跟踪对MHC I类呈递的体内应答:施用MHC I类/抗原促进剂(例如,肽、蛋白或灭活的/减弱的病毒疫苗),然后用活性剂(例如病毒) 攻击,并监测对该试剂的应答,典型地与未接种疫苗的对照进行对比。用与前述的那些(例如CTL细胞毒性测定和细胞因子释放的定量)类似的方法,可以针对CTL活性监测离体样品。

[0333] 使用免疫亲和力(例如,抗-MHC抗体“下拉”纯化)从裂解以后的中毒细胞分离HLA-A、HLA-B和/或HLA-C分子,并从纯化的复合物回收有关的肽(即,分离的MHC分子呈递的肽)。通过测序质谱法分析回收的肽。将质谱法数据与蛋白数据库文库进行对比,所述蛋白数据库文库由外源(非自身)肽(T-细胞表位X)的序列和国际人类蛋白索引(代表“自身的”或非免疫原性的肽)组成。根据概率数据库,将所述肽按照重要性排序。将所有检测的抗原(非自身)肽序列列出。通过检索乱序诱饵数据库来验证数据以减少伪命中(参见例如Ma B, Johnson R,Mol Cell Proteomics 11:O111.014902 (2012))。结果证实,来自T-细胞表位X的肽在MHC复合物中呈递到中毒靶细胞的表面上。

[0334] 由于表达的抗原-特异性的HLA分子,呈递的肽-抗原-MHC复合物的集合可以在细胞之间变化。T-细胞然后可以使用具有不同抗原特异性的不同TCR分子识别在细胞表面上展示的特定肽-抗原-MHC复合物。

[0335] 因为本发明的靶向细胞的分子可以递送多个T-细胞表位,例如,通过将两个或更多个不同的T-细胞表位嵌入在单个蛋白酶体递送效应物多肽中,所以本发明的单个靶向细胞的分子可以在具有不同MHC类别变体的相同物种的脊索动物中(例如,在具有不同HLA等位基因的人类中)是有效的。这可能允许基于MHC复合物蛋白多样性和多态性在不同的受试者亚群中同时组合具有不同有效性的不同T-细胞表位(参见例如Yuhki N 等人,J Hered 98:390-9(2007))。例如,人MHC复合物蛋白、HLA蛋白基于遗传世系在人类中变化,例如非洲人(亚撒哈拉)、美国印第安人、高加索人、蒙古人、新几内亚人和澳大利亚人或太平洋岛人(参见例如Wang M, Claesson M,Methods Mol Biol 1184:309-17(2014))。

[0336] T-细胞应答的活化是某些抗癌、抗赘生物、抗肿瘤和/或抗-微生物生物药物的期望特征,以刺激患者自身的针对靶向细胞的免疫系统。稳健的和强烈的T-细胞应答的活化也是许多疫苗的期望特征(Aly HA,J Immunol Methods 382:1-23(2012))。生物体内靶细胞对T-细胞表位的呈递可以导致针对生物体靶细胞和/或它的一般场所的稳健免疫应答的活化。因而,可以利用用于呈递的T-细胞表位的靶向递送来工程改造治疗方案期间T-细胞应答的活化。

[0337] B.通过靶向细胞毒性和/或CTL募集实现的细胞杀死

[0338] 包含本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的、本发明的细胞靶向分子可以提供:1)细胞类型特异性的 T-细胞-表位递送用于MHC I类呈递,和2)有效的细胞毒性。另外,本发明的细胞靶向分子的某些实施方案还提供了去免疫化,这会降低当施用给哺乳动物时某些免疫应答的可能性。

[0339] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,在接触与细胞靶向部分的细胞外靶生物分子(例如靶向细胞的结合区域)物理上连接的细胞时,本发明的细胞靶向分子能够造成所述细胞的死亡。细胞杀死的机制可以是直接的(例如通过毒素效应物区域的酶活性)或间接的(通过CTL介导的细胞裂解),且可以在改变的靶细胞条件下,诸如离体操纵的靶细胞、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。

[0340] 1.通过T-细胞表位递送和MHC I类呈递实现的间接细胞杀死

[0341] 本发明的递送T-细胞表位的、CD8+ T-细胞超免疫化的多肽(经过或未经过B-细胞表位去免疫化)可以用作细胞靶向分子的组分用于间接细胞杀死。本发明的细胞靶向分子的某些实施方案是细胞毒性的,因为它们包含本发明的CD8+ T-细胞表位呈递多肽,所述多

肽在细胞靶向分子的靶标内化后将一个或多个T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类呈递途径。

[0342] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,在接触与细胞靶向部分的细胞外靶生物分子(例如靶向细胞的结合区域)物理上连接的细胞时,本发明的细胞靶向分子能够间接地造成所述细胞的死亡,例如,通过靶细胞对一个或多个T-细胞表位的呈递和随后CTL的募集。

[0343] 2.通过靶向细胞的毒素细胞毒性实现的直接细胞杀死

[0344] 本发明的递送T-细胞表位的、CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的多肽可以用作细胞靶向分子的组分用于直接细胞杀死。

[0345] 因为许多天然存在的毒素适合杀死真核细胞,使用毒素来源的、蛋白酶体递送效应物区域设计的细胞毒性蛋白可以表现出有效的细胞杀死活性。具体地,蛋白酶体递送效应物区域也可以包含核糖体毒性的毒素效应物多肽。但是,预见到其它毒素效应物区域用在本发明的细胞靶向分子中,例如,来自并非催化地灭活核糖体、而是由于其它机制而具有细胞毒性的毒素的多肽。例如,cholix毒素、热不稳定的肠毒素、和百日咳毒素异源三聚体G蛋白通过攻击Gsα亚基。

[0346] ABx毒素超家族的许多成员的A亚基包含一旦进入细胞的细胞溶胶中就能够杀死真核细胞的酶促结构域。用多种ABx毒素来源的、包含毒素酶促结构域的多肽内的T-细胞表位替代B-细胞表位,不会显著地改变它们的酶活性。因而,本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的多肽可以潜在地提供两种细胞杀死机制。

[0347] 本发明的细胞靶向分子的某些实施方案是细胞毒性的,因为它们包含本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,所述多肽包含有活性的毒素组分。

[0348] 在本发明的细胞靶向分子的某些实施方案中,在接触与细胞靶向部分的细胞外靶生物分子(例如靶向细胞的结合区域)物理上连接的细胞时,本发明的细胞靶向分子能够直接地造成所述细胞的死亡,例如,通过毒素效应物区域的酶活性。

[0349] C.去免疫化会改善涉及施用给哺乳动物的应用

[0350] 本发明的多肽和细胞靶向分子作为治疗剂和/或诊断剂施用给哺乳动物物种具有改善的有用性,因为降低了在哺乳动物中产生不希望的免疫应答的可能性,同时增加了在哺乳动物中产生合乎需要的免疫应答的可能性。

[0351] 本发明的某些CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的毒素来源的多肽当施用给不同哺乳动物时可能在它们的抗原性谱方面存在差异,但是预期具有降低的B-细胞和/或CD4+ T-细胞抗原性和/或免疫原性。在某些实施方案中,在破坏B-细胞表位和添加CD8+ T- 细胞表位以后,在本发明的多肽中保留了去免疫化的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽的来源原始毒素多肽的期望生物学功能。另外,B-细胞表位经常与成熟的CD4+ T-细胞的表位一致或重叠,从而破坏B-细胞表位,经常同时破坏CD4+ T-细胞表位。

[0352] D.在细胞类型之间的选择性细胞毒性

[0353] 本发明的某些细胞靶向分子用于在有未靶向的旁观者细胞存在下选择性地杀死特定靶细胞。通过将免疫原性T-细胞表位的递送靶向靶细胞的 MHC I类途径,随后的T-细胞表位呈递和本发明的细胞靶向分子诱导的、CTL介导的靶细胞的细胞裂解可以限于在有

未靶向的细胞存在下优先杀死选择的细胞类型。另外,不同毒素效应物区域的有效细胞毒性活性对靶细胞的杀死可以限于用免疫原性T-细胞表位和细胞毒性的毒素效应物多肽的同时递送优先杀死靶细胞。

[0354] 在某些实施方案中,在将本发明的细胞靶向分子施用给细胞类型的混合物后,细胞靶向分子能够相对于与细胞外靶生物分子没有物理上连接的细胞类型选择性地杀死与细胞外靶生物分子物理上连接的那些细胞。因为许多毒素(例如,ABx和核糖体毒素家族的成员)适合用于杀死真核细胞,使用毒素效应物区域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毒素效应物区域的递送靶向特定细胞类型,该有效的细胞杀死活性可以限于仅杀死希望通过它们与选择的结合区域的靶生物分子的物理结合而靶向的那些细胞类型。

[0355] 在某些实施方案中,本发明的细胞毒性的细胞靶向分子能够选择性地或优先地造成两个或更多个不同细胞类型的混合物内的特定细胞类型的死亡。这能够实现与不表达靶生物分子的“旁观者”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。可替换地,如果靶生物分子以足够低的量表达和/或以小量与未靶向的细胞类型物理上连接,结合区域的靶生物分子的表达可以非专属于一种细胞类型。这能够实现与不表达显著量的靶生物分子或没有与显著量的靶生物分子物理上连接的“旁观者”细胞类型相比高优先的对特定细胞类型的靶向细胞杀死,诸如3倍细胞毒性效应。

[0356] 在某些其它实施方案中,在将细胞毒性的细胞靶向分子施用给两个不同的细胞类型群体后,细胞毒性的细胞靶向分子能够造成细胞死亡,如通过靶细胞群体(其成员表达细胞毒性蛋白的结合区域的细胞外靶生物分子)上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域的细胞外靶生物分子的细胞群体的CD_{50}剂量低至少3倍。

[0357] 在某些实施方案中,对与细胞外靶生物分子物理上连接的细胞类型的群体的细胞毒性活性是没有与结合区域的任何细胞外靶生物分子物理上连接的细胞类型群体的细胞毒性活性的至少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)对与结合区域的靶生物分子物理上连接的特定细胞类型的细胞群体的细胞毒性,除以(b)对没有与结合区域的靶生物分子物理上连接的细胞类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域的靶生物分子物理上连接的细胞群体或细胞类型,对与结合区域的靶生物分子物理上连接的细胞群体或细胞类型的选择性的细胞毒性高至少3倍、5倍、10 倍、15倍、20倍、25倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍、250倍、 500倍、750倍或1000倍。

[0358] 该优先细胞杀死功能允许本发明的某些细胞毒性的细胞靶向分子在不同条件下和在有非靶向的旁观者细胞(诸如离体操纵的细胞类型的混合物、体外培养的含有细胞类型混合物的组织)存在下、或在体内在有多个细胞类型存在下(例如原位或在多细胞生物体内的天然位置)杀死靶向细胞。

[0359] E.另外的外源物质向靶向细胞的内部的递送

[0360] 除了细胞毒性和细胞生长抑制应用以外,本发明的细胞靶向分子任选地可以用于信息收集和诊断功能。此外,本发明的细胞毒性的细胞靶向分子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生物分子物理上连接

的细胞和/或标记所述细胞。本发明的用于接收外源物质的细胞靶向分子可以靶向表达靶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,因为不同的毒素效应物区域和另外的外源物质可以连接至不同的结合区域以提供不同的应用,诸如肿瘤细胞的非侵袭性体内成像。

[0361] 因为本发明的细胞靶向分子(包括其无毒形式)能够进入与细胞外靶生物分子(其被细胞靶向分子的结合区域识别)物理上连接的细胞中,本发明的细胞靶向分子的某些实施方案可以用于将另外的外源物质递送进靶向细胞类型的内部。在一个意义上,本发明的整个细胞靶向分子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靶向分子本身连接、但是除此以外的异源物质。在T-细胞表位添加以后变成无毒的CD8+ T- 细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽仍然可以用于将外源物质递送进细胞中(例如T-细胞表位替换对于毒素效应物区域的催化功能而言关键性的重叠氨基酸残基)。

[0362] 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。

[0363] 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、在癌症中异常地表达的蛋白、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。

[0364] F.用于诊断功能的信息收集

[0365] 本发明的某些靶向细胞的分子用在特定细胞、细胞类型和/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)对毒素效应物区域的催化灭活,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、本发明的细胞毒性的靶向细胞的分子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。

[0366] 将本领域已知的检测促进剂与本发明的各种靶向细胞的分子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,本发明的靶向细胞的分子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(例如内吞区室、高尔基区室、内质网区室和细胞溶质区室)的成像,本发明的靶向细胞的分子的诊断实施方案可以用于信息收集。

[0367] 使用本发明的靶向细胞的分子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。

[0368] 例如,使用用本发明的靶向细胞的分子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的、靶向细胞的分子的无毒诊断变体区分哪些患者属于预期对本发明的相同靶向细胞的分子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CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的靶向细胞的分子(包括本发明的细胞毒性的、靶向细胞的分子的无毒变体)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。

[0369] VII.本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的生产、制备和纯化以及包含它们的细胞靶向分子

[0370] 使用本领域技术人员众所周知的生化工程技术,可以生产本发明的 CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和细胞靶向分子。例如,通过标准合成方法、通过使用重组表达系统或通过任意其它合适的方法,可以制备本发明的多肽和靶向细胞的分子。因而,可以以许多方式合成本发明的多肽和靶向细胞的蛋白,所述方式包括、例如包括以下步骤的方法:(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,并且分离和纯化最终的肽化合物产物; (2)在宿主细胞中表达编码本发明的靶向细胞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)进行编码本发明的靶向细胞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(1)、(2)或(3)的方法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)以获得肽组分,并且回收所述肽组分。

[0371] 可能优选的是,借助于固相或液相肽合成,合成本发明的靶向细胞的蛋白的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽或蛋白或多肽组分。可以适当地通过标准合成方法生产本发明的多肽和靶向细胞的分子。因而,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。在该背景下,可以参考WO 1998/11125,或尤其是Fields G等人,Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (Synthetic Peptides,Grant G,编,Oxford University Press,U.K.,第2版, 2002)以及其中的合成实施例。

[0372] 使用本领域众所周知的重组技术,可以制备(生产和纯化)本发明的 CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和细胞毒性的、靶向细胞的蛋白。一般而言,通过培养用包含编码多核苷酸的载体转化或转染的宿主细胞并且从细胞培养物中回收多肽来制备所述多肽的方法被描述于,例如Sambrook J等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,U.S.,1989);Dieffenbach C等人,PCR Primer:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press,N.Y.,U.S.,1995)。任意合适的宿主细胞可以用于生产本发明的多肽和/或靶向细胞的蛋白。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

稳定地或瞬时地转染、转化、转导或感染的细胞。此外,通过修饰编码本发明的多肽或靶向细胞的蛋白的多核苷酸,可以生产本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/ 或靶向细胞的蛋白,所述修饰导致改变一个或多个氨基酸或者删除或插入一个或多个氨基酸,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和/或改变的血清半衰期。

[0373] 存在多种可以选择用来生产本发明的多肽或靶向细胞的蛋白的表达系统。例如,用于表达本发明的靶向细胞的蛋白的宿主生物包括:原核生物,诸如大肠杆菌(E.coli)和枯草芽孢杆菌(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(如莱茵衣藻(C.reinhardtii)),昆虫细胞系,哺乳动物细胞(如CHO细胞),植物细胞系,和真核生物诸如转基因植物(如拟南芥(A.thaliana) 和本赛姆氏烟草(N.benthamiana))。

[0374] 因此,本发明还提供了根据以上所述方法并且使用编码本发明的多肽的部分或全部或本发明的靶向细胞的蛋白的多肽组分的多核苷酸、包含当被引入到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来生产本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的多肽和/或靶向细胞的蛋白的方法。

[0375] 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,从其它组分诸如宿主细胞因子中分离(或纯化)出期望的多肽或蛋白,从而获得高纯度的或基本均质的制品。纯化可以通过本领域众所周知的方法完成,诸如离心技术、萃取技术、色谱和分级分离技术(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、疏水相互作用色谱法、反相色谱法、在硅胶或阳离子交换树脂诸如DEAE等上的色谱法、色谱聚焦、和蛋白A琼脂糖色谱法,以除去污染物),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可以用于增加本发明的CD8+T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或靶向细胞的分子的纯度。在某些实施方案中,本发明的多肽和靶向细胞的分子可以任选地以同多聚体形式(即,两个或更多个相同的本发明的多肽或靶向细胞的分子的蛋白复合物)纯化。

[0376] 在下面的实施例中是用于生产本发明的多肽或靶向细胞的分子的方法的非限制性实施例的描述,以及本发明的示例性靶向细胞的分子的生产的具体的、但是非限制性的方面。

[0377] VIII.包含本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的药物和诊断组合物或包含它们的细胞靶向分子

[0378] 本发明提供了多肽和蛋白,其单独地或与一种或多种另外的治疗剂组合地在药物组合物中用于治疗或预防以下更详细地描述的病患、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)。本发明还提供了药物组合物,其包含本发明的多肽或靶向细胞的分子或根据本发明的其药学上可接受的盐或溶剂合物,以及至少一种药学上可接受的载体、赋形剂或媒介物。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细胞靶向分子的同多聚体和/或异多聚体形式。所述药物组合物将可用在治疗、改善、或预防以下更详细地描述的疾病、病患、病症或症状的方法中。预期每种

这样的疾病、病患、病症或症状是就根据本发明的药物组合物的应用而言的单独实施方案。本发明还提供了用在至少一种如以下更详细地描述的根据本发明的治疗方法中的药物组合物。

[0379] 本文中使用的术语“患者”和“受试者”互换使用以表示表现出至少一种疾病、病症或病患的症状、征象和/或指征的任何生物体,通常是脊椎动物诸如人类和动物。这些术语包括哺乳动物诸如灵长类动物、家畜动物(例如牛、马、猪、绵羊、山羊等)、伴侣动物(例如猫、狗等)和实验动物(例如小鼠、兔、大鼠等)的非限制性例子。

[0380] 本文中使用的“治疗”或“处理”及其语法变体表示用于获得有益的或期望的临床结果的方案。该术语可以表示延缓病患、病症或疾病的发作或发展速度,减轻或缓解与其有关的症状,产生病患的全部或部分消退,或者以上任何的一些组合。为了本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括、但不限于:症状的减轻或缓解、疾病程度的降低、疾病状态的稳定(例如不恶化)、疾病进展的推迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及康复(无论是部分的还是完全的),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”或“处理”还可以是指相对于在不接受治疗的情况下预期的存活时间延长存活。需要治疗的受试者(例如人)因此可以是已经罹患所讨论的疾病或病症的受试者。术语“治疗”或“处理”包括相对于不存在治疗的情况抑制或减轻病理学状态或症状的严重程度的增加,并且不一定意味着暗示相关疾病、病症或病患的完全停止。关于肿瘤和/或癌症,治疗包括总肿瘤负荷和/或单个肿瘤大小的减小。

[0381] 本文中使用的术语“防止”、“预防”及其语法变体表示用于预防病患、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案。因此,“预防”可以表示预防或防止的措施。为了本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括、但不限于:预防或减慢疾病的症状、进展或发展,无论是否是可检测的还是不可检测的。需要预防的受试者(例如人)因此可以是尚未罹患所讨论的疾病或病症的受试者。术语“预防”包括相对于不存在治疗的情况减慢疾病的发作,并且不一定意图暗示相关疾病、病症或病患的永久性预防。因此病患的“预防”在某些上下文中可以表示降低发展病患的风险,或者预防或延迟与该病患有关的症状的发展。

[0382] 本文中使用的“有效量”或“治疗有效量”是在受试者中产生至少一种期望的治疗效果的组合物(例如治疗组合物或试剂)的量或剂量,诸如预防或治疗靶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有此需要的给定受试者选择的具体治疗的期望效力的量。该量将随技术人员理解的多种因素变化,包括、但不限于,治疗性化合物的特征(包括活性、药代动力学、药效动力学和生物利用度),受试者的生理条件(包括年龄、性别、疾病类型、疾病阶段、一般身体状况、对给定剂量的应答性、和药物的类型),制剂中一种或多种药学上可接受的载体的性质,和施用途径。临床和药理学领域的技术人员将能够通过例行实验确定治疗有效量,即通过监测受试者对化合物的施用的应答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))。

[0383] 诊断组合物包含本发明的多肽或细胞靶向分子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细胞靶向分子中。所述试剂的掺入可以是通过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。

[0384] 当生产或制备本发明的诊断组合物时,本发明的靶向细胞的分子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靶向细胞的分子用于信息收集方法,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等人,J Nucl Med 48:304-10(2007);Nayak T, Brechbiel M,Bioconjug Chem 20:825-41(2009);Paudyal P等人,Oncol Rep 22:115-9(2009);Qiao J等人,PLoS ONE 6:e18103(2011);Sano K等人,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)、锍(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、镓和钨化合物。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等人,Clin Cancer Res 14:7488-96(2008)),可以直接地或间接地掺入检测促进剂。

[0385] 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袭性体内成像技术,例如:计算机体层摄影术成像(CT scanning)、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等人,Cancer Lett 315:97-111(2012))。

[0386] IX.包含本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽或细胞靶向分子的药物和/或诊断组合物的生产或制备

[0387] 本发明的多肽和细胞靶向分子中的任一种的药学上可接受的盐或溶剂合物同样是在本发明范围内。

[0388] 术语“溶剂合物”在本发明的上下文中表示在溶质(在本发明中,根据本发明的多肽化合物或其药学上可接受的盐)和溶剂之间形成的确定化学计量的复合物。在这方面的溶剂可以是,例如,水、乙醇或另一种药学上可接受的、典型地为小分子的有机物质,例如,但不限于,乙酸或乳酸。当所讨论的溶剂是水时,这样的溶剂合物通常被称为水合物。

