



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월09일

(11) 등록번호 10-2275090

(24) 등록일자 2021년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/545 (2006.01) **A61K 38/20** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/545 (2013.01)
A61K 38/2006 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7002679
- (22) 출원일자(국제) 2014년07월04일
 심사청구일자 2019년07월03일
- (85) 번역문제출일자 2016년01월29일
- (65) 공개번호 10-2016-0108293
- (43) 공개일자 2016년09월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2014/064283
- (87) 국제공개번호 WO 2015/007542
 국제공개일자 2015년01월22일
- (30) 우선권주장
 13306047.5 2013년07월19일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2011029870 A1
 WO2010036918 A1
 WO2011020783 A1
 WO2009003145 A1

- (73) 특허권자
브이아이비 브이지더블유
 벨기에 비-9052 겐트 리비스세스트라트 120
유니버시티테이트 겐트
 벨기에 비-9000 겐트 신트-피에터스니유스트라트 25
 (뒷면에 계속)
- (72) 발명자
타베르니에, 잔
 벨기에 비-9860 발젼 보텔베그 2
젤로, 사라
 벨기에 비-9000 겐트 윈터스트라트 15
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 성선영

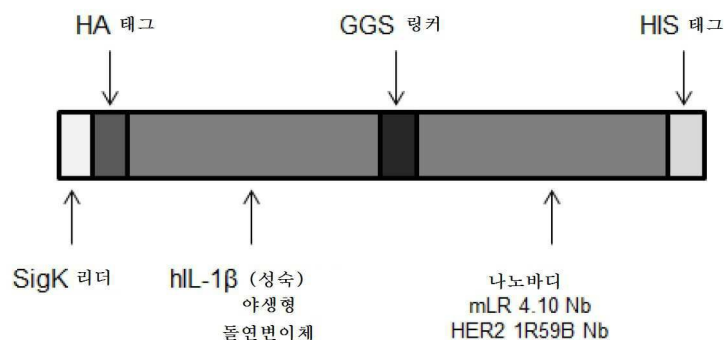
(54) 발명의 명칭 표적화된 변형된 IL-1 패밀리 구성원

(57) 요약

본 개시내용은 사이토카인 수용체를 통한 감소된 활성을 갖는 변형된 인터류킨-1(IL-1) 패밀리 구성원 사이토카인에 관한 것이고, 상기 인터류킨-1 패밀리 구성원 사이토카인은 표적 세포에 특이적으로 전달된다. 바람직하게는, IL-1 패밀리 구성원 사이토카인은 돌연변이체이고, 더 바람직하게는 이것은 IL-1 수용체에 대해 낮은 친화도

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



를 갖는 돌연변이체 IL-1이고, 상기 돌연변이체 IL-1은 표적 세포에 특이적으로 전달된다. 표적화는 바람직하게는 표적화 모이어티, 바람직하게는 항체 또는 항체 유사 분자에 대한 변형된 IL-1 패밀리 구성원 사이토카인의 융합에 의해 실현된다. 본 개시내용은 추가로 질환을 치료하기 위한 이러한 표적화된 변형된 IL-1 패밀리 구성원 사이토카인의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6813 (2017.08)
C07K 16/2869 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/569 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C07K 2319/74 (2013.01)

(73) 특허권자

상트르 나쇼날 드 라 르세르쥬 시앙티피끄
 프랑스 에프-75794 파리 뤼 미셸-앙주 3
상트르 하스피탈리에 레지오날 유니베르시테르 드 몽펠리에
 프랑스 에프-34295 몽펠리에 191 애비뉴 듀 도이앵 가스통 지로
유니베르시테 드 몽펠리에
 프랑스 34090 몽펠리에 뤼 어거스트 브로우소네트 163

(72) 발명자

필만, 프랑크

벨기에 비-9050 정브루지 데지어 메르시에란 46

유제, 질

프랑스 에프-34090 몽펠리에 11 아비뉴 데 카스텔 누 4 앙클루 라푸

명세서

청구범위

청구항 1

표적화 작제물로서,

(i) 야생형 인간 IL-1 β 에 비해서 수용체에 대한 저감된 친화성을 특징으로 하는 돌연변이된 인간 IL-1 β 로서, 상기 돌연변이된 인간 IL-1 β 는 R120G, Q131G, L145G, H146A, Q148G, F162A 및 K208E로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 상기 돌연변이된 인간 IL-1 β , 및

(ii) 중쇄 항체의 가변 도메인(variable domain of heavy chain antibody: VHH) 또는 새로운 항원 수용체의 가변 도메인(variable domain of new antigen receptor: VNAR)을 포함하는 표적화 모이어티를 포함하는, 표적화 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 IL-1R1 및/또는 IL-1RacP 발현 세포 상에 발현된 마커에 표적화되는, 표적화 작제물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 조직 특이적 마커에 지향되는, 표적화 작제물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 Her2에 지향되는, 표적화 작제물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 돌연변이된 인간 IL-1 β 는,

- (i) Q131G 및 Q148G;
- (ii) Q148G 및 K208E;
- (iii) R120G 및 Q131G;
- (iv) R120G 및 H146G;
- (v) R120G 및 K208E;
- (vi) R120G, F162A, 및 Q164E;
- (vii) F162A 및 Q164E;
- (viii) Q164E 및 E167K; 및
- (ix) L145A 및 L147A

로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, 표적화 작제물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 Her2에 대한 VHH를 포함하는, 표적화 작제물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 표적화 모이어티는 표적 세포 상에 돌연변이된 IL-1 β 의 활성을 회복시키는, 표적화 작제물.

청구항 9

약제로서 사용하기 위한, 제1항에 따른 표적화 작제물.

청구항 10

면역 반응의 자극에 사용하기 위한, 제1항에 따른 표적화 작제물.

청구항 11

암의 치료에 사용하기 위한, 제1항에 따른 표적화 작제물.

청구항 12

제1항에 따른 표적화 작제물 및 적합한 부형제를 포함하는, 면역 반응을 자극하기 위한 조성물.

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 사이토카인 수용체를 통한 감소된 활성을 갖는 변형된 인터류킨-1(IL-1) 패밀리를 구성원 사이토카인에 관한 것이고, 상기 인터류킨-1 패밀리를 구성원 사이토카인은 표적 세포에 특이적으로 전달된다. 바람직하게는, IL-1 패밀리를 구성원 사이토카인은 돌연변이체이고, 더 바람직하게는 이것은 IL-1 수용체에 대해 낮은 친화도를 갖는 돌연변이체 IL-1이고, 상기 돌연변이체 IL-1은 표적 세포에 특이적으로 전달된다. 표적화는 바람직하게는 표적화 모이어티, 바람직하게는 항체 또는 항체 유사 분자에 대한 변형된 IL-1 패밀리를 구성원 사이토카인의 융합에 의해 실현된다. 본 발명은 추가로 질환을 치료하기 위한 이러한 표적화된 변형된 IL-1 패밀리를 구성원 사이토카인의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인터류킨-1(IL-1) 패밀리는 밀접히 관련된 수용체의 그룹을 통해 작용하는, 11개의 구조적으로 관련된 패밀리를 구성원(IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33 및 IL-1F5 내지 IL-1F10)으로 이루어지고, 이들은 가장 강력한 면역계 신호전달 분자들 중에 있다. 모든 IL-1 수용체는 유사한 방식의 활성화를 갖는다: 제1 수용체 서브유닛에 대한 리간드의 결합(즉, IL-1 α 및 β 에 대한 IL-1R1의 결합, IL-18에 대한 IL-18R의 결합 및 IL-33에 대한 ST2의 결합) 시, 제2 수용체 서브유닛이 동원되고(즉, IL-1 α 및 β 에 대한 IL-1RAP, IL-18에 대한 IL-18RAP 및 IL-33에 대한 IL-1RAP), 신호전달은 수용체 서브유닛의 세포질 톨(Toll)/IL-1 수용체(TIR) 도메인의 병치를 통해 개시된다. 이합체화된 TIR 도메인은, 다른 중간체의 동원을 통해 염증촉진 핵 인자- κ B(NF- κ B) 및 미토젠-활성화 단백질 키나제(mitogen-activated protein kinase: MAPK) 경로의 활성화를 발생시키는, MYD88 어답터 단백질에 대한 도킹 플랫폼을 제공한다. IL-1 패밀리를 구성원은 선천성 면역 세포에 의해 주로 생성되고, 면역 반응 동안 다양한 세포 유형에 작용한다(검토를 위해 문헌[Sims and Smith, 2010]을 참조).

