



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105612180 B

(45)授权公告日 2019.11.12

(21)申请号 201480040652.6

蒙彼利埃大学医疗中心

(22)申请日 2014.07.04

(72)发明人 J·塔威尼尔 S·格罗

F·保罗 G·尤则

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105612180 A

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(43)申请公布日 2016.05.25

代理人 孟锐

(30)优先权数据

13306047.5 2013.07.19 EP

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 14/545(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.01.18

C07K 16/32(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/064283 2014.07.04

(56)对比文件

WO 2011020783 A2,2011.02.24,

WO 2010036918 A2,2010.04.01,

WO 2011029870 A1,2011.03.17,

CN 102573922 A,2012.07.11,

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2015/007542 EN 2015.01.22

(73)专利权人 弗拉芒区生物技术研究所

地址 比利时根特市

专利权人 根特大学

法国国家科学研究中心

蒙彼利埃第二大学

审查员 王航

权利要求书2页 说明书15页

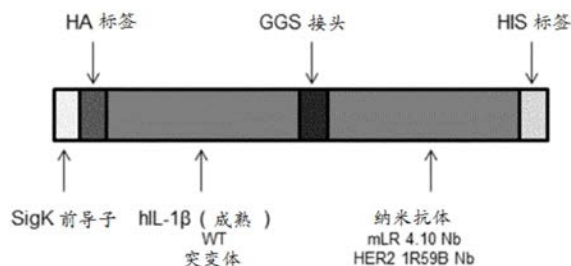
序列表30页 附图7页

(54)发明名称

经靶向修饰的IL-1家族成员

(57)摘要

本公开涉及一种经修饰的白介素-1(IL-1)家族成员细胞因子,其对其细胞因子受体具有降低的活性,其中所述白介素-1家族成员细胞因子是特异性地递送至靶细胞。优选地,IL-1家族成员细胞因子是突变体,更优选它是对IL-1受体具有低亲和力的突变体IL-1,其中所述突变体IL-1是特异性地递送至靶细胞。靶向优选是通过使所述经修饰的IL-1家族成员细胞因子融合至靶向部分、优选抗体或抗体样分子而实现。本公开另外涉及此类经靶向修饰的IL-1家族成员细胞因子用于治疗疾病的用途。



1. 一种包括靶向构建体的组合物,其中所述构建体包含:
 - (1) 以与野生型IL-1 β 相比对其受体的亲和力降低为特征的突变体IL-1 β ,其中所述突变体IL-1 β 包括选自R120G、Q131G、H146A、Q148G、K208E和K209A的突变,以及
 - (2) 靶向部分,其包含骆驼重链抗体的可变域(VHH)或者新抗原受体的可变域(VNAR)。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述靶向部分靶向在表达IL-1R1和/或IL-1RacP的细胞上所表达的标记物。
3. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述靶向部分定向于组织特异性标记物。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述靶向部分定向于Her2或瘦素受体。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述突变体IL-1 β 包括下述的一个或多个突变:
 - (i) Q131G和Q148G,
 - (ii) Q148G和K208E,
 - (iii) R120G和Q131G,
 - (iv) R120G和H146A,
 - (v) R120G和K208E,
 - (vi) R120G、F162A和Q164E,
 - (vii) F162A和Q164E,和
 - (viii) H145A和L147A。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其用作药剂。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其用于刺激免疫反应。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其用于治疗癌症。
9. 包括下述靶向构建体的组合物在制造用于刺激细胞中的免疫反应的药物中的用途,其中所述靶向构建体包含:
 - (1) 以与野生型IL-1 β 相比对其受体的亲和力降低为特征的突变体IL-1 β ,其中所述突变体IL-1 β 包括选自R120G、Q131G、H146A、Q148G、K208E和K209A的突变,以及
 - (2) 靶向部分,其包含骆驼重链抗体的可变域(VHH)或者新抗原受体的可变域(VNAR)。
10. 根据权利要求9所述的用途,其中NF κ B被活化。
11. 根据权利要求9或10所述的用途,其中所述突变体IL-1 β 包括下述的一种或多种:
 - (i) Q131G和Q148G,
 - (ii) Q148G和K208E,
 - (iii) R120G和Q131G,
 - (iv) R120G和H146A,
 - (v) R120G和K208E,
 - (vi) R120G、F162A和Q164E,
 - (vii) F162A和Q164E,
 - (viii) H145A和L147A,和

所述靶向部分定向于Her2或瘦素受体。

经靶向修饰的IL-1家族成员

[0001] 本发明涉及一种经修饰的白介素-1 (IL-1) 家族成员细胞因子, 其对其细胞因子受体具有降低的活性, 其中所述白介素-1家族成员细胞因子是特异性地递送至靶细胞。优选地, IL-1家族成员细胞因子是突变体, 更优选它是对IL-1受体具有低亲和力的突变体IL-1, 其中所述突变体IL-1特异性地递送至靶细胞。靶向优选是通过使经修饰的IL-1家族成员细胞因子融合至靶向部分、优选抗体或抗体样分子而实现。本发明另外涉及此类经靶向修饰的IL-1家族成员细胞因子用于治疗疾病的用途。

[0002] 白介素-1 (IL-1) 家族由11个在结构上相关的家族成员 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-18、IL-33以及IL-1F5至IL-1F10) 组成, 其属于最有效的免疫系统信号传导分子, 通过一组紧密相关的受体起作用。所有IL-1受体具有类似的活化模式: 在配体结合至一级受体亚单位 (即对于IL-1 α 和 β 来说的IL-1R1、对于IL-18来说的IL-18R以及对于IL-33来说的ST2) 后, 第二受体亚单位被募集 (即对于IL-1 α 和 β 来说的IL-1RAP、对于IL-18来说的IL-18RAP以及对于IL-33来说的IL-1RAP) 并且经由并列放置受体亚单位的胞质Toll/IL-1受体 (TIR) 结构域而起始信号传导。二聚化TIR结构域为MYD88衔接蛋白提供对接平台, 其经由招募其他中间物而引起促炎性核因子- κ B (NF- κ B) 和分裂素活化的蛋白激酶 (MAPK) 通道的活化。IL-1家族成员主要由先天免疫细胞产生并且在免疫反应期间作用于多种细胞类型 (关于综述参见Sims和Smith, 2010)。

[0003] T淋巴细胞是主要IL-1家族靶细胞之一并且使尤其IL-1 α 和IL-1 β 对不同T细胞亚群的扩增和分化的影响加强, 特定而言, 已充分确定了CD8⁺T细胞 (Ben-Sasson 2011; Ben-Sasson, 2013) 和Th17细胞 (Sutton等人, 2006; Acosta-Rodriguez等人, 2007; Dunne等人, 2010; Shaw等人, 2012)。Th17细胞的特征为产生IL-17并且在自体免疫性疾病和慢性炎症中起重要作用 (综述于Wilke等人, 2011中)。在T细胞亚群之中, Th17细胞表达最高水平的IL-1R, 并且IL-1在Th17启动中起重要作用。

[0004] IL-18作为IFN γ -诱导细胞因子最为著名, 其对Th1细胞和自然杀伤 (NK) 细胞具有有效作用 (Okamura等人, 1995; Takeda等人1998)。此外, IL-18增强嗜中性粒细胞功能 (Leung等人, 2001)。若干报导证实在动物模型中的IL-18抗肿瘤作用 (Micallef等人, 1997; Loeffler等人, 2008; Wigginton等人, 2002; Zaki等人, 2010), 并且重组人类IL-18治疗近来进入临床试验, 以评估其治疗晚期癌症的功效 (Robertson等人, 2008)。与IL-18相反, IL-33主要作用于Th2细胞 (Schmitz等人, 2005) 和肥大细胞 (Allakhverdi等人, 2007), 并且近来显示作用于CD8⁺T细胞以驱动抗病毒反应 (Bonilla等人, 2012)。其他IL-1家族成员未更充分表征, 但总起来说不同IL-1家族成员对不同T细胞亚群或其他细胞类型具有特异性并且因此具有不同治疗应用。

[0005] 除具有间接抗肿瘤活性之外, 经由活化T细胞和NK细胞, IL-1家族成员显示具有直接细胞抑制性质, 这在人类黑色素瘤细胞上得到最有说服力地证实 (Morinaga等人, 1990; Usui等人, 1991; Rangnekar等人, 1992)。

[0006] 鉴于若干IL-1家族成员在炎性过程中的贡献, 临床兴趣一直以来主要是以发展IL-1拮抗策略为方向 (Dinarelli等人, 2012)。尽管如此, 受控制的激动性IL-1活性的开发

可应用于不同生理/病理过程中,其中免疫刺激作用将是所需的。关于IL-1在免疫刺激治疗中的使用的主要担忧问题之一是其在全身施用时的严重毒性。然而,当IL-1作用可限于所选细胞群体时,毒性问题可得以解决,这展示出治疗前景。

[0007] 举例来说,虽然鉴于Th17在诸如多发性硬化、类风湿性关节炎以及炎性肠道疾病(Wilke等人,2011)等自体免疫病状中的病原作用,阻断Th17反应已受到广泛关注,正常Th17功能针对包括结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) (Khader等人,2007)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) (Ye等人,2001)以及百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*) (Higgins等人,2006)的一系列病原体的保护性免疫来说是不可缺少的。由于IL-1 β 刺激Th17功能,所述想法已上升至使用IL-1 β 作为T细胞佐剂来增强对弱毒疫苗的反应(Ben-Sasson等人,2011)。其他应用可以是使IL-1 β 或IL-33靶向CD8+T细胞群体以增强抗病毒反应或使IL-18靶向Th1细胞或NK细胞以促进抗肿瘤活性。

[0008] 令人惊讶地,我们发现有可能设计IL-1家族修饰,其在活化受体方面具缺陷,但当融合至靶向部分时,通过在细胞表面的浓集效应恢复其对所选细胞类型的活性。IL-1突变体对其同源受体具有降低的亲和力,并且因此不能有效结合并且活化其受体。然而,通过使它们融合至靶向部分(诸如纳米抗体(nanobody)),突变体IL-1家族成员在表达由靶向部分识别的细胞表面靶标的细胞上的活性得以恢复。因为活化仅限于所选靶向细胞类型,所以不产生大的全身性毒性。

[0009] 本发明的第一方面是靶向构建体,其包含以对细胞因子受体的亲和力降低为特征的经修饰的IL-1家族成员细胞因子,以及靶向部分。IL-1家族成员细胞因子是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra、IL-18、IL-36Ra、IL-36 α 、IL-37、IL-36 β 、IL-36 γ 、IL-38以及IL-33(也分别表示为IL-1F1、IL-1F2、IL-1F3、IL-1F4、IL-1F5、IL-1F6、IL-1F7、IL-1F8、IL-1F9、IL-1F10和IL-1F11)。对于关于IL-1家族的综述,参见Dinarello(2011)。经修饰的IL-1家族细胞因子意指IL-1家族细胞因子已被改变,以改变对其受体的亲和力,并且作为最终结果,与通常结合至受体的内源性野生型细胞因子相比,经修饰的IL-1家族细胞因子具有降低的受体亲和力和随之发生的降低的生物活性。此类修饰可以是降低普通野生型细胞因子的活性的修饰,或者它可以是增加同源性、非内源性IL-1家族细胞因子(诸如但不限于对IL-1家族细胞因子受体不具活性的另一种类的IL-1家族细胞因子)的亲和力的修饰。修饰可以是本领域技术人员已知的降低或增加活性的任何修饰,包括但不限于化学和/或酶促修饰,诸如聚乙二醇化和糖基化、融合至其他蛋白质以及突变。优选地,所述修饰是突变,甚至更优选地它是降低IL-1家族细胞因子的亲和力的突变。如在此所用的降低的亲和力和随之发生的降低的生物活性意味经修饰的IL-1家族细胞因子的生物活性与通常结合于受体的IL-1家族细胞因子相比小于IL-1家族细胞因子的生物活性的70%,甚至更优选小于IL-1家族细胞因子的生物活性的60%,更优选小于IL-1家族细胞因子的生物活性的50%,更优选小于IL-1家族细胞因子的生物活性的40%,更优选小于IL-1家族细胞因子的生物活性的30%,更优选小于IL-1家族细胞因子的生物活性的20%,更优选小于IL-1家族细胞因子的生物活性的10%,最优选地小于IL-1家族细胞因子的生物活性的1%。优选地,经修饰的IL-1家族细胞因子是野生型IL-1家族细胞因子的突变体并且活性可与野生型IL-1家族细胞因子相比。亲和力和/或活性可通过本领域技术人员已知的任何方法来测量。