[0389] 可以将本发明的多肽和蛋白或其盐配制成为了贮存或施用而制备的药物组合物,所述药物组合物典型地包含在药学上可接受的载体中的治疗有效量的本发明的化合物或其盐。术语“药学上可接受的载体”包括任何标准的药物载体。用于治疗用途的药学上可接受的载体是制药领域中众所周知的,并且描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.(A.Gennaro,编,1985)中。本文中使用的“药学上可接受的载体”包括任意的和所有的生理上可接受的(即相容的)溶剂、分散介质、包衣剂、抗微生物

剂等渗剂和吸收延迟剂等。药学上可接受的载体或稀释剂包括在适合用于口服、直肠、鼻或胃肠外(包括皮下、肌肉内、静脉内、真皮内和透皮)施用的制剂中使用的那些。示例性的药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。可以在本发明的药物组合物中采用的合适水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、和它们的合适混合物,植物油诸如橄榄油,以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣材料如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需粒度,以及通过使用表面活性剂。在某些实施方案中,所述载体适合用于静脉内、肌肉内、皮下、胃肠外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输注)。取决于所选择的施用途径,可以将所述蛋白或其它药物组分包被在物质中,所述物质意图保护化合物免于当通过特定施用途径施用给患者时活性蛋白可能遇到的低pH和其它天然灭活条件的作用。

[0390] 本发明的药物组合物的制剂可以方便地以单位剂型呈现,并且可以通过药学领域众所周知的任何方法制备。以这种形式,将组合物分入含有适当量的活性组分的单位剂量中。单位剂型可以是包装的制剂,含有离散量的制剂的包装,例如,小包片剂、胶囊剂、和在管形瓶或安瓿瓶中的粉剂。单位剂型还可以是胶囊剂、扁囊剂、或片剂本身,或者它可以是适当数量的这些包装形式中的任一种。它可以以单次剂量可注射形式例如以笔的形式提供。可以为任意合适的施用途径和方式配制组合物。皮下或透皮施用模式可以特别适用于本文描述的治疗性蛋白。

[0391] 本发明的药物组合物还可以含有佐剂诸如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过灭菌操作,和通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等,可以确保防止微生物的存在。组合物中的等渗剂,诸如糖、氯化钠等,也可能是合乎需要的。此外,通过包含延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶),可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0392] 本发明的药物组合物还任选地包括药学上可接受的抗氧化剂。示例性的药学上可接受的抗氧化剂是水溶性的抗氧化剂诸如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;油溶性的抗氧化剂,诸如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴香醚(BHA)、丁羟甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚等;和金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0393] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含本发明的不同的多肽和/或靶向细胞的分子或前述任一种的酯、盐或酰胺中的一种或组合,以及至少一种药学上可接受的载体。

[0394] 治疗组合物典型地在制造和储存条件下是无菌和稳定的。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它有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,包括,例如,水、醇诸如乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液体聚乙二醇)、或任何合适的混合物。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣诸如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的颗粒尺寸,以及通过本领域众所周知的制剂化学使用表面活性剂。在某些实施方案中,等渗剂(例如糖类,多元醇诸如甘露醇、山梨醇,或氯化钠)可以是在组合物中合乎需要的。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸盐和明胶),可以实现可注射组合物的延长吸收。

[0395] 用于真皮内或皮下应用的溶液或混悬液典型地包括以下一种或多种:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、丙三醇、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;和张度调节剂例如,氯化钠或葡萄糖。可以用酸或碱(诸如盐酸或氢氧化钠)或者含有柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐等的缓冲液调节pH。这样的制品可以封装在安瓿瓶、一次用弃注射器或由玻璃或塑料制成的多次剂量管形瓶中。

[0396] 可以如下制备无菌注射溶液:将所需量的本发明的多肽或靶向细胞的分子掺入含有上述成分中的一种或组合的适当溶剂中,当需要时,随后灭菌微滤。通过将活性化合物掺入含有分散介质和其它成分(诸如上述的那些) 的无菌媒介物中,可以制备分散体。就用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末而言,制备方法是真空干燥和冷冻干燥(低压冻干法),其产生活性成分以及来自其无菌过滤溶液的任何另外期望成分的粉末。

[0397] 当将治疗有效量的本发明的多肽或靶向细胞的分子设计为通过例如静脉内、皮肤或皮下注射来施用时,结合剂将呈无热原的、胃肠外可接受的水溶液的形式。考虑到适当的pH、等渗性、稳定性等,用于制备胃肠外可接受的蛋白溶液的方法是在本领域技术内。除了结合剂之外,用于静脉内、皮肤、或皮下注射的优选药物组合物将含有等渗媒介物诸如氯化钠注射液、林格氏注射液、葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、含有乳酸盐的林格氏注射液、或本领域已知的其它媒介物。本发明的药物组合物还可以含有稳定剂、防腐剂、缓冲剂、抗氧化剂、或本领域技术人员众所周知的其它添加剂。

[0398] 如本文别处所述,本发明的多肽或靶向细胞的分子可以用保护化合物免于快速释放的载体来制备,诸如受控释放制剂,包括植入物、透皮贴剂、和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。许多用于制备这样的制剂的方法被授予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))。

[0399] 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期望分布。例如,血脑屏障排除许多大的和/或亲水的化合物。为了将本发明的治疗性化合物或组合物靶向至特定体内位置,可以将它们配制在例如脂质体中,所述脂质体可以包含被选择性地运输进特定细胞或器官中的一个或多个部分,从而增强靶向药物递送。示例性的靶向部分包括叶酸盐或生物素;甘露糖苷;抗体;表面活性蛋白A受体;p120联蛋白等。

[0400] 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、纳米囊、纳米球和纳米颗粒(参见例如Honda M等人,Int J Nanomedicine 8:495-503 (2013);Sharma A等人,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,例如,脂质体、polaxamer 407和羟磷灰石,可以制备控释制剂。

[0401] X.多核苷酸、表达载体和宿主细胞

[0402] 除了本发明的多肽和蛋白以外,在本发明范围内还包括编码本发明的多肽和细胞靶向分子或其功能部分的多核苷酸。术语“多核苷酸”等同于术语“核酸”,其中的每一个包

括以下的一个或多个:脱氧核糖核酸(DNA)的聚合物、核糖核酸(RNA)的聚合物、使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、片段和同源物。本发明的多核苷酸可以是单链的、双链的或三链的。这样的多核苷酸被具体公开为包括所有能够编码示例性蛋白的多核苷酸,例如,考虑已知在RNA密码子的第三位中可容忍的但是编码与不同RNA密码子相同的氨基酸的摆动(wobble) (参见Stothard P,Biotechniques 28:1102-4(2000))。

[0403] 在一个方面,本发明提供了多核苷酸,其编码本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或细胞靶向蛋白、或其片段或衍生物。所述多核苷酸可以包括,例如,这样的核酸序列:其编码与包含所述蛋白的氨基酸序列之一的多肽具有至少50%、55%、 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更多同一性的多肽。本发明还包括这样的多核苷酸:其包含在严谨条件下与编码本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/ 或细胞靶向蛋白、或其片段或衍生物的多核苷酸杂交的核苷酸序列,或者任何这样的序列的反义物或互补物。

[0404] 本发明的分子(例如,CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T- 细胞去免疫化的多肽和/或包含它们的靶向细胞的蛋白)的衍生物或类似物尤其包括这样的多核苷酸(或多肽)分子:其具有与本发明的多核苷酸、 CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽或靶向细胞的蛋白基本上同源的区域,例如与相同大小的多核苷酸或多肽序列具有至少约45%、50%、70%、80%、95%、98%或甚至99%同一性(具有 80-99%的优选同一性),或当与比对序列进行对比时,其中所述比对通过本领域已知的计算机同源性程序进行。一种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。还包括能够在严谨条件下与编码本发明的靶向细胞的蛋白的序列的的互补物杂交的多核苷酸(参见例如Ausubel F等人,Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,New York,NY,U.S.,1993)),以及以下。严谨条件是本领域技术人员已知的,并且可以在例如Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,NY,U.S.,Ch.Sec.6.3.1-6.3.6(1989)) 中找到。

[0405] 本发明还提供了包含本发明范围内的多核苷酸的表达载体。使用本领域众所周知的材料和方法,可以将能够编码本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或靶向细胞的蛋白的多核苷酸插入已知载体(包括细菌质粒、病毒载体和噬菌体载体)中以产生表达载体。这样的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pTxb1和pIVEX2.3)内生产本发明的预见到的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或靶向细胞的蛋白所必需的多核苷酸。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、包含特定多核苷酸的表达载体是本领域普通技术人员众所周知的,可以使用例行实验确定,或者可以购买。

[0406] 本文中使用的术语“表达载体”表示包含一个或多个表达单元的直线或环形的多核苷酸。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。表达单元典型地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读码框和转录终止子。表达载体含有一个或多个表达单元。因而,在本发明的上下文中,

编码包含单个多肽链的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或蛋白(例如遗传上与CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物区域重组的scFv)的表达载体至少包括所述单个多肽链的表达单元,而包含例如两个或更多个多肽链(例如一个链包含V_L结构域,且第二个链包含与毒素效应物区域连接的V_H结构域)的蛋白至少包括两个表达单元,所述蛋白的两个多肽链中的每一个具有一个表达单元。对于本发明的多链靶向细胞的蛋白的表达,每个多肽链的表达单元还可以单独地包含在不同的表达载体上(例如,可以用已经在其中引入每个多肽链的表达载体的单个宿主细胞实现表达)。

[0407] 能够指导多肽和蛋白的瞬时或稳定表达的表达载体是本领域众所周知的。表达载体通常包括,但不限于以下一个或多个:异源信号序列或肽、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列,其中的每一个均为本领域众所周知的。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本领域已知的。

[0408] 术语“宿主细胞”表示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诸如大肠杆菌,或者真核细胞(例如酵母、昆虫、两栖动物、鸟或哺乳动物细胞)。使用本领域已知的标准技术,可以实现包含本发明的多核苷酸或能够生产本发明的多肽和/或靶向细胞的蛋白的宿主细胞系的创建和分离。

[0409] 在本发明范围内的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽和/或蛋白可以是如下产生的本文描述的多肽和蛋白的变体或衍生物:通过改变一个或多个氨基酸或者删除或插入一个或多个氨基酸(这可以使它更适合实现期望的性能,诸如被宿主细胞更佳地表达),修饰编码多肽和/或蛋白的多核苷酸。

[0410] XI.递送装置和试剂盒

[0411] 在某些实施方案中,本发明涉及一种装置,其包含用于递送给有此需要的受试者的本发明的主题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主题组合物,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。

[0412] 试剂盒也在本发明范围内,所述试剂盒包含本发明的主题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。

[0413] XII.产生本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的方法

[0414] 本发明提供了通过修饰已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽而产生本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽的方法;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位添加至所述多肽。在本发明的某些其它方法中,将所述异源T-细胞表位嵌入或插入在能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽中。

[0415] 在本发明的方法的某些实施方案中,通过修饰已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽而产生本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位添加至所述多肽。在本发明的某些其它方法中,将所述异源T-细胞表位嵌入或插入在能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽中。

[0416] 在本发明的方法的某些实施方案中,将已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽制备成本发明的T-细胞超免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位添加至所述多肽。在本发明的方法的某些其它实施方案中,将已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽制备成本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位添加至所述多肽。在本发明的某些其它方法中,将异源T-细胞表位嵌入或插入能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽中。

[0417] 在本发明的方法的某些实施方案中,产生能够递送T-细胞表位用于由 MHC I类分子呈递的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位添加至能够将T-细胞表位从细胞的内体区室在细胞内递送至细胞的蛋白酶体的多肽。在本发明的某些其它方法中,将异源T-细胞表位嵌入或插入能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽内。

[0418] 在本发明的方法的某些实施方案中,产生T-细胞超免疫化的和/或B- 细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T- 细胞表位插入或嵌入已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽的内源性B-细胞表位区域中。

[0419] 在本发明的方法的某些实施方案中,产生本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位嵌入或插入已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽的内源性B-细胞表位区域。

[0420] 在本发明的方法的某些实施方案中,将已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽制备成本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位嵌入或插入所述多肽的内源性B-细胞表位区域。在本发明的方法的某些其它实施方案中,将已经能够从细胞的内体区室在细胞内按路线发送至细胞的细胞溶胶、ER或溶酶体的多肽制备成本发明的CD8+ T-细胞超免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源T-细胞表位嵌入或插入所述多肽的内源性B-细胞表位区域。

[0421] 在本发明的方法的某些实施方案中,产生能够递送T-细胞表位用于由MHC I类分子呈递的去免疫化的多肽;所述方法包括下述步骤:将异源 T-细胞表位嵌入或插入能够将T-细胞表位从细胞的内体区室细胞内递送至细胞的蛋白酶体的多肽的内源性B-细胞表位区域。

[0422] 在本发明的方法的某些实施方案中,产生去免疫化的多肽,当施用给脊索动物时其具有降低的B-细胞免疫原性。在本发明的方法的某些实施方案中,是一种用于降低多肽中的B-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的异源T-细胞表位所

包含的一个或多个氨基酸残基破坏多肽内的B-细胞表位区域。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0423] 本发明的方法的某些实施方案是在施用给脊索动物以后降低多肽中的B-细胞免疫原性、同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏多肽内的B-细胞表位区域。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0424] 本发明的方法的某些实施方案是在施用给脊索动物以后降低多肽中的B-细胞免疫原性、同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:1)鉴别多肽中的B-细胞表位;和2)用添加至多肽的异源CD8+T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的B-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0425] 本发明的方法的某些实施方案是在施用给脊索动物以后降低多肽中的B-细胞免疫原性、同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:1)鉴别多肽中的B-细胞表位;和2)用添加至多肽的异源CD8+T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的B-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0426] 在本发明的方法的某些实施方案中,产生CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,当施用给脊索动物时,其具有降低的CD4+ T-细胞免疫原性。在本发明的方法的某些实施方案中,是一种用于降低多肽中的CD4+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏多肽内的CD4+ T-细胞表位区域。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在B-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在CD4+ T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0427] 本发明的方法的某些实施方案是在施用给脊索动物以后降低多肽中的CD4+ T-细胞免疫原性、同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏多肽内的CD4+ T-细胞表位区域。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在CD4+ T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在CD4+ T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0428] 本发明的方法的某些实施方案是在施用给脊索动物以后降低多肽中的CD4+ T-细胞免疫原性、同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:1)鉴别多肽中的CD4+ T-细胞表位;和2)用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的 CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在CD4+T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步

骤还包括在CD4+ T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0429] 本发明的方法的某些实施方案是在施用给脊索动物以后降低多肽中的CD4+ T-细胞免疫原性、同时增加CD8+ T-细胞免疫原性的方法,所述方法包括下述步骤:1)鉴别多肽中的CD4+ T-细胞表位;和2)用添加至多肽的异源CD8+ T-细胞表位所包含的一个或多个氨基酸残基破坏鉴别的 CD4+ T-细胞表位。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在CD4+T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸置换。在某些其它实施方案中,所述破坏步骤还包括在CD4+ T-细胞表位区域中产生一个或多个氨基酸插入。

[0430] XIII.使用本发明的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽、包含它们的细胞靶向分子、或其药物和/或诊断组合物的方法

[0431] 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、靶向细胞的分子和药物组合物的方法,其用于将T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类呈递途径、靶向杀死细胞,用于将另外的外源物质递送进靶向细胞中,用于标记靶向细胞的内部,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。

[0432] 已经细胞毒性的分子,例如包含细胞毒性的毒素区域多肽的潜在治疗剂,可以被工程改造成更有细胞毒性和/或具有通过完全不同的机制起作用的多余备用细胞毒性。这些多种细胞毒性机制可以彼此补充(诸如通过提供直接和间接细胞杀死的两种机制,以及对局部区域的免疫刺激机制),冗余地彼此支持(诸如通过在没有另一种存在下提供直接细胞杀死),和/或保护免于形成抗性(通过限制对同时阻断两种不同机制的恶性的或受感染的细胞的较低可能情形的抗性)。

[0433] 另外,其细胞毒性依赖于毒素效应物和/或酶促区域的亲本细胞毒性分子可以如下工程改造:通过T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类系统并随后呈递至靶细胞的表面,将母体分子突变成无酶促活性,但是具有细胞毒性。该方案会除去一种细胞毒性机制,同时添加另一种并添加通过T- 细胞表位呈递对靶细胞的局部区域进行免疫刺激的能力。此外,其细胞毒性依赖于酶促区域的亲本细胞毒性分子可以仅仅通过T-细胞表位递送至MHC I类系统如下工程改造成具有细胞毒性:通过将T-细胞表位嵌入母体分子的酶促结构域中使得酶活性减少或消除。这允许将酶促细胞毒性的分子(其具有一旦进入内体区室中按路线发送至细胞溶胶和/或ER的能力) 一步修饰成无酶促活性的、细胞毒性分子,其依赖于T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类系统和随后呈递在靶细胞的表面上实现细胞毒性。通过连接多个靶向细胞的结合区域(其靶向两个或更多个细胞类型的混合物内 (例如,生物体内)的特定细胞类型),本发明的任意多肽可以工程改造成具有作为治疗剂的潜力的靶向细胞的细胞毒性分子。

[0434] 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,本发明提供了使用特征在于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:1-60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靶向细胞的分子的组分。

[0435] 本发明提供了杀死细胞的方法,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主题组合物之一

接触以后,本发明的多肽、蛋白和药物组合物可以用于杀死特定细胞类型。在某些实施方案中,本发明的细胞毒性的多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀死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,本发明的细胞毒性的多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀死不同细胞类型的混合物中的癌细胞。在某些实施方案中,本发明的细胞毒性的多肽、蛋白或药物组合物可以用于杀死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死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死被病毒或微生物感染的细胞,或以其它方式选择性地杀死表达特定细胞外靶生物分子(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,和用于净化不希望的细胞类型的移植组织。

[0436] 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,本发明的细胞毒性的多肽、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)可以表现出有效细胞杀死活性。通过使用高亲和力结合区域使酶活性毒素区域和T-细胞表位的递送靶向特定细胞类型,可以将该有效的细胞杀死活性限于特异性地和选择性地杀死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。

[0437] 本发明提供了一种在有此需要的患者中杀死细胞的方法,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。

[0438] 细胞毒性的多肽、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连接的细胞外生物分子而杀死患者中的癌细胞。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。可能受益于本发明的方法和组合物的、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。

[0439] 本发明的细胞毒性的多肽或靶向细胞的分子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连接的细胞外生物分子而杀死患者中的免疫细胞(无论是健康的还是恶性的)。

[0440] 本发明的细胞毒性的多肽或靶向细胞的分子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连接的细胞外生物分子而杀死患者中受感染的细胞。

[0441] 为了以下目的利用本发明的靶向细胞的分子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等人,Br J Haematol 132:42-55(2006);(参见例如Alpdogan O,van den Brink M,Semin Oncol 39:629-42(2012))。

[0442] 为了以下目的利用本发明的靶向细胞的分子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，本发明的靶向细胞的分子可以用在用于预防器官和/或组织移植排斥的方法中，其中在移植本发明的细胞毒性的、靶向细胞的分子或其药物组合物之前灌注供体器官或组织，以便净化供体T-细胞和/或B-细胞的器官(参见例如Alpdogan O,van den Brink M,Semin Oncol 39:629-42(2012))。

[0443] 为了以下目的利用本发明的靶向细胞的分子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等人,Br J Haematol 132:42-55(2006)；(参见例如 Alpdogan O,van den Brink M,Semin Oncol 39:629-42(2012))。

[0444] 本发明的细胞毒性的多肽或靶向细胞的分子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连接的细胞外生物分子而杀死患者中受感染的细胞。

[0445] 本发明的靶向细胞的分子的某些实施方案或其药物组合物可以用于给生物体内的部位“播种”非自身的T-细胞表位-肽呈递细胞，以便活化免疫系统从而保护所述部位。在本发明的这种“播种”方法的某些其它实施方案中，所述部位是肿瘤块或感染的组织部位。在本发明的这种“播种”方法的优选实施方案中，所述非自身的T-细胞表位-肽选自由以下组成的组：尚未被靶向细胞的分子的靶细胞呈递的肽，没有存在于靶细胞表达的任何蛋白内的肽，没有存在于靶细胞的蛋白质组内的肽，没有存在于要播种的部位的细胞外微环境中的肽，和没有存在于要靶向的肿瘤块或感染的组织部位中的肽。

[0446] 这种“播种”方法的功能是用一个或多个MHC I类呈递的T-细胞表位标记脊索动物内的一个或多个靶细胞，所述T-细胞表位用于被效应物T- 细胞识别和活化下游免疫应答。通过利用本发明的靶向细胞的分子的细胞内化功能、细胞内按路线发送功能和T-细胞表位递送功能，展示递送的 T-细胞表位的靶细胞被利用来诱导宿主T-细胞对呈递的靶细胞的识别和其它免疫应答的诱导，包括CTL对靶细胞的杀死。使用本发明的靶向细胞的分子的这种“播种”方法可以通过诱导适应性免疫应答以攻击播种的微环境(例如，肿瘤块或感染的组织部位，无论是否呈递递送靶向细胞的分子的T-细胞表位)内的细胞来提供暂时的疫苗接种效应。这种“播种”方法还可以诱导对生物体内的靶细胞群体、肿瘤块和/或感染的组织部位的免疫耐受性的破坏。

[0447] 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的多肽或靶向细胞的分子或其药物组合物。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患状的严重程度的降低，无疾病患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。