[0003]

T 림프구는 주요 IL-1 패밀리를 표적 세포 중 하나이고, 상이한 T 세포 부분집합, 특히 CD8+ T 세포(Ben-Sasson, 2011; Ben-Sasson, 2013) 및 Th17 세포(Sutton et al., 2006; Acosta-Rodriguez et al., 2007; Dunne et al., 2010; Shaw et al., 2012)의 성장 및 분화에서 특히 IL-1 α 및 IL-1 β 의 강화 효과는 확고히 확립되었다. Th17 세포는 IL-17의 생성을 특징으로 하고, 자가면역 질환 및 만성 염증에서 중요한 역할을 한다(문헌[Wilke et al., 2011]에서 검토됨). T 세포 부분집합 중에서, Th17 세포는 최고 수준의 IL-1R을 발현하고, IL-1은 Th17 프라이밍에서 중요한 역할을 한다.

[0004]

IL-18은 문헌[Okamura et al., 1995; Takeda et al. 1998]에서 Th1 세포 및 자연 살해(natural killer: NK) 세포에서 강력한 작용을 갖는 IFN γ -유도 사이토카인으로 가장 잘 공지되어 있다. 또한, IL-18은 호중구 기능을 증대시킨다(Leung et al., 2001). 몇몇 보고는 동물 모델에서 IL-18 항종양 작용을 입증하고(Micallef et al.,

1997; Loeffler et al., 2008; Wigginton et al., 2002; Zaki et al., 2010), 재조합 인간 IL-18 치료는 진행된 암의 치료에 대한 이의 효능을 평가하기 위한 임상 실험에 최근에 들어갔다(Robertson et al., 2008). IL-18 과 반대로, IL-33은 Th2 세포(Schmitz et al., 2005) 및 비만 세포(Allakhverdi et al., 2007)에 주로 작용하고, 최근에 항바이러스 반응을 촉진하도록 CD8 + T 세포에 작용하는 것으로 나타났다(Bonilla et al., 2012). 다른 IL-1 패밀리의 구성원은 덜 훌륭히 규명되었지만, 요약하면 상이한 IL-1 패밀리의 구성원은 상이한 T 세포 부분집합 또는 다른 세포 유형에 대한 특이성을 갖고, 이에 따라 상이한 치료 분야를 갖는다.

[0005] 간접적인 항종양 활성을 갖는 것 이외에, T 및 NK 세포의 활성화를 통해, IL-1 패밀리의 구성원은 직접적인 세포 분열억제 특성(cytostatic property)을 갖는 것으로 나타났고, 이 특성은 인간 흑색종 세포에서 가장 설득력 있게 입증되었다(Morinaga et al., 1990; Usui et al., 1991; Rangnekar et al., 1992).

[0006] 염증성 과정에 대한 몇몇 IL-1 패밀리의 구성원의 기여의 관점에서, 임상적인 관심은 IL-1-길항 전략의 개발에 주로 맞춰진다(Dinarelli et al., 2012). 그럼에도 불구하고, 제어된 표현형 IL-1 활성의 이용은 상이한 생리학/병리학 과정에 적용을 가질 수 있고, 이 과정에서 면역자극 효과가 바람직할 것이다. 면역자극 치료에서의 IL-1의 이용과 관련한 주요 관심 중 하나는 전신 투여될 때 이의 심각한 독성이다. 그러나, IL-1 작용이 선택된 세포 집단에 구속될 때, 독성 문제는 해결될 것이고, 이것은 치료학적 전망을 연다.

[0007] 예를 들어, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염 및 염증성 장 질환과 같은 자가면역 병증에서의 병원성 역할의 관점에서 Th17 반응을 차단하는 것에 많은 관심이 있지만(Wilke et al., 2011), 정상 Th17 기능은 마이코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)(Khader et al., 2007), 클레브시엘라 뉴모니아에(*Klebsiella pneumoniae*)(Ye et al., 2001) 및 보르테텔라 페르투스시(*Bordetella pertussis*)(Higgins et al., 2006)를 포함하는 일련의 병원균에 대한 보호 면역에 필수적이다. IL-1 β 가 Th17 기능을 자극하므로, 백신을 약화시키도록 반응을 증대시키기 위해 T 세포 아쥬번트(adjutant)로서 IL-1 β 를 사용하는 것에 대한 생각이 일어났다(Ben-Sasson et al., 2011). 다른 분야는 항바이러스 반응을 증대시키기 위한 CD8+ T 세포 집단에 대한 IL-1 β 또는 IL-33의 표적화 또는 항종양 활성을 증진시키기 위한 Th1 세포 또는 NK 세포에 대한 IL-18의 표적화일 수 있다.

[0008] 놀랍게도, 본 발명자들은 수용체를 활성화하는 데 있어서 결함이 있지만, 표적화 모이어티에 융합될 때, 세포 표면에서의 집중 효과에 의해 선택된 세포 유형에서 활성을 회복하는, IL-1 패밀리의 변형을 설계할 수 있다는 것을 발견하였다. IL-1 돌연변이체는 이의 동족 수용체에 대한 감소된 친화도를 갖고, 이에 따라 이의 수용체에 효과적으로 결합하고 활성화할 수 없다. 그러나, 이것을 표적화 모이어티(예컨대, 나노바디)에 융합함으로써, 돌연변이체 IL-1 패밀리의 구성원의 활성은 표적화 모이어티에 의해 인식된, 세포 표면 표적을 발현하는 세포에서 회복된다. 활성화가 선택된 표적화된 세포 유형에만 구속되므로, 주요 전신 독성이 발생하지 않는다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 제1 양상은 사이토카인 수용체에 대한 감소된 친화도를 특징으로 하는 변형된 IL-1 패밀리의 구성원 사이토카인 및 표적화 모이어티를 포함하는 표적화 작제물이다. IL-1 패밀리의 구성원 사이토카인은 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있고, IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL18, IL-36Ra, IL-36 α , IL-37, IL-36 β , IL-36 γ , IL-38 및 IL-33(또한 각각 IL-1F1, IL-1F2, IL-1F3, IL-1F4, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9, IL-1F10 및 IL-1F11로 나타냄)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. IL-1 패밀리에 대한 검토를 위해, 디나렐로(Dinarelli)의 문헌(2011)을 참조한다. 변형된 IL-1 패밀리의 사이토카인은 IL-1 패밀리의 사이토카인이 이의 수용체에 대한 친화도를 변경하도록 변한다는 것을 의미하고, 최종 결과에 의해 변형된 IL-1 패밀리의 사이토카인은, 수용체에 보통 결합하는 내인성 야생형 사이토카인과 비교하여, 수용체에 대한 친화도가 감소되고 결과적으로 생물학적 활성이 감소된다. 이러한 변형은 보통의 야생형 사이토카인의 활성을 감소시키는 변형일 수 있거나, 이것은 상동성 비내인성 IL-1 패밀리의 사이토카인(예컨대, 인간 IL-1 패밀리의 사이토카인 수용체에서 활성이 아닌 또 다른 종의 IL-1 패밀리의 사이토카인(이것으로 제한되지는 않음))의 친화도를 증가시키는 변형일 수 있다. 변형은 화학 변형 및/또는 효소 변형, 예컨대 폐쇄화 및 당화, 다른 단백질에 대한 융합 및 돌연변이(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 당해 분야의 당업자에게 공지된 활성을 감소시키거나 증가시키는 임의의 변형일 수 있다. 바람직하게는, 상기 변형은 돌연변이이고, 심지어 더 바람직하게는 이것은 IL-1 패밀리의 사이토카인의 친화도를 감소시키는 돌연변이이다. 본원에서 사용되는 바와 같은 친화도의 감소 및 결과로 생긴 생물학적 활성의 감소는, 변형된 IL-1 패밀리의 사이토카인이, 수용체에 보통 결합하는 IL-1 패밀리의 사이토카인과 비교하여, IL-1 패밀리의 사이토카인의 생물학적 활성의 70% 미만, 심지어 더 바람직하게는 IL-1 패밀리의 사이토카인의 생물학적 활성의 60% 미만, 더 바람직하게는 IL-1 패밀리의 사이토카인의 생물학적 활성의 50% 미만, 더 바람직하게는 IL-1 패밀리의 사이토카인의 생물학적 활성의 40% 미만, 더 바람직하게는 IL-1 패밀리의 사이토카인의 생물학적 활성의