[0010] 本发明的优选实施方案是一种靶向构建体,其包含以对白介素-1受体类型I (IL-1RI) 和/或白介素-1受体辅助蛋白 (IL-1RAcP) 受体的亲和力降低为特征的突变体IL-1 β ,以及靶向部分。如在此所用的突变体IL-1 β 可以是对受体具有较低亲和力并且因此对促炎性转录因子NF κ B的活化减少的任何突变体形式。与野生型IL-1 β 对受体的亲和力相比,突变体IL-1 β 对受体的亲和力可通过Scatchard作图分析和计算机拟合结合数据(例如Scatchard, 1949) 或如Brecht等人(1993) 所描述在流通条件下通过反射干涉光谱学来测量。突变体IL-1 β 的活性典型地是使用生物分析(例如通过诱导细胞死亡) 或通过测量受体下游的信号传导事件来测量。此类信号传导事件可以是NF- κ B的修饰或核移位,或所选报告基因的诱导。所述突变体可以是点突变体、缺失或插入突变体或其组合;一种蛋白质中可存在若干突变。优选地,所述突变体IL-1 β 是通过活性诱变获得,诸如但不限于通过聚合酶链反应扩增进行定点诱变。优选地,所述突变体IL-1 β 的生物活性小于野生型IL-1 β 的生物活性的70%,甚至更优选小于野生型IL-1 β 的生物活性的60%,更优选小于野生型IL-1 β 的生物活性的50%,更优选小于野生型IL-1 β 的生物活性的40%,更优选小于野生型IL-1 β 的生物活性的30%,更优选小于野生型IL-1 β 的生物活性的20%,更优选小于野生型的生物活性的10%,最优选地小于减小的野生型的1% (即编码序列已突变以获得突变体IL-1 β 的野生型IL-1 β)。优选地,所述突变体是选自以下的突变体:A117G/P118G、R120X、L122A、T125G/L126G、R127G、Q130X、Q131G、K132A、S137G/Q138Y、L145G、H146X、L145A/L147A、Q148X、Q148G/Q150G、Q150G/D151A、M152G、F162A、F162A/Q164E、F166A、Q164E/E167K、N169G/D170G、I 172A、V174A、K208E、K209X、K209A/K210A、K219X、E221X、E221S/N224A、N224S/K225S、E244K、N245Q (其中X可以是氨基酸中的任何变化,优选非保守变化)。甚至更优选所述突变选自R120A、R120G、Q130A、Q130W、H146A、H146G、H146E、H146N、H146R、Q148E、Q148G、Q148L、K209A、K209D、K219S、K219Q、E221S和E221K。最优选所述突变选自R120G、H146N、H146R、Q148E、Q148G和K209A。(编号基于人类IL-1 β 序列,基因库登录号NP_000567,版本号NP-000567.1,GI:10835145)。

[0011] IL-18突变的优选区域是Y37-K44、R49-Q54、D59-R63、E67-C74、R80、M87-A97、N127-K129、Q139-M149、K165-K171、R183和Q190-N191。最优选的是区域E67-C74和M87-A97 (编号基于人类序列,基因库登录号AAV38697,版本号AAV38697.1,GI:54696650)。

[0012] IL-33突变的优选区域是I113-Y122、S127-E139、E144-D157、Y163-M183、E200、Q215、L220-C227和T260-E269 (编号基于人类序列,基因库登录号NP_254274,版本号NP_254274.1,GI:15559209)

[0013] 优选地,所述靶向部分靶向在表达IL-1 β 受体的细胞,优选表达IL1-RI的细胞上所表达的标记物。在一个优选实施方案中,所述靶向部分定向于组织特异性标记物。

[0014] 经修饰的IL-1家族成员键联至靶向部分。如在此所用的“键联”可以通过共价键结来进行,或者它可以是通过亲和力结合来进行。如在此所用的“靶向部分”是可通过结合位点与结合分子之间的特异性相互作用使融合蛋白定向于在表达IL-1家族成员受体的细胞上的结合位点的结合分子。在一个优选实施方案中,所述结合分子是小化合物,其特异性结合于位于细胞外部的分子。在另一优选实施方案中,所述分子是糖结构,其定向于在细胞壁上表达的凝集素样分子。在另一优选实施方案中,所述结合分子是肽,其靶向肿瘤或炎症环境。此类肽是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于NGR和RGD肽(Yang等人,2011; W02005054293)。在另一优选实施方案中,所述结合分子是包含结合域的蛋白质。此包括但

不限于碳水化合物结合域(CBD) (Blake等人,2006)、凝集素结合蛋白、重链抗体(hcAb)、单域抗体(sdAb)、微型抗体(minibody) (Tramontano等人,1994)、骆驼重链抗体的可变域(VHH)、新抗原受体的可变域(VNAR)、亲和体(affibody) (Nygren等人,2008)、阿尔法体(alphabody) (W02010066740)、经设计的锚蛋白重复结构域(DARPin) (Stumpp等人,2008)、抗转运蛋白(anticalin) (Skerra等人,2008)、打结素(knottin) (Kolmar等人,2008)以及经工程改造的CH2结构域(纳米抗体(nanoantibody);Dimitrov,2009)。优选地,所述靶向部分由单一多肽链组成并且未经翻译后修饰。甚至更优选地,所述靶向部分是纳米抗体。

[0015] 靶向部分可以是本领域技术人员已知的任何靶向部分。在一个非限制性实例中,所述靶向部分可以是双特异性抗体,其对于一种特异性来说定向于靶细胞上的结合位点,而对于另一种特异性来说定向于所靶向的细胞因子或定向于融合至所述细胞因子的标签。在另一个非限制性实例中,靶向部分可化学键联至突变体白介素-1,或者它可以是重组融合蛋白。优选地,所述靶向构建体是重组融合蛋白。靶向部分可直接融合至突变体IL-1 β ,或者它可借助于接头片段,优选GGS接头进行融合。靶向部分可融合在突变IL-1 β 的氨基末端或在羧基末端;优选所述靶向部分融合在突变IL-1 β 分子的羧基末端尽头。靶向构建体可进一步包含其他结构域,诸如但不限于标签序列、信号序列、另一种细胞因子或抗体。

[0016] 本发明的另一个方面是一种根据本发明用作药剂的靶向构建体。一个优选实施方案是一种根据本发明用于刺激免疫反应的靶向构建体。实际上,已知IL-1治疗可诱导抗原在B细胞上的表达(Killar等人,1989);同样地,IL-18治疗加强细胞和体液免疫性(Kinoshita等人,2011)。同理,已证实IL-1作用于T细胞以增强体内免疫反应的量值(Ben-Sasson等人,2011;Ben Sasson等人,2013)。因此,本发明的一个优选方面是根据本发明在接种中用作佐剂的靶向构建体。根据本发明的靶向构建体在此方面中尤其有趣,因为普通野生型IL-1的促炎性效应使得IL-1照此应用是不可能的。

[0017] 本发明的另一个方面是一种根据本发明用于治疗癌症的靶向构建体。实际上,Morinaga等人,1990;Usui等人,1991以及Rangnekar等人,1992已表明IL-1家族成员确实具有直接细胞抑制性质,这在人类黑素瘤细胞上得到最有说服力地证实。

[0018] 附图简述

[0019] 图1:IL-1 β -纳米抗体融合蛋白的示意性图示

[0020] 图2:在模拟转染细胞或用信号传导缺陷型Her2转染的细胞中,野生型和突变体Q148G IL-1Her2纳米抗体融合体(A)和其他所选突变体(B)对NF κ B活性的诱导作用的浓度依赖性。

[0021] 图3:在模拟转染细胞或用信号传导缺陷型Her2转染的细胞中,野生型和突变体(Q148G、L145A/L147A、F162A/Q164E) IL-1Her2纳米抗体融合体对内源性NF- κ B p65的核移位的影响。

[0022] 图4:在表达鼠瘦素受体(mLR)或不表达鼠瘦素受体(无mLR)的细胞上,融合至抗鼠瘦素受体纳米抗体的野生型和5种不同IL-1突变体对NF κ B活性的诱导作用。

[0023] 图5:在模拟转染细胞或用信号传导缺陷型Her2转染的细胞中,融合至Her2纳米抗体的IL1双重突变体对NF κ B活性的诱导作用的浓度依赖性。

实施例

[0024] 实施例的材料和方法

[0025] IL-1-纳米抗体融合蛋白的克隆。

[0026] 针对鼠瘦素受体的4-10种纳米抗体描述于Zabeau等人(2012)和专利W0 2006/053883中。抗Her2纳米抗体1R59B描述于Vaneycken等人(2011)中。在C端His标签存在的情况下,将两种纳米抗体在pMET7真核表达载体中克隆。经由基因合成产生编码成熟IL-1 β 蛋白的密码子最佳化序列,其前面是SigK前导肽,并且具备N端HA标签(Invitrogen Gene Art)。为产生IL-1 β -纳米抗体融合蛋白,在pMet7中将IL-1 β 序列5'克隆至纳米抗体序列,其中13 \times GGG接头将细胞因子与纳米抗体部分隔开。(图1)

[0027] IL-1 β 突变体。

[0028] 预期对IL-1R具有降低的结合亲和力的IL-1 β 突变体是基于文献和对已公开的与受体复合的人类IL-1 β 的晶体结构的分析进行选择。hIL-1 β 部分中的突变是使用表I中所示的诱变引物经由定点诱变(QuickChange, Stratagene)产生:

[0029] 表I:突变体和所用的引物

[0030]

		正向引物	反向引物
1	A117G/ P118G	CCGACTACGCTGGCGGCAGTGACGGTGTCA GAAGCCTGAACTGC	GCAGTTCAGGCTTCTGACACCGTCACTG CCGCCAGCGTAGTCGG
2	R120A	CTGGCGGCAGCGCCCCTGTCTGCTAGCCTGA ACTGCACCCTGCG	CGCAGGGTGCAGTTCAGGCTAGCGACA GGGGCGCTGCCGCCAG
3	R120G	GCGGCAGCGCCCCTGTCTGGAAGCTTGAAGT GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
4	L122A	CGCTGGCGGCAGTGCCCCTGTCTGAGAAGCGC GAACTGCACCCTGCGGGACAGC	GCTGTCCCGCAGGGTGCAGTTCGCGCT TCTGACAGGGGCACTGCCGCCAGCG
5	T125G/ L126G	CGCCCCTGTCTGAGAAGCCTGAACTGCGGCGG CCGGGACAGCCAGCAGAAAAGC	GCTTTTCTGCTGGCTGTCCCGGCCCGCC GCAGTTCAGGCTTCTGACAGGGGCG
6	R127G	AGAAGCCTGAACTGCACACTGGGGGACAGC CAGCAGAAAAGCCTGGTC	GACCAGGCTTTTCTGCTGGCTGTCCCCC AGTGTGCAGTTCAGGCTTCT
7	Q130A	CCCTGCGGGACAGCGCGCAGAAAAGCCTGG	CCAGGCTTTTCTGCGCGCTGTCCCGCA GGG
8	Q130W	CTGCACCCTGCGGGACAGCTGGCAGAAAAG CCTGGTCATGAGC	GCTCATGACCAGGCTTTTCTGCCAGCTG TCCCGCAGGGTGCAG
9	Q131G	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTC	CGCTCATGACCAGGCTCTTCCCCTGGCT