[0448] 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。

[0449] 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、胃肠外、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)。"胃肠外施用"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。

[0450] 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6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。

[0451] 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1 mg/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。

[0452] 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、脊柱或其它胃肠外施用途径,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胃肠外途径施用,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。

[0453] 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。

[0454] 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的、靶向细胞的分子或其药物组合物,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递途径的核酸分子、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。

[0455] 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靶向细胞的细胞死亡和/或靶向细胞的生长的抑制。这样,本发明的细胞毒性的、靶向细胞的分子和包含它们的药物组合物将可用在治疗多种病理学病症 (其中杀死或除去靶细胞可能是有益的,例如尤其是癌症、肿瘤、其它生长异常、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。

[0456] 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。

[0457] 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)中的恶性肿瘤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。

[0458] 本发明的细胞毒性的多肽、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,和用于净化不希望的细胞类型的移植组织。本发明的细胞毒性的多肽、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。

[0459] 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,例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、人免疫缺陷病毒相关的疾病、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。

[0460] 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。

[0461] 为了杀死患者中T-细胞或B-细胞的目的,通过将本发明的细胞毒性蛋白或其药物组合物施用给患者而提供由T-细胞或B-细胞介导的疾病或病患的预防或治疗,是在本发明范围内。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,无论移植的物质的来源,例如人或非人来源。

[0462] 使用本发明的细胞毒性的多肽、蛋白或药物组合物通过宿主T-细胞的靶向细胞杀死而提供骨髓接受者用于预防或治疗宿主抗移植物疾病,是在本发明范围内。

[0463] 本发明的细胞毒性的多肽、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的多肽、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以下组成的组: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。

[0464] 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。

[0465] 在本发明的某些实施方案中是使用本发明的多肽或靶向细胞的分子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、其它生长异常、免疫病症和/或微生物感染。例如,在减少炎症的努力中,可以用这样的药物治疗在患者的皮肤上呈现的免疫病症。在另一个实施例中,在减小肿瘤大小或完全消除肿瘤的努力中,可以用这样的药物治疗皮肤肿瘤。

[0466] 本发明的某些细胞毒性的多肽、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-蛋白偶联的受体)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。因为某些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的、靶向细胞的分子可以用于杀死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等人,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(诸如帕金森氏病和阿尔茨海默氏病)的模型系统(参见例如Hamlin A等人,PLoS One e53472(2013))。

[0467] 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/或免疫细胞类型的内部的方法。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和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。

[0468] 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适当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靶向细胞的分子/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靶向细胞的分子的量将尽可能地低,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。

[0469] 与检测促进剂组合的本发明的多肽和靶向细胞的分子的细胞类型特异性的靶向会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域的细胞外靶生物分子物理上连接。使用本发明的多肽或靶向细胞的分子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袭性体内肿瘤成像(关于综述,参见,Kaur S 等人,Cancer Lett 315:97-111(2012))。

[0470] 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以标记或检测癌症、肿瘤和/或免疫细胞类型的内部的方法(参见例如,Koyama Y等人,Clin Cancer Res 13:2936-45(2007); Ogawa M等人,Cancer Res 69:1268-72(2009); Yang L等人,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。

[0471] 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。本发明的主题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的集合或非常适合使用本发明的递送装置。

[0472] 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否是局部或全身问题。

[0473] 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等人,Nat.Biotechnol 22:701-6(2004);Evans M 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.108:9578-82(2011))。

[0474] 用于检测细胞类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,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、心脏生成、克罗恩病、糖尿病、红斑(erythematosus)、胃炎、移植排斥、移植物抗宿主病、格雷夫斯氏病、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、淋巴组织增生的病症、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、溃疡性结肠炎、血管炎、细胞增殖、炎症、白细胞活化、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、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、T急性淋巴细胞白血病/淋巴瘤(ALL)、急性髓性白血病、急性髓性白血病(AML)、B- 细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)、B-细胞前淋巴细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(BL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML-BP)、慢性髓性白血病(CML)、弥漫性大B细胞性淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、毛细胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)、血管内大B-细胞淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病、淋巴浆细胞性淋巴瘤、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、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、原发性渗出性淋巴瘤、幼淋巴细胞白血病、早幼粒细胞性白血病、小淋巴细胞性淋巴瘤、脾边缘带淋巴瘤、T- 细胞淋巴瘤(TCL)、重链病、单克隆丙种球蛋白病、单克隆免疫球蛋白沉积病、骨髓增生异常综合征(MDS)、郁积型多发性骨髓瘤和Waldenstrom 巨球蛋白血症。

[0475] 在某些实施方案中,本发明的多肽和靶向细胞的分子或其药物组合物用于诊断和治疗,或仅用于诊断。在某些情形下,合乎需要的是,在选择本发明的多肽或靶向细胞的分子用于治疗之前,确定或验证在受试者和/ 或来自受试者(例如,需要治疗的患者)的患病组织中表达的HLA变体和/或HLA等位基因。

[0476] 以下非限制性实施例进一步举例说明了本发明:1)CD8+ T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的多肽,2)CD8+ T-细胞表位呈递毒素来源的多肽,和3)选择性地细胞毒性的、靶向细胞的蛋白,其包含前述多肽且能够特异性地靶向特定细胞类型。

[0477] 实施例

[0478] 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。

[0479] MHC I类系统对T-细胞免疫原性表位肽的呈递会靶向呈递细胞用于通过CTL介导的裂解进行杀死,并且也触发局部微环境中的免疫刺激。通过工程改造靶细胞-内化治疗剂的毒素效应物多肽组分内的免疫原性表位序列,可以完成免疫刺激性抗原的靶向递送和呈递。靶细胞对免疫刺激性非自身抗原(例如已知的具有高免疫原性的病毒抗原)的呈递会向其它免疫细胞发出信号以破坏靶细胞以及向所述区域募集更多的免疫细胞。

[0480] 在实施例中,通过工程改造内部区域以包含一个或多个T-细胞表位,将T-细胞表位嵌入或插入可以充当靶细胞-内化分子的组分的志贺毒素效应物多肽和白喉毒素效应物多肽中。因而,不存在另外的氨基酸残基、肽或多肽组分与开始多肽的终末融合。

[0481] 在实施例中,通过工程改造多个氨基酸置换,但是与亲本毒素效应物多肽相比不改变示例性毒素效应物多肽中的氨基酸残基的总数,将大多数 T-细胞表位嵌入靶细胞-内

化分子的毒素效应物多肽组分中。因而,对于在实施例中试验的所有白喉毒素效应物多肽和大多数志贺毒素效应物多肽,不存在另外氨基酸的插入,而是仅存在对现有氨基酸的置换,从而导致亲本多肽的原始长度的维持。

[0482] 制备新颖的毒素来源的效应物多肽(其可以充当细胞靶向分子(例如免疫毒素和配体-毒素融合体)的组分),其可以促进T-细胞表位的细胞内化、亚细胞按路线发送至细胞溶胶和递送至细胞溶胶用于通过MHC I类途径呈递至靶细胞表面以向CTL发出信号。

[0483] 还通过使用一种或多种本发明的方法将T-细胞表位嵌入或插入B-细胞表位区域中,将某些新颖的毒素来源的效应物多肽去免疫化。为了同时在相同毒素多肽区域内去免疫化和提供在靶细胞表面上的T-细胞表位呈递,通过用预测会结合MHC I类分子的已知T-细胞表位替换它们来破坏预测的B-细胞表位区域。在计算机环境中分析来自毒素来源的多肽的氨基酸序列以预测抗原性的和/或免疫原性的B-细胞表位。针对毒素效应物功能的保留,实验性地试验了各种T-细胞表位嵌入的、毒素来源的多肽。

[0484] 试验了本发明的示例性T-细胞表位呈递毒素效应物多肽的毒素效应物功能的保留,并与包含野生型毒素多肽序列的毒素效应物多肽(在本文中被称作“野生型”或“WT”)进行了对比,所述包含野生型毒素多肽序列的毒素效应物多肽不包含对毒素效应物区域的任何内部修饰或突变。

[0485] 本发明的示例性的呈递CD8+ T-细胞表位的志贺毒素来源的多肽的下述实施例证实了在保留一种或多种志贺毒素效应物功能的同时提供T-细胞表位递送用于MHC I类呈递的方法。此外,本发明的示例性的呈递CD8+T-细胞表位的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素来源的多肽的下述实施例证实了同时提供以下内容的方法:1)T-细胞表位递送用于 MHC I类呈递,2)保留一种或多种毒素效应物功能,和3)毒素效应物区域的去免疫化。

[0486] 本发明的示例性的靶向细胞的分子结合被靶向细胞类型表达的靶生物分子并进入靶向细胞。本发明的内化的示例性的靶向细胞的蛋白将它们的去免疫化的毒素效应物区域有效地按路线发送至细胞溶胶并将免疫原性T-细胞表位有效地递送至靶细胞的MHC I类途径,从而导致T-细胞表位肽在靶细胞区域的表面上的呈递。

[0487] 实施例1.将T-细胞表位嵌入或插入细胞靶向分子的多肽组分内

[0488] 在该实施例中,T-细胞表位序列选自人病毒蛋白并嵌入或插入志贺毒素效应物多肽中。在某些变体中,将T-细胞表位嵌入或插入B-细胞表位区域中,以便破坏天然存在的B-细胞表位。在其它变体中,将T-细胞表位嵌入预测不含有任何B-细胞表位的区域中,且因而,预测这些修饰不会破坏任何显性的B-细胞表位。在某些以上变体中,将T-细胞表位嵌入预测会破坏催化活性的区域中。

[0489] A.选择T-细胞表位肽用于嵌入或插入

[0490] 在该实施例中,选择已知的T-细胞表位肽用于嵌入和插入具有细胞内地按路线发送至细胞溶胶的固有能力的志贺毒素效应物区域。例如,存在许多已知的免疫原性的病毒蛋白和来自人病毒(诸如人甲型流感病毒和人 CMV病毒)的病毒蛋白的肽组分。选择能够结合人MHC I类分子和/或引起人CTL介导的应答的免疫原性病毒肽。

[0491] 使用Immune Epitope Database(IEDB)Analysis Resource MHC-I结合预测的共有工具和推荐的参数(Kim Y等人,Nucleic Acids Res 40:W252-30 (2012)),针对结合人

群中由更流行的等位基因编码的常见人MHC I类人白细胞抗原(HLA)变体的能力,将七种预测为T-细胞表位的肽(SEQ ID NO:4-10)评分。所述IEDB MHC-I结合预测分析会预测“ANN亲和力”—输入肽和选择的人HLA变体之间的估计结合亲和力,其中小于50纳摩尔(nM) 的IC_{50}值被认为是高亲和力,在50-500nM之间的IC_{50}值被认为是中间亲和力,且在500-5000nM之间的IC_{50}值被认为是低亲和力。所述IEDB MHC-I结合预测分析通过最低百分比排序指示了最佳结合剂。表1显示了IEDB MHC-I结合预测百分比排序和与选择的人HLA变体结合的七种试验的T细胞表位-肽(SEQ ID NO:4-10)的预测的结合亲和力。

[0492] 表1.与各种人MHC I类复合物结合的各种病毒蛋白来源的T-细胞表位的预测

[0493]

T-细胞表位		**IEDB MHC-I 结合预测**		
名称	**序列**	**HLA 等位基因**	**百分比排序**	**预测的亲和力**
F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	HLA-A*32:01	0.80	中间
		HLA-A*02:01	0.80	高
		HLA-A*02:06	2.20	高
F2-2	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	HLA-A*32:01	1.40	中间
		HLA-A*02:01	4.60	低
		HLA-A*02:06	9.55	中间
F2-3	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	HLA-A*32:01	2.80	低
		HLA-A*02:01	8.20	低
		HLA-A*02:06	11.25	低
F2-4	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	HLA-A*02:01	1.40	高
		HLA-A*02:06	2.40	高
		HLA-A*32:01	3.10	低
F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	HLA-A*03:01	0.25	高
		HLA-A*30:01	0.70	高

[0494]

		HLA-A*31:01	4.25	中间
F3-4	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	HLA-A*03:01	0.25	高
		HLA-A*30:01	0.80	高
		HLA-A*31:01	3.30	中间
C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	HLA-A*02:03	0.30	高
		HLA-A*02:01	1.00	高
		HLA-A*02:06	1.10	高

[0495] IEDB MHC-I结合预测分析的结果表明,预测有些肽以高亲和力结合多种人MHC I类分子,而预测其它肽以更适中的亲和力结合分析的人 MHC I类分子。

[0496] B.鉴别毒素和毒素效应物多肽中的B-细胞表位区域

[0497] 为去免疫化选择适合于蛋白酶体递送的、具有固有亚细胞按路线发送特征的毒素来源的多肽,以便减小施用给脊索动物以后不希望的免疫应答 (例如,抗-毒素抗体的产生)的可能性。在计算机环境中分析了来自毒素和毒素来源的多肽的氨基酸序列以预测抗原性的和/或免疫原性的B-细胞表位。

[0498] 针对B-细胞表位分析了从志贺毒素和白喉毒素来源的多肽效应物。

[0499] 志贺毒素来源的效应物多肽

[0500] 首先,在志贺毒素A亚基内鉴别出B-细胞表位区域。利用计算方法来预测志贺毒素A亚基序列中的抗原性的和/或免疫原性的B-细胞表位,所述B-细胞表位具有在施用以后引起哺乳动物免疫系统的应答的潜力。

[0501] 使用志贺样毒素链A(PDB ID:1DM0_A)的多肽序列和3D结构数据以及由ProImmune,Inc.(Sarasota,FL,U.S.)提供的REVEAL®系统,预测志贺毒素的A亚基内的直链B-细胞表位。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 Linear Epitope Prediction(Larsen J等人,Immunome Res 2:2(2006))、ElliPro Antibody表位预测(Haste Andersen P等人,Protein Sci 15: 2558-67(2006);Ponomarenko J,Bourne P,BMC Struct Biol 7:64(2007))和/ 或Epitopia服务器(Rubinstein N等人,BMC Bioinformatics 10:287(2009)),预测志贺毒素的A亚基的氨基酸序列内的B-细胞表位。使用Epitopia服务器预测将免疫原性的B-细胞表位鉴别为直链氨基酸残基的任意段,所述段包含在Epitopia的免疫原性量表上预测为"高"(评分为4或5)的大多数残基。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2-4)。

[0502] 表2.志贺样毒素1(SEQ ID NO:1)的成熟天然A亚基的B-细胞表位预测

[0503]

表位区域	天然定位的氨基酸位置				
	REVEAL	BcePred	Bepipred	ElliPro	Epitopia
1					1-15
2		29-35	28-34	27-37	18-23
3	42-48	39-46	43-47		44-49
4	58-66	55-61	56-64	57-66	52-62
5	96-103	105-111	100-115	96-110	94-102, 109-114
6	144-151	141-147	147-151	144-153	
7	183-189	181-187	183-185	180-190	179-188
8			211-219		211-220
9	243-251			243-257	245-259
10	257-268	261-267	254-268		
11	289-293	285-291		262-293	262-281

[0504] 表3.志贺毒素(SEQ ID NO:2)的成熟天然A亚基的B-细胞表位预测

[0505]

天然定位的氨基酸位置			
REVEAL	BcePred	Bepipred	ElliPro
	29-35	28-34	27-37

[0506]

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

[0507] 表4.志贺样毒素2(SEQ ID NO:3)的成熟天然A亚基的B-细胞表位预测

[0508]

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

[0509] 除了志贺毒素来源的毒素效应物多肽(其能够诱导细胞内化和指导它们自身亚细胞按路线发送至细胞溶胶)以外,可以选择来自其它蛋白的细胞溶质按路线发送效应物区域作为要修饰成本发明多肽的多肽的来源,例如,来自其它ABx和/或RIP毒素。

[0510] 白喉毒素来源的效应物多肽

[0511] 白喉毒素已经被用于设计免疫毒素和配体-毒素融合分子,其中白喉来源的组分可以提供细胞内化和细胞溶质按路线发送效应物功能。利用一种计算方法来预测白喉毒素A亚基中的抗原性的和/或免疫原性的B-细胞表位区域,所述B-细胞表位区域具有在哺乳动物免疫系统中引起应答的潜力。使用BcePred网络服务器(Saha S,Raghava G,Lecture Notes in Comput Sci 3239:197-204(2004)),预测白喉毒素(SEQ ID NO:44)的A亚基中的B- 细胞表位区域。该计算方法揭示了原型白喉毒素A亚基中的七种假定的 B-细胞表位区域(表5)。另外,据称由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)会提供白喉毒素的所有实验性地表征的B-细胞和 T-细胞表位。目前,IEDB提供了7种表位,具有至少一个关于在实施例中使用的白喉毒素A亚基和白喉毒素效应物多肽SEQ ID NO:44相关肽表位的阳性测量结果(参见表5和SEQ ID NO:44的区域182-201和225-238)。

[0512] 表5.白喉毒素(SEQ ID NO:44)的成熟天然A亚基的B-细胞表位预测

[0513]

表位区域	天然定位的氨基酸	
	BcePred	IEDB
1	3-10	
2		15-31
3	33-43	32-54
4	71-77	
5		93-113
6	125-131	
7	138-146	141-167
8	165-175	141-167
9	185-191	181-193

[0514] C.鉴别毒素和毒素效应物多肽中的CD4+ T-细胞表位区域

[0515] 针对任何CD4+ T-细胞表位的存在分析了志贺毒素A亚基。通过由 ProImmune Inc.(Sarasota,FL,U.S.)执行的REVEAL™Immunogenicity System(IS)T-细胞测定,预测了志贺样毒素1(SEQ ID NO:1)的成熟A亚基的T-细胞表位。该测定使用来自受试蛋白的多个重叠肽序列以试验来自除去了CD8+ T-细胞的健康供体细胞样品的CD4+ T-细胞对任何免疫应答的引起。使用该测定在以下天然地定位的氨基酸残基的集合处鉴别出七个 T-细胞表位区域:CD4+ T-细胞表位区域#1:4-33,CD4+ T-细胞表位区域 #2:34-78,CD4+ T-细胞表位区域#3:77-103,CD4+ T-细胞表位区域 #4:128-168,CD4+ T-细胞表位区域#5:160-183,CD4+ T-细胞表位区域 #6:236-258,和CD4+ T-细胞表位区域#7:274-293。

[0516] 在NIAD的IEDB上针对T-细胞表位研究了在实施例中用作亲本多肽用于产生白喉毒素效应物多肽的白喉毒素A亚基和野生型(WT)白喉毒素效应物多肽。目前,IEDB提供了超过25种肽表位,具有至少一个关于在实施例中的白喉毒素A亚基和白喉毒素效应物多肽的相关T-细胞免疫原性的阳性测量结果。在白喉毒素的IEDB中鉴别出几个T-细胞表位区域,例如,在以下氨基酸残基位置与SEQ ID NO:45的多肽中的重叠免疫原性肽对应的下述区域:2-21、22-41、32-71、72-91、82-221、212-231、232-251 和251-301。

[0517] D.产生毒素效应物多肽,其具有嵌入的或插入的破坏内源性B-细胞表位区域和/或内源性CD4+ T-细胞表位区域的T-细胞表位

[0518] 使用志贺毒素和白喉毒素,产生了本发明的示例性的毒素来源的效应物多肽。

[0519] 志贺毒素来源的效应物多肽

[0520] 使用本领域已知的技术生产了编码细胞毒性蛋白的核酸,所述细胞毒性蛋白包含志贺毒素效应物区域和用于细胞靶向的免疫球蛋白型结合区域。本实施例的亲本细胞毒性蛋白中的志贺毒素效应物区域包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-251。

[0521] 使用本领域已知的标准技术,将一系列突变工程改造进编码亲本细胞毒性蛋白的核酸中,并生产细胞毒性蛋白的变体,所述变体与亲本细胞毒性蛋白相比包含多个氨基酸

置换。选择所述突变以通过嵌入表1中描述的至少一个T-细胞表位肽来破坏表2中描述的至少一个预测的B-细胞表位区域。对于在实施例中描述的本发明的示例性多肽中的大多数，通过操作编码目标区域的核酸序列来嵌入每个T-细胞表位的氨基酸序列，使得变体中编码的氨基酸残基的总数与亲本细胞毒性蛋白中的氨基酸残基的总数保持不变。产生了十种不同的多核苷酸，每种编码本发明的不同的示例性的细胞毒性的、靶向细胞的蛋白，所述蛋白包含本发明的不同的示例性的志贺毒素效应物多肽组分。使用本领域已知的标准技术，将这些示例性的多核苷酸用于生产十种本发明的示例性的细胞毒性的、靶向细胞的蛋白。在某些实验中，本实施例的细胞毒性蛋白的全长编码序列开始于或终止于编码Strep-tag®II的多核苷酸以促进检测和纯化。使用技术人员已知的方法纯化蛋白。

[0522] 使用在表1中描述的T-细胞表位之一，从亲本细胞毒性蛋白衍生出十一种细胞毒性蛋白，每种包含本发明的一种示例性的志贺毒素效应物多肽 (选自SEQ ID NO:11-21)和表2中的预测的B-细胞表位区域中的至少一种的破坏。对十一种细胞毒性蛋白中的每一种的亲本志贺毒素效应物多肽的确切修饰显示在表6中。表6列出了每种嵌入的T-细胞表位的序列、修饰在志贺毒素A亚基中的天然位置和B-细胞表位区域中的破坏的氨基酸段。

[0523] 表6.示例性的志贺毒素效应物多肽，其具有嵌入或插入在B-细胞表位区域和/或CD4+ T-细胞表位区域中的T-细胞表位

[0524]