30% 미만, 더 바람직하게는 IL-1 패밀리 사이토카인의 생물학적 활성의 20% 미만, 더 바람직하게는 IL-1 패밀리 사이토카인의 생물학적 활성의 10% 미만, 가장 바람직하게는 IL-1 패밀리 사이토카인의 생물학적 활성의 1% 미만을 갖는다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 변형된 IL-1 패밀리 사이토카인은 야생형 IL-1 패밀리 사이토카인의 돌연변이체이고, 활성은 야생형 IL-1 패밀리 사이토카인과 비교된다. 친화도 및/또는 활성은 당해 분야의 당업자에게 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0010] 본 발명의 바람직한 실시형태는 인터류킨-1 수용체 타입 I(IL-1RI) 및/또는 인터류킨-1 수용체 보조 단백질(IL-1RAcP) 수용체에 대한 감소된 친화도를 특징으로 하는 돌연변이체 IL-1 β 및 표적화 모이어티를 포함하는 표적화 작제물이다. 본원에서 사용되는 바와 같은 돌연변이체 IL-1 β 는 수용체에 대한 더 낮은 친화도 및 결과로서 염증촉진(proinflammatory) 전사 인자 NF- κ B의 감소된 활성화를 갖는 임의의 돌연변이체 형태일 수 있다. 수용체에 대한 야생형 IL-1 β 의 친화도와 비교하여 수용체에 대한 돌연변이체 IL-1 β 의 친화도는 결합 데이터의 스캐차드 플롯 분석(Scatchard plot analysis) 및 컴퓨터 피팅(computer-fitting)(예를 들어, Scatchard, 1949)에 의해 또는 브레체트(Brecht) 등의 문헌(1993)에 기재된 바와 같은 조건을 통한 흐름 하의 반사율계 간섭 분광학(reflectometric interference spectroscopy)에 의해 측정될 수 있다. 돌연변이체 IL-1 β 의 활성은 바이오검정을 이용하여(예를 들어, 세포사의 유도에 의해) 또는 수용체의 하류의 신호전달 사건을 측정함으로써 통상적으로 측정된다. 이러한 신호전달 사건은 NF- κ B의 변형 또는 핵 전좌, 또는 선택된 리포터 유전자의 유도일 수 있다. 돌연변이체는 점 돌연변이체, 결실 또는 삽입 돌연변이체, 또는 이들의 조합일 수 있고; 몇몇 돌연변이는 일 단백질에 존재할 수 있다. 바람직하게는, 상기 돌연변이체 IL-1 β 는 활성 돌연변이유발, 예컨대 중합효소 사슬 반응 증폭에 의한 부위 지정 돌연변이유발(이것으로 제한되지는 않음)에 의해 얻어진다. 바람직하게는, 상기 돌연변이체 IL-1 β 는 야생형 IL-1 β 의 생물학적 활성의 70% 미만, 심지어 더 바람직하게는 야생형 IL-1 β 의 생물학적 활성의 60% 미만, 더 바람직하게는 야생형 IL-1 β 의 생물학적 활성의 50% 미만, 더 바람직하게는 야생형 IL-1 β 의 생물학적 활성의 40% 미만, 더 바람직하게는 야생형 IL-1 β 의 생물학적 활성의 30% 미만, 더 바람직하게는 야생형 IL-1 β 의 생물학적 활성의 20% 미만, 더 바람직하게는 야생형의 생물학적 활성의 10% 미만, 가장 바람직하게는 이것이 추론된 야생형(즉, 돌연변이체 IL-1 β 를 얻도록 코딩 서열이 돌연변이된 야생형 IL-1 β)의 1% 미만의 생물학적 활성을 갖는다. 바람직하게는, 상기 돌연변이체는 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, I172A, V174A, K208E, K209X, K209A/K210A, K219X, E221X, E221S/N224A, N224S/K225S, E244K, N245Q(여기서, X는 아미노산의 임의의 변화, 바람직하게는 비보존적 변화일 수 있음)로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이체이다. 심지어 더 바람직하게는, 상기 돌연변이는 R120A, R120G, Q130A, Q130W, H146A, H146G, H146E, H146N, H146R, Q148E, Q148G, Q148L, K209A, K209D, K219S, K219Q, E221S 및 E221K로 이루어진 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 상기 돌연변이는 R120G, H146N, H146R, Q148E, Q148G 및 K209A로 이루어진 군으로부터 선택된다. (인간 IL-1 β 서열에 기초한 넘버링, 진뱅크(genbank) 수탁 번호 NP_000567, 버전 NP_000567.1, GI: 10835145).

[0011] IL-18에 대한 돌연변이에 대한 바람직한 구역은 Y37-K44, R49-Q54, D59-R63, E67-C74, R80, M87-A97, N127-K129, Q139-M149, K165-K171, R183 및 Q190-N191이다. E67-C74 및 M87-A97 구역(인간 서열에 기초한 넘버링, 진뱅크 수탁 번호 AAV38697, 버전 AAV38697.1, GI: 54696650)이 가장 바람직하다.

[0012] IL-33에 대한 돌연변이에 대한 바람직한 구역은 I113-Y122, S127-E139, E144-D157, Y163-M183, E200, Q215, L220-C227 및 T260-E269(인간 서열에 기초한 넘버링, 진뱅크 수탁 번호 NP_254274, 버전 NP_254274.1, GI: 15559209)이다.

[0013] 바람직하게는, 상기 표적화 모이어티는 IL-1 β 수용체 발현 세포, 바람직하게는 IL-1RI를 발현하는 세포에서 발현된 마커에 표적화한다. 바람직한 일 실시형태에서, 상기 표적화 모이어티는 조직 특이적 마커에 지향된다.

[0014] 변형된 IL-1 패밀리 구성원은 표적화 모이어티에 연결된다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "연결된"은 공유 결합에 의할 수 있거나, 이것은 친화도 결합에 의할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "표적화 모이어티"는, 결합 부위와 결합 분자 사이의 특이적 상호작용에 의해, IL-1 패밀리 구성원에 대한 수용체를 발현하는 세포에서의 결합 부위를 향해 융합 단백질을 지향시킬 수 있는, 결합 분자이다. 바람직한 일 실시형태에서, 상기 결합 분자는 세포의 바깥에 위치한 분자에 특이적으로 결합하는 작은 화합물이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 분자는 세포벽에서 발현된 렉틴 유사 분자를 향해 지향된 당 구조이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 결합 분자는 종양 또는 염증 환경을 표적화하는 펩타이드이다. 이러한 펩타이드는 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있고, NGR 및 RGD 펩타이드를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다(Yang et al., 2011; WO2005054293). 훨씬 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 결합 분자는 결합 도메인을 포함하는 단백질이다.

이것은 탄수화물 결합 도메인(carbohydrate binding domain: CBD)(Blake et al, 2006), 렉틴 결합 단백질, 중쇄 항체(heavy chain antibody: hcAb), 단일 도메인 항체(single domain antibody: sdAb), 미니바디(minibody)(Tramontano et al., 1994), 카멜리드 중쇄 항체의 가변 도메인(variable domain of camelid heavy chain antibody: VHH), 새로운 항원 수용체의 가변 도메인(variable domain of new antigen receptor: VNAR), 애퍼바디(affibody)(Nygren et al., 2008), 알파바디(alphabody)(WO2010066740), 설계된 안키린-반복 도메인(designed ankyrin-repeat domain: DARPIn)(Stumpp et al., 2008), 안티칼린(anticalin)(Skerra et al., 2008), 크노틴(knottin)(Kolmar et al., 2008) 및 조작된 CH2 도메인(나노항체; Dimitrov, 2009)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 상기 표적화 모이어티는 단일 폴리펩타이드 사슬로 이루어지고, 전사 후 변형되지 않는다. 심지어 더 바람직하게는, 상기 표적화 모이어티는 나노바디이다.