[0031]

		正向引物	反向引物
		ATGAGCG	GTCCCGCAG
10	K132A	GCACCCTGCGGGACAGCCAGCAGGCTAGCC TGGTCATGAGCGGCC	GGCCGCTCATGACCAGGCTAGCCTGCT GGCTGTCCCGCAGGGTGC
11	S137G/ Q138Y	CAGCAGAAAAGCCTGGTCATGGGGTACCCCT ACGAGCTGAAGGCACTGC	GCAGTGCCTTCAGCTCGTAGGGGTACC CCATGACCAGGCTTTTCTGCTG
12	L145G	GCCCCCTACGAGCTGAAGGCAGGTCATCTGCA GGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGATGACCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGC
13	H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG
14	H146G	CCTACGAGCTGAAGGCACTGGGTCTGCAGG GCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGACCCAGTG CCTTCAGCTCGTAGG
15	H146E	GCTGAAGGCACTGGAGCTGCAGGGCCAGG	CCTGGCCCTGCAGCTCCAGTGCCTTCA GC
16	H146N	AGCTGAAGGCACTGAATCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGATTAGTGCCTTCAGC T
17	H146R	CTGAAGGCACTGCGTCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGACGCAGTGCCTTCAG
18	L145A/ L147A	GCGGCCCCCTACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCGCATGCGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCGC
19	Q148E	GGCACTGCATCTGGAGGGCCAGGACAT	ATGTCCTGGCCCTCCAGATGCAGTGCC
20	Q148G	GAAGGCACTGCATCTGGGTGGCCAGGACAT GGAACAGC	GCTGTTCCATGTCCTGGCCACCCAGATG CAGTGCCTTC
21	Q148L	GCACTGCATCTGCTGGGCCAGGACATG	CATGTCCTGGCCAGCAGATGCAGTGC
22	Q148G/ Q150G	CGAGCTGAAGGCACTGCATCTGGGGGGCGG GGACATGGAACAGCAGG	CCTGCTGTTCCATGTCCCCGCCCCCA GATGCAGTGCCTTCAGCTCG
23	Q150G/ D151A	GCACTGCATCTGCAGGGCGGGGCCATGGAA CAGCAGGTCGTGTTTCAGC	GCTGAACACGACCTGCTGTTCCATGGCC CCGCCCTGCAGATGCAGTGC
24	M152G	GCACTGCATCTGCAGGGCCAGGACGGGGAA CAGCAGGTGGTGTTCAGCATGAGC	GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC CCGTCCTGGCCCTGCAGATGCAGTGC
25	F162A	CATGGAACAGCAGGTGGTGTTCAGCATGAGC GCCGTGCAGGGCGAGGAAAGCAACGAC	GTCGTTGCTTTCCTCGCCCTGCACGGC GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC ATG
26	F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTTCCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
27	F166A	CCGACTTCACCATGCAGGCCGTCTCCAGCGG CGGCAGCAGATCTGG	CCAGATCTGCTGCCGCCGCTGGAGACG GCCTGCATGGTGAAGTCGG
28	Q164E/ E167K	GCATGAGCTTCGTGGGGGGCAAGGAAAGCA ATGACAAGATCCCCGTGGCC	GGCCACGGGGATCTTGTCATTGCTTTCC TTGCCCCCACGAAGCTCATGC
29	N169G/ D170G	GCAGGGCGAGGAAAGCGGCGGCAAGATCCC CGTGGCCCTAGGCCTGAAAGAGAAG	CTTCTCTTTCAGGCCTAGGGCCACGGG GATCTTGCCGCCGCTTTCCTCGCCCTGC
30	I172A	GAAAGCAACGACAAGGCCCCCGTGGCCCTG GG	CCCAGGGCCACGGGGCCTTGTCGTTG CTTTC
31	V174A	GCAACGACAAGATCCCCGCGGCCCTGGGCC	CTTTCAGGCCCAGGGCCGCGGGGATCT

[0032]

		正向引物	反向引物
		TGAAAG	TGTCGTTGC
32	K208E	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTCCATCTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTCCAGCTGC
33	K209A	CCCCAAGAACTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAGCGCTTCGTGTTCAAC	GTTGAACACGAAGCGCTTTTCCATCTTT GCCTTGGGGTAGTCTTGGGG
34	K209D	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCAAGGACAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTCCATCTTGCTTGGGGTAG TTCTTGGGATCCACGCTTCCAGCTGC
35	K209A/ K210A	CCCCAAGAACTACCCCAAGGCAGCGATGGAA AAACGCTTCGTGTTTC	GAACACGAAGCGTTTTTCCATCGCTGCC TTGGGGTAGTTCTTGGGG
36	K219S	AAAAACGCTTCGTGTTCAACAGCATCGAGAT CAACAACAAGCTC	GAGCTTGTTGTTGATCTCGATGCTGTTG AACACGAAGCGTTTTT
37	K219Q	AAAAACGCTTCGTGTTCAACCAGATCGAGAT CAACAACAAG	CTTGTTGTTGATCTCGATCTGTTGAAC ACGAAGCGTTTTT
38	E221S	GCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACAAC AAGCTCGAGT	ACTCGAGCTTGTTGTTGATCGAGATCTT GTTGAACACGAAGC
39	E221K	CTTCGTGTTCAACAAGATCAAGATCAACAACA AGCTCGA	TCGAGCTTGTTGTTGATCTTGATCTTGTT GAACACGAAG
40	K219S/ E221S	GGAAAAACGCTTCGTCTTCAACAGCATCTCG ATCAACAACAAGCTCGAGTTCG	CGAACTCGAGCTTGTTGTTGATCGAGAT GCTGTTGAAGACGAAGCGTTTTTCC
41	E221S/ N224A	CGCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACG CCAAGCTCGAGTTCGAG	CTCGAACTCGAGCTTGCGCTTGATCGAG ATCTTGTTGAACACGAAGCG
42	N224S/ K225S	CAACAAGATCGAGATCAACAGCAGCCTCGAA TTCGAGAGCGCCAG	CTGGGCGCTCTCGAATTCGAGGCTGCT GTTGATCTCGATCTTGTTG
43	E244K	CCCCAACTGGTACATCAGTACTAGTCAGGCC AAGAATATGCCCGTGTTC	GGAACACGGGCATATTCTTGGCCTGACT AGTACTGATGTACCAGTTGGGG
44	N245Q	CAGCACTAGTCAGGCCGAGCAGATGCCCCGT CTTCCTGGGCGGCACC	GGTGCCGCCAGGAAGACGGGCATCTG CTCGGCCTGACTAGTGCTG
45	E244K/ N245Q	CATCAGCACTAGTCAGGCCAAGCAGATGCCC GTCTTCCTGGGCGGCACC	GGTGCCGCCAGGAAGACGGGCATCTG CTTGGCCTGACTAGTGCTGATG
46	R120G/ * Q131G	GCGGCAGCGCCCCTGTCGGAAGCTTGAAC GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
47	R120G/ * H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG
49	R120G/ * L145A/ L147A	GCGGCCCCCTACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCGCATGCGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCGC
48	R120G/ ** Q148G	GCGGCAGCGCCCCTGTCGGAAGCTTGAAC GCACCCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
50	R120G/ * F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTTCAAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTTCCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
51	R120G/ * K208E	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	GCGTTTTCCATCTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTCCAGCTGC

		正向引物	反向引物
[0033]	52	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGAGCCTGGTC	CGCTCATGACCAGGCTCTTCCCCTGGCT
	**	Q148G ATGAGCG	GTCCCGCAG
	53	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA	GGATCTTGTCATTGCTTTCTCGCCCTC
	**	F162A/ Q164E GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
	54	GCAGCTGGAAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC	GCGTTTTTCCATCTTTTCTCGGGGTAGT
	**	K208E CCCGAGAAAAAGATGGAAAAACGC	TCTTGGGATCCACGCTTTCAGCTGC

[0034] *使用R120G作为模板产生双重/三重-突变体。**使用Q148G作为模板产生双重/三重-突变体。

[0035] IL-1 β 融合蛋白的制备。

[0036] IL-1 β 融合蛋白是在HEK293T细胞中制备。对于小规模制备,在6孔板中按每孔400000个细胞将HEK293T细胞接种于补充有10%FCS的DMEM中。在24小时之后,将培养基用血清减少的培养基(DMEM/5%FCS)代替并且使用线性PEI转染细胞。简言之,通过将1 μ g表达载体与5 μ g PEI组合于160 μ l DMEM中来制备PEI转染混合物,在室温下孵育10分钟并且逐滴添加至孔中。在24小时之后,将转染的细胞用DMEM洗涤并且用每孔1.5ml OptiMem使其分层,从而制备蛋白质。在48小时之后回收条件培养基,经0.45 μ 过滤器过滤并且储存于-20℃下。通过Elisa (R&D Systems)根据制造商的说明书测定条件培养基中的IL-1 β 含量。

[0037] NF- κ B报告基因分析。

[0038] 为评估IL-1R活化,我们使用稳定表达IL-1R的HEK-Blue™ IL-1 β 细胞(Invivogen)并且用NF- κ B荧光素酶报告基因将它们瞬时转染。简言之,将HEK-Blue™ IL-1 β 细胞接种于96孔板中的培养基(DMEM/10%FCS)中(每孔10000个细胞)并且在第二天使用磷酸钙沉淀法用指示量的表达质粒和每孔5ng的3 κ B-Luc报告基因质粒进行转染(Vanden Berghe等人, 1998)。转染后24小时,将培养基用饥饿培养基(DMEM)替代,并且转染后48小时,用融合蛋白诱导细胞6小时。在诱导之后,将细胞裂解并且使用Promega荧光虫荧光素酶分析系统在Berthold centro LB960光度计上测定裂解产物中的荧光素酶活性。

[0039] 经由共焦显微镜分析NF- κ B核移位。

[0040] 对于共焦成像,将每孔10⁵个HEK293-T细胞(在6孔板中)接种于玻璃盖玻片(Zeiss)上,用聚L-赖氨酸(Sigma)包被。第二天,将细胞使用磷酸钙沉淀法用每孔200ng空载体或HER2 Δ cyt表达质粒进行转染。在48小时之后,将细胞用媒介物(培养基)或IL1-Her2纳米抗体融合蛋白(10ng/ml)处理30分钟。接着,将细胞用1 \times PBS冲洗并且在室温下在4%多聚甲醛中固定15分钟。在用1 \times PBS洗涤三次之后,将细胞用含0.1%Triton X-100的1 \times PBS渗透化10分钟并且再在室温下在含1%BSA的1 \times PBS中阻断10分钟。然后将样品在37℃下与兔抗p65抗体(Santa Cruz C20,1:800稀释)和小鼠抗Flag抗体(Sigma M2,1:2000)一起孵育1小时。在1 \times PBS中洗涤四次之后,将细胞在室温下与抗兔Alexa 488和抗小鼠Alexa 594荧光染料缀合的二级抗体(两者均1:800稀释)一起孵育1小时。在第二抗体孵育之后,将细胞在1 \times PBS中洗涤四次并且将核用DAPI (2 μ g/ml)染色。在1 \times PBS中的最终洗涤步骤之后,将盖玻片使用没食子酸丙酯进行封片。在Olympus IX-81激光扫描共焦显微镜上使用60 \times 1.35NA物镜采集图像并且使用Fluoview 1000软件进行分析。