位置(天然残基位置)	T-细胞表位名称	嵌入的 T-细胞表位	B-细胞表位区域	替换的 B-细胞表位区域
4-12	F3-4	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	1	TLDFSTAKT (SEQ ID NO:136)
43-51	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	SGSGDNLFA (SEQ ID NO:137)
44-52	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	3	GSGDNLFAV (SEQ ID NO:138)

[0525]

44-52	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	GSGDNLFAV (SEQ ID NO:138)
53-61	F2-2	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	4	DVRGIDPEE (SEQ ID NO:139)
53-61	F2-3	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	4	DVRGIDPEE (SEQ ID NO:139)
53-61	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	4	DVRGIDPEE (SEQ ID NO:139)
104-112	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	5	TAVTLSGDS (SEQ ID NO:140)
180-188	F2-4	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	7	TTLDDLSGR (SEQ ID NO: 141)
53-61	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	4	DVRGIDPE (SEQ ID NO:142)
245/246	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	9	无(插入在 246)

[0526] 前九种细胞毒性蛋白各自包含含有嵌入的T-细胞表位的志贺毒素效应物多肽(参见表6)—意味着对亲本细胞毒性蛋白的志贺毒素效应物多肽组分中的氨基酸残基的总体总数没有任何改变。在表6中列出的前九种修饰中的每一种举例说明了破坏B-细胞表位区域的嵌入T-细胞表位。由于这九种修饰是精确替换,破坏的T-细胞表位序列和B-细胞表位区域序列具有相同的长度且逐个匹配以从氨基端至羧基端的次序列出的每个氨基酸。表6中的第十种志贺毒素效应物多肽(53-61-F2)包含部分替换和在位置61处的一个氨基酸的插入,所述插入使剩余的羧基端野生型(WT) 氨基酸残基漂移一个位置。表6中的第十一种志贺毒素效应物多肽是整个 T-细胞表位在天然地定位的氨基酸残基245和246之间的完整插入。该插入位于SLT-1A的B-细胞表位区域#9天然地定位的氨基酸243-259内。

[0527] 计算机环境计算分析预测,对于八种T-细胞表位嵌入的或插入的志贺毒素效应物多肽变体而言,存在于野生型志贺毒素中的至少一个B-细胞表位被消除,并且预测通过在表6的任意示例性志贺毒素效应物多肽中嵌入或插入T-细胞表位没有产生新B-细胞表位(也参见下面的实施例3)。

[0528] 另外,由SEQ ID NO:11-17和19-21代表的志贺毒素效应物多肽各自包含预测的内源性CD4+ T-细胞表位的破坏。

[0529] 白喉毒素来源的效应物多肽

[0530] 类似于上面修饰志贺毒素来源的多肽的描述,将T-细胞表位嵌入具有蛋白酶体递送效应物功能的白喉毒素来源的多肽中以产生本发明的示例性的嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽。所述T-细胞表位选自表1 中的肽且被嵌入以破坏在表5中描述的至少一个预测的B-细胞表位区域。

[0531] 本实施例的所有白喉毒素来源的多肽包含与来自白喉毒素B亚基的易位结构域连续的来自白喉毒素A亚基的催化结构域、在A和B亚基来源的毒素效应物多肽区域之间的弗林蛋白酶切割基序、以及在A和B亚基来源的毒素效应物多肽区域中的半胱氨酸之间的预测二硫键。因而,在该实施例中的白喉毒素来源的多肽包含蛋白酶体递送效应物区域和核糖体毒性的毒素效应物多肽。本发明的示例性的、嵌入的T-细胞表位的、白喉毒素效应物多肽的多肽序列提供为SEQ ID NO:46、47和48。

[0532] 使用标准技术,在白喉毒素效应物多肽中做出一系列突变以便将T- 细胞表位嵌入与预测的B-细胞表位区域重叠的位置(参见表5)。表7如下显示了嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽的实施例:指示嵌入的T- 细胞表位的位置(基于SEQ ID NO:44中的天然白喉毒素多肽序列)、T- 细胞表位名称、T-细胞表位肽序列、被破坏的预测的B-细胞表位区域和天然白喉毒素多肽序列中被替换的氨基酸序列。

[0533] 表7.具有嵌入B-细胞表位区域中的T-细胞表位的示例性白喉毒素效应物多肽

[0534]

位置(天然位置)	**T-细胞表位**	**嵌入的 T-细胞表位**	**B-细胞表位区域**	**被替换的 B-细胞表位区域**	**B-细胞表位预测**	
					原始表位	新表位
34-42	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	2	GIQKPKSGT (SEQ ID NO:143)	被消除	无
69-77	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	NENPLSGKA (SEQ ID NO:144)	被消除	无

[0535]

168-176	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	6	ETRGKRGQD (SEQ ID NO:145)	被消除	无

[0536] 针对如上所述预测的B细胞表位中的任何变化,分析了嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体(SEQ ID NO:46、47和48)。在所有三种嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体中,野生型白喉毒素氨基酸序列中预测的B-细胞表位被消除,且没有预测新的B-细胞表位(表7)。

[0537] 将三种嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体(SEQ ID NO:46、47和48)和仅包含野生型毒素氨基酸序列(SEQ ID NO:45)的亲本白喉毒素效应物多肽各自设计成具有氨基端甲硫氨酸和羧基端聚组氨酸-标签 (6xHis标签(SEQ ID NO:146))以促进表达和纯化。本发明的两种示例性的嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体和仅包含野生型毒素氨基酸序列的亲本白喉毒素效应物多肽由本领域已知的细菌表达系统生产并在本领域已知的条件下纯化,例如,镍-次氮基三乙酸(Ni-NTA)树脂色谱法。

[0538] E.产生志贺毒素效应物多肽,其具有不会破坏任何B-细胞表位区域的嵌入的T-细胞表位

[0539] 认识到来自在实施例中描述的所有方法的所有B-细胞表位区域预测 (表2),鉴别出预测不含有任何B-细胞表位的SLT-1A的区域。通过替换天然氨基酸(通过置换),将来自

表1的T-细胞表位肽序列嵌入在被鉴别为缺少B-细胞表位的那些区域中以产生本发明的三种不同的示例性的志贺毒素效应物多肽,如在表8中所示。表8显示了成熟的天然SLT-1A多肽序列中鉴别的区域和被构建进志贺毒素效应物多肽中的替换T-细胞表位序列(参见SEQ ID NO:22-39)。

[0540] 表8.嵌入志贺毒素效应物多肽的B-细胞表位区域之外的T-细胞表位

[0541]

位置(天然残基位置)	T-细胞表位名称	嵌入的 T-细胞表位	替换的 WT 区域
66-74	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	NLRLIVERN (SEQ ID NO:147)
75-83	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)

[0542]

157-165	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	AMLRFVTVT (SEQ ID NO:149)
164-172	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	VTAEALRFR (SEQ ID NO:150)
221-229	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	VGRISFGSI (SEQ ID NO:151)
231-239	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	AILGSVALI (SEQ ID NO:152)
66-74	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	NLRLIVERN (SEQ ID NO:147)
75-83	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)
157-165	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	AMLRFVTVT (SEQ ID NO:149)
164-172	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	VTAEALRFR (SEQ ID NO:150)
221-229	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	VGRISFGSI (SEQ ID NO:151)
231-239	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	AILGSVALI (SEQ ID NO:152)
66-74	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	NLRLIVERN (SEQ ID NO:147)
75-83	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)
157-165	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	AMLRFVTVT (SEQ ID NO:149)
164-172	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	VTAEALRFR (SEQ ID NO:150)
221-229	C2	NLVPMVATV	VGRISFGSI

[0543]

		(SEQ ID NO:10)	(SEQ ID NO:151)
231-239	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	AILGSVALI (SEQ ID NO:152)

[0544] 使用BcePred程序分析了包含表8的嵌入T-细胞表位作为精确替换的志贺毒素效应物多肽序列。表8的嵌入的T-细胞表位精确替换都没有破坏通过该程序预测的六个表位区域中的任一个。表8的嵌入的T-细胞表位替换序列之一(变体75-83-F3)导致新B-细胞表位的预测。在区域(66-74) 和/或(157-165)附近嵌入T-细胞表位可能干扰志贺毒素效应物功能的催化活性,因为它们靠近已知SLT-1A催化活性必需的至少一个氨基酸(例如 Y77和E167)。

[0545] 另外,除了具有嵌入在位置221-229处的异源T-细胞表位的多肽(其由SEQ ID NO:26、32和38代表)以外,由SEQ ID NO:22-39代表的志贺毒素效应物多肽都包含预测的内源性CD4+ T-细胞表位的破坏。

[0546] F.产生毒素效应物多肽,其具有破坏毒素催化功能的嵌入T-细胞表位

[0547] 对于志贺毒素A亚基的酶活性而言最关键的残基包括酪氨酸-77(Y77) 和谷氨酸-167(E167)(Di,Toxicon 57:535-39(2011))。将来自表1的T-细胞表位肽序列嵌入在志贺毒素效应物多肽中,使得Y77或E167被突变以便减少或消除志贺毒素酶活性。在表9中显示了本发明的六种不同的示例性志贺毒素效应物多肽,它们包含破坏催化性氨基酸残基的异源T-细胞表位。表9显示了成熟的天然SLT-1A多肽序列中的嵌入T-细胞表位的位置、嵌入的替换T-细胞表位序列、成熟的天然SLT-1A多肽序列中被替换的序列、和产生的催化残基破坏(也参见SEQ ID NO:23,29,40,41,42,和43)。

[0548] 表9.嵌入志贺毒素效应物多肽中以灭活志贺毒素催化功能的T-细胞表位

[0549]

位置(天然残基位置)	**T-细胞表位名称**	**嵌入的 T-细胞表位**	**被替换的 WT 区域**	**催化残基变化**
75-83	C2	NLVPMVATV	NLYVTGFVN	Y77V

[0550]

		(SEQ ID NO:10)	(SEQ ID NO:148)	
75-83	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	NLYVTGFVN (SEQ ID NO:148)	Y77R
77-85	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	YVTGFVNRT (SEQ ID NO:153)	Y77G
159-167	F2	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	LRFVTVTAE (SEQ ID NO:154)	E167L
159-167	F3	ILRGSVAHK (SEQ ID NO:8)	LRFVTVTAE (SEQ ID NO:154)	E167K
162-170	C2	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	VTVTAEALR (SEQ ID NO:155)	E167V

[0551] 由SEQ ID NO:23、29、40、42和43代表的所有志贺毒素效应物多肽包含预测的内源性CD4+ T-细胞表位的破坏。另外,在具有表8所示的不破坏任何B-细胞表位区域的嵌入T-细胞表位的示例性志贺毒素效应物多肽中,它们中的至少八种会破坏志贺毒素效应物区域的催化性氨基酸残基(参见SEQ ID NO:23、25、29、31 35和37)。

[0552] 除了嵌入和插入在单个位置以外,将多个用于MHC I类呈递的免疫原性T-细胞表位嵌入和/或插入在相同志贺毒素来源的多肽或白喉毒素来源的多肽内用在多个T-细胞表位同时靶向递送中,例如,用第一个嵌入的 T-细胞表位破坏B-细胞表位区域,并用第二个嵌入的T-细胞表位破坏毒素催化功能。但是,应当指出,单个嵌入的T-细胞表位可以同时破坏B- 细胞表位区域和毒素催化功能。

[0553] 实施例2.针对核糖体毒性的毒素效应物功能的保留来试验毒素来源的效应物多肽

[0554] 针对核糖体毒性的毒素效应物功能的保留试验了本发明的示例性的毒素来源的效应物多肽。

[0555] 志贺毒素来源的效应物多肽的核糖体毒性保留

[0556] 使用核糖体抑制测定,确定了嵌入或插入一个或多个T-细胞表位以后亲本志贺毒素效应物多肽的酶活性的保留。在该实施例中该测定的结果是基于用作为细胞毒性蛋白的组分的每种志贺毒素效应物多肽执行测定。使用基于组织培养细胞的毒性测定,测量了包含不同志贺毒素效应物多肽的不同细胞毒性蛋白的特异性细胞毒性。将本发明的示例性的细胞毒性的、靶向细胞的蛋白的酶促活性和细胞毒性活性与单独的亲本志贺毒素效应物多肽(没有靶向细胞的结合区域)和“WT”细胞毒性蛋白进行了对比,所述“WT”细胞毒性蛋白包含相同细胞-靶向结构域(例如包含能够以高亲和力结合细胞外靶生物分子的免疫球蛋白型结合区域的结合区域)、但是具有野生型志贺毒素效应物区域(WT)。

[0557] 使用TNT®Quick Coupled Transcription/Translation试剂盒(L1170 Promega

Madison,WI,U.S.),使用无细胞体外蛋白翻译测定,确定了包含嵌入的或插入的T-细胞表位的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物多肽区域或WT区域)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$_{50}$)))]计算每个样品的半数最大抑制浓度(IC$_{50}$)值。为每种包含B细胞表位替换/破坏志贺毒素效应物多肽区域的去免疫化蛋白和包含野生型志贺毒素效应物区域的对照蛋白(WT)计算IC$_{50}$值。

[0558] 如在表10中所指出的,本发明的示例性的志贺毒素效应物多肽区域表现出与野生型志贺毒素效应物多肽(WT)相当的核糖体抑制。如在表10 中报道的,表现出在包含野生型志贺毒素效应物区域的阳性对照构建体的 10倍内的IC$_{50}$的、包含本发明的志贺毒素效应物多肽的任何构建体被认为表现出与野生型相当的核糖体抑制活性。

[0559] 表10.志贺毒素功能的保留:示例性的志贺毒素效应物多肽的体外催化活性和体内特异性细胞毒性

[0560]

示例性的志贺毒素效应物多肽	**志贺毒素功能**	
位置-T-细胞-表位	**核糖体灭活**	**特异性细胞毒性**
4-12-F3-4	与野生型相当	与野生型相当
43-51-C2	与野生型相当	与野生型相当
44-52-F2	与野生型相当	与野生型相当
53-61-F2	与野生型相当	与野生型相当
53-61-F2-2	与野生型相当	与野生型相当
53-61-F2-3	与野生型相当	与野生型相当
53-61-C2	与野生型相当	与野生型相当
104-112-C2	与野生型相当	与野生型相当
180-188-F2-4	与野生型相当	与野生型相当
245-F3	与野生型相当	与野生型相当

[0561] 在志贺毒素效应物多肽作为细胞毒性蛋白的组分的背景下,通过细胞杀死测定,确定了T-细胞表位嵌入/插入以后本发明的示例性志贺毒素效应物多肽的细胞毒性的保留。与不表达细胞毒性蛋白的结合区域的靶生物分子的细胞相比,使用表达细胞外靶标的细胞确定了包含志贺毒素效应物多肽(其包含嵌入的或插入的T-细胞表位)的蛋白的细胞毒性水平。将细胞铺板(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物多肽区域)的一系列10倍稀释液,然后将5μL稀释液或缓冲液对照加给细胞。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® 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。

[0562] 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数最大细胞毒性浓度(CD_{50})值。计算包含表10中的本发明的示例性志贺毒素效应物多肽的每种蛋白、包含野生型志贺毒素效应物区域和单独野生型SLT-1A 亚基(没有靶向结构域)的阳性对照细胞毒性蛋白(二者被认为是WT阳性对照)的CD_{50}。

[0563] 如表10中所示,包含本发明的示例性志贺毒素效应物多肽的蛋白表现出与野生型(WT)志贺毒素效应物多肽相当的细胞特异性的细胞毒性。如在表10中关于特异性细胞毒性所报告的,“与野生型相当”是指,包含志贺毒素效应物多肽(其包含嵌入的或插入的T-细胞表位)的蛋白对靶阳性细胞群体表现出在包含野生型(WT)志贺毒素效应物区域的蛋白的10倍内的CD_{50}和/或小于包含单独SLT-1A亚基的蛋白的50倍的CD_{50}。

[0564] 另外,与生物分子靶标阴性的细胞(即在细胞表面处不表达蛋白构建体的细胞-靶标结合区域的生物分子靶标的细胞)相比,包含本发明的示例性志贺毒素效应物多肽的相同蛋白构建体对表达生物分子靶标的细胞表现出特异性细胞毒性。因而,所有包含表10中的示例性志贺毒素效应物多肽的蛋白是表现出与野生型(WT)相当的志贺毒素效应物功能的细胞毒性蛋白,且每种细胞毒性蛋白包含在一个或多个预测的B-细胞表位区域中的破坏。

[0565] 白喉毒素来源的效应物多肽的核糖体毒性的保留

[0566] 将示例性的、嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽的催化活性与仅包含野生型氨基酸序列的白喉毒素效应物多肽(在本文中被称作“野生型”或“WT”)进行了对比。两种嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体都保留核糖体灭活活性。

[0567] 使用核糖体抑制测定和作为阳性对照的野生型(WT)白喉毒素效应物多肽,试验了在靶向细胞的分子的背景下具有嵌入的T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体的酶活性的保留。除非另外指出,否则如上所述,使用TNT®Quick Coupled Transcription/Translation试剂盒(L1170 Promega Madison,WI,U.S.),使用无细胞的体外蛋白翻译测定,确定这些毒素效应物多肽的核糖体灭活能力。首先,将白喉毒素效应物多肽在体外在标准条件下用弗林蛋白酶(New England Biolabs,Ipswich,MA,U.S.)切割。然后,将切割的蛋白在缓冲液中稀释以制备每个样品的一系列稀释液。将每个系列中的每个稀释液与TNT反

应混合物中的每一个以及荧光素酶T7对照 DNA组合并如上所述试验核糖体灭活活性。

[0568] 如上所述,计算白喉毒素效应物多肽的IC_{50}。图2和表11显示了该体外测定的结果,所述测定是关于本发明的示例性的、嵌入T-细胞的、白喉毒素效应物多肽的白喉核糖体毒性的毒素效应物功能的保留。嵌入T- 细胞的、白喉毒素效应物多肽的活性与野生型(WT)阳性对照相当,因为 IC_{50}值是在野生型白喉毒素效应物多肽对照的10倍内(图2;表11)。

[0569] 表11.示例性的嵌入T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽的催化活性的保留

[0570]

白喉毒素效应物多肽	**IC_{50} (μM)**	**相对于WT的倍数变化**
野生型(WT)	1.80	1.0
嵌入 T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体 34-42-F2	4.94	2.8
嵌入 T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽变体 168-176-F3	13.3	7.5
示例性的白喉毒素效应物多肽	白喉毒素功能: **核糖体灭活**	
34-42-F2	与野生型相当	
168-176-F3	与野生型相当	

[0571] 实施例3.试验嵌入T-细胞表位的毒素效应物多肽中的B-细胞表位区域和CD4+ T-细胞表位区域的破坏的去免疫化效应

[0572] 通过相对于仅包含野生型氨基酸序列的野生型(WT)志贺毒素效应物多肽研究抗原性和/或免疫原性水平,针对去免疫化试验了使用嵌入的或插入的T-细胞表位对志贺毒素效应物多肽中的B-细胞表位区域的破坏。

[0573] 通过蛋白质印迹分析来试验去免疫化

[0574] 为了分析去免疫化,在计算机环境中和通过蛋白质印迹法试验了志贺毒素效应物多肽的抗原性或免疫原性水平,所述蛋白质印迹法使用预形成的识别野生型志贺毒素效应物多肽的抗体。

[0575] 使用下述参数使用BcePred网络服务器,针对预测的B-细胞表位的破坏,检查了在表6中描述的每种志贺毒素效应物多肽(SEQ ID NO:11-21):具有亲水性2、可达性2、暴露的表面2.4、抗原倾向1.8、灵活性1.9、旋转1.9、极性2.3和组合1.9的默认设置的灵活读出(Saha S,Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239:197-204(2004))。通过其它程序在野生型SLT-1A亚基中鉴别出的三个预测的免疫原性表位区域(参见表2)用具有默认设置的BcePred灵活方案没有预测出,且因而没有进行分析。

[0576] T-细胞表位在本发明的下述示例性志贺毒素效应物多肽SEQ ID NO: 11-21中的嵌入或插入导致意图进行破坏的预测的B-细胞表位的消除,无需引入任何从头表位(新表位)(表12)。使用具有默认设置的BcePred灵活方案,本发明试验的示例性志贺毒素效应物多肽都没有一个导致任何从头预测的B-细胞表位的产生(表12)。用具有默认设置的

BcePred灵活方案没有预测的任何B-细胞表位区域以“未鉴别”来指示,且在T-细胞表位嵌入或插入以后的结果以“N/A”来指示,以表示“不适用”。

[0577] 表12.嵌入的或插入的T-细胞表位的B-细胞表位区域破坏分析

[0578]

使用 T-细胞表位替换的 B-细胞表位区域破坏			BcePred 柔性 B-细胞表位预测		
T-细胞表位位置	**嵌入的 T-细胞表位**	**被破坏的 B-细胞表位区域**	**WT 志贺毒素序列(亲本)**	**修饰的志贺毒素序列**	**新表位预测**
4-12	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	1	未鉴别	N/A	无

[0579]

43-51	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	39-46	被消除	无
44-52	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	3	39-46	被消除	无
44-52	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	39-46	被消除	无
53-61	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	4	55-61	被消除	无
53-61	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	4	55-61	被消除	无
53-61	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	4	55-61	被消除	无
53-61	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	4	55-61	被消除	无
104-112	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	5	105-111	被消除	无
180-188	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	7	181-187	被消除	无
245/246	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	9	未鉴别	N/A	无