[0015] 표적화 모이어티는 당해 분야의 당업자에게 공지된 임의의 표적화 모이어티일 수 있다. 비제한적인 예에서, 상기 표적화 모이어티는, 일 특이성을 위해 표적 세포에서의 결합 부위에 지향되고, 다른 특이성을 위해 표적화된 사이토카인, 또는 상기 사이토카인에 융합된 태그에 지향된, 이중특이적 항체일 수 있다. 또 다른 비제한적인 예에서, 표적화 모이어티는 돌연변이체 인터류킨-1에 화학적으로 연결될 수 있거나, 이것은 재조합 융합 단백질일 수 있다. 바람직하게는, 상기 표적화 작제물은 재조합 융합 단백질이다. 표적화 모이어티는 돌연변이체 IL-1 β 에 직접적으로 융합될 수 있거나, 이것은 링커 단편, 바람직하게는 GGS 링커의 도움에 의해 융합될 수 있다. 표적화 모이어티는 돌연변이된 IL-1 β 의 아미노 말단 또는 카복시 말단에서 융합될 수 있고; 바람직하게는 상기 표적화 모이어티는 돌연변이된 IL-1 β 분자의 카복시 말단 맨 끝에서 융합될 수 있다. 표적화 작제물은 태그 서열, 신호 서열, 또 다른 사이토카인 또는 항체(이들로 제한되지는 않음)와 같은 다른 도메인을 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양상은 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 표적화 작제물이다. 바람직한 일 실시형태는 면역 반응의 자극에서 사용하기 위한 본 발명에 따른 표적화 작제물이다. 실제로, IL-1 치료가 B 세포에서 항원 발현을 유도할 수 있다는 것이 공지되어 있고(Killar et al., 1989); 마찬가지로, IL-18 치료는 세포 면역 및 체액 면역을 증대시킨다(Kinoshita et al., 2011). 유사한 방식으로, 생체내 면역 반응의 규모를 증대시키기 위해 IL-1이 T 세포에 작용한다는 것이 입증되었다(Ben-Sasson et al., 2011; Ben Sasson et al., 2013). 따라서, 본 발명의 바람직한 일 양상은 백신접종에서 아주변트로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 표적화 작제물이다. 보통의 야생형 IL-1의 염증촉진 효과가 IL-1의 이용이 불가능하게 하므로, 본 발명에 따른 표적화 작제물은 이 관점에서 특히 흥미롭다.

[0017] 본 발명의 훨씬 또 다른 양상은 암을 치료하는 데 사용하기 위한 본 발명에 따른 표적화 작제물이다. 실제로, 문헌[Morinaga et al., 1990, Usui et al., 1991 및 Rangnekar et al., 1992]은 IL-1 패밀리를 구성원이 직접적인 세포분열억제 특성을 갖는다는 것을 나타냈고, 이것은 인간 흑색종 세포에서 가장 설득력 있게 입증되었다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1: IL-1 β -나노바디 융합 단백질의 개략적 도면;

도 2: 모의 형질주입된 세포, 또는 신호전달 결핍 Her2로 형질주입된 세포에서의, 야생형 및 돌연변이체 Q148G IL-1 Her2 나노바디 융합체(A) 및 다른 선택된 돌연변이체(B)에 의한, NF κ B 활성의 유도의 농도 의존도를 도시한 도면;

도 3: 모의 형질주입된 세포, 또는 신호전달 결핍 Her2로 형질주입된 세포에서의, 내인성 NF- κ B p65의 핵 전좌에서의 야생형 및 돌연변이체(Q148G, L145A/L147A, F162A/Q164E) IL-1 Her2 나노바디 융합체의 효과를 도시한 도면;

도 4: 쥐과 렙틴 수용체를 발현하는 세포(murine leptin receptor: mLR) 또는 이것을 발현하지 않는 세포(mLR 무)에서의, 항-쥐과 렙틴 수용체 나노바디에 융합된, 야생형 및 5개의 상이한 IL-1 돌연변이체에 의한 NF κ B 활성의 유도를 도시한 도면;

도 5: 모의 형질주입된 세포, 또는 신호전달 결핍 Her2로 형질주입된 세포에서의, Her2 나노바디에 융합된, IL1 이중 돌연변이체에 의한 NF κ B 활성의 유도의 농도 의존도를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 실시예

[0020] 실시예에 대한 재료 및 방법

[0021] *IL-1-나노바디 융합 단백질의 클로닝.*

[0022] 쥐와 랩틴 수용체에 지향된 4-10개의 나노바디가 문헌[Zabeau et al. (2012)] 및 특허 WO 2006/053883에 기재되어 있다. 항-Her2 나노바디 1R59B는 문헌[Vaneycken et al. (2011)]에 기재되어 있다. 나노바디 둘 다를 pMET7 진핵생물 발현 벡터에서 C 말단 His 태그와 클로닝하였다. SigK 리더 펩타이드가 선행하고, N 말단 HA 태그가 구비된, 성숙 IL-1 β 단백질을 코딩하는 코돈 최적화된 서열을 유전자 합성에 의해 생성하였다(인비트로젠 아트(Invitrogen Gene Art)). IL-1 β -나노바디 융합 단백질을 생성하기 위해, IL-1 β 서열을, 사이토카인 및 나노바디 모이어티를 분리시키는 13 x GGS 링커에 의해, pMet7에서 나노바디 서열에 5' 클로닝하였다(도 1).

[0023] *IL-1 β 돌연변이체.*

[0024] 문헌 및 수용체와 복합체화된 인간 IL-1 β 의 공개된 결정 구조의 분석에 기초하여 IL-1R에 대한 결합 친화도가 감소된 것으로 예상된 IL-1 β 돌연변이체를 선택하였다. 표 1에 기재된 바와 같은 돌연변이유발 프라이머를 사용하여 부위 지정된 돌연변이유발(퀵체인지(QuickChange), 스트라진(Stratagene))을 통해 hIL-1 β 모이어티에서의 돌연변이를 생성하였다.

표 1

사용된 돌연변이체 및 프라이머

		정방향 프라이머	역방향 프라이머
1	A117G/ P118G	CCGACTACGCTGGCGGAGCTGACGGTGTCA GAAGCCTGAAGTGC	GCAGTTCAGGCTTCTGACACCGTCACTG CCGCCAGCGTAGTCGG
2	R120A	CTGGCGGAGCGCCCTGTCTGCTAGCCTGA ACTGCACCTGCG	CGCAGGGTGCAGTTCAGGCTAGCGACA GGGGCGCTGCCGCCAG
3	R120G	GCGGCAGCGCCCTGTCTGGAAGCTTGAAGT GCACCTGCG	GCAGGGTGCAGTTCAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
4	L122A	CGCTGGCGGAGTGCCTGTCTGAGAAGCGC GAAGTGCACCTGCGGGACAGC	GCTGTCCCGCAGGGTGCAGTTCGCGCT TCTGACAGGGGCACTGCCGCCAGCG
5	T125G/ L126G	CGCCCTGTCTGAGAAGCCTGAAGTGCAGCGG CCGGGACAGCCAGCAGAAAAGC	GCTTTTCTGCTGGCTGTCCCGGCCGCC GCAGTTCAGGCTTCTGACAGGGGCG
6	R127G	AGAAGCCTGAAGTGCACACTGGGGGACAGC CAGCAGAAAAGCCTGGTC	GACCAGGCTTTTCTGCTGGCTGTCCCC AGTGTGCAGTTCAGGCTTCT
7	Q130A	CCCTGCGGGAGAGCGCGCAGAAAAGCCTGG	CCAGGCTTTTCTGCGCGCTGTCCCGCA GGG
8	Q130W	CTGCACCTGCGGGAGAGCTGGCAGAAAAG CCTGGTCATGAGC	GCTCATGACCAGGCTTTTCTGCCAGCTG TCCCGCAGGGTGCAG
9	Q131G	CTGCGGGAGAGCCAGGGGAAGAGCTGGTC ATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTTTTCCCTGGCT GTCCCGCAG
10	K132A	GCACCTGCGGGAGAGCCAGCAGGCTAGCC TGCTCATGAGCGGCC	GGCCGCTCATGACCAGGCTAGCCTGCT GGCTGTCCCGCAGGGTGC
11	S137G/ Q138Y	CAGCAGAAAAGCCTGGTCATGGGGTACCCCT ACGAGCTGAAGGCACTGC	GCAGTGCCTTCAGCTCGTAGGGGTACC CCATGACCAGGCTTTTCTGCTG
12	L145G	GCCCCTACGAGCTGAAGGAGGTCATCTGCA GGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGATGACCTG CCTTCAGCTCGTAGGGG
13	H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG
14	H146G	CCTACGAGCTGAAGGCACTGGGTCTGCAGG GCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCAGACCCAGTG CCTTCAGCTCGTAGG
15	H146E	GCTGAAGGCACTGGAGCTGCAGGGCCAGG	CCTGGCCCTGCAGCTCCAGTGCCTTCA GC
16	H146N	AGCTGAAGGCACTGAATCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGATTCACTGCCTTCAGC T
17	H146R	CTGAAGGCACTGCGTCTGCAGGGCCAG	CTGGCCCTGCAGACGCACTGCCTTCAG
18	L145A/ L147A	GCGGCCCTACGAGCTGAAGGAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCCTGGCCCTGCCATGCGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCG

[0025]

		정방향 프라이머	역방향 프라이머
19	Q148E	GGCACTGCATCTGGAGGGCCAGGACAT	ATGTCCTGGCCCTCCAGATGCAGTGCC
20	Q148G	GAAGGCACTGCATCTGGGTGGCCAGGACAT GGAACAGC	GCTGTTCCATGTCCTGGCCACCCAGATG CAGTGCCTTC
21	Q148L	GCACTGCATCTGCTGGGCCAGGACATG	CATGTCCTGGCCCAGCAGATGCAGTGC
22	Q148G/ Q150G	CGAGCTGAAGGCACTGCATCTGGGGGGCGG GGACATGGAACAGCAGG	CCTGCTGTTCCATGTCCCGCCCCCA GATGCAGTGCCTTCAGCTCG
23	Q150G/ D151A	GCACTGCATCTGCAGGGCGGGGCCATGGAA CAGCAGGTCGTGTTCAAGC	GCTGAACACGACCTGCTGTTCCATGGCC CCGCCCTGCAGATGCAGTGC
24	M152G	GCACTGCATCTGCAGGGCCAGGACGGGGAA CAGCAGGTGGTGTTCAGCATGAGC	GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC CCGTCCTGGCCCTGCAGATGCAGTGC
25	F162A	CATGGAACAGCAGGTGGTGTTCAGCATGAGC GCCGTGCAGGGCGAGGAAAGCAACGAC	GTGCTTGTCTTCTCGCCCTGCACGGC GCTCATGCTGAACACCACCTGCTGTTCC ATG
26	F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
27	F166A	CCGACTTCACCATGCAGGCCGTCTCCAGCGG CGGCAGCAGATCTGG	CCAGATCTGCTGCCGCGCTGGAGACG GCCTGCATGGTGAAGTCGG
28	Q164E/ E167K	GCATGAGCTTCGTGGGGGGCAAGGAAAGCA ATGACAAGATCCCGTGGCC	GGCCACGGGGATCTTGTCATTGCTTTC TTGCCCCCACGAAGCTCATGC
29	N169G/ D170G	GCAGGGCGAGGAAAGCGGCGGCAAGATCCC CGTGGCCCTAGGCCTGAAAGAGAAG	CTTCTCTTTCAGGCCTAGGGCCACGGG GATCTTGCCGCGCTTCTCGCCCTGC
30	I172A	GAAAGCAACGACAAGGCCCCCGTGGCCCTG GG	CCCAGGGCCACGGGGGCTTGTCTGTG CTTTC
31	V174A	GCAACGACAAGATCCCGCGGCCCTGGGCC TGAAAG	CTTTCAGGCCACGGGCGCGGGGATCT TGTCGTTGC
32	K208E	GCAGCTGGAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGAAAAACGC	GCGTTTTTCCATCTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTTCAGCTGC
33	K209A	CCCCAAGAACTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAGCGCTTCGTGTTCAAC	GTTGAACACGAAGCGCTTTTCCATCTTT GCCTTGGGGTAGTCTTGGGG
34	K209D	GCAGCTGGAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCAAGGACAAGATGAAAAACGC	GCGTTTTTCCATCTTGTCCTTGGGGTAG TTCTTGGGATCCACGCTTTCAGCTGC
35	K209A/ K210A	CCCCAAGAACTACCCCAAGGCAAGATGGAA AAACGCTTCGTGTTTC	GAACACGAAGCGTTTTTCCATCGCTGCC TTGGGGTAGTCTTGGGG
36	K219S	AAAAACGCTTCGTGTTCAACAGCATCGAGAT CAACAACAAGCTC	GAGCTTGTTGTTGATCTCGATGCTGTTG AACACGAAGCGTTTTT
37	K219Q	AAAAACGCTTCGTGTTCAACCAGATCGAGAT CAACAACAAG	CTTGTTGTTGATCTCGATCTGGTTGAAC ACGAAGCGTTTTT
38	E221S	GCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACAAC AAGCTCGAGT	ACTCGAGCTTGTGTTGATCGAGATCTT GTTGAACACGAAGC

[0026]

		정방향 프라이머	역방향 프라이머
39	E221K	CTTCGTGTTCAACAAGATCAAGATCAACAACA AGCTCGA	TCGAGCTTGTGTTGATCTTGATCTTGTT GAACACGAAG
40	K219S/ E221S	GGAAAAACGCTTCGTCTTCAACAGCATCTCG ATCAACAACAAGCTCGAGTTCC	CGAACTCGAGCTTGTGTTGATCGAGAT GCTGTTGAAGACGAAGCGTTTTTCC
41	E221S/ N224A	CGCTTCGTGTTCAACAAGATCTCGATCAACG CCAAGCTCGAGTTTCGAG	CTCGAACTCGAGCTTGGCGTTGATCGAG ATCTTGTGAACACGAAGCG
42	N224S/ K225S	CAACAAGATCGAGATCAACAGCAGCCTCGAA TTCGAGAGCGCCAG	CTGGGCGCTCTCGAATTCGAGGCTGCT GTTGATCTCGATCTTGTTG
43	E244K	CCCCAACTGGTACATCAGTACTAGTCAGGCC AAGAATATGCCCCGTGTTCC	GGAACACGGGCATATTCTTGGCCTGACT AGTACTGATGTACCAGTTGGGG
44	N245Q	CAGCACTAGTCAGGCCGAGCAGATGCCCGT CTTCTGGGCGGCACC	GGTGCCGCCAGGAAGACGGGCATCTG CTCGGCCTGACTAGTGCTG
45	E244K/ N245Q	CATCAGCACTAGTCAGGCCAAGCAGATGCC GTCTTCTGGGCGGCACC	GGTGCCGCCAGGAAGACGGGCATCTG CTTGGCCTGACTAGTGCTGATG
46	R120G/ * Q131G	GCGGCAGCGCCCTGTCTCGAAGCTTGA GCACCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
47	R120G/ * H146A	CGAGCTGAAGGCACTGGCTCTTCAGGGCCA GGACATGG	CCATGTCTGGCCCTGAAGAGCCAGTG CCTTCAGCTCG
49	R120G/ * L145A/ L147A	GCGGCCCTACGAGCTGAAGGCAGCGCATG CGCAGGGCCAGGACATGG	CCATGTCTGGCCCTGCGCATGCGCTG CCTTCAGCTCGTAGGGGCCGC
48	R120G/ ** Q148G	GCGGCAGCGCCCTGTCTCGAAGCTTGA GCACCTGC	GCAGGGTGCAGTTCAAGCTTCCGACAG GGGCGCTGCCGC
50	R120G/ * F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
51	R120G/ * K208E	GCAGCTGGAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGAAAAACGC	GCGTTTTTCATCTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTTCAGCTGC
52	Q131G/ ** Q148G	CTGCGGGACAGCCAGGGGAAGGCCTGGTC ATGAGCG	CGCTCATGACCAGGCTCTTCCCTGGCT GTCCCGCAG
53	Q148G/ ** F162A/ Q164E	GCAGGTCGTGTTTCAGCATGAGCGCCGTGGA GGGCGAGGAAAGCAATGACAAGATCC	GGATCTTGTCATTGCTTCTCGCCCTC CACGGCGCTCATGCTGAACACGACCTG C
54	Q148G/ ** K208E	GCAGCTGGAAGCGTGGATCCCAAGAACTAC CCCGAGAAAAAGATGAAAAACGC	GCGTTTTTCATCTTTTCTCGGGGTAGT TCTTGGGATCCACGCTTTCAGCTGC

* 이중/삼중-플루언시체는 주형으로서 R120G를 사용하여 생성되었다.
** 이중/삼중-플루언시체는 주형으로서 Q148G를 사용하여 생성되었다.

[0027]

[0028]

[0029]

IL-1 β 융합 단백질의 생성.