[0041] 实施例1:IL-1 β -配体和IL-1 β -纳米抗体融合蛋白。

[0042] 图1示出了用表I中描述的WT hIL-1 β 或hIL1 β 突变体构建的IL-1 β -纳米抗体融合蛋白的方案。

[0043] 实施例2:在表达Nb靶标的细胞上所选突变体IL-1 β -纳米抗体融合体的IL-1 β 活性得以恢复。

[0044] 使野生型IL-1 β 和45种IL-1 β 突变体(表I)融合至充分表征的识别Her2的纳米抗体(1R59B)。将IL-1 β -纳米抗体融合蛋白在HEK-Blue™ IL-1 β 细胞上进行测试,用NF- κ B报告基因质粒(每孔5ng)和Her2 Δ cyt(信号传导缺陷型)表达质粒(每孔2ng)进行瞬时转染。将细胞用IL-1 β -Her2纳米抗体融合体处理6小时(剂量反应在0.4至250ng/ml范围内)。如图2A中所证实,IL-1 β -Q148G-Her2纳米抗体融合体与WT IL1- β -Her2纳米抗体融合体相比展示降低的活化NF- κ B的能力。重要地,Q148G突变体靶向表达Her2 Δ cyt的细胞使其活性恢复,并且产生关于NF- κ B活化的剂量反应曲线,其完全平行于模拟转染细胞上的WT IL-1 β 的剂量反应曲线。由此图还清楚的是WT IL-1 β -Her2纳米抗体融合体的强靶向效应。融合至Her2纳米抗体的另外六种IL-1 β 突变体(R120G、Q131G、H146A、H145A/L147A、F162A/Q164E和K208E)观测到类似的“通过靶向活化”的效应(图2B)。

[0045] 为获得关于“通过靶向活化”概念的其他证据,我们接下来探索了我们是否可经由共焦显微镜目视观察在表达Her2的细胞中IL-1 β -Her2纳米抗体融合体对NF- κ B的选择性活化。我们通过分析NF- κ B核移位测量了内源性NF- κ B的活化。如由图3清楚的,在不表达Her2的细胞中,仅WT IL-1 β -Her2纳米抗体融合体促进内源性NF- κ B的移位。然而,在模拟转染细胞中,其不促进可检测NF- κ B移位,在还对于Her2呈染色阳性的细胞中,三种所测试的突变体IL1- β -Her2纳米抗体融合体触发NF- κ B核移位,指示其仅作用于所靶向的细胞。

[0046] 为评估对于不相关的膜蛋白来说使用纳米抗体“通过靶向活化”的概念是否还起作用,我们将WT IL-1 β 和五种失能(disabled)IL-1 β 突变体(R120G、Q131G、H146A、Q148G、K209A)融合至先前表征的识别mLR的纳米抗体(4-10)。使用HEK-Blue™ IL-1 β 细胞进行类似于关于IL-1 β -Her2纳米抗体融合体(图2)所报导的实验,用mLR表达质粒(每孔10ng)进行瞬时转染。类似于由Her2纳米抗体融合蛋白所获得的结果,与WT融合体相比,所有经研究的突变体IL-1 β 纳米抗体融合体(在12.5ng/ml下测试)显示降低的活化不表达mLR的细胞上的NF- κ B的能力。然而,通过mLR纳米抗体部分靶向使所选突变体的活性部分恢复(图4)。

[0047] 因为上文所描述的IL-1 β 突变体保留显著的残余生物活性,所以我们将不同突变组合以获得具有降低的基础活性的双重/三重突变体。测试了九种双重/三重突变体(参照表I突变体46至54),并且由这些突变体来看,六种突变体蛋白质(Q131G/Q148G、Q148G/K208E、R120G/Q131G、R120G/Q131G、R120G/H146A、R120G/K208E、R120G/F162A/Q164E)在Her2-阴性细胞上不展示残余活性(使用与图2中相同的分析来测量NF- κ B),而在过表达Her2 Δ cyt的细胞上部分恢复的活性是显而易见的(图5)。

[0048] 这些数据总起来说表明通过使非活性突变体IL-1 β 融合至识别细胞表面受体的纳米抗体来部分靶向非活性突变体IL-1 β 有可能通过经膜浓集作用促成的受体相互作用使其在纳米抗体靶细胞上的活性恢复。可使用识别不同类别的膜蛋白的纳米抗体实现通过靶向活化的事实表明“通过靶向活化”概念的广泛适用性。

[0049] 因为这些数据提供关于使突变体IL-1家族成员靶向所选细胞类型从而使其仅在这些靶细胞上的活性恢复的能力的概念的证据,所以制备了允许使IL-1家族成员靶向生理

学相关的IL-1 β 靶细胞的纳米抗体。鉴于IL-1家族成员作为T细胞和NK细胞活化剂的重要作用,将纳米抗体设计成使IL-1特异性地靶向T细胞和NK细胞亚群。更具体地说,研制了靶向主要表达于Th17细胞上的CCR6的纳米抗体以及靶向细胞毒性T细胞上的CD8的纳米抗体,并且使其融合至IL1家族成员,优选IL-1 β 。

[0050] 实施例3:IL-1 β -纳米抗体融合体对由原代人类T细胞产生IL-17的影响。

[0051] 原代人类T细胞是分离自血沉棕黄层。首先,通过lymphoprep密度梯度离心分离PBMC,并且将0/N与0.5ng/ml rhIL-2一起孵育以进行回收。接着,使用全T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)根据制造商的说明书分离T细胞。简言之,将T细胞再悬浮(1×10^6 /ml)于补充有10%FCS和CD3/CD28活化微珠粒的RPMI-1640(Miltenyi Biotec)中。接着,将细胞(100 μ l/孔)涂铺于U型底96孔板中并且用指示浓度的IL-1 β 变体刺激96小时。用PMA/离子霉素(两者均在100nM下)再刺激6小时之后,回收上清液并且通过Elisa(R&D Systems)测定IL-17水平。其他细胞因子是经由Luminex技术评估。

[0052] 对于所选突变体IL-1 β -纳米抗体融合体(例如使用靶向CCR6的纳米抗体),通过使用流式细胞术方法的细胞内染色来评估靶细胞特异性IL-17和IFN γ 产生。

[0053] 另外,为确证对Th17群体的选择性,经由使用Flag标签和所选CD标记物的双重染色继之以流式细胞术分析来测量对PBMC亚群的结合。

[0054] 最后,在人类Th17细胞功能的临床相关体外模型中,评估IL-1 β -纳米抗体融合体的佐剂活性。鉴于对针对百日咳博德特氏菌的更有效疫苗(或现有疫苗的佐剂)的需要,我们确定了在初始T细胞与经百日咳博德特氏菌处理的单核细胞衍生的树突细胞(MDDC)的共培养模型中所选融合蛋白是否增强人类Th17反应。自血沉棕黄层分离人类MDDC(使用单核细胞分离试剂盒II,Miltenyi Biotec),用不同比率的百日咳博德特氏菌处理48小时并且然后与原初同种异体T细胞共培养12天。在用抗CD3/抗CD28再刺激之后,使用Elisa/Luminex技术(参照上文)确定上清液中的细胞因子型态。

[0055] 实施例4:IL-1 β -纳米抗体融合体对CTL的影响

[0056] 为评估IL-1 β -CD8纳米抗体融合体是否可特异性地增强CD8+T细胞的功能,通过lymphoprep密度梯度离心自血沉棕黄层分离人类PBMC并且用与wt或突变体IL1 β -CD8Nb融合体组合的CD3/CD28活化微珠粒(Miltenyi Biotec)刺激24小时。通过进行针对活性(磷酸化)NF- κ B和IFN γ 的细胞内染色来评估这些融合蛋白对CD8+T细胞活化的影响。此外,为研究IL-1 β -纳米抗体融合体是否影响CTL脱粒,使PBMC(2×10^6 个细胞/ml)在与增加剂量的IL-1 β 融合蛋白组合的植物血球凝集素(PHA,1 μ g/ml)和IL-2(100IU/ml)存在下分化48小时。接着,为诱导脱粒,将细胞用CD3/CD28dynabeads刺激3小时并且通过流式细胞术加以分析。脱粒是经由检测细胞表面CD107a来进行测量,所述细胞表面CD107a是一种充分确定的自然杀伤活性标记物。在对白细胞汇集物进行的所有流式细胞术分析中,包括抗CD8染色以允许监测IL-1 β -CD8Nb作用的细胞类型特异性。

[0057] 最后,为评估IL-1 β -CD8纳米抗体融合体是否促进体内抗肿瘤活性,将C57BL/6小鼠皮下注射TC1肿瘤细胞,其由HPV16产生E6和E7抗原性致癌蛋白。此模型先前用于证实IL-1 β 促进CD8+T细胞介导的抗原特异性抗肿瘤反应(Ben-Sasson,2013)。简言之,在肿瘤注射之后四天,将小鼠用含有与DOTAP和LPS组合的HPV16E7₄₉₋₅₇肽的疫苗并且在存在或不存在WT或突变体IL-1 β -CD8Nb融合体或IL-1 β -GFP Nb融合体的情况下进行免疫。监测免疫后18天

内的肿瘤大小。

[0058] 实施例5:体内实验-疫苗佐剂作用。

[0059] 在第一系列实验中,将C57BL/6小鼠用不同剂量的WT和突变体IL-1 β -纳米抗体融合体以及未融合的IL-1 β 进行静脉内/腹膜内处理,以监测急性毒性。在处理后的不同时间通过尾部静脉穿刺收集静脉血,并且通过Luminex分析确定血清中的细胞因子型态。此外,在所选白细胞亚群中经由流式细胞术分析确定细胞内细胞因子水平(IL-17, IFN γ) 和IL-1R的活化(如通过测量磷酸化NF- κ B水平所评估)。

[0060] 当最佳剂量已确定时,在鼠接种方案中评估其佐剂活性。简言之,将C57BL/6小鼠用无细胞百日咳疫苗(Pa)进行腹膜内免疫。Pa疫苗由每小鼠5 μ g的纯化重组解毒百日咳毒素(PT9K/129G)+丝状血凝素(FHA)(根据Brereton等人,2011的组合物)组成。在免疫之后24小时,腹膜内或静脉内施用所选突变体IL1 β -Nb或PBS。在28天之后对动物进行加强免疫。将一组动物在第二次免疫之后14天时处死并且分离脾细胞并且在体外用培养基或FHA再刺激3天。经由Luminex技术测定培养物上清液中的细胞因子水平(IL-17、IFN γ 、IL-2、IL-10、IL-5、IL-4等)。将第二组小鼠在加强免疫后第14天用百日咳博德特氏菌激发并且在激发后2h和5天以及10天时处死。分离肺并且肺匀浆中的CFU将在Bordet-Gengou琼脂平板上定量。如脾细胞上清液中一般,测定肺匀浆中的细胞因子水平。此外,在免疫之前对血液进行取样(自尾部静脉)并且然后每14天测定血清中的百日咳博德特氏菌特异性IgG水平。

[0061] 实施例6:IL-1 β -纳米抗体融合体的直接抗肿瘤作用

[0062] 为研究所选IL1-纳米抗体融合体的直接抗肿瘤活性,我们使用人类A375黑素瘤细胞,其被证实对IL-1诱导的细胞抑制效应高度敏感(Morinaga等人,1990)。为使突变体IL-1家族成员靶向A375细胞,产生了表达高亲和力纳米抗体已可用的细胞表面标记物(即CD20)的稳定A375克隆。与亲本A375细胞相比,此细胞系对突变体IL1-纳米抗体融合体的抗增殖作用的敏感性是使用XTT增殖分析在体外进行研究。突变体IL-1-纳米抗体融合体的体内抗肿瘤活性是使用A375异种移植模型进行研究。简言之,将无胸腺裸鼠用A375细胞(亲本或表达用于靶向的表面标记物)进行皮下接种并且监测用PBS或突变体IL1-纳米抗体融合体处理的动物的肿瘤生长持续四周。

[0063] 实施例7:IL18的原理的延伸:在肿瘤模型中的应用

[0064] 为评估IL1家族成员的间接抗肿瘤活性,使用Meth A同基因小鼠肉瘤模型根据先前用于证实IL-18的抗肿瘤活性的方案进行实验,以阐述所选突变体IL-18-纳米抗体融合体的功效(Micallef等人,1997)。这些实验中所用的IL18变体由融合至靶向具有杀肿瘤性质的免疫细胞(即CTL、NK细胞)的纳米抗体的突变体IL-18组成。将小鼠用构建体处理,并且当与模拟处理对照相比时注意到肿瘤显著减小。

[0065] 参考文献

[0066] Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. (2007) Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 8:942-9.