[0580] 使用预形成的识别野生型(WT)志贺毒素效应物多肽(其包含SEQ ID NO:1的氨基酸1-251)的抗体(多克隆和单克隆抗体),通过蛋白质印迹法针对去免疫化试验了志贺毒素效应物多肽的相对抗原性水平。

[0581] 在包含志贺毒素效应物多肽的细胞毒性蛋白上执行蛋白质印迹法,所述志贺毒素效应物多肽仅包含野生型(WT)志贺毒素序列或包含多种修饰的志贺毒素序列(其包含通过T-细胞表位替换实现的B-细胞表位区域破坏)(SEQ ID NOs:11-19)之一。给这些细胞毒性蛋白加载等量重复的4-20%十二烷基硫酸钠(SDS)、聚丙烯酰胺凝胶(Lonza,Basel,CH),并在变性条件下电泳。将得到的凝胶通过考马斯染色进行分析或根据生产商的说明书使用iBlot®(Life Technologies,Carlsbad,CA,U.S.)系统转移至聚二氟乙烯 (PVDF)膜。将得到的膜在标准条件下使用下述抗体进行探测:兔多克隆α-NWSHPQFEK(SEQ ID NO:156)(A00626,Genscript,Piscataway,NJ, U.S.),其识别也被称作Streptag®II的多肽NWSHPQFEK(SEQ ID NO:156);小鼠单克隆α-Stx(mAb1或抗-SLT-1A mAb1)(BEI NR-867 BEI Resources,Manassas,VA,U.S.;可与志贺毒素和志贺样毒素1A亚基交叉反应);兔多克隆抗体α-SLT-1A(pAb1或抗-SLT-1A pAb1)(Harlan Laboratories,Inc.Indianapolis,IN,U.S.,针对SLT-1A氨基酸1-251产生的定制抗体生产);和兔多克隆抗体α-SLT-1A(pAb2或抗-SLT-1A pAb2)(Genscript,Piscataway,NJ,U.S.,定制抗体生产),其针对肽RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:157)和HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:158)产生。肽序列RGIDPEEGRFNN(SEQ ID NO:157)位于SLT-1A和StxA中的氨基酸55-66处,跨预测的B细胞表位,且肽序列HGQDSVRVGR(SEQ ID NO:158)位于SLT-1A和StxA中的214-223处,跨预测的B-细胞表位。

[0582] 使用标准条件检测膜结合的抗体,且在适当时,使用辣根过氧化物酶 (HRP)缀合的第二抗体(山羊抗-兔-HRP或山羊抗-小鼠-HRP,Thermo Scientific,Rockford,IL,U.S.)。图3-4显示了蛋白质印迹的图像,其中编号的凝胶和/或膜的泳道和图例用相同的各个编号指示哪种志贺毒素效应物多肽是加载进每个泳道中的细胞毒性蛋白样品的组分。对于每种凝胶,考马斯染色和/或抗-streptag II蛋白质印迹信号充当总细胞毒性蛋白加载对照。所有经修饰的志贺毒素效应物多肽具有减少或消除的被一种或多种可以识别野生型SLT-1A的抗体的识别,从而指示减少的抗原性和成功的去免疫化。在图3和4中显示的蛋白质印迹分析的结果总结在表13中。

[0583] 表13.通过蛋白质印迹进行的表位破坏分析:试验的示例性志贺毒素效应物多肽表现出减少的或消除的抗体结合

[0584]

细胞毒性蛋白包含:	**蛋白质印迹结果**		
	抗-SLT-1A pAb1	**抗-SLT-1A pAb2**	**抗-SLT-1A**

[0585]

					mAb1
WT 志贺毒素效应物区域			存在	存在	存在
示例性的志贺毒素效应物多肽，其包含用下面的 T-细胞表位破坏的 B-细胞表位区域:					
T-细胞表位位置	**嵌入的 T-细胞表位**	**被破坏的 B-细胞表位区域**	**蛋白质印迹结果**		
			抗-SLT-1A pAb1	**抗-SLT-1A pAb2**	**抗-SLT-1A mAb1**
4-12	ILRFSVAHK (SEQ ID NO:9)	1	减少	存在	消除
43-51	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	3	减少	存在	消除
44-52	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	3	强烈减少	减少	消除
53-61	GILGFVFTL (SEQ ID NO:4)	4	减少	消除	消除
53-61	DILGFVFTL (SEQ ID NO:5)	4	减少	消除	未试验
53-61	DILGFDFTL (SEQ ID NO:6)	4	减少	消除	未试验
53-61	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	4	强烈减少	强烈减少	消除
104-112	NLVPMVATV (SEQ ID NO:10)	5	存在	存在	消除
180-188	GILGDVFTL (SEQ ID NO:7)	7	存在	存在	消除

[0586] 试验CD4+ T-细胞去免疫化

[0587] 使用人CD4+ T-细胞增殖测定(在有外源施加的多肽存在下)和人 CD4+树突T-细胞刺激测定(在有用施加的多肽处理过的人单核细胞存在下),针对CD4+ T-细胞免疫原性的降低试验了预测的CD4+ T-细胞表位区域中的破坏。

[0588] 使用技术人员已知的T-细胞增殖测定来试验CD4+ T-细胞表位去免疫化在示例性

毒素效应物多肽中的有效性,所述毒素效应物多肽包含嵌入或插入预测的CD4+ T-细胞表位中的T-细胞表位。本实施例的T-细胞增殖测定涉及标记CD4+ T-细胞和然后使用流式细胞计数法测量响应于不同肽的施用的增殖变化,所述肽源自使用嵌入或插入异源CD8+ T-细胞表位(例如,SEQ ID NO:11-43)的方法去免疫化的多肽或不具有与它有关的任何异源T-细胞表位的参比多肽。

[0589] 合成了一系列从多肽来源的重叠肽,并在CFSE CD4+ T细胞增殖测定(ProImmune Inc.,Sarasota,FL,U.S)中进行了试验。将人CD8+ T-细胞除去的、用CFSE标记的外周血单核细胞(PBMC)与5μM每种目标肽一起在 6个重复孔中培养7天。每个测定板包括一组未经处理的对照孔。所述测定还包括参比抗原对照,其包含已知MHC II类抗原的合成肽。

[0590] 如通过流式细胞计量术直接测量的,响应于施用的肽而增殖的CD8+T-细胞除去的PBMC将表现出CFSE荧光强度的下降。对于原初T-细胞分析,通过与来自未刺激的样品的结果进行对比,诸如通过关于荧光信号排序为阴性的、暗淡的或高的,为每个刺激的样品确定在背景以上的刺激百分比。将每个样品中关于CD4+CFSE T-细胞暗淡群体的计数表达为总CD4+ T-细胞群体的比例。使用重复值来计算在背景以上的刺激百分比(具有抗原刺激的CD4+ T-细胞CFSE暗淡细胞的比例减去没有抗原刺激的 CD4+ T-细胞CFSE暗淡细胞的比例)。从重复值计算平均值和平均值标准误差。如果背景以上的刺激百分比大于0.5%且也大于背景以上的标准误差的2倍,则认为结果是"阳性的"。为了允许对比肽,计算了响应指数。该指数是基于将每种肽的响应的量级(背景以上的刺激百分比)乘以每种肽的响应供体的数目(抗原性百分比)。

[0591] 确定相对CD4+ T-细胞免疫原性

[0592] 使用下述树突细胞(DC)T-细胞增殖测定,确定了本发明的示例性全长多肽的相对CD4+ T-细胞免疫原性。该DC T-细胞测定测量对外源施加的多肽或蛋白的CD4+ T-细胞应答。使用ProImmune的DC-T测定服务执行所述DC T-细胞测定以确定本发明的多肽、蛋白和靶向细胞的分子之间的 CD4+ T-细胞驱动的免疫原性相对于起始亲本多肽、蛋白或靶向细胞的分子(其缺少任何异源T-细胞表位的添加)的相对水平。本实施例的DC T- 细胞测定涉及针对从施用的多肽、蛋白或靶向细胞的分子样品来源的肽的抗原呈递来试验人树突细胞。

[0593] 简而言之,基于高分辨率MHC II类组织分类,使用健康的人供体组织来分离分类的样品。使用20、40或50个供体的组群。首先,在确定成分培养基中培养得自人供体PBMC的单核细胞以产生未成熟的树突细胞。然后,将未成熟的树突细胞用明确定义的对照抗原进行刺激,并通过在确定成分培养基中进一步培养而诱导成更成熟的表型。接着,将来自相同人供体样品的、CD8+ T-细胞除去的供体PBMC用CFSE标记。然后将CFSE 标记的、CD8+ T-细胞除去的PBMC与抗原预处理的树突细胞一起培养7 天以允许CD4+树突细胞刺激,此后试验每个样品的8个重复。作为阴性对照,每个树突细胞培养物系列还包括一组未处理的树突细胞。对于阳性对照,所述测定包含两种明确定义的参比抗原,每种包含全长蛋白。

[0594] 为了评价基于树突细胞的免疫原性,在研究组群之间分析了供体细胞应答的频率。认为测定中的阳性应答指示潜在体内CD4+ T-细胞应答。将阳性应答(其测量为在背景以上的刺激的百分比)定义为在2个或更多个独立供体样品中大于0.5百分比(%)的。通过取在每个样品的接受供体之间得到的背景以上的平均刺激百分比,确定阳性供体细胞应答

的强度。通过将应答强度值乘以供体应答的频率来计算应答指数,以确定每个样品的 CD4+ T-细胞免疫原性的水平。另外,通过对比来自以下两个样品的结果确定代表相对CD4+ T-细胞免疫原性的应答指数:一个包含嵌入预测的 CD4+ T-细胞表位区域中的CD8+ T细胞表位,且第二个变体缺少对相同预测的CD4+ T-细胞区域的任何破坏,以确定破坏是否会减少人供体细胞的 CD4+ T-细胞应答。

[0595] 通过体内相对免疫原性试验去免疫化

[0596] 使用人免疫系统的哺乳动物模型,针对去免疫化试验了志贺毒素效应物多肽的相对免疫原性水平。每周3次给小鼠静脉内地施用包含野生型(WT)或去免疫化形式的志贺毒素效应物多肽组分的细胞毒性蛋白或多肽持续2周或更长。从注射的小鼠采取血液样品,并通过酶联免疫吸附测定 (ELISA)试验对细胞毒性蛋白和/或志贺毒素效应物多肽的反应性。与仅注射了野生型形式的志贺毒素效应物多肽或包含它们的组合物的小鼠相比,将在注射了去免疫化的志贺毒素效应物多肽或包含它们的组合物的小鼠中引起减少的免疫原性应答。相对减少的免疫原性应答指示,去免疫化的志贺毒素效应物多肽就施用给哺乳动物以后具有减少的疫原性潜力和允许哺乳动物的免疫系统做出应答的时间而言被去免疫化。

[0597] 另外,使用本实施例的方法针对去免疫化试验了本发明的白喉毒素效应物多肽(例如SEQ ID NO:46-48),以验证每个包含嵌入的或插入的T-细胞表位的白喉毒素效应物多肽中的一个或多个B-细胞表位区域的破坏。

[0598] 实施例4.试验本发明的示例性志贺毒素效应物多肽实现的、嵌入的 T-细胞表位的细胞内化、亚细胞按路线发送和在靶细胞表面上的呈递

[0599] 在该实施例中,研究了本发明的示例性的靶向细胞的蛋白(其各自包含本发明的一种示例性的志贺毒素效应物多肽)将T-细胞表位递送至靶细胞的MHC I类途径用于呈递至靶细胞表面的能力。另外,使用本实施例的方法试验了包含本发明的白喉毒素效应物多肽(例如SEQ ID NO:46-48) 的靶向细胞的蛋白,以验证它们将嵌入的T-细胞表位递送至MHC I类呈递系统的能力。

[0600] 使用本领域已知的标准技术,制备了本发明的多种示例性的靶向细胞的蛋白,其中各自包含细胞类型-靶向区域和本发明的志贺毒素效应物多肽 (参见例如WO2014164680和WO2014164693)。本发明的一种靶向细胞的蛋白包含本发明的志贺毒素效应物多肽和靶向细胞的结合区域,所述结合区域能够表现出对细胞外靶生物分子的高亲和力结合,所述细胞外靶生物分子与特定细胞类型的表面物理上连接。本发明的靶向细胞的蛋白能够选择性地靶向表达它们的靶向细胞的结合区域的靶生物分子的细胞并内化进这些靶细胞中。

[0601] 使用一种流式细胞计量方法来证实与MHC I类分子形成复合物的T- 细胞表位(插入或嵌入在志贺毒素效应物区域中)的递送和在靶细胞表面上的细胞外展示。该流式细胞计量方法利用可溶性的人T-细胞受体(TCR)多聚体试剂(Soluble T-Cell Antigen Receptor STAR™Multimer,Altor Bioscience Corp.,Miramar,FL,U.S.),各自具有对不同表位-人HLA复合物的高亲和力结合。

[0602] 每种STAR™TCR多聚体试剂源自特定T-细胞受体,并允许基于选择的TCR识别在特定MHC I类分子的背景下存在的特定肽而检测特定肽 -MHC复合物。这些TCR多聚体由已经用抗生蛋白链菌素生物素化和多聚化的重组人TCR组成。用藻红蛋白(PE)标记TCR多聚体。

这些TCR多聚体试剂允许检测存在于人细胞表面上的特定肽-MHC I类复合物,因为每种可溶性的TCR多聚体类型在不同条件下识别并稳定地结合特定肽-MHC 复合物(Zhu X等人,J Immunol 176:3223-32(2006))。这些TCR多聚体试剂允许通过流式细胞计量术鉴别和定量存在于细胞表面上的肽-MHC I类复合物。

[0603] 在该实施例中使用TCR CMV-pp65-PE STAR多聚体试剂(Altor Bioscience Corp.,Miramar,FL,U.S.)。可以用TCR CMV-pp65-PE STAR™多聚体试剂检测表达HLA-A2的人细胞对CMV C2肽(NLVPMVATV (SEQ ID NO:10))的MHC I类途径呈递,所述TCR CMV-pp65-PE STAR™多聚体试剂表现出与人HLA-A2形成复合物的CMV-pp65表位-肽(残基 495-503,NLVPMVATV(SEQ ID NO:10))的高亲和力识别且用PE标记。

[0604] 在该实施例中使用的靶细胞是可从ATCC(Manassas VA,U.S.)得到的永生化的人癌细胞。使用本领域已知的标准流式细胞计量方法,证实靶细胞在它们的细胞表面上表达HLA-A2 MHC-I类分子和在该实施例中使用的蛋白的细胞靶向部分的细胞外靶生物分子。

[0605] 用本发明的示例性的靶向细胞的蛋白处理靶细胞,每种蛋白包含不同的志贺毒素效应物多肽,所述多肽包含嵌入预测的B-细胞表位区域中的 T-细胞表位。在该实施例中试验的本发明的每种示例性的靶向细胞的蛋白之一包含以下志贺毒素效应物多肽之一:43-51-C2(SEQ ID NO:13)、53-61-C2(SEQ ID NO:17)和104-112-C2(SEQ ID NO:18)。考虑到对志贺毒素的细胞类型特异性敏感性,通过在与其他人所用浓度类似的浓度外源施用本发明的不同的示例性的靶向细胞的蛋白来处理靶细胞集合(参见例如Noakes K等人,FEBS Lett 453:95-9(1999))。然后将处理过的细胞在标准条件(包括在37℃和含有5%二氧化碳的气氛)下温育6小时,以允许志贺毒素效应物区域介导的中毒。然后,将细胞用细胞培养基洗涤,再悬浮于新鲜细胞培养基中,并在用TCR CMV-pp65-PE STAR™多聚体试剂染色之前温育20小时。

[0606] 作为对照,在三种条件下处理靶细胞集合:1)没有任何处理(“未处理”),意味着没有添加外源分子,2)用外源施加的CMV C2肽(CMV-pp65,氨基酸495-503:序列NLVPMVATV (SEQ ID NO:10),由BioSynthesis, Lewisville,TX,U.S.合成),和3)用外源施加的与Peptide Loading Enhancer(“PLE”,Altor Biosicence Corp.,Miramar,FL)组合的CMV C2肽 (NLVPMVATV(SEQ ID NO:10),如上)。与PLE处理组合的C2肽允许外源肽加载和充当阳性对照。展示适当MHC I类单元型的细胞可以被迫从细胞外空间(即在没有施加的肽的细胞内化存在下)或在有PLE(它是B2- 微球蛋白和其它组分的混合物)存在下加载适当的外源施加的肽。

[0607] 处理以后,将所有细胞集合洗涤并与TCR CMV-pp65-PE STAR多聚体试剂一起在冰上温育1小时。将细胞洗涤,并使用Accuri™C6流式细胞计(BD Biosciences,San Jose,CA,U.S.)通过流式细胞计量术测量样品的荧光以检测与群体中的细胞结合的任何TCR CMV-pp65-PE STAR™多聚体的存在并定量(有时在本文中被称作“染色”)。

[0608] 不同处理的细胞集合的流式细胞计数分析的结果显示在图5和表14 中。未经处理的对照组用于通过采用门控来鉴别阳性和阴性细胞群体,所述门控导致小于1%的来自未经处理的对照组的细胞处于“阳性”门控(代表背景信号)中。然后将相同的门控应用于其它样品以表征每个样品的阳性群体。在图5中,给出了流式细胞计量术直方图,计数(细胞的数目)是在Y- 轴上,且相对荧光单位(RFU)是在X-轴(对数标度)上。所有直方图中的灰色线显

示了未处理的细胞的图,且黑色线显示了根据指示的处理处理过的细胞的图。在表14中,给出了C2-表位-肽-HLA-A2复合物染色阳性的处理集合中细胞的百分比。在该测定中的阳性细胞是被TCR-CMV-pp65-PE STAR试剂结合并在上述阳性门控中计数的细胞。表14也显示了每个集合在RFU中的对应索引平均荧光强度(“iMFI”,乘以阳性百分比的阳性群体的荧光)。

[0609] 表14.本发明的示例性的靶向细胞的蛋白的流式细胞计量术结果:在中毒的靶细胞的表面上检测到的肽-表位C2-MHC I类复合物

[0610]

	TCR CMV-pp65-PE 流式细胞计量术	
靶细胞处理: 外源施加的分子	**阳性细胞的百分比**	**iMFI (RFU)**
未处理	0.96%	20
含有志贺毒素效应物区域 43-51-C2 的靶向细胞的蛋白	7.6%	113
含有志贺毒素效应物区域 53-61-C2 的靶向细胞的蛋白	4.5%	64
含有志贺毒素效应物区域 104-112-C2 的靶向细胞的蛋白	6.7%	89
仅 C2 肽	0.95%	19
C2 肽和 PLE	36.7%	728

[0611] 施用了包含43-51-C2、53-61-C2和104-112-C2的外源蛋白的细胞分别在它们的群体的7.6%、4.5%和6.7%的细胞上表现出C2-肽-HLA-A2复合物的细胞表面阳性信号。相反,“未处理”和用“仅C2肽”处理的细胞群体含有小于1%的阳性细胞(分别是0.96%和0.95%)。由于未测量的加工效率和动力学,在单个时间点在“靶向细胞的蛋白”处理样品中检测到的呈递的C2-肽-HLA-A2复合物的百分比可能不会准确地反映由本发明的这些示例性的靶向细胞的蛋白可能实现的最大呈递。

[0612] 阳性对照“C2肽和PLE”群体含有36.7%阳性细胞;但是,所述肽仅可以从细胞外空间(“外源地”)和在有PLE存在下加载在表面上,如通过与作为未经处理的对照组的、具有类似背景染色水平(0.95%)的“仅C2肽”结果进行对比所证实的。

[0613] 外源施加的与人MHC I类分子形成复合物的嵌入T-细胞表位C2(C2 表位-肽/HLA-A2)在中毒的靶细胞的细胞表面上的检测证实,包含示例性志贺毒素效应物区域43-51-C2、53-61-C2或104-112-C2的靶向细胞的蛋白能够进入靶细胞、执行充分的亚细胞按路线发送和将足够的嵌入T-细胞表位递送至MHC I类途径用于在靶细胞表面上进行表面呈递。

[0614] 实施例5.试验中毒靶细胞的细胞毒性的T-细胞介导的细胞裂解和由本发明的蛋白递送的T-细胞表位的MHC I类呈递所触发的其它免疫应答

[0615] 在该实施例中,使用本领域已知的标准测定来研究靶细胞对由本发明的示例性的靶向细胞的蛋白递送的T-细胞表位的MHC I类呈递的功能后果。要研究的功能后果包括CTL活化、CTL介导的靶细胞杀死和CTL的 CTL细胞因子释放。

[0616] 使用一种基于CTL的细胞毒性测定来评估表位呈递的后果。所述测定包括组织培养的靶细胞和T-细胞。如在实施例4中所述,使靶细胞中毒。简而言之,将靶细胞在含有不同的外源施加的蛋白的标准条件下温育6小时,其中某些蛋白包含本发明的志贺毒素效应物多肽或本发明的白喉毒素效应物多肽。接着,将CTL加给中毒的靶细胞并温育以允许T-细胞识别和结合展示表位-肽/MHC I类复合物的任何靶细胞。然后,使用技术人员已知的标准方法研究了某些功能后果,包括CTL与靶细胞的结合、通过 CTL介导的细胞裂解实现的靶细胞杀死和细胞因子(诸如干扰素γ或白介素)的释放(通过ELISA或ELIspot)。