HEK293T 세포에서 IL-1 β 융합 단백질을 생성하였다. 소규모 생성을 위해, HEK293T 세포를 10%의 FCS가 보충된 DMEM에 400000개 세포/웰로 6웰 플레이트로 파종하였다. 24시간 후, 배양 배지를 감소된 혈청을 갖는 배지(DMEM/5%의 FCS)로 대체하고, 선형 PEL을 사용하여 세포를 형질주입시켰다. 간단히 말하면, PEI 형질주입 혼합물을 160 μ l의 DMEM 중에 1 μ g의 발현 벡터를 5 μ g의 PEI와 조합함으로써 준비하고, 실온에서 10분 동안 항온처리하고, 웰에 점적하였다. 24시간 후, 형질주입된 세포를 DMEM으로 세척하고, 단백질 생성을 위해 1.5ml의 옵티메(OptiMem)/웰로 레이어링하였다. 순화 배지를 48시간 후 되찾고(recuperating), 0.45 μ 필터를 통해 여과시키고, -20 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 순화 배지에서의 IL-1 β 함량을 제조업자의 지시(알앤디 시스템즈(R&D Systems))에 따라 Elisa에 의해 결정하였다.

[0030]

NF- κ B 리포터 유전자 검정.

[0031]

IL-1R 활성화를 평가하기 위해, 본 발명자들은 IL-1R을 안정하게 발현하는 HEK-블루(Blue)(상표명) IL-1 β 세포(인비보젠(Invivogen))를 사용하였고, 이것을 NF- κ B 루시페라제 리포터 유전자에 의해 일시적으로 형질주입시켰다. 간단히 말하면, HEK-블루(상표명) IL-1 β 세포를 96웰 플레이트(10000개 세포/웰) 내 배양 배지(DMEM/10%의 FCS)에 파종하고, 표시된 양의 발현 플라스미드 및 5ng/웰의 3 κ B-Luc 리포터 유전자 플라스미드에 의해 인산칼슘 침강 방법을 이용하여 다음날 형질주입시켰다(Vanden Berghe et al., 1998). 형질주입 24시간 후, 배양 배지를 기아 배지(DMEM)로 대체하고, 형질주입 48시간 후, 융합 단백질에 의해 6시간 동안 세포를 유도하였다. 유도 후, 세포를 용해시키고, 베르톨드 센트로 LB960 발광측정기(Berthold centra LB960 luminometer)에서 프로메가(Promega) 반딧불이 루시페라제 검정 시스템을 사용하여 용해물 중의 루시페라제 활성을 결정하였다.

[0032]

공초점 현미경검사를 통한 NF- κ B 핵 전좌의 분석.

- [0033] 공초점 영상화를 위해, 폴리-L-라이신(시그마(Sigma))으로 코팅된 유리 커버슬립(자이스(Zeiss))에서 (6웰 플레이트에서) 10^5 개의 HEK293-T 세포/웰을 파종하였다. 다음날, 인간칼슘 침강 방법을 이용하여 세포를 200ng/웰의 빈 벡터 또는 HER2 Δ cyt 발현 플라스미드로 형질주입시켰다. 48시간 후, 세포를 비히클(배지) 또는 IL1-Her2 나노바디 융합 단백질(10ng/ml)로 30분 동안 처리하였다. 다음에, 세포를 1xPBS로 세정하고, 4% 파라폼알데하이드 중에 실온에서 15분 동안 고정하였다. 1xPBS로 3회 세척 후, 세포를 1xPBS 중에 10분 동안 0.1% 트리톤(Triton) X-100으로 투과시키고, 실온에서 또 다른 10분 동안 1xPBS 중의 1% BSA 중에 차단하였다. 이후, 샘플을 래빗 항-p65 항체(산타 크루즈(Santa Cruz) C20, 1:800 희석) 및 마우스 항-플래그(anti-Flag) 항체(시그마 M2, 1:2000)와 37℃에서 1시간 동안 항온처리하였다. 1xPBS 중에 4회 세척 후, 세포를 실온에서 항-래빗 알렉사(Alexa) 488 및 항-마우스 알렉사 594 형광색소-접합 2차 항체(둘 다 1:800 희석)와 1시간 동안 항온처리하였다. 2차 항체 항온처리 후, 세포를 1xPBS 중에 4회 세척하고, 핵을 DAPI(2 μ g/ml)로 염색하였다. 1xPBS 중의 최종 세척 단계 후, 프로필 갈레이트를 사용하여 커버슬립을 탑재하였다. 올림푸스(Olympus) IX-81 레이저 스캐닝 공초점 현미경에서 60x 1.35 NA 대물렌즈를 사용하여 이미지를 획득하고, 플루오뷰(Fluoview) 1000 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [0034] **실시예 1: IL-1 β -리간드 및 IL-1 β -나노바디 융합 단백질.**
- [0035] 도 1은 표 1에 기재된 야생형 hIL-1 β 또는 hIL1 β 돌연변이체에 의해 작제된 IL-1 β -나노바디 융합 단백질의 도표를 보여준다.
- [0036] **실시예 2: 선택된 돌연변이체 IL-1 β -나노바디 융합체의 IL-1 β 활성은 Nb 표적을 발현하는 세포에서 회복된다.**
- [0037] 야생형 IL-1 β 및 45 IL-1 β 돌연변이체(표 1)를 훌륭히 규명된 나노바디 인식 Her2에 융합하였다(1R59B). NF- κ B 리포터 유전자 플라스미드(5ng/웰) 및 Her2 Δ cyt(신호전달 결핍) 발현 플라스미드(2ng/웰)로 일시적으로 형질주입된 HEK-블루(상표명) IL-1 β 세포에서 IL-1 β -나노바디 융합 단백질을 시험하였다. 세포를 IL-1 β -Her2 나노바디 융합체에 의해 6시간 동안 처리하였다(용량 반응은 0.4 내지 250ng/ml의 범위임). 도 2a에서 입증된 것처럼, IL-1 β -Q148G-Her2 나노바디 융합체는 야생형 IL-1 β -Her2 나노바디 융합체와 비교하여 NF- κ B를 활성화하는 능력의 감소를 나타냈다. 중요하게는, Her2 Δ cyt-발현 세포에 대한 Q148G 돌연변이체의 표적화는 이의 활성을 회복하고, 모의 형질주입된 세포에서 야생형 IL-1 β 와 완벽하게 유사한 NF- κ B 활성화에 대한 용량-반응 곡선을 생성하였다. 야생형 IL-1 β Her2 나노바디 융합체에 대한 강한 표적화 효과가 이 도면으로부터 또한 명확하다. Her2 나노바디에 융합된 6개의 다른 IL-1 β 돌연변이체(R120G, Q131G, H146A, H145A/L147A, F162A/Q164E 및 K208E)에 대해 유사한 "표적화에 의한 활성화" 효과가 관찰되었다(도 2b).
- [0038] "표적화에 의한 활성화" 개념에 대한 추가의 증거를 얻기 위해, 본 발명자들은 다음에 본 발명자들이 공초점 현미경검사를 통해 IL-1 β -Her2 나노바디 융합체에 의해 Her2 발현 세포에서 NF- κ B의 선택적 활성화를 가시화할 수 있는지를 조사하였다. 본 발명자들은 핵 전좌를 평가함으로써 내인성 NF- κ B의 활성화를 측정하였다. 도 3으로부터 명확한 것처럼, 야생형 IL-1 β -Her2 나노바디 융합체만이 Her2를 발현하지 않는 세포에서 내인성 NF- κ B의 전좌를 촉진하였다. 이것이 모의 형질주입된 세포에서 검출 가능한 NF- κ B 전좌를 촉진하지 않았지만, 3개의 시험된 돌연변이체 IL1- β -Her2 나노바디 융합체가 Her2에 대해 또한 양성 염색된 세포에서 NF- κ B 핵 전좌를 촉발하였고, 이는 이것이 표적화된 세포에서 오직 작용한다는 것을 나타낸다.
- [0039] "표적화에 의한 활성화" 개념이 비연관 막 단백질에 대한 나노바디를 사용하여 또한 작용하는지를 평가하기 위해, 본 발명자들은 야생형 IL-1 β 및 손상된(disabled) IL-1 β 돌연변이체 중 5개(R120G, Q131G, H146A, Q148G, K209A)를 mLR을 인식하는 이전에 규명된 나노바디(4-10)에 융합하였다. mLR 발현 플라스미드(10ng/웰)로 일시적으로 형질주입된 HEK-블루(상표명) IL-1 β 세포를 사용하여 IL-1 β -Her2 나노바디 융합체에 대해 보고된 것과 유사한 실험(도 2)을 수행하였다. Her2 나노바디 융합 단백질에 의해 얻은 결과와 유사하게, (12.5ng/ml에서 시험된) 모든 조사된 돌연변이체 IL-1 β 나노바디 융합체는, 야생형 융합체와 비교하여, mLR을 발현하지 않는 세포에서 NF- κ B를 활성화하는 능력의 감소를 나타냈다. 그러나, mLR 나노바디 모이어티에 의한 표적화는 선택된 돌연변이체의 활성을 부분적으로 회복하였다(도 4).
- [0040] 상기 기재된 IL-1 β 돌연변이체가 상당한 남은 생물학적 활성을 보유하므로, 본 발명자들은 감소된 기본 활성을 갖는 이중/삼중 돌연변이체를 얻기 위해 상이한 돌연변이를 조합하였다. 9개의 이중/삼중 돌연변이체를 시험하였고(비고, 표 1 돌연변이체 46 내지 54) 및 이들로부터, 6개의 돌연변이체 단백질(Q131G/Q148G, Q148G/K208E, R120G/Q131G, R120G/Q131G, R120G/H146A, R120G/K208E, R120G/F162A/Q164E)은 Her2-음성 세포에서 (도 2에서처럼 NF- κ B를 측정하기 위한 동일한 검정을 이용하여) 남은 활성을 나타내지 않았지만, Her2 Δ cyt를 과발현하는

세포에서 부분적으로 회복된 활성이 명확하였다(도 5).