[0067] Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. (2007) Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast

cells.J Immunol.179:2051-4.

[0068] Ben-Sasson SZ,Caucheteux S,Crank M,Hu-Li J,Paul WE. (2011) IL-1 acts on T cells to enhance the magnitude of in vivo immune responses.Cytokine.56:122-5.

[0069] Ben-Sasson SZ,Hogg A,Hu-Li J,Wingfield P,Chen X,Crank M,Caucheteux S,Ratner-Hurevich M,Berzofsky JA,Nir-Paz R,Paul WE. (2013) IL-1 enhances expansion,effector function,tissue localization,and memory response of antigen-specific CD8 T cells.J Exp Med.210:491-502.

[0070] Blake,A.W.,McCartney,L.,Flint,J.,Bolam,D.N.,Boraston,A.B.,Gilbert,H.J.and Knox,J.P. (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding molecules in prokaryotic enzymes.J.Biol.Chem.281,29321-29329.

[0071] Bonilla WV,Fröhlich A,Senn K,Kallert S,Fernandez M,Johnson S,Kreutzfeldt M,Hegazy AN,Schrick C,Fallon PG,Klemenz R,Nakae S,Adler H,Merkler D,Löhning M,Pinschewer DD. (2012).The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8⁺ T cell responses.Science.335:984-9.

[0072] Brecht A.,Gauglitz G.,Polster J. (1993).Interferometric immunoassay in a FIA-system-A sensitive and rapid approach in label-free immunosensing., Biosens Bioelectron 8:387-392.

[0073] Brereton CF,Sutton CE,Ross P J,Iwakura Y,Pizza M,Rappuoli R,Lavelle EC,Mills KH. (2011).Escherichia coli heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against infection by driving innate IL-1 and IL-23 production.J Immunol.2011May 15;186(10):5896-906.

[0074] Dimitrov,D.S. (2009) Engineered CH2 domains (nanoantibodies) .mAbs 1,26-28.

[0075] Dinarello CA,Simon A, van der Meer JW. (2012).Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases.Nat Rev Drug Discov.11:633-52.

[0076] Dunne A,Ross PJ,Pospisilova E,Masin J,Meaney A,Sutton CE,Iwakura Y,Tschopp J,Sebo P,Mills KH. (2010).Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis.J Immunol.185:1711-9.

[0077] Higgins SC,Jarnicki AG,Lavelle EC,Mills KH.TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis:role of IL-17-producing T cells.J Immunol.2006 Dec1;177(11):7980-9.

[0078] Khader SA,Bell GK,Pearl JE,Fountain JJ,Rangel-Moreno J,Cilley GE,Shen F,Eaton SM,Gaffen SL,Swain SL,Locksley RM,Haynes L,Randall TD,Cooper AM. (2007).IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis

challenge. *Nat Immunol.* 2007 8:369-77.

[0079] Killar, L.M., Hatfield, C.A., Carding, S.R., Pan, M., Winterrowd, G.E. and Bottomly, K. (1989) In vivo administration of interleukin 1 elicits an increased Ia antigen expression on B cells through the production of interleukin 4. *Eur. J. Immunol.* 19, 2205-2210.

[0080] Kinoshita, M., Miyazaki, H., Ono, S., Inatsu, A., Nakashima, H., Tsujimoto, H., Shinomiya, N., Saitoh, D. and Seki, S. (2011). Enhancement of neutrophil function by interleukin 18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 79, 2670-2680.

[0081] Kolmar, H. (2008) Alternative binding proteins: biological activity and therapeutic potential of cysteine-knot miniproteins. *FEBS J.* 275, 2684-2690.

[0082] Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. (2001). A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol.* 167:2879-86.

[0083] Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. (2008). IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 15:787-94.

[0084] Micallef MJ, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M. (1997). Interleukin 18 induces the sequential activation of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes to protect syngeneic mice from transplantation with Meth A sarcoma. *Cancer Res.*; 57:4557-63.

[0085] Morinaga Y, Hayashi H, Takeuchi A, Onozaki K. (1990). Antiproliferative effect of interleukin 1 (IL-1) on tumor cells: G0-G1 arrest of a human melanoma cell line by IL-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 173:186-92.

[0086] Nygren, P-A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J.* 275, 2668-2676.

[0087] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et al. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 378:88-91.

[0088] Rangnekar W, Waheed S, Rangnekar VM. (1992). Interleukin-1-inducible tumor growth arrest is characterized by activation of cell type-specific "early" gene expression programs. *J Biol Chem.* 267:6240-8.

[0089] Robertson MJ, Kirkwood JM, Logan TF, Koch KM, Kathman S, Kirby LC, Bell WN, Thurmond LM, Weisenbach J, Dar MM. (2008). A dose-escalation study of recombinant human interleukin-18 using two different schedules of administration in patients with cancer. *Clin Cancer Res.* 14:3462-9

[0090] Scatchard G. (1949). *Ann New York Acad Sci* 51, 660-72.

[0091] Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. (2005). IL-33, an

interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*.23:479-90.

[0092] Shaw MH, Kamada N, Kim YG, Núñez G. (2012). Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med*.209:251-8.

[0093] Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. (2010). *Nat Rev Immunol*.10:89-102.

[0094] Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins-harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J*.275,2677-2683.

[0095] Stump, M. T., Binz, H. K., Amstutz, P. (2008) DARPins: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 13,695-701.

[0096] Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*.203:1685-91.

[0097] Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity*.8:383-90.

[0098] Tramontano, A., Bianchi, E., Venturini, S., Martin, F., Pessi, A and Sollazzo, M. (1994) The making of the minibody: an engineered beta-protein for the display of conformationally constrained peptides. *J. Mol. Recognition* 7,9-24.

[0099] Usui N, Mimnaugh EG, Sinha BK. (1991). A role for the interleukin 1 receptor in the synergistic antitumor effects of human interleukin 1 alpha and etoposide against human melanoma cells. *Cancer Res*.1991;51:769-74.

[0100] Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem*.273:3285-90.

[0101] Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V. (2011). Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J*.25:2433-46.

[0102] Wigginton JM, Lee JK, Wiltrout TA, Alvord WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wiltrout RH. (2002). Synergistic engagement of an ineffective endogenous anti-tumor immune response and induction of IFN-gamma and Fas-ligand-dependent tumor eradication by combined administration of IL-18 and IL-2. *J Immunol*.169:4467-74.

[0103] Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. (2011). Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol*.32:603-11.

[0104] Ye P,Rodriguez FH,Kanaly S,Stocking KL,Schurr J,Schwarzenberger P, Oliver P,Huang W,Zhang P,Zhang J,Shellito JE,Bagby GJ,Nelson S,Charrier K, Peschon JJ,Kolls JK. (2001).Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment,and host defense.J Exp Med.194:519-27.

[0105] Zabeau L,Verhee A,Catteeuw D,Faes L,Seeuws S,Decruy T,Elewaut D, Peelman F,Tavernier J. (2012).Selection of non-competitive leptin antagonists using a random nanobody-based approach.Biochem J.441:425-34.

[0106] Zaki MH,Vogel P,Body-Malapel M,Lamkanfi M,Kanneganti TD. (2010).IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation.J Immunol.185:4912-20.

序列表

[0001]	<110>	弗拉芒区生物技术研究 所 根特大学 法国国家科学研究中心 蒙彼利埃第二大学 蒙彼利埃大学医疗中心	
	<120>	经靶向修饰的 IL-1 家族成员	
	<130>	JT/IL1/461	
	<150>	EP 13306047.5	
	<151>	2013-07-19	
	<160>	108	
	<170>	PatentIn 版本 3.5	
	<210>	1	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	1	
		ccgactacgc tggcggcagt gacggtgtca gaagcctgaa ctgc	44
	<210>	2	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	2	
		ctggcggcag cgcccctgtc gctagcctga actgcaccct gcg	43
	<210>	3	

<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 3
gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc

39

<210> 4
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 4
cgctggcggc agtgcccctg tcagaagcgc gaactgcacc ctgcgggaca gc

52

[0002]

<210> 5
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 5
cgcccctgtc agaagcctga actgcggcgg ccgggacagc cagcagaaaa gc

52

<210> 6
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 6

	agaagcctga actgcacact gggggacagc cagcagaaaa gcctggtc	48
	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 7	
	ccctgcggga cagcgcgagc aaaagcctgg	30
	<210> 8	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0003]	<223> 引物	
	<400> 8	
	ctgcaccctg cgggacagct ggcagaaaag cctggatcatg agc	43
	<210> 9	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 9	
	ctgcgggaca gccaggggaa ggcctggtc atgagcg	37
	<210> 10	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

[0004]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	10	
		gcaccctgcg ggacagccag caggctagcc tggtcatgag cggcc	45
	<210>	11	
	<211>	49	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	11	
		cagcagaaaa gcctgggtcat ggggtacccc tacgagctga aggcactgc	49
	<210>	12	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	12	
		gccctacga gctgaaggca ggtcatctgc agggccagga catgg	45
	<210>	13	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	13	
		cgagctgaag gcaactggctc ttcagggccca ggacatgg	38
	<210>	14	

<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	14	
cctacgagct gaaggcactg ggtctgcagg gccaggacat gg		42
<210>	15	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	15	
gctgaaggca ctggagctgc agggccagg		29
[0005]		
<210>	16	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	16	
agctgaaggc actgaatctg cagggccag		29
<210>	17	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	17	

	ctgaaggcac tgcgtctgca gggccag	27
	<210> 18	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 18	
	gcggccccta cgagctgaag gcagcgcattg cgcagggcca ggacatgg	48
	<210> 19	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0006]	<223> 引物	
	<400> 19	
	ggcactgcat ctggagggcc aggacat	27
	<210> 20	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 20	
	gaaggcactg catctgggtg gccaggacat ggaacagc	38
	<210> 21	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

[0007]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	21	
		gcactgcatc tgctgggccca ggacatg	27
	<210>	22	
	<211>	47	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	22	
		cgagctgaag gcactgcatc tggggggcgg ggacatggaa cagcagg	47
	<210>	23	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	23	
		gcactgcatc tgcagggcgg ggccatggaa cagcaggtcg tgttcage	48
	<210>	24	
	<211>	54	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	24	
		gcactgcatc tgcagggcca ggacggggaa cagcaggtgg tgttcagcat gage	54
	<210>	25	

<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 25
catggaacag caggtggtgt tcagcatgag cgccgtgcag ggcgaggaaa gcaacgac 58

<210> 26
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 26
gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc 56

[0008]

<210> 27
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 27
ccgacttcac catgcaggcc gtctccagcg gcggcagcag atctgg 46