[0617] 使用商购可得的CTL应答测定,例如CytoTox96®非放射性测定 (Promega,Madison,WI,U.S.)、Granzyme B ELISpot测定(Mabtech,Inc.,Cincinnati,OH,U.S.)、胱天蛋白酶活性测定和LAMP-1易位流式细胞计数测定,定量了展示表位-肽/MHC I类复合物的靶细胞对CTL的活化。为了特异性地监测CTL介导的靶细胞杀死,如本领域所述(参见例如Durward M 等人,J Vis Exp 45 pii 2250(2010)),使用羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE) 进行靶细胞的体外和体内研究。

[0618] 实施例6.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和对CD20特异性的结合区域的细胞毒性蛋白(与 SLT-1A融合的αCD20)

[0619] 在该实施例中,T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物区域源自如上所述的志贺样毒素1(SLT-1A)的A亚基。免疫球蛋白型结合区域αCD20-抗原源自识别人CD20的免疫球蛋白型结构域(参见例如Haisma等人,Blood 92:184-90(1999);Geng S等人,Cell Mol Immunol 3:439-43(2006);Olafesn T等人,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域。CD20在多个癌细胞类型上表达,例如,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细胞和黑素瘤细胞。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。

[0620] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的构建、生产和纯化

[0621] 将免疫球蛋白型结合区域αCD20和志贺毒素效应物区域(例如,SEQ ID NO:11-43)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 NO:49、50和51)的多核苷酸来生产融合蛋白。如在以前的实施例中所述,使用细菌的和/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。

[0622] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的体外特征

[0623] 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 CD20+细胞和CD20-细胞的结合特性、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。

[0624] 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。

[0625] 使用CD20+细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的细胞毒性

[0626] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定,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死测定,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)。另外,通过导致 CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了SLT-1A::αCD20的细胞毒性。

[0627] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCD20的体内效应

[0628] 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源自在它们的细胞表面上表达CD20的人赘生性细胞向那些小鼠中的注射。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0629] 实施例7.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和对HER2特异性的结合区域的细胞毒性蛋白(“与 SLT-1A融合的αHER2-V_HH”)

[0630] 在该实施例中,CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物区域源自如上所述的志贺样毒素1(SLT-1A)的A亚基。免疫球蛋白型结合区域是从骆驼科抗体(V_HH)蛋白5F7的单结构域可变区来源的αHER2 V_HH,如在美国专利申请公开2011/0059090中所述。

[0631] 细胞毒性蛋白“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”的构建、生产和纯化

[0632] 将免疫球蛋白型结合区域和志贺毒素效应物区域连接在一起以形成融合蛋白(参见,例如,SEQ ID NO:52、53和54)。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物区域(其包含SEQ ID NO:11-43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,使得所述结合区域任选地位于志贺毒素效应物区域的氨基端附近,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。

[0633] 确定细胞毒性蛋白“与SLT-1A融合的αHER2-V_HH”的体外特征

[0634] 通过基于荧光的流式细胞计量术,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。

[0635] 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0.1-100 pM。

[0636] 使用HER2+细胞杀死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

[0637] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用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死测定,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0.01-100 nM。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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了与SLT-1A融合的αHER2-V_HH的细胞毒性。

[0638] 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

[0639] 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源自在它们的细胞表面上表达HER2的人赘生性细胞向那些小鼠中的注射。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0640] 实施例8.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从抗体αEB-抗原来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0641] 在该实施例中,CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物区域是从如上所述的志贺样毒素1(SLT-1A)的A亚基来源的去免疫化的志贺毒素效应物多肽。免疫球蛋白型结合区域αEB- 抗原源自针对EB抗原的单克隆抗体(Fang C等人,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域。所述EB抗原在多个细胞类型上表达,诸如被EB病毒和癌细胞(例如淋巴瘤和鼻咽癌细胞)感染的细胞。另外, EB感染与其它疾病(例如,多发性硬化)有关。

[0642] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αEpsteinBarr::KDEL的构建、生产和纯化

[0643] 将免疫球蛋白型结合区域αEB-抗原和志贺毒素效应物区域连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:61)以形成蛋白。例如,通过表达编码αEB-抗原-结合蛋白SLT-1A::αEpsteinBarr::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::αEpsteinBarr::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0644] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEpsteinBarr::KDEL的体外特征

[0645] 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 EB抗原阳性细胞和EB抗原阴性细胞的结合特性。SLT-1A::αEpsteinBarr::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。

[0646] 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::αEpsteinBarr::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::αEpsteinBarr::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0647] 使用细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEpsteinBarr::KDEL的细胞毒性

[0648] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用EB抗原阳性细胞确定SLT-1A::αEpsteinBarr::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀死测定,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::αEpsteinBarr::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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了 SLT-1A::αEpsteinBarr::KDEL的细胞毒性。

[0649] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEpsteinBarr::KDEL的体内效应

[0650] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEpsteinBarr::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源自在它们的细胞表面上表达EB抗原的人赘生性细胞向那些小鼠中的注射。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0651] 实施例9.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从抗体αLeishmania-抗原来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0652] 在该实施例中,志贺毒素效应物区域是从如上所述的志贺样毒素1 (SLT-1A)的A亚基来源的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽。免疫球蛋白型结合区域αLeishmania-抗原源自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Leishmania抗原(参见Silveira T等人,Int J Parasitol 31:1451-8(2001);Kenner J等人,J Cutan Pathol 26:130-6 (1999);Berman J和Dwyer,Clin Exp Immunol 44:342-348(1981))。

[0653] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αLeishmania::KDEL的构建、生产和纯化

[0654] 将免疫球蛋白型结合区域α-Leishmania-抗原和志贺毒素效应物区域连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:61)以形成蛋白。例如,通过表达编码Leishmania-抗原-结合蛋白SLT-1A::αLeishmania::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::αLeishmania::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0655] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αLeishmania::KDEL的体外特征

[0656] 通过基于荧光的流式细胞计量术,确定本实施例的细胞毒性蛋白对 Leishmania抗原阳性细胞和Leishmania抗原阴性细胞的结合特性。SLT-1A::αLeishmania::KDEL对Leishmania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Leishmania抗原阴性细胞的显著结合。

[0657] 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 SLT-1A::αLeishmania::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::αLeishmania::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0658] 使用细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αLeishmania::KDEL的细胞毒性

[0659] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用Leishmania 抗原阳性细胞确定SLT-1A::αLeishmania::KDEL的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀死测定,使用Leishmania抗原阴性细胞作为 Leishmania抗原阳性细胞的对比,确定SLT-1A::α

Leishmania::KDEL的选择性细胞毒性特征。对于Leishmania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Leishmania抗原的细胞的CD_{50}是在细胞表面上表达Leishmania抗原的细胞的大约10-10,000倍(更少的细胞毒性)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了SLT-1A::αLeishmania::KDEL的细胞毒性。

[0660] 实施例10.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从免疫球蛋白型结合区域α神经降压肽-受体来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0661] 在该实施例中,志贺毒素效应物区域是从如上所述的志贺样毒素1 (SLT-1A)的A亚基来源的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽。免疫球蛋白型结合区域α神经降压肽- 受体源自结合人神经降压肽受体的DARPin™ (GenBank Accession: 2P2C_R)或单克隆抗体(Ovigne J等人,Neuropeptides 32:247-56 (1998))。所述神经降压肽受体由多种癌细胞(诸如乳腺癌、结肠癌、肺癌、黑素瘤和胰腺癌细胞)表达。

[0662] 细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的构建、生产和纯化

[0663] 将免疫球蛋白型结合区域α神经降压肽R和志贺毒素效应物区域连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:61)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::α神经降压肽R::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0664] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的体外特征

[0665] 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性。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。

[0666] 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0.1-100 pM。

[0667] 使用细胞杀死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

[0668] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死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死测定,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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了SLT-1A::α神经降压肽R::KDEL的细胞毒

性。

[0669] 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

[0670] 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物肿瘤的效应,所述异种移植物肿瘤源自在它们的细胞表面上表达神经降压肽受体的人赘生性细胞向那些小鼠中的注射。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0671] 实施例11.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从免疫球蛋白型结合区域αEGFR来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0672] 在该实施例中,志贺毒素效应物区域是从志贺样毒素1的A亚基 (SLT-1A)来源的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽。结合区域αEGFR源自AdNectin™(GenBank Accession:3QWQ_B)、Affibody™(GenBank Accession:2KZI_A;美国专利 8,598,113)或抗体,它们都结合一种或多种人表皮生长因子受体。表皮生长因子受体的表达与人癌细胞(例如,肺癌细胞、乳腺癌细胞和结肠癌细胞) 有关。

[0673] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的构建、生产和纯化

[0674] 将免疫球蛋白型结合区域αEGFR和志贺毒素效应物区域连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:61)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::αEGFR::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0675] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的体外特征

[0676] 通过基于荧光的流式细胞计量术确定本实施例的细胞毒性蛋白对 EGFR+细胞和EGFR-细胞的结合特性。SLT-1A::αEGFR::KDEL对 EGFR+细胞的B_{max}被测量为大约50,000-200,000MFI,具有在0.01-100 nM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。

[0677] 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 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。

[0678] 使用细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的细胞毒性

[0679] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用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死测定,使用EGFR-细胞作为利什曼原虫(Leishmania)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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了SLT-1A::αEGFR::KDEL的细胞毒性。

[0680] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEGFR::KDEL的体内效应

[0681] 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物肿瘤的效应,所述异种移植物肿瘤源自在它们的细胞表面上表达EGFR的人赘生性细胞向那些小鼠中的注射。通过导致CTL 介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0682] 实施例12.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从抗体αCCR5来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0683] 在该实施例中,志贺毒素效应物区域是从志贺样毒素1的A亚基 (SLT-1A)来源的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽。免疫球蛋白型结合区域αCCR5源自针对人CCR5 (CD195)的单克隆抗体(Bernstone L等人,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。

[0684] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL的构建、生产和纯化

[0685] 将免疫球蛋白型结合区域αCCR5和志贺毒素效应物区域连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:61)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::αCCR5::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0686] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5的体外特征

[0687] 通过基于荧光的流式细胞计量术确定本实施例的细胞毒性蛋白对 CCR5+细胞和CCR5-细胞的结合特性。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。

[0688] 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 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。在该无细胞测定中 SLT-1A::αCCR5::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0689] 使用细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL的细胞毒性

[0690] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用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死测定,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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了SLT-1A::αCCR5::KDEL的细胞毒性。

[0691] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL的体内效应

[0692] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αCCR5::KDEL对从供体材料除去T-细胞的体内效应(参见Tsirigotis P等人,Immunotherapy 4: 407-24(2012))。使用非人灵长类动物来确定SLT-1A::αCCR5的体内效应。当用SLT-1A::αCCR5::KDEL预处理捐赠的器官时,在肾移植以后的恒河猴中分析移植物抗宿主病(参见Weaver T等人,Nat Med 15:746-9(2009))。在胃肠外施用不同剂量的SLT-1A::αCCR5::KDEL以后,观察到食蟹猴灵长类动物

中外周血T淋巴细胞的体内除去。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递，针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。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)以后严格除去循环T-细胞(参见Sellier P等人，PLoS One 5: e10570(2010))。

[0693] 实施例13.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从抗-Env免疫球蛋白结构域来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0694] 在该实施例中，志贺毒素效应物区域是从志贺毒素的A亚基(StxA)来源的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽。免疫球蛋白型结合区域αEnv源自结合HIV包膜糖蛋白(Env) 的现有抗体，诸如GP41、GP120、GP140或GP160(参见例如Chen W等人，J Mol Bio 382:779-89(2008)；Chen W等人，Expert Opin Biol Ther 13: 657-71(2013)；van den Kerkhof T等人，Retrovirology 10:102(2013))，或源自使用标准技术制备的抗体(参见Prabakaran等人，Front Microbiol 3:277(2012))。Env是也在HIV复制过程中在HIV-受感染的细胞的细胞表面上展示的HIV表面蛋白。尽管Env在受感染的细胞中主要在内体区室中表达，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的、靶向细胞的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。

[0695] 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等人，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等人，J Virol 88:1125-39(2014))，优选的是，使用小于100kD且理想地小于 25kD，诸如sdAb或V_HH结构域。

[0696] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的构建、生产和纯化

[0697] 将免疫球蛋白型结合区域αEnv和志贺毒素效应物区域连接到一起，并添加羧基端KDEL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。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::αEnv::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0698] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的体外特征

[0699] 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Env+细胞和Env-细胞的结合特性。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K_D，而在该测定中不存在与Env-细胞的显著结合。

[0700] 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 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。

[0701] 使用细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的细胞毒性

[0702] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用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死测定，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/或用于感染所述细胞以使它们为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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了 SLT-1A::αEnv::KDEL的细胞毒性。

[0703] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αEnv::KDEL的体内效应

[0704] 通过将SLT-1A::αEnv::KDEL施用给猿猴免疫缺陷病毒(SIV)感染的非人灵长类动物,试验SLT-1A::αEnv::KDEL的抑制HIV感染的用途(参见 Sellier P等人,PLoS One 5:e10570(2010))。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0705] 实施例14.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽和从抗体αUL18来源的结合区域的细胞毒性蛋白

[0706] 在该实施例中,志贺毒素效应物区域是从志贺样毒素1的A亚基 (SLT-1A)来源的CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽。免疫球蛋白型结合区域αUL18源自使用本领域已知的技术制备的抗体,所述抗体针对存在于巨细胞病毒感染的人细胞上的细胞表面巨细胞病毒蛋白UL18(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症性病症有关。

[0707] 细胞毒性蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的构建、生产和纯化

[0708] 将免疫球蛋白型结合区域αUL18和志贺毒素效应物区域连接到一起,并添加羧基端KDEL(SEQ ID NO:61)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::αUL18::KDEL细胞毒性蛋白的表达。

[0709] 确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的体外特征

[0710] 通过基于荧光的流式细胞计量术确定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阴性细胞的结合特性。SLT-1A::αUL18::KDEL对巨细胞病毒蛋白UL18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巨细胞病毒蛋白UL18阴性细胞的显著结合。

[0711] 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 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。在该无细胞测定中 SLT-1A::αUL18::KDEL对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0712] 使用细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白SLT-1A::αUL18::KDEL的细胞毒性

[0713] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死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死测定,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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了SLT-1A::αUL18::KDEL的细胞毒性。

[0714] 实施例15.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物多肽和对CD20特异性的结合区域的细胞毒性蛋白(与白喉毒素融合的αCD20)

[0715] 在该实施例中,CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物区域源自如上所述的白喉毒素1的A亚基。免疫球蛋白型结合区域αCD20-抗原源自识别人CD20的免疫球蛋白型结构域(参见例如Haisma等人,Blood 92:184-90(1999);Geng S等人,Cell Mol Immunol 3:439-43(2006);Olafesn T等人,Protein Eng Des Sel 23:243-9(2010)),所述免疫球蛋白型结构域包含能够结合CD20的细胞外部分的免疫球蛋白型结合区域。CD20在多种癌细胞类型(例如,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细胞和黑素瘤细胞) 上表达。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。

[0716] 细胞毒性蛋白白喉毒素::αCD20的构建、生产和纯化

[0717] 将免疫球蛋白型结合区域αCD20和白喉毒素效应物区域(例如,SEQ ID NO:46、47和48)连接到一起。例如,通过表达编码αCD20-抗原-结合蛋白白喉毒素::αCD20(参见,例如,SEQ ID NO:55、56和57)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白喉毒素::αCD20细胞毒性蛋白的表达。

[0718] 确定细胞毒性蛋白白喉毒素::αCD20的体外特征

[0719] 如在以前的专利中所述,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CD20+细胞和CD20-细胞的结合特性。白喉毒素::αCD20对CD20+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CD20-细胞的显著结合。

[0720] 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白喉毒素::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。在该无细胞测定中白喉毒素::αCD20对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100pM。

[0721] 使用CD20+细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白白喉毒素::αCD20的细胞毒性

[0722] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用CD20+细胞确定白喉毒素::αCD20的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀死测定,使用CD20-细胞作为CD20+细胞的对比,确定白喉毒素::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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了白喉毒素::αCD20的细胞毒性。

[0723] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白白喉毒素::αCD20的体内效应

[0724] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白白喉毒素::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源自在它们的细胞表面上表达CD20的人赘生性细胞向那些小鼠中的注射。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接

细胞毒性研究了细胞杀死。

[0725] 实施例16.包含T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物多肽和对HER2特异性的结合区域的细胞毒性蛋白(“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”)

[0726] 在该实施例中,CD8+ T-细胞超免疫化的和B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的白喉毒素效应物区域源自如上所述的白喉毒素的A亚基。免疫球蛋白型结合区域是从骆驼科抗体(V_HH)蛋白5F7的单结构域可变区来源的αHER2 V_HH,如在美国专利申请公开2011/0059090中所述。

[0727] 细胞毒性蛋白“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”的构建、生产和纯化

[0728] 将免疫球蛋白型结合区域和白喉毒素效应物区域连接到一起以形成融合蛋白(参见,例如,SEQ ID NO:58、59和60)。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白喉毒素效应物区域(其包含SEQ ID NO:46、47或48的氨基酸)的多核苷酸在框架内克隆。产生“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”细胞毒性蛋白的变体,使得所述结合区域任选地位于白喉毒素效应物区域的氨基端附近,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“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”细胞毒性蛋白变体的表达。

[0729] 确定细胞毒性蛋白“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”的体外特征

[0730] 如在以前的专利中所述,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。“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”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。

[0731] 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“与白喉毒素融合的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“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”变体对蛋白合成的IC_{50}是大约0.1-100 pM。

[0732] 使用HER2+细胞杀死测定来确定细胞毒性蛋白“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”的细胞毒性

[0733] 通过如上面在前述实施例中所述的一般细胞杀死测定使用HER2+细胞确定“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”的细胞毒性特征。另外,通过相同的一般细胞杀死测定,使用HER2-细胞作为HER2+细胞的对比,确定“与白喉毒素融合的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0.01-100 nM。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)。另外,通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了与“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”的细胞毒性。

[0734] 使用动物模型确定细胞毒性蛋白“与白喉毒素融合的αHER2-V_HH”的体内效应

[0735] 使用动物模型来确定细胞毒性蛋白“与白喉毒素融合的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源自在它们的细胞表面上表达HER2的人赘生性细胞向

那些小鼠中的注射。通过导致CTL介导的细胞毒性的T-细胞表位递送和呈递,针对直接细胞毒性和间接细胞毒性研究了细胞杀死。

[0736] 实施例17.靶向不同细胞类型的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞 /CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素来源的细胞毒性蛋白

[0737] 在该实施例中,志贺毒素效应物区域包含从志贺样毒素1的A亚基 (SLT-1A)、志贺毒素(StxA)和/或志贺样毒素2(SLT-2A)来源的T-细胞超免疫化的和/或B-细胞/CD4+ T-细胞去免疫化的志贺毒素效应物多肽,前述 B-细胞表位区域中的任意一个或多个通过一个或多个嵌入或插入的T-细胞表位而破坏。结合区域源自这样的免疫球蛋白结构域:其来自选自表15 的第1列的分子,且其结合在表15的第2列中指示的细胞外靶生物分子。任选地使用本领域已知的试剂和技术用羧基端KDEL-型信号基序和/或检测促进剂制备本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生物分子的细胞,试验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15的第3 列中指出的疾病、病患和/或病症。

[0738] 表15.细胞毒性蛋白的细胞靶向的不同结合区域

[0739]

结合区域的来源	细胞外靶标	应用
阿仑珠单抗	CD52	B-细胞癌症，诸如淋巴瘤和白血病，和 B-细胞

[0740]

		相关的免疫病症，诸如自身免疫病症
巴利昔单抗	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	EpCAM	多种癌症，诸如卵巢癌、恶性腹水、胃癌
西妥昔单抗	EGFR	多种癌症，诸如结直肠癌和头颈癌
达克珠单抗	CD25	B-细胞谱系癌症和T-细胞病症，诸如器官移植物的排斥
达雷木单抗	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
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	LFA-1 (CD11a)	自身免疫病症，诸如银屑病
厄马索单抗	HER2/neu	多种癌症和肿瘤，诸如乳腺癌和结直肠癌
吉妥珠单抗	CD33	骨髓癌或免疫病症
替伊莫单抗	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
伊匹木单抗	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	CD3	器官移植排斥的预防
那他珠单抗	整联蛋白α4	自身免疫病症，诸如多发性硬化和克罗恩病
阿托珠单抗	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	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
奥法木单抗	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	呼吸道合胞体病毒的F蛋	治疗呼吸道合胞体病毒

	白	
帕木单抗	EGFR	多种癌症，诸如结直肠癌和头颈癌
培妥珠单抗	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	VEGFR2	多种癌症和癌症相关的病症，诸如实体瘤
利妥昔单抗	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	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	HER2/neu	多种癌症和肿瘤，诸如乳腺癌和结直肠癌
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	整联蛋白 α4β7	自身免疫病症，诸如克罗恩病和溃疡性结肠炎
[0741] 结合 CD20 的 scFv Geng S 等人, *Cell Mol Immunol* 3: 439-43 (2006); Olafesn T 等人, *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
结合 CD22 的 scFv Kawas S 等人, *MAbs* 3: 479-86 (2011)	CD22	B-细胞癌症或 B-细胞相关的免疫病症
结合 CD25 的 scFv Muramatsu H 等人, *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
结合 CD30 的单克隆抗体 Klimka A 等人, *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
结合 CD33 的单克隆抗体 Benedict C 等人, *J Immunol*	CD33	骨髓癌或免疫病症

[0742]