- [0041] 이 데이터는 종합하여, 부분적으로 불활성인 돌연변이체 IL-1 β 를 세포 표면 수용체를 인식하는 나노바디에 융합함으로써, 이것을 표적화하는 것이, 아마도 막 집중 효과를 통한 강제된 수용체 상호작용에 의해, 나노바디 표적 세포에서 이의 활성을 회복시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 표적화에 의한 활성화가 상이한 유형의 막 단백질질을 인식하는 나노바디를 사용하여 성취될 수 있다는 사실은 "표적화에 의한 활성화" 개념의 광범위한 이용성을 나타낸다.
- [0042] 이 데이터는 선택된 세포 유형에 대해 돌연변이체 IL-1 패밀리 구성원을 표적화하여, 이 표적 세포 단독에 대한 이의 활성을 회복하는 능력에 대한 개념의 증거를 제공하므로, 생리학적으로 관련된 IL-1 β 표적 세포에 대한 IL-1 패밀리 구성원의 표적화를 허용하는 나노바디가 생성된다. T 세포 및 NK 세포 활성화제로서의 IL-1 패밀리 구성원의 중요한 역할의 관점에서, 나노바디는 IL-1을 T 세포 및 NK 세포 부분집합에 특이적으로 표적화하도록 설계된다. 더 구체적으로, Th17 세포에서 주로 발현된 CCR6을 표적화하는 나노바디 및 세포독성 T 세포에서 CD8을 표적화하는 나노바디를 개발하고, IL1-패밀리의 구성원, 바람직하게는 IL-1 β 에 융합하였다.
- [0043] **실시예 3: 1차 인간 T 세포에 의한 IL-17 생성에 대한 IL-1 β -나노바디 융합체의 효과.**
- [0044] 버피(buffy) 코트로부터 1차 인간 T 세포를 분리하였다. 처음에, PBMC를 림포프리프(lymphoprep) 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하고, 회수를 위해 0.5ng/ml rhIL-2와 O/N 항온처리하였다. 다음에, 제조업자의 지시에 따라 pan-T 세포 분리 키트(밀테위 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 사용하여 T 세포를 분리하였다. 간단히 말하면, 10%의 FCS 및 CD3/CD28 활성화 마이크로비드(밀테위 바이오텍)가 보충된 RPMI-1640 중에 T 세포를 재현탁시켰다 (1x10⁶/ml). 다음에, 세포(100 μ l/웰)를 U 바닥 96웰 플레이트에서 도말하고, 표시된 농도의 IL-1 β 돌연변이체에 의해 96시간 동안 자극하였다. (둘 다 100nM에서의) PMA/이오노마이신에 의한 추가의 6시간 자극 후, 상청액을 회수하고, Elisa(알앤디 시스템즈)에 의해 IL-17 수준을 결정하였다. 루미넥스(Luminex) 기술을 통해 추가의 사이토카인을 평가하였다.
- [0045] (예를 들어, CCR6을 표적화하는 나노바디와의) 선택된 돌연변이체 IL-1 β -나노바디 융합체에 대해, 유세포계수 접근법을 이용하여 세포내 염색에 의해 표적 세포-특이적 IL-17 및 IFN γ 생성을 평가하였다.
- [0046] 또한, Th17 집단에 대한 선택도를 확증하기 위해, 플래그 태그 및 선택된 CD 마커를 사용한 이중 염색, 이어서 유세포계수 분석을 통해 PBMC 하위집단에 대한 결합을 측정하였다.
- [0047] 마지막으로, 인간 Th17 세포 기능의 임상적으로 관련된 실험실내 모델에서, IL-1 β -나노바디 융합체의 아췌번트 활성을 평가하였다. 보르테텔라 페르투스시에 대한 더 효과적인 백신(또는 기존의 백신에 대한 아췌번트)에 대한 수요의 관점에서, 본 발명자들은 비. 페르투스시 처리된 단핵구 유도 수지상 세포(monocyte-derived dendritic cell: MDDC)에 의한 나이브 T 세포의 공동배양 모델에서 선택된 융합 단백질이 인간 Th17 반응을 증대시키는지를 결정하였다. 인간 MDDC를 (단핵구 분리 키트 II(밀테위 바이오텍)를 사용하여) 버피 코트로부터 분리하고, 상이한 비율의 비. 페르투스시에 의해 48시간 동안 처리하고, 이후 나이브 동종이제 T 세포와 12일 동안 공동배양하였다. 항-CD3/항-CD28에 의한 재자극 후, Elisa/루미넥스 기술(상기 참조)을 이용하여 상청액 중의 사이토카인 프로필을 결정하였다.
- [0048] **실시예 4: CTL에서의 IL-1 β -나노바디 융합체의 효과**
- [0049] IL-1 β -CD8 나노바디 융합체가 CD8+ T 세포의 기능을 특이적으로 증대시킬 수 있는지를 평가하기 위해, 인간 PBMC를 버피 코트로부터 림포프리프 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하고, 야생형 또는 돌연변이체 IL1 β -CD8 Nb 융합체와 조합하여 CD3/CD28 활성화 마이크로비드(밀테위 바이오텍)에 의해 24시간 동안 자극하였다. 활성화(인산화) NF- κ B 및 IFN γ 에 대한 세포내 염색을 수행함으로써 CD8+ T 세포 활성화에 대한 이 융합 단백질의 효과를 평가하였다. 또한, IL-1 β -나노바디 융합체가 CTL 탈과립화에 영향을 미치는지를 조사하기 위해, PBMC(2x10⁶ 개 세포/ml)를 증가하는 용량의 IL-1 β 융합 단백질과 조합하여 피토헤마글루티닌(PHA, 1 μ g/ml) 및 IL-2(100 IU/ml)의 존재 하에 48시간 동안 분화시켰다. 다음에, 탈과립화를 유도하기 위해, 세포를 CD3/CD28 다이나비드(dynabead)에 의해 3시간 동안 자극하고, 유세포계수법에 의해 분석하였다. 자연 살해 활성에 대해 훌륭히 확립된 마커인 세포 표면 CD107a의 검출을 통해 탈과립화를 측정하였다. 백혈구 풀(pool)에서의 모든 유세포계수 분석에서, IL-1 β -CD8 Nb 효과의 세포 유형 특이성의 모니터링을 허용하도록 항-CD8 염색이 포함되었다.
- [0050] 마지막으로, IL-1 β -CD8 나노바디 융합체가 생체내 항종양 활성을 촉진하는지를 평가하기 위해, C57BL/6 마우스에 HPV16으로부터 E6 및 E7 항원 종양단백질을 생성하는 TC1 종양 세포로 동시에 주입하였다. IL-1 β 가 CD8+ T

세포 매개, 항원 특이적, 항종양 반응을 촉진한다는 것을 입증하도록 이 모델을 이전에 이용하였다(Ben-Sasson, 2013). 간단히 말하면, DOTAP 및 LPS와 조합되고, 야생형 또는 돌연변이체 IL-1 β -CD8 Nb 융합체 또는 IL-1 β -GFP Nb 융합체를 갖거나 갖지 않는, HPV16E 7₄₉₋₅₇ 펩타이드를 함유하는 백신에 의한 종양 주사 5일 후에 마우스를 면역화하였다. 면역화 후 18일 동안 종양 크기를 모니터링하였다.