<210> 28
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 28

	gcatgagctt cgtggggggc aaggaaagca atgacaagat ccccgtagcc	50
	<210> 29	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 29	
	gcagggcgag gaaagcggcg gcaagatccc cgtggcccta ggcctgaaag agaag	55
	<210> 30	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0009]	<223> 引物	
	<400> 30	
	gaaagcaacg acaaggcccc cgtggccctg gg	32
	<210> 31	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 31	
	gcaacgacaa gatccccgcg gccctgggcc tgaaag	36
	<210> 32	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	32	
	gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc		55
	<210>	33	
	<211>	49	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	33	
	ccccagaac tacccaagg caaagatgga aaagcgttc gtgttcaac		49
	<210>	34	
	<211>	55	
	<212>	DNA	
[0010]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	34	
	gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta cccaaggac aagatggaaa aacgc		55
	<210>	35	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	35	
	ccccagaac tacccaagg cagcgatgga aaaacgttc gtgttc		46
	<210>	36	

<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 36
aaaaacgctt cgtgttcaac agcatcgaga tcaacaacaa gctc 44

<210> 37
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 37
aaaaacgctt cgtgttcaac cagatcgaga tcaacaacaa g 41

[0011]

<210> 38
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 38
gcttcgtgtt caacaagatc tcgatcaaca acaagctcga gt 42

<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 39

	cttcgtgttc aacaagatca agatcaacaa caagctcga	39
	<210> 40	
	<211> 53	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 40	
	ggaaaaacgc ttcgtcttca acagcatctc gatcaacaac aagctcgagt tcg	53
	<210> 41	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0012]	<223> 引物	
	<400> 41	
	cgcttcgtgt tcaacaagat ctcgatcaac gccaaagctcg agttcgag	48
	<210> 42	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 42	
	caacaagatc gagatcaaca gcagcctcga attcgagagc gcccag	46
	<210> 43	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	43	
	ccccaactgg	tacatcagta	ctagtcaggc caagaatatg cccgtgttcc
			50
	<210>	44	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	44	
	cagcactagt	caggccgagc	agatgcccggt cttcctgggc ggcacc
			46
	<210>	45	
	<211>	49	
	<212>	DNA	
[0013]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	45	
	catcagcact	agtcaggcca	agcagatgcc cgtcttcttg ggcggcacc
			49
	<210>	46	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	46	
	gcggcagcgc	ccctgtcgga	agcttgaact gcaccctgc
			39
	<210>	47	

<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 47
cgagctgaag gcactggctc ttcagggcca ggacatgg 38

<210> 48
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 48
gcggccccta cgagctgaag gcagcgcatg cgcagggcca ggacatgg 48

[0014]

<210> 49
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 49
gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc 39

<210> 50
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 50

	gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc	56
	<210> 51	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 51	
	gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc	55
	<210> 52	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0015]	<223> 引物	
	<400> 52	
	ctgcgggaca gccaggggaa gagcctggtc atgagcg	37
	<210> 53	
	<211> 56	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 53	
	gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc	56
	<210> 54	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	54	
	gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc		55
	<210>	55	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	55	
	gcagttcagg cttctgacac cgtcactgcc gccagcgtag tcgg		44
	<210>	56	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
[0016]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	56	
	cgcagggtgc agttcaggct agcgacaggg gcgctgccgc cag		43
	<210>	57	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	57	
	gcagggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc		39
	<210>	58	

<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 58
gctgtcccg c aggggtgcagt tcgcgcttct gacaggggca ctgccgccag cg 52

<210> 59
<211> 52
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 59
gcttttctgc tggctgtccc ggccgccgca gttcaggctt ctgacagggg cg 52

[0017]

<210> 60
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 60
gaccaggett ttctgtggc tgtccccag tgtgcagttc aggettct 48

<210> 61
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 61

	ccaggctttt ctgcgcgctg tcccgcaggg	30
	<210> 62	
	<211> 43	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 62	
	gctcatgacc aggtttttct gccagctgtc ccgcagggtg cag	43
	<210> 63	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0018]	<223> 引物	
	<400> 63	
	cgctcatgac caggctcttc ccctggctgt cccgcag	37
	<210> 64	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 64	
	ggccgctcat gaccaggcta gcctgctggc tgtccgcag ggtgc	45
	<210> 65	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	65	
		gcagtgcctt cagctcgtag gggtagccca tgaccaggct tttctgctg	49
	<210>	66	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	66	
		ccatgtcctg gccctgcaga tgacctgcct tcagctcgta ggggc	45
	<210>	67	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
[0019]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	67	
		ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg	38
	<210>	68	
	<211>	42	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	68	
		ccatgtcctg gccctgcaga cccagtgcct tcagctcgta gg	42
	<210>	69	

<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 69
cctggccctg cagctccagt gccttcagc 29

<210> 70
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 70
ctggccctgc agattcagt ccttcagct 29

[0020]

<210> 71
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 71
ctggccctgc agacgcagt ccttcag 27

<210> 72
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 72

	ccatgtcctg gccctgcgca tgcgctgcct tcagctcgta ggggccgc	48
	<210> 73	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 73	
	atgtcctggc cctccagatg cagtgcc	27
	<210> 74	
	<211> 38	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0021]	<223> 引物	
	<400> 74	
	gctgttccat gtcctggcca cccagatgca gtgccttc	38
	<210> 75	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 75	
	catgtcctgg cccagcagat gcagtgc	27
	<210> 76	
	<211> 47	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	76	
	cctgctgttc catgtccccg cccccagat gcagtgcctt cagctcg		47
	<210>	77	
	<211>	48	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	77	
	gctgaacacg acctgctgtt ccatggcccc gccctgcaga tgcagtgc		48
	<210>	78	
	<211>	54	
	<212>	DNA	
[0022]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	78	
	gctcatgctg aacaccacct gctgttcccc gtcctggccc tgcagatgca gtgc		54
	<210>	79	
	<211>	58	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	79	
	gtcgttgctt tcctgccct gcacggcgt catgetgaac accacctgct gttccatg		58
	<210>	80	

<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 80
ggatcttgtc attgctttcc tcgccctcca cggcgetcat gctgaacacg acctgc 56

<210> 81
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 81
ccagatctgc tgccgccgct ggagacggcc tgcattggtga agtcgg 46

[0023]

<210> 82
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 82
ggccacgggg atcttgatcat tgccttcctt gccccccacg aagctcatgc 50

<210> 83
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 83

	cttctctttc aggcctaggg ccacggggat cttgccgccg ctttcctcgc cctgc	55
	<210> 84	
	<211> 32	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 84	
	cccagggccca cgggggcctt gtcgttgctt tc	32
	<210> 85	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0024]	<223> 引物	
	<400> 85	
	ctttcaggcc cagggccgcg gggatcttgt cgttgc	36
	<210> 86	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 86	
	gcgtttttcc atctttttct cggggtagtt cttgggatcc acgtttcca gctgc	55
	<210> 87	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	87	
		g ttgaacacg aagcgctttt ccattctttgc ctggggtag ttcttgggg	49
	<210>	88	
	<211>	55	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	88	
		gcgtttttcc atcttgctct tgggtagtt ctgggatcc acgtttcca gctgc	55
	<210>	89	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
[0025]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	89	
		gaacacgaag cgtttttcca tcgtgcctt gggtagttc ttgggg	46
	<210>	90	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	90	
		gagcttggtg ttgatctcga tgctgttgaa cacgaagcgt tttt	44
	<210>	91	

<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 91
cttgttggtg atctcgatct ggttgaacac gaagcgtttt t 41

<210> 92
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 92
actcgagctt gttgttgatc gagatcttgt tgaacacgaa gc 42

[0026]

<210> 93
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 93
tcgagcttgt tgttgatctt gatcttggtg aacacgaag 39

<210> 94
<211> 53
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 94

	cgaactcgag cttgttggtg atcgagatgc tgttgaagac gaagcgtttt tcc	53
	<210> 95	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 95	
	ctcgaactcg agcttggcgt tgatcgagat cttgttgaac acgaagcg	48
	<210> 96	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0027]	<223> 引物	
	<400> 96	
	ctgggcgctc tcgaattcga ggctgctggt gatctcgatc ttgttg	46
	<210> 97	
	<211> 50	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 97	
	ggaacacggg catattcttg gcctgactag tactgatgta ccagttgggg	50
	<210> 98	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	98	
	ggtgccgccc aggaagacgg gcatctgctc ggcctgacta gtgctg		46
	<210>	99	
	<211>	49	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	99	
	ggtgccgccc aggaagacgg gcatctgctt ggcctgacta gtgctgatg		49
	<210>	100	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
[0028]	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	100	
	gcagggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc		39
	<210>	101	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	101	
	ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg		38
	<210>	102	

<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 102
ccatgtcctg gccctgcgca tgcgctgcct tcagctcgta ggggccgc 48

<210> 103
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 103
gcagggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc 39

[0029]

<210> 104
<211> 56
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 104
ggatcttgtc attgctttcc tcgccctcca cggegetcat gctgaacacg acctgc 56

<210> 105
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 105

	gcgtttttcc atctttttct cggggtagtt cttgggatcc acgtttcca gctgc	55
	<210> 106	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 106	
	cgctcatgac caggtcttcc ccctggctgt cccgcag	37
	<210> 107	
	<211> 56	
	<212> DNA	
[0030]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 107	
	ggatcttgtc attgttttcc tcgccctcca cggcgtcat gctgaacacg acctgc	56
	<210> 108	
	<211> 55	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 108	
	gcgtttttcc atctttttct cggggtagtt cttgggatcc acgtttcca gctgc	55