Methods 201: 223-31 (1997)		
结合免疫球蛋白结构域的 CD38 美国专利 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
结合 CD40 的 scFv Ellmark P 等人, *Immunology* 106: 456-63 (2002)	CD40	多种癌症和免疫病症
结合 CD52 的单克隆抗体 美国专利 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
结合 CD56 的单克隆抗体 Shin J 等人, *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、骨髓瘤
结合 CD79 的单克隆抗体 Zhang L 等人, *Ther Immunol* 2: 191-202 (1995)	CD79	B-细胞癌症或 B-细胞相关的免疫病症
结合 CD248 的 scFv Zhao A 等人, *J Immunol Methods* 363: 221-32 (2011)	CD248	多种癌症，诸如抑制血管生成
结合 EpCAM 的单克隆抗体 Schanzer J 等人, *J Immunother* 29: 477-88 (2006)	EpCAM	多种癌症，诸如卵巢癌、恶性腹水、胃癌
结合 PSMA 的单克隆抗体 Frigerio B 等人, *Eur J Cancer* 49: 2223-32 (2013)	PSMA	前列腺癌
结合 Eph-B2 的单克隆抗体 Abéngozar M 等人, *Blood* 119: 4565-76 (2012)	Eph-B2	用于多种癌症诸如结直肠癌和前列腺癌

[0743]

结合内皮糖蛋白的单克隆抗体 Völkel T 等人, *Biochim Biophys Res Acta* 1663: 158-66 (2004)	内皮糖蛋白	多种癌症，诸如乳腺癌和结直肠癌
结合 FAP 的单克隆抗体 Zhang J 等人, *FASEB J* 27: 581-9 (2013)	FAP	多种癌症，诸如肉瘤和骨癌
结合 CEA 的抗体和 scFv Neumaier M 等人, *Cancer Res* 50: 2128-34 (1990); Pavoni E 等人, *BMC Cancer* 6: 4 (2006); Yazaki P 等人, *Nucl Med Biol* 35: 151-8 (2008); Zhao J 等人, *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
结合 CD24 的单克隆抗体 Kristiansen G 等人, *Lab Invest* 90: 1102-16 (2010)	CD24	多种癌症，诸如膀胱癌
结合 LewisY 抗原的 scFv Power B 等人, *Protein Sci* 12: 734-47 (2003)；单克隆抗体 BR96 Feridani A 等人, *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	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、新生儿的溶血疾病

[0744]

阿非莫单抗	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
安芦珠单抗或 ima-638	IL-13	多种癌症和免疫病症
布雷奴单抗	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	IL-1	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎
塞妥珠单抗	TNF-α	多种癌症和免疫病症，诸如克罗恩病
非扎奴单抗	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	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	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
美泊珠单抗	IL-5	多种免疫病症和癌症，诸如 B-细胞癌症
奈瑞莫单抗	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	多种免疫病症和癌症
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
司妥昔单抗	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
替西木单抗或曲美木单抗	CTLA-4	多种癌症
tildrakizumab	IL23	免疫学上介导的炎症性病症

[0745]

tnx-650	IL-13	多种癌症和免疫病症，诸如 B-细胞癌症
托珠单抗或 atlizumab	IL-6 受体	多种癌症和免疫病症，诸如类风湿性关节炎
乌司奴单抗	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，和抑制血管形成
多种细胞因子：IL-2、IL-6、IL-23、CCL2、BAFF、TNF、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 等人, *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	流感表面抗原，例如血球凝集素和流感基质蛋白 2	病毒感染
从患者样品鉴别出的广泛中和抗体 Prabakaran 等人, *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	冠状病毒表面抗原	病毒感染
从患者样品鉴别出的广泛中和抗体 Prabakaran 等人, *Front Microbiol* 3: 277 (2012)	亨尼波病毒表面抗原	病毒感染

[0746] 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。

[0747] 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。的美国专利申请公开US 2007/0298434 A1、US 2009/0156417 A1和 US 2013/0196928 A1的公开内容各自通过引用整体并入这里。国际PCT 专利申请系列号WO 2014/164693和WO 2014164680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,U.S.)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。

序列表

<110> 分子模板公司

<120> MHC I类表位递送多肽

<130> 14-05PCT

<140>
<141>

<150> PCT/US15/12968
<151> 2015-01-26

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

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

<160> 158

<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（Escherichia coli）

[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> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<220>

<223> T细胞表位肽F2

<400> 4
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<220>
<223> T细胞表位肽F2-2

<400> 5
Asp Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<220>
<223> T细胞表位肽F2-3

[0006] <400> 6
Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<220>
<223> T细胞表位肽F2-4

<400> 7
Gly Ile Leu Gly Asp Val Phe Thr Leu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<220>
<223> T细胞表位肽F3

<400> 8
Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 甲型流感病毒

<220>
<223> T细胞表位肽F3-4

<400> 9
Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人巨细胞病毒

<220>
<223> T细胞表位肽C2

<400> 10
Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
1 5

[0007]

<210> 11
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体4-12-F3-4

<400> 11
Lys Glu Phe Ile Leu Arg Phe Ser Val Ala His Lys 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

[0008]

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> 12
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体44-52-F2

<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 Ile Leu Gly Phe
        35                  40                  45

Val Phe Thr Leu 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
```

[0009]

```
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> 13
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体43-51-C2

<400> 13
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

[0010]

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 Asn Leu Val Pro Met Val
35 40 45

Ala Thr Val 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

[0011]

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

<210> 14
<211> 252
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位部分嵌入的和插入的
志贺毒素效应物多肽变体53-61-F2

<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 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 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 Gly 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

[0012] Ser His Ser Gly 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
225 230 235 240

Leu 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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体53-61-F2-2

<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 Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gly Arg Phe
50 55 60

[0013] 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> 16
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

[0014]

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体53-61-F2-3

<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

Leu Phe Ala Val Asp Ile Leu Gly Phe Asp Phe Thr Leu 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

[0015]

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
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体53-61-C2

<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 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val 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

[0016]

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> 18
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体104-112-C2

<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

[0017]

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 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val
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

[0018]

<210> 19
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体180-188-F2-4

<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

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

[0019]

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 Ser His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
245 250

<210> 20
<211> 260
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位插入的志贺毒素效应物

多肽变体245/246-F3

〈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

Cys 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

[0020] 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 Ser His His His Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Ala Ser
245 250 255

Arg Val Ala Arg
260

<210> 21
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体44-52-C2

<400> 21
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
[0021] 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 Asn Leu Val Pro Met
35 40 45

Val Ala Thr 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

[0022] 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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体66-74-F2

<400> 22
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 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 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

[0023] 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> 23

<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体75-83-F2

<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				

[0024]

Asn	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe	Val
65					70					75					80
Phe	Thr	Leu	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> 24
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

[0025]

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体157-165-F2

<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

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 Gly Ile Leu Gly
145                 150                 155                 160

Phe Val Phe Thr Leu 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
```

[0026]

```
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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体164-172-F2

<400> 25

```
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

[0027]

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 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 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> 26
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体221-229-F2

<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

[0028]

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 Gly Ile Leu Gly
210 215 220

Phe Val Phe Thr Leu 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
[0029] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体231-239-F2

<400> 27
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
[0030] 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 Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>

<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体66-74-F3

<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 Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys 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
```

[0031]

```
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> 29
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体75-83-F3

<400> 29
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

[0032]

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 Ile Leu Arg Gly Ser Val
65 70 75 80

Ala His Lys 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

[0033]

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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体157-165-F3

<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

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 Ile Leu Arg Gly
145 150 155 160

[0034]

Ser Val Ala His Lys 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> 31
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体164-172-F3

<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

[0035]

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 Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys 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> 32
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体221-229-F3

[0036]

<400> 32
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

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

[0037]

Ser Val Ala His Lys 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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体231-239-F3

<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 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

[0038] 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 Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys Leu
225 230 235 240

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

<210> 34
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体66-74-C2

<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 Glu Glu Gly Arg Phe
[0039] 50 55 60

Asn Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val 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> 35
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

[0040]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体75-83-C2

<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 Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Val Pro Met Val
65 70 75 80

Ala Thr Val 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

[0041]

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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体157-165-C2

<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

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
```

[0042]

```
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 Asn Leu Val Pro
145                 150                 155                 160

Met Val Ala Thr Val 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> 37
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体164-172-C2

<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

[0043]

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 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val 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

[0044]

<210> 38
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体221-229-C2

<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 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
```

[0045]

```
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 Asn Leu Val Pro
    210                 215                 220

Met Val Ala Thr Val 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> 人工序列的描述：合成的

多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体231-239-C2

<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

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

[0046] 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 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Leu
225 230 235 240

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

<210> 40
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体77-85-F2

<400> 40
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
[0047] 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 Gly Ile Leu Gly
65 70 75 80

Phe Val Phe Thr Leu 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

[0048] 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> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体159-167-F2

<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

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

[0049] His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Gly Ile
145 150 155 160

Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu 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> 42

<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体159-167-F3

<400> 42

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				

[0050]

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	Ile	Leu
145					150					155					160
Arg	Gly	Ser	Val	Ala	His	Lys	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> 43
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

[0051]

<220>
<223> T细胞表位嵌入的志贺毒素效应物
多肽变体162-170-C2

<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 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 Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val 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

[0052]

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> 193
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 白喉毒素A亚基

<400> 44
Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu Asn
1 5 10 15

Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln
20 25 30

Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp
35 40 45

Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly
50 55 60

Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly Val
65 70 75 80

Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys Val
85 90 95

Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu
100 105 110

Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly
115 120 125

[0053]

Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser
130 135 140

Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser
145 150 155 160

Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
165 170 175

Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg
180 185 190

Arg

<210> 45
<211> 398
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 白喉毒素效应物多肽
包含野生型白喉毒素序列

<400> 45

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

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
            20                  25                  30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
        35                  40                  45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
    50                  55                  60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
65                  70                  75                  80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
                85                  90                  95
```

[0054]

```
Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu Ser Leu Thr
            100                 105                 110

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
        115                 120                 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
    130                 135                 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145                 150                 155                 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln
                165                 170                 175

Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
            180                 185                 190

Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
        195                 200                 205
```

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320

[0055]

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His
385 390 395

<210> 46
<211> 398
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的白喉毒素效应物
多肽变体34-42-F2

<400> 46

Met	Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu
1				5				10					15		
Asn	Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile
			20					25					30		
Gln	Lys	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe	Val	Phe	Thr	Leu	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp
		35					40					45			
Asp	Asp	Trp	Lys	Gly	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala
	50					55					60				
Gly	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly
65					70					75					80
Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys
				85					90					95	

[0056]

Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr
			100					105					110		
Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe
		115					120					125			
Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly
	130					135					140				
Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu
145					150					155					160
Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln
				165					170					175	
Asp	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val
			180					185					190		
Arg	Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp
		195					200					205			

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320

[0057]

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His
385 390 395

<210> 47
<211> 398
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的白喉毒素效应物
多肽变体168-176-F3

<400> 47

Met	Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu
1				5				10					15		
Asn	Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile
			20					25					30		
Gln	Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp
		35					40					45			
Asp	Asp	Trp	Lys	Gly	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala
	50					55					60				
Gly	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Glu	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly	Lys	Ala	Gly	Gly
65					70					75					80
Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys
				85					90					95	

[0058]

Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr
			100					105					110		
Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe
		115					120					125			
Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly
	130					135					140				
Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu
145					150					155					160
Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Ile	Leu	Arg	Gly	Ser	Val	Ala	His
				165					170					175	
Lys	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val
			180					185					190		
Arg	Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp
		195					200					205			

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320

[0059]

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His
385 390 395

<210> 48
<211> 398
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> T细胞表位嵌入的白喉毒素效应物
多肽变体69-77-C2

<400> 48

Met	Gly	Ala	Asp	Asp	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Lys	Ser	Phe	Val	Met	Glu
1				5				10						15	
Asn	Phe	Ser	Ser	Tyr	His	Gly	Thr	Lys	Pro	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser	Ile
			20					25					30		
Gln	Lys	Gly	Ile	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Asp
		35					40					45			
Asp	Asp	Trp	Lys	Gly	Phe	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr	Asp	Ala	Ala
	50					55					60				
Gly	Tyr	Ser	Val	Asp	Asn	Leu	Val	Pro	Met	Val	Ala	Thr	Val	Gly	Gly
65					70					75					80
Val	Val	Lys	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Leu	Lys
				85					90					95	

[0060]

Val	Asp	Asn	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu	Thr
			100					105					110		
Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Gln	Val	Gly	Thr	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys	Arg	Phe
		115					120					125			
Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Ala	Glu	Gly
	130					135					140				
Ser	Ser	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Leu
145					150					155					160
Ser	Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln
				165					170					175	
Asp	Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val
			180					185					190		
Arg	Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp
		195					200					205			

Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320

[0061]

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu
325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser His His His His His His
385 390 395

<210> 49
<211> 512
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白: α-CD20融合于
去免疫化的SLT-1A变体#1

<400> 49

```
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
```

[0062]

```
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

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 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser
290 295 300

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro
305 310 315 320

[0063]

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 Gly 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 Gly 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

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 Arg Val Ala Arg
500 505 510

<210> 50
<211> 511
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

[0064]

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：α-CD20融合于
去免疫化的SLT-1A变体#2

<400> 50
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

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

[0065]

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 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly
290 295 300

Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr
305 310 315 320

Val 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

Ser Gly 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 Gly 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

[0066]

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 Arg Val Ala Arg
500 505 510

<210> 51
<211> 513
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白: α-CD20融合于
去免疫化的SLT-1A变体#3

<400> 51

```
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

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
```

[0067]

```
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

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 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
290 295 300

Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
305 310 315 320

[0068] 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 Asn Leu Val
355 360 365

Pro Met Val Ala Thr Val 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 Gly 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

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 Arg Val Ala
500 505 510

Arg

<210> 52
<211> 385
<212> PRT
<213> 人工序列

[0069]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：抗-HER2-VHH融合于
去免疫化的SLT-1A变体#1

<400> 52
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
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 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
165 170 175

Ser Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
180 185 190

[0070] 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

Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
225 230 235 240

Thr Leu Ser Gly 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 Gly 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 Arg Val Ala
370 375 380

Arg
385

<210> 53
<211> 387
<212> PRT
<213> 人工序列

[0071]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：抗-HER2-VHH融合于
去免疫化的SLT-1A变体#2

<400> 53
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
1 5 10 15

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

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

Asn Leu Phe Ala Val Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val 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 Gly 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 Gly 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

[0072] 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
225 230 235 240

Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg 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> 54
<211> 390
<212> PRT
<213> 人工序列

[0073]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：抗-HER2-VHH融合于
去免疫化的SLT-1A变体#3（α-HER2-VHH::SLT-1A::KDEL）

<400> 54
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
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 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile
165 170 175

Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile
180 185 190

[0074] Asp 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

Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Asn Leu
225 230 235 240

Val Pro Met Val Ala Thr Val 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 Gly 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 Arg Val
370 375 380

Ala Arg Lys Asp Glu Leu
385 390

<210> 55
<211> 652
<212> PRT
<213> 人工序列

[0075]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：α-CD20融合于
去免疫化的白喉毒素变体#1

<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 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

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

[0076] 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 Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser
260 265 270

Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr
275 280 285

Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gln
290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys

305 310 315 320

Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly
325 330 335

Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val
340 345 350

Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe
370 375 380

Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro
385 390 395 400

Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg Gly
[0077] 420 425 430

Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala
435 440 445

Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn
450 455 460

Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser
465 470 475 480

Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn
485 490 495

Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His
500 505 510

Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr
515 520 525

Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val
530 535 540

```
Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys
545                 550                 555                 560

Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly
                565                 570                 575

Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln
            580                 585                 590

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

Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser
    610                 615                 620

Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala
625                 630                 635                 640

Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
                645                 650
```

[0078]

<210> 56
<211> 651
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：α-CD20融合于
去免疫化的白喉毒素变体#2

<400> 56

```
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

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
[0079] 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 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe
260 265 270

Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val
275 280 285

Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly
290 295 300

Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr
305 310 315 320

Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys
325 330 335

Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu
340 345 350

Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu Gly Leu
355 360 365

Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile
370 375 380

Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe
385 390 395 400

[0080]

Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala
405 410 415

Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Ile Leu Arg Gly Ser
420 425 430

Val Ala His Lys Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly
435 440 445

Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu
450 455 460

Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu
465 470 475 480

Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys
485 490 495

Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln
500 505 510

Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly
515 520 525

Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn
530 535 540

Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr
545 550 555 560

Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile
565 570 575

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

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

Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile
610 615 620

[0081]

Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr
625 630 635 640

Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
645 650

<210> 57
<211> 653
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：α-CD20融合于
去免疫化的白喉毒素变体#3

<400> 57
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

```
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
```

[0082]

```
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
```

Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys
260 265 270

Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly
275 280 285

Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr
290 295 300

Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn
305 310 315 320

Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Leu Val Pro Met Val
325 330 335

Ala Thr Val Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys
340 345 350

Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu
355 360 365

[0083]

Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu
370 375 380

Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu
385 390 395 400

Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu
405 410 415

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg
420 425 430

Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys
435 440 445

Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile
450 455 460

Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu
465 470 475 480

Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro
485 490 495

Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe
500 505 510

His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val
515 520 525

Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala
530 535 540

Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu
545 550 555 560

Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met
565 570 575

Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala
580 585 590

[0084]

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

Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu
610 615 620

Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro
625 630 635 640

Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
645 650

<210> 58
<211> 525
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：抗-HER2-VHH融合于
去免疫化的白喉毒素变体#1

<400> 58

```
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
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
```

[0085]

```
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 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys
    130                 135                 140

Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
                165                 170                 175

Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn
            180                 185                 190

Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser
        195                 200                 205

Gly Lys Ala Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys
    210                 215                 220
```

Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu Leu
225 230 235 240

Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu
245 250 255

Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu
260 265 270

Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu
275 280 285

Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr Arg
290 295 300

Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys
305 310 315 320

Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile
325 330 335

[0086] Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu
340 345 350

Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro
355 360 365

Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe
370 375 380

His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val
385 390 395 400

Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala
405 410 415

Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu
420 425 430

Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met
435 440 445

Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala

450 455 460

Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu
465 470 475 480

Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu
485 490 495

Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro
500 505 510

Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser
515 520 525

<210> 59
<211> 527
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

[0087]

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：抗-HER2-VHH融合于
去免疫化的白喉毒素变体#2

<400> 59
Met Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser Lys Ser Phe Val Met Glu
1 5 10 15

Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro Gly Tyr Val Asp Ser Ile
20 25 30

Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr Gln Gly Asn Tyr Asp
35 40 45

Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Asn Lys Tyr Asp Ala Ala
50 55 60

Gly Tyr Ser Val Asp Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala Gly Gly
65 70 75 80

Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr Lys Val Leu Ala Leu Lys
85 90 95

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

Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
115 120 125

Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser Leu Pro Phe Ala Glu Gly
130 135 140

Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp Glu Gln Ala Lys Ala Leu
145 150 155 160

Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
165 170 175

Lys Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala Cys Ala Gly Asn Arg Val
180 185 190

Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys Ile Asn Leu Asp Trp Asp
195 200 205

[0088] Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile Glu Ser Leu Lys Glu His
210 215 220

Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser Pro Asn Lys Thr Val Ser
225 230 235 240

Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu Phe His Gln Thr Ala Leu
245 250 255

Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr Val Thr Gly Thr Asn Pro
260 265 270

Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp Ala Val Asn Val Ala Gln
275 280 285

Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu Glu Lys Thr Thr Ala Ala
290 295 300

Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val Met Gly Ile Ala Asp Gly
305 310 315 320

Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val Ala Gln Ser Ile Ala Leu

325 330 335

Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro Leu Val Gly Glu Leu Val
340 345 350

Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val Glu Ser Ile Ile Asn Leu
355 360 365

Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg Pro Ala Tyr Ser Pro Gly
370 375 380

His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro
385 390 395 400

Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
405 410 415

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
420 425 430

Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln
[0089] 435 440 445

Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly
450 455 460

Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
465 470 475 480

Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro
485 490 495

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln
500 505 510

Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
515 520 525

<210> 60
<211> 530
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<223> 细胞毒性蛋白：抗-HER2-VHH融合于
去免疫化的白喉毒素变体#3
(α-HER2-VHH::白喉毒素:KDEL)

<400> 60

```
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
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
```

[0090]

```
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 Gly Ala Asp Asp Val Val Asp Ser Ser
    130                 135                 140

Lys Ser Phe Val Met Glu Asn Phe Ser Ser Tyr His Gly Thr Lys Pro
145                 150                 155                 160

Gly Tyr Val Asp Ser Ile Gln Lys Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly
                165                 170                 175