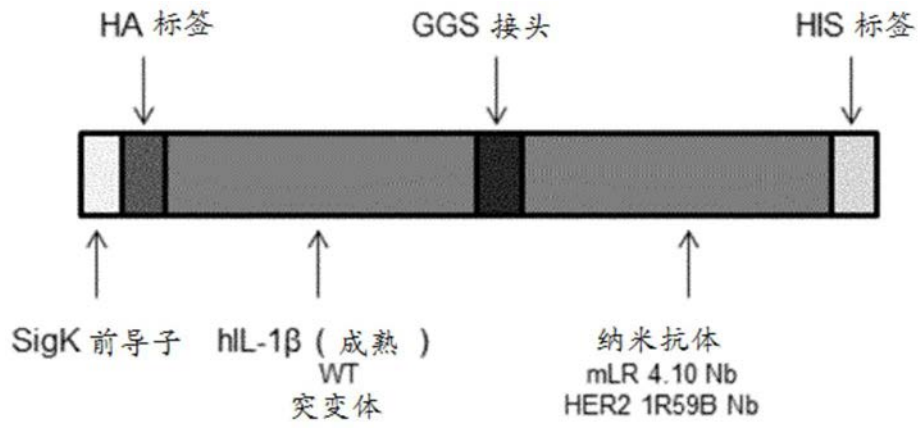


图1

A

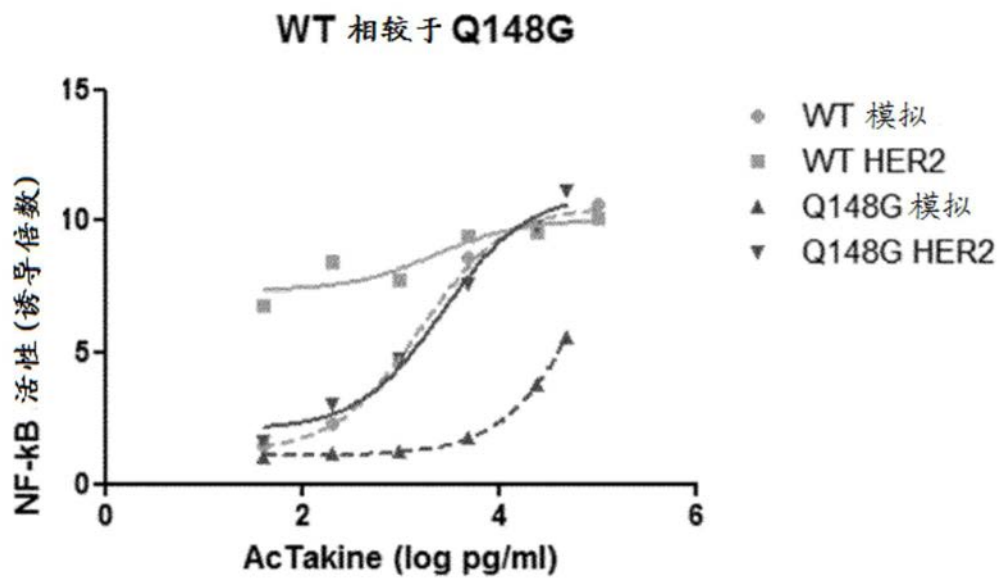


图2

B

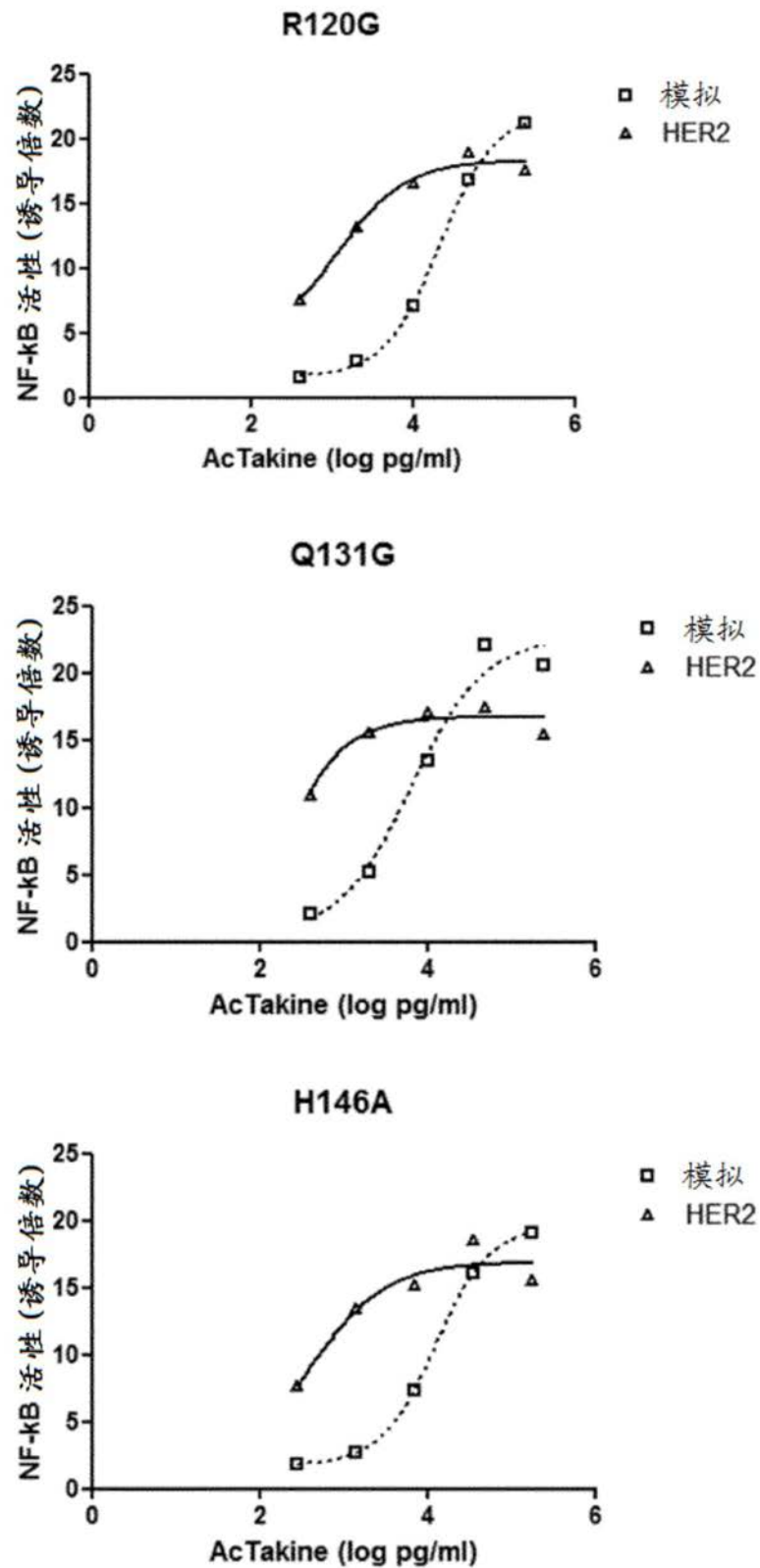


图2续

B

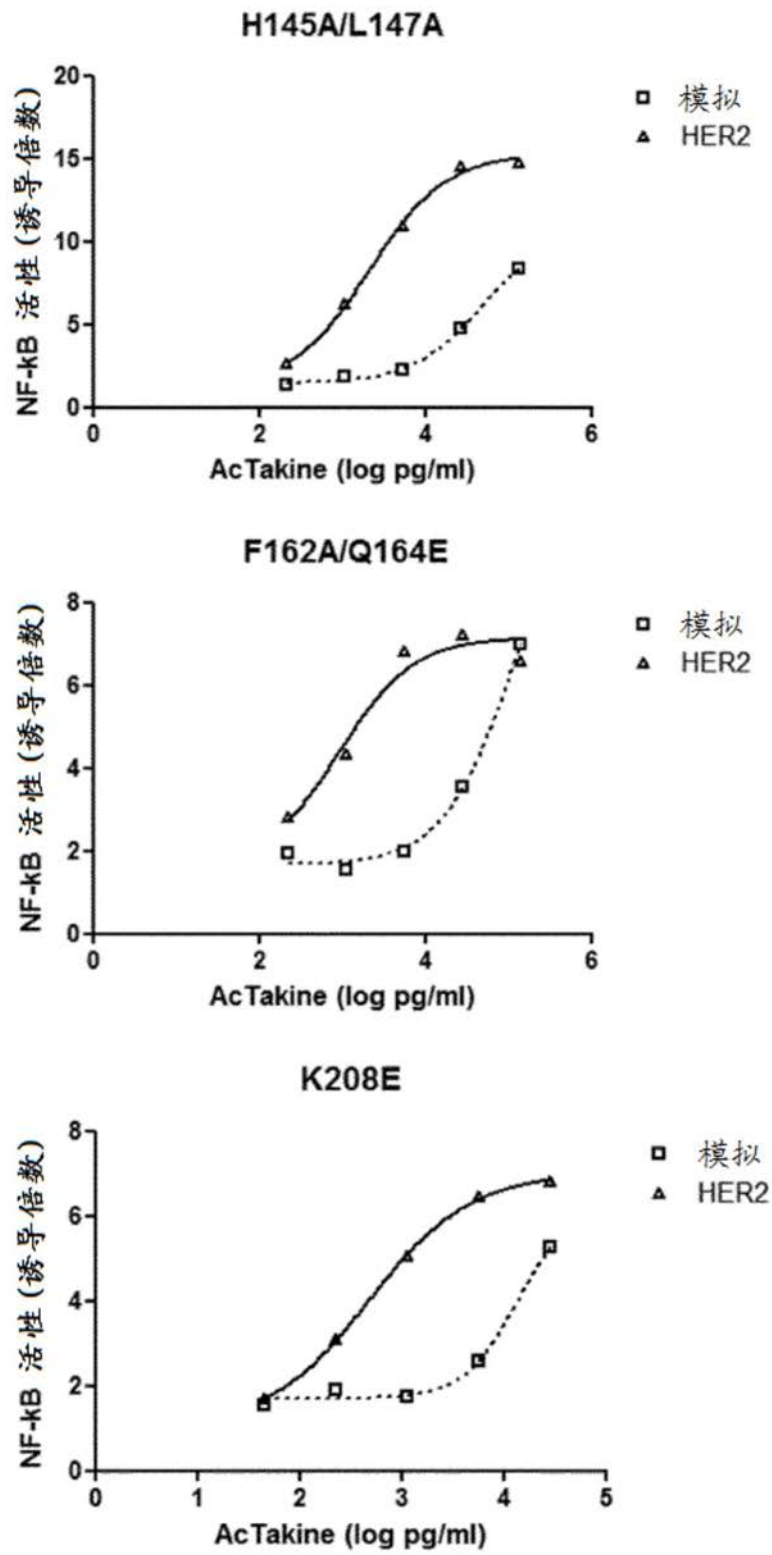


图2续

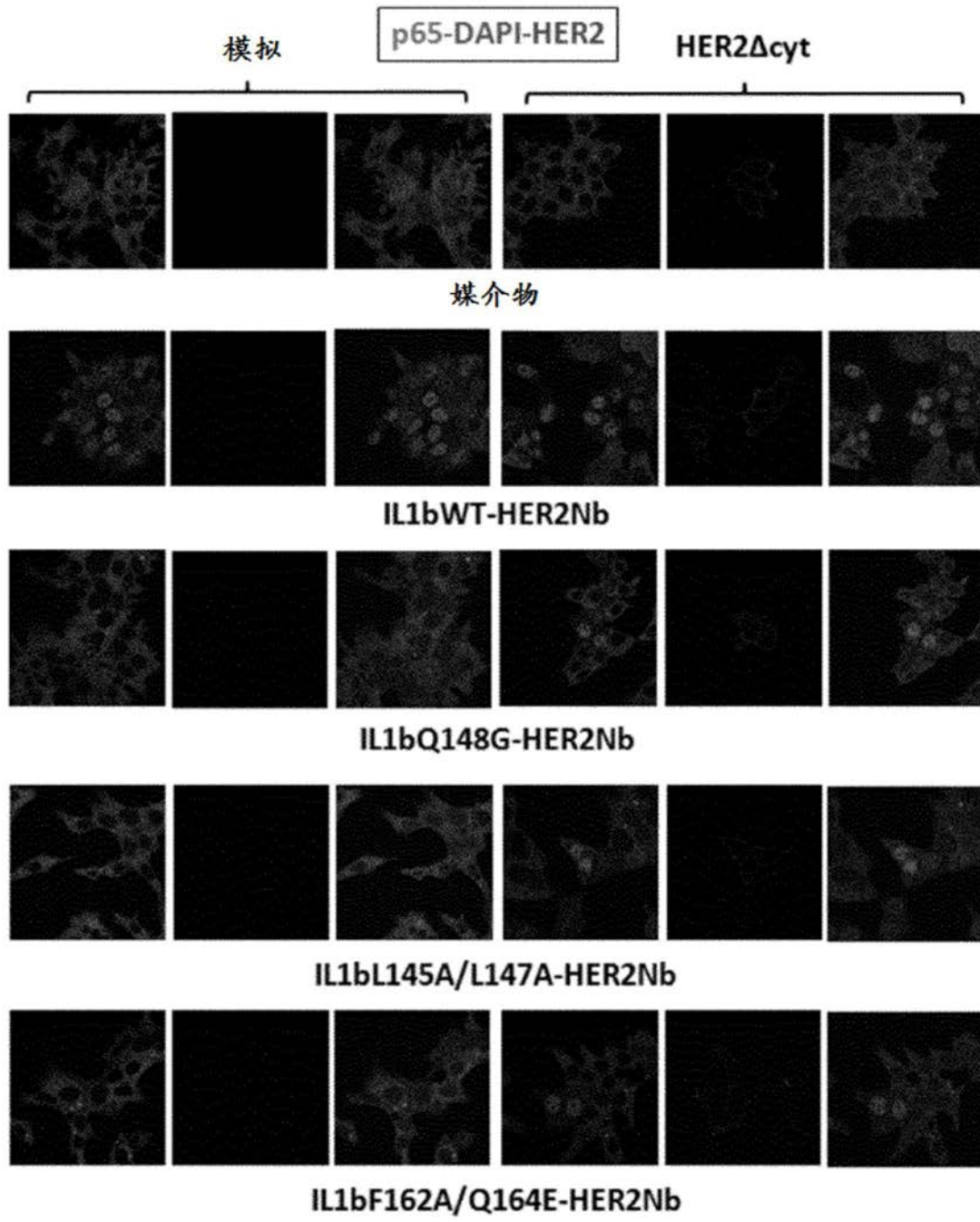


图3

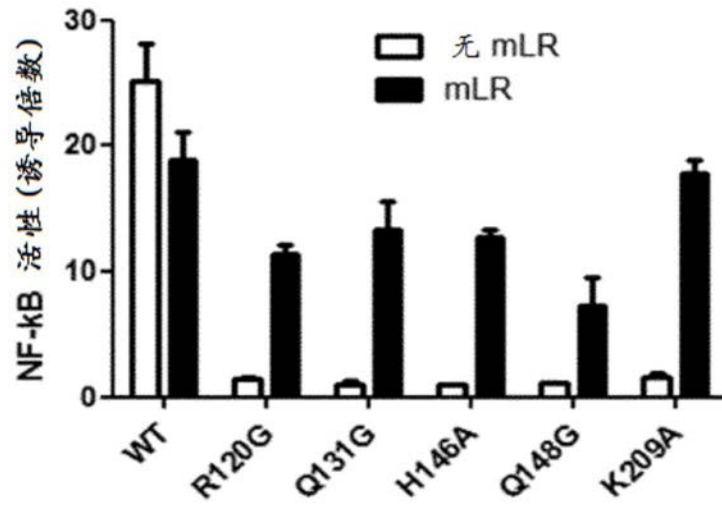


图4

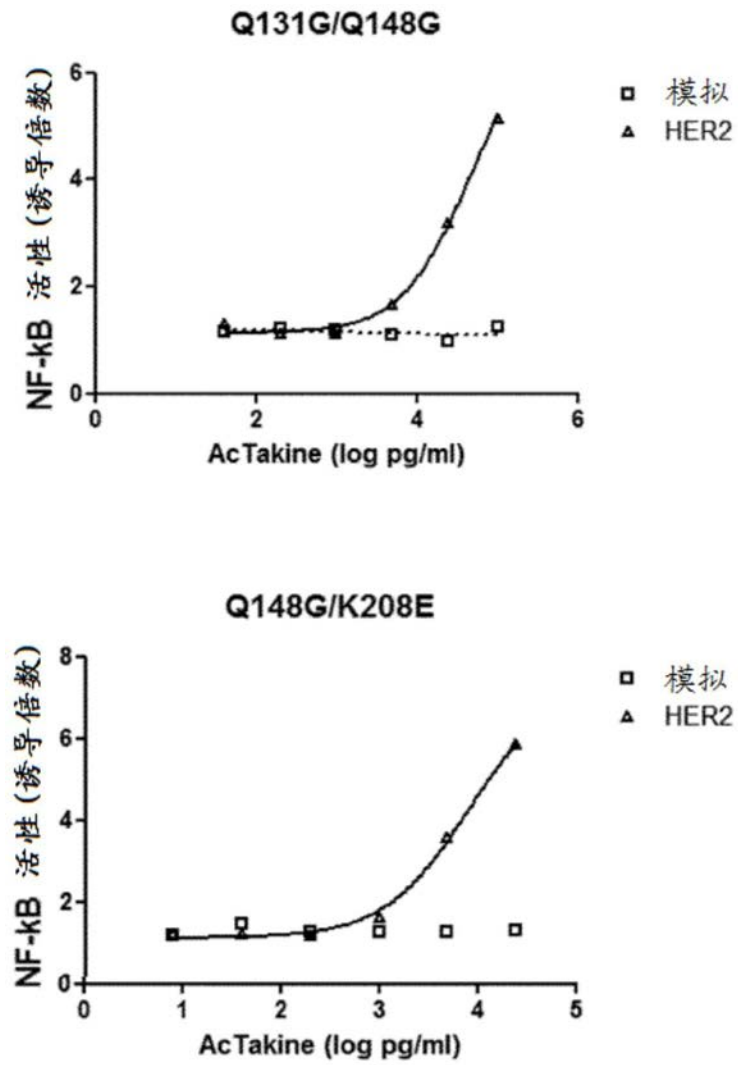


图5

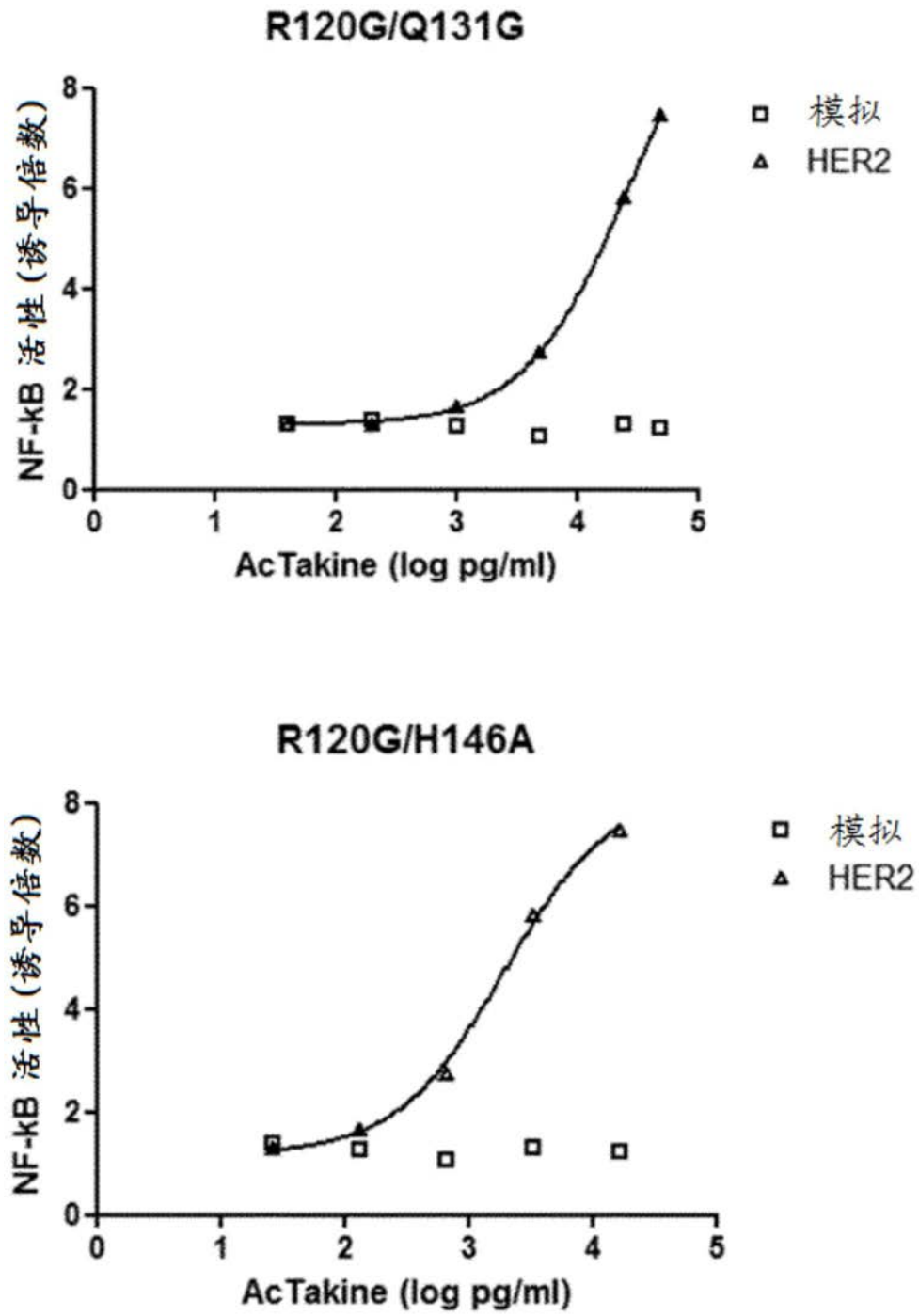


图5续

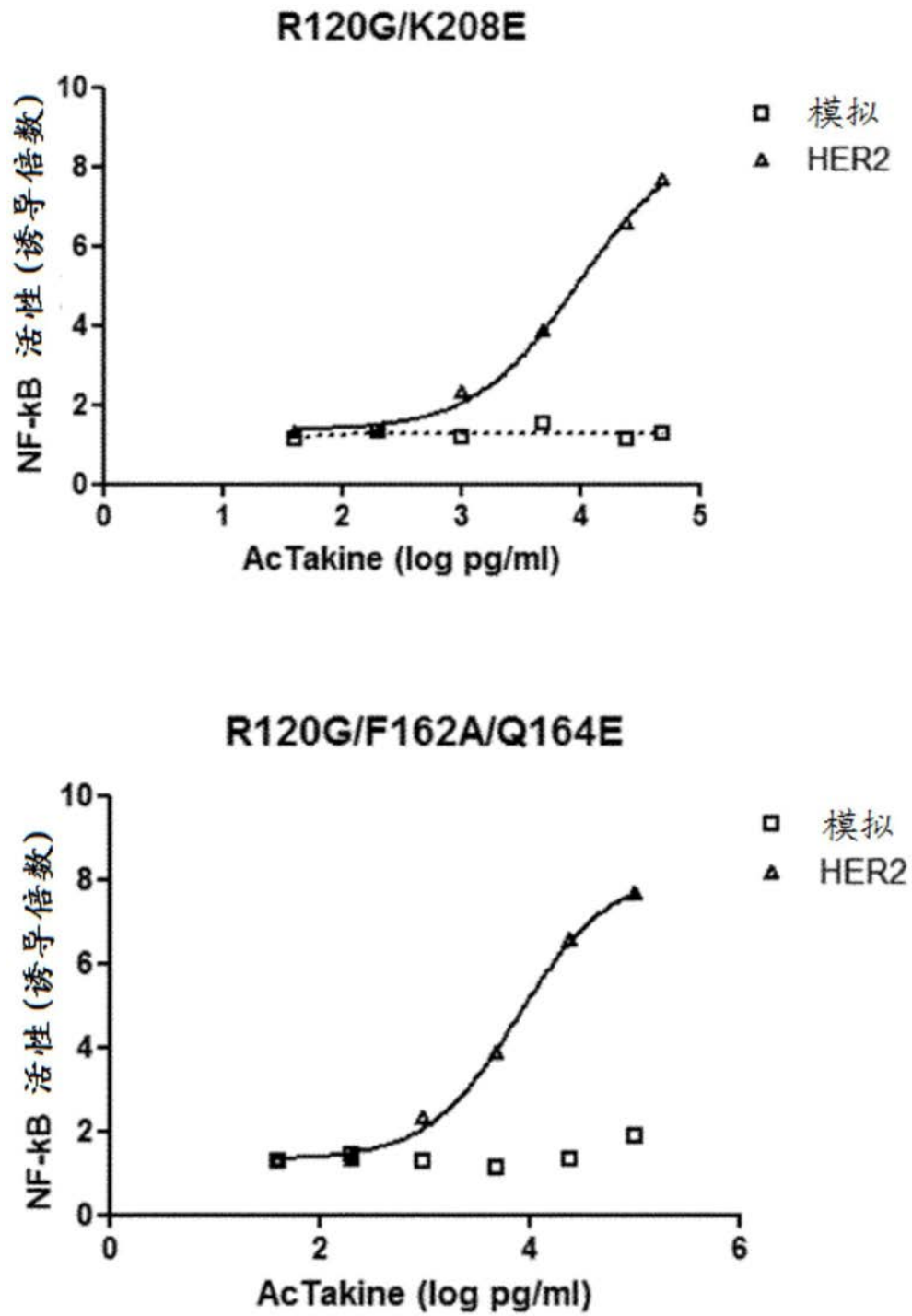


图5续