Thr Gln Gly Asn Tyr Asp Asp Asp Trp Lys Gly Phe Tyr Ser Thr Asp
            180                 185                 190
```

Asn Lys Tyr Asp Ala Ala Gly Tyr Ser Val Asp Asn Leu Val Pro Met
195 200 205

Val Ala Thr Val Gly Gly Val Val Lys Val Thr Tyr Pro Gly Leu Thr
210 215 220

Lys Val Leu Ala Leu Lys Val Asp Asn Ala Glu Thr Ile Lys Lys Glu
225 230 235 240

Leu Gly Leu Ser Leu Thr Glu Pro Leu Met Glu Gln Val Gly Thr Glu
245 250 255

Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Asp Gly Ala Ser Arg Val Val Leu Ser
260 265 270

Leu Pro Phe Ala Glu Gly Ser Ser Ser Val Glu Tyr Ile Asn Asn Trp
275 280 285

Glu Gln Ala Lys Ala Leu Ser Val Glu Leu Glu Ile Asn Phe Glu Thr
290 295 300

[0091] Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp Ala Met Tyr Glu Tyr Met Ala Gln Ala
305 310 315 320

Cys Ala Gly Asn Arg Val Arg Arg Ser Val Gly Ser Ser Leu Ser Cys
325 330 335

Ile Asn Leu Asp Trp Asp Val Ile Arg Asp Lys Thr Lys Thr Lys Ile
340 345 350

Glu Ser Leu Lys Glu His Gly Pro Ile Lys Asn Lys Met Ser Glu Ser
355 360 365

Pro Asn Lys Thr Val Ser Glu Glu Lys Ala Lys Gln Tyr Leu Glu Glu
370 375 380

Phe His Gln Thr Ala Leu Glu His Pro Glu Leu Ser Glu Leu Lys Thr
385 390 395 400

Val Thr Gly Thr Asn Pro Val Phe Ala Gly Ala Asn Tyr Ala Ala Trp
405 410 415

Ala Val Asn Val Ala Gln Val Ile Asp Ser Glu Thr Ala Asp Asn Leu

420 425 430

Glu Lys Thr Thr Ala Ala Leu Ser Ile Leu Pro Gly Ile Gly Ser Val
435 440 445

Met Gly Ile Ala Asp Gly Ala Val His His Asn Thr Glu Glu Ile Val
450 455 460

Ala Gln Ser Ile Ala Leu Ser Ser Leu Met Val Ala Gln Ala Ile Pro
465 470 475 480

Leu Val Gly Glu Leu Val Asp Ile Gly Phe Ala Ala Tyr Asn Phe Val
485 490 495

Glu Ser Ile Ile Asn Leu Phe Gln Val Val His Asn Ser Tyr Asn Arg
500 505 510

Pro Ala Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Gly Gly Ser Lys Asp
515 520 525

Glu Leu
[0092] 530

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 61
Lys Asp Glu Leu
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 62
His Asp Glu Phe
1

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 63
His Asp Glu Leu
1

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 64
Arg Asp Glu Phe
1

[0093]

<210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 65
Arg Asp Glu Leu
1

<210> 66
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 66
Trp Asp Glu Leu
1

<210> 67
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 67
Tyr Asp Glu Leu
1

<210> 68
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 68
His Glu Glu Phe
1

[0094]

<210> 69
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 69
His Glu Glu Leu
1

<210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 70
Lys Glu Glu Leu
1

<210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 71
Arg Glu Glu Leu
1

<210> 72
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 72
Lys Ala Glu Leu
1

[0095] <210> 73
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 73
Lys Cys Glu Leu
1

<210> 74
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 74
Lys Phe Glu Leu
1

<210> 75

<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 75
Lys Gly Glu Leu
1

<210> 76
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 76
Lys His Glu Leu
1

<210> 77
[0096] <211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 77
Lys Leu Glu Leu
1

<210> 78
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 78
Lys Asn Glu Leu
1

<210> 79
<211> 4

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 79
Lys Gln Glu Leu
1

<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 80
Lys Arg Glu Leu
1

<210> 81
<211> 4
[0097] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 81
Lys Ser Glu Leu
1

<210> 82
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 82
Lys Val Glu Leu
1

<210> 83
<211> 4
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 83
Lys Trp Glu Leu
1

<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 84
Lys Tyr Glu Leu
1

<210> 85
<211> 4
<212> PRT
[0098] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 85
Lys Glu Asp Leu
1

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 86
Lys Ile Glu Leu
1

<210> 87
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 87
Asp Lys Glu Leu
1

<210> 88
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 88
Phe Asp Glu Leu
1

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0099]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 89
Lys Asp Glu Phe
1

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 90
Lys Lys Glu Leu
1

<210> 91
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 91
His Ala Asp Leu
1

<210> 92
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 92
His Ala Glu Leu
1

<210> 93
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0100] <220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 93
His Ile Glu Leu
1

<210> 94
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 94
His Asn Glu Leu
1

<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 95
His Thr Glu Leu
1

<210> 96
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 96
Lys Thr Glu Leu
1

<210> 97
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0101] <223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 97
His Val Glu Leu
1

<210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 98
Asn Asp Glu Leu
1

<210> 99
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的

肽

<400> 99
Gln Asp Glu Leu
1

<210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 100
Arg Glu Asp Leu
1

<210> 101
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0102]

<400> 101
Arg Asn Glu Leu
1

<210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 102
Arg Thr Asp Leu
1

<210> 103
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 103
Arg Thr Glu Leu
1

<210> 104
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 104
Ser Asp Glu Leu
1

<210> 105
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0103]

<400> 105
Thr Asp Glu Leu
1

<210> 106
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 106
Ser Lys Glu Leu
1

<210> 107
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 107
Ala Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 108
His Ala Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 109
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0104] <400> 109
His Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 110
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 110
Lys Leu Glu Asp Glu Leu
1 5

<210> 111
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 111

Ile Arg Ser Asp Glu Leu
1 5

<210> 112
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 112
Glu Arg Ser Thr Glu Leu
1 5

<210> 113
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 113
[0105] Arg Pro Ser Thr Glu Leu
1 5

<210> 114
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 114
Ala Ser Gly Gly Pro Glu
1 5

<210> 115
<211> 54
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的多肽

<220>

<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

[0106]

<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

<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> 这一区域可涵盖1-10 'Gly(2-4)Ser'
重复单元，其中一些位置可以
不存在

<400> 115

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> 116
<211> 210
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
[0107] <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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (37)..(41)
<223> 可以存在或可以不存在

<220>

<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

[0108]

<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>
<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

[0109]

<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)
<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> 这一序列可涵盖1-30 ’(Gly)X-Ser’
重复单元，其中X表示1-6并且其中一些
位置可以不存在

<400> 116

```
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
```

[0110]

```
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

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> 117
<211> 210
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(6)
<223> 可以存在或可以不存在

[0111]

<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

<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)
[0112] <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>
<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

[0113] <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)
<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> 这一序列可涵盖1-30 ’(Ser)X-Gly’
重复单元，其中X表示1-6并且其中一些
位置可以不存在

<400> 117

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	
			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

[0114]

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				
Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
145					150					155					160
Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	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> 118
<211> 150
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
多肽

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(150)
<223> 这一序列可涵盖1-30 'Gly-Gly-Gly-
Gly-Ser' 重复单元，其中一些位置可以
absent

<400> 118
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

[0115]

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

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> 119
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：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absent

<400> 119
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

[0116]

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 120
Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

<210> 121
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 121
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
1 5 10

<210> 122
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 122
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 123
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

[0117] <220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 123
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 124
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 124
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
1 5 10

<210> 125
<211> 5

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 125
Ser Arg Ser Ser Gly
1 5

<210> 126
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 126
Ser Gly Ser Ser Cys
1 5

[0118]

<210> 127
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 127
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> 128
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 128
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 129
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 129
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 130
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

[0119]

<210> 131
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 131
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 132
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 133
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 133
Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 134
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 134
[0120] Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 135
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 135
Asp Ser Lys Lys Pro
1 5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的

肽

<400> 136
Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr
1 5

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 137
Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala
1 5

<210> 138
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
[0121] 肽

<400> 138
Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val
1 5

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 139
Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu
1 5

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 140
Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
1 5

<210> 141
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 141
Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg
1 5

<210> 142
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

[0122]

<400> 142
Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu
1 5

<210> 143
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 143
Gly Ile Gln Lys Pro Lys Ser Gly Thr
1 5

<210> 144
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 144
Asn Glu Asn Pro Leu Ser Gly Lys Ala
1 5

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 145
Glu Thr Arg Gly Lys Arg Gly Gln Asp
1 5

<210> 146
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
6xHis tag

[0123] <400> 146
His His His His His His
1 5

<210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 147
Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
1 5

<210> 148
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 148

Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn
1 5

<210> 149
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 149
Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr
1 5

<210> 150
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 150
[0124] Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg
1 5

<210> 151
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 151
Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile
1 5

<210> 152
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 152
Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile

1 5

<210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 153
Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr
1 5

<210> 154
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 154
Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu
[0125] 1 5

<210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 155
Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
1 5

<210> 156
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的肽

<400> 156
Asn Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
1 5

<210> 157
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 157
Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn
1 5 10

[0126]

<210> 158
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
肽

<400> 158
His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
1 5 10

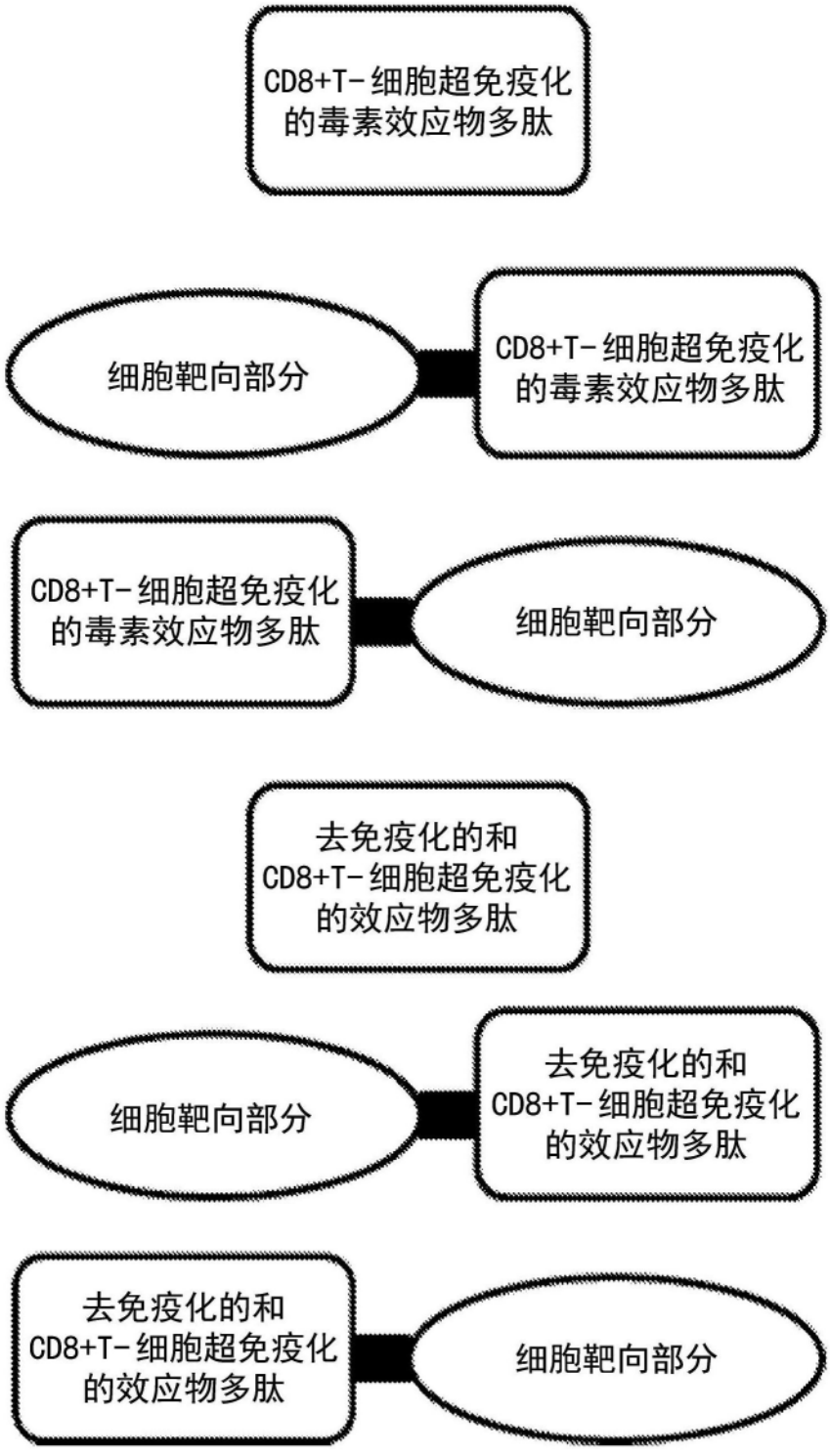

CD8+T-细胞超免疫化的毒素效应物多肽
细胞靶向部分
CD8+T-细胞超免疫化的毒素效应物多肽
CD8+T-细胞超免疫化的毒素效应物多肽
细胞靶向部分
去免疫化的和CD8+T-细胞超免疫化的效应物多肽
细胞靶向部分
去免疫化的和CD8+T-细胞超免疫化的效应物多肽
去免疫化的和CD8+T-细胞超免疫化的效应物多肽
细胞靶向部分

图1

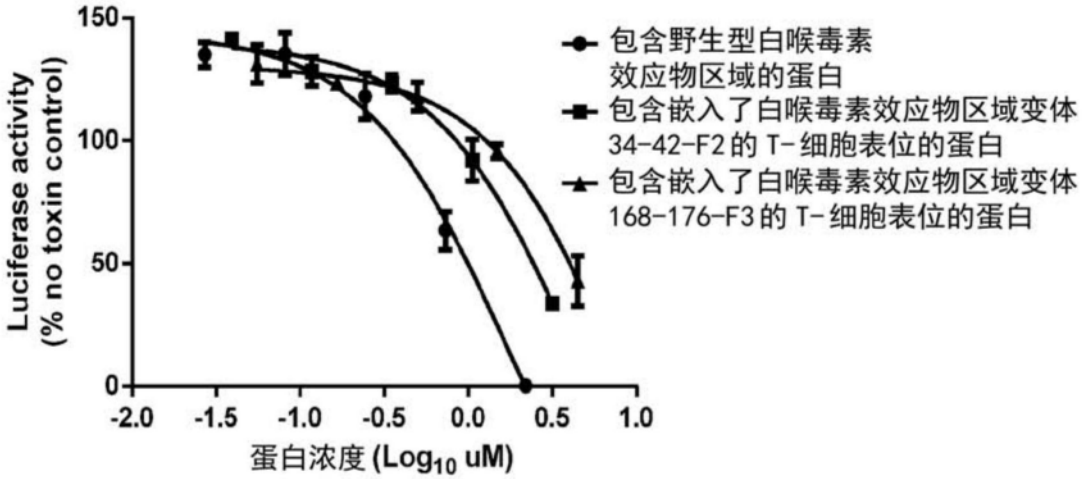
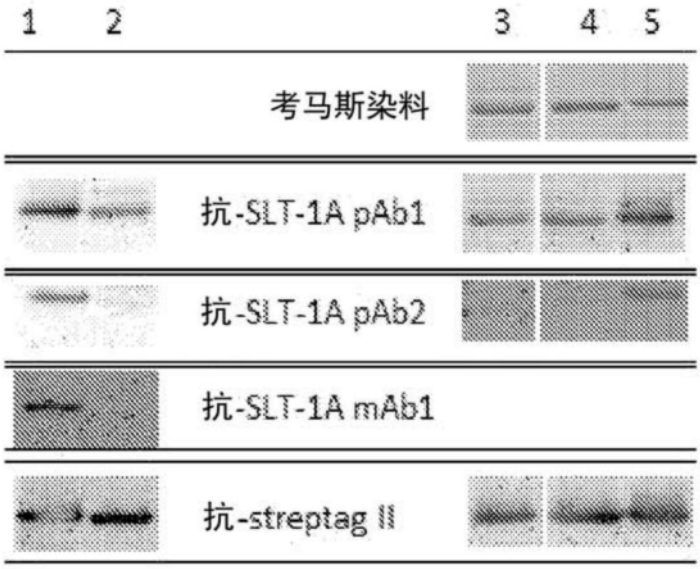
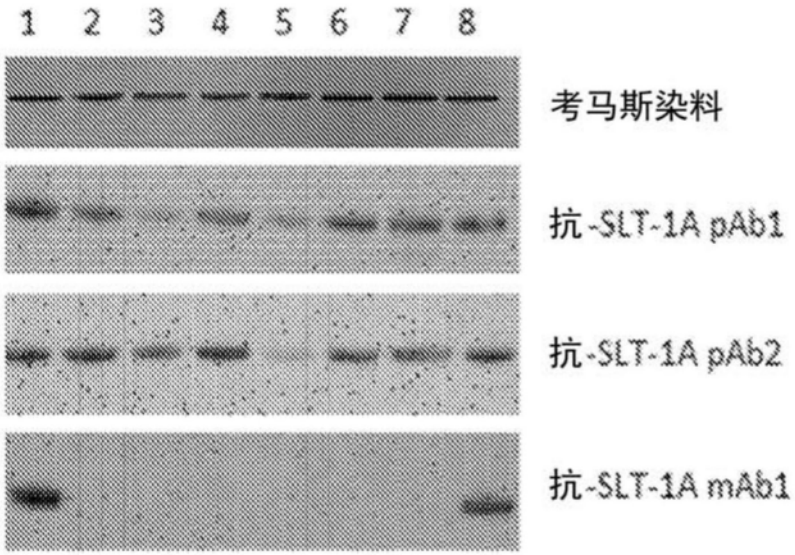


图2



1. 具有野生型志贺毒素效应物区域的细胞毒性蛋白
2. 包含 53-61-F2 的细胞毒性蛋白
3. 包含 53-61-F2-3 的细胞毒性蛋白
4. 包含 53-61-F2-2 的细胞毒性蛋白
5. 具有野生型志贺毒素效应物区域的细胞毒性蛋白

图3



1. 具有野生型志贺毒素效应物区域的细胞毒性蛋白
2. 包含 4-12-F3的细胞毒性蛋白
3. 包含 44-52-F2 的细胞毒性蛋白
4. 包含 43-51-C2 的细胞毒性蛋白
5. 包含 53-61-C2 的细胞毒性蛋白
6. 包含 104-112-C2 的细胞毒性蛋白
7. 包含 180-188-F2-4 的细胞毒性蛋白
8. 具有野生型志贺毒素效应物区域的细胞毒性蛋白

图4

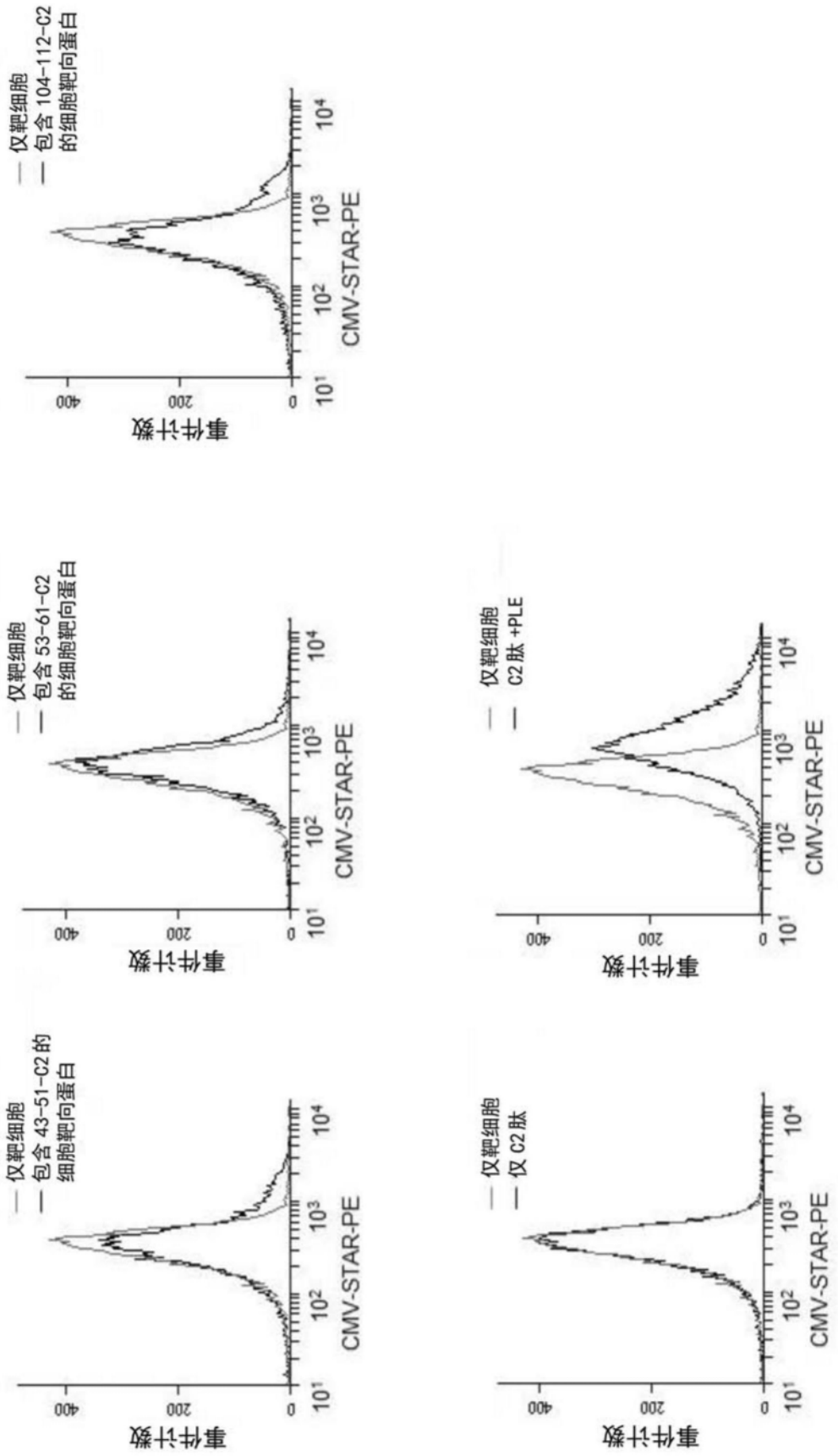

仅靶细胞
包含 104-112-C2 的细胞靶向蛋白
仅靶细胞
包含 53-61-C2 的细胞靶向蛋白
仅靶细胞
C2 肽 +PLE
仅靶细胞
包含 43-51-C2 的细胞靶向蛋白
仅靶细胞
仅 C2 肽
事件计数
CMV-STAR-PE

图5