[0051] **실시예 5: 생체내 실험 - 백신 아췌번트 효과**

[0052] 처음의 일련의 실험에서 C57BL/6 마우스를 상이한 용량의 야생형 및 돌연변이체 IL-1 β -나노바디 융합체 및 비융합된 IL-1 β 에 의해 iv/ip 처리하여, 급성 독성을 모니터링하였다. 정맥혈을 꼬리 천자에 의한 처리 후 상이한 시간에 수집하고, 루미넥스 검정에 의해 혈청 중의 사이토카인 프로파일을 결정하였다. 또한, 유세포계수 분석을 통해 세포내 사이토카인 수준(IL-17, IFN γ) 및 (포스포-NF- κ B 수준을 측정함으로써 평가된) IL-1R의 활성화를 선택된 백혈구 부분집합에서 결정하였다.

[0053] 최적 용량이 확립되었을 때, 이의 아췌번트 활성을 젓과 백신접종 프로토콜에서 평가하였다. 간단히 말하면, C57BL/6 마우스를 무세포 페르투스스 백신(Pa)에 의해 ip 면역화하였다. Pa 백신은 5 μ g/마우스의 정제된 재조합 해독된 페르투스스 독소(PT9K/129G) + 섬질 헤마글루티닌(filamentous hemagglutinin: FHA)(문헌[Brereton et al., 2011]에 따른 조성)으로 이루어진다. 면역화 24시간 후, 선택된 돌연변이체 IL1 β -Nb 또는 PBS를 ip 또는 iv 투여하였다. 동물을 28일 후 부스팅하였다. 제2 면역화 후 14일에 일 세트의 동물을 희생시키고, 비장세포를 분리하고, 배지 또는 FHA에 의해 3일 동안 실험실내 재자극하였다. 루미넥스 기술을 통해 배양 상청액 중의 사이토카인 수준(IL-17, IFN γ , IL-2, IL-10, IL-5, IL-4 등)을 결정하였다. 제2 세트의 마우스를 부스팅 14일 후에 비. 페르투스스에 의해 시험접종하고, 시험접종 2시간 및 5일 및 10일 후 희생시켰다. 폐를 분리하고, 폐 균질액에서의 CFU는 보르데-장구(Bordet-Gengou) 한천 플레이트에서 정량화될 것이다. 폐 균질액에서의 사이토카인 수준을 비장세포 상청액에서와 같이 결정하였다.

[0054] 또한, 면역화 전에 및 이후 14일마다 혈청 중의 비. 페르투스스 특이적 IgG 수준의 결정을 위해 혈액을 (꼬리 정맥으로부터) 샘플링하였다.

[0055] **실시예 6: IL-1 β -나노바디 융합체의 직접적인 항종양 효과**

[0056] 선택된 IL1-나노바디 융합체의 직접적인 항종양 활성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 IL-1 유도된 세포분열억제 효과에 매우 민감한 것으로 밝혀진 인간 A375 흑색종 세포를 이용하였다(Morinaga et al., 1990). A375 세포에 대한 돌연변이체 IL-1 패밀리 구성원의 표적화를 허용하기 위해, 고친화도 나노바디가 이미 이용 가능한 세포 표면 마커(즉, CD20)를 발현하는 안정한 A375 클론을 생성하였다. 모 A375 세포와 비교하여, 돌연변이체 IL1-나노바디 융합체의 항증식성 효과에 대한 이 세포주의 감수성을 XTT 증식 검정을 이용하여 실험실내 조사하였다. A375 이종 장기 이식 모델을 이용하여 돌연변이체 IL-1-나노바디 융합체의 생체내 항종양 활성을 조사하였다. 간단히 말하면, 무흉선 마우스를 (모 또는 표적화를 위해 표면 마커를 발현하는) A375 세포에 의해 동시에 접종하고, PBS 또는 돌연변이체 IL1-나노바디 융합체로 처리된 동물에서 4주 동안 종양 성장을 모니터링하였다.

[0057] **실시예 7: IL18에 대한 원칙의 연장: 종양 모델에서의 적용**

[0058] IL1 패밀리 구성원의 간접적인 항종양 활성을 평가하기 위해, IL-18의 항종양 활성을 입증하기 위해 이전에 사용된 프로토콜(Micallef et al., 1997)에 따라 Meth A 동계이식 마우스 육종 모델을 이용하여 선택된 돌연변이체 IL-18-나노바디 융합체의 효율을 해결하기 위해 실험을 수행하였다. 이 실험에 사용된 IL18 변이체는 종양억제 특성을 갖는 면역 세포(즉, CTL, NK 세포)를 표적화하는 나노바디에 융합된 돌연변이체 IL-18로 이루어진다. 마우스를 작제물로 처리하고, 모의 처리된 대조군과 비교할 때 상당한 종양 감소가 주목된다.

[0059]

참조문헌

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Brereton CF, Sutton CE, Ross PJ, 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.* 2011 May 15;186(10):5896-906.

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

Dinareello 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.

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.

[0060]

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 Dec 1;177(11):7980-9.

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.

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.

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.

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

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.

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

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.

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.

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

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.

[0061]

Rangnekar VV, 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.

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

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

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.

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.

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

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.

Stump, M.T., Binz, H.K., Amstutz, P. (2008) DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug iscov. Today* 13, 695-701.

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.

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.

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.

[0062]

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.

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.

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.

Wigginton JM, Lee JK, Wiltout TA, Alvord WG, Hixon JA, Subleski J, Back TC, Wiltout 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.

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

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.

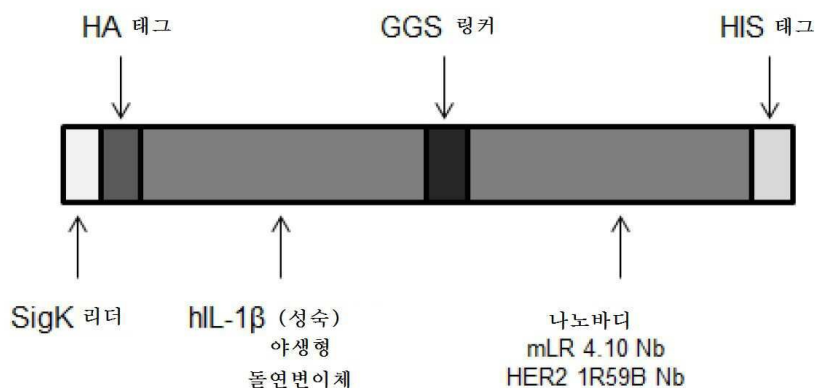
Zabeau L, Verhee A, Catteeuw D, Faes L, Seeuws S, Decruy T, Elewaut D, Peelman F, Tavernier J. (2012). Selection of non-competitive leptin antagonists using a random nanobody-based approach. Biochem J. 441:425-34.

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.

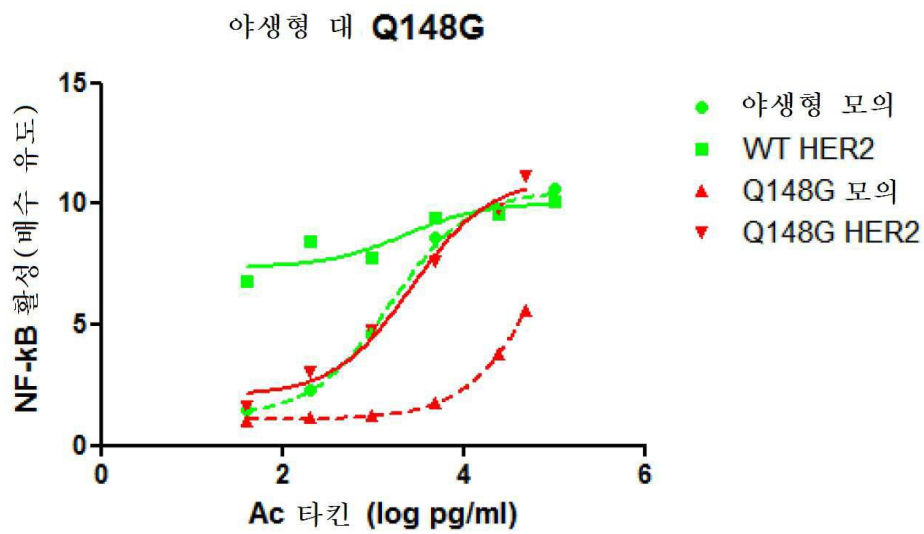
[0063]

도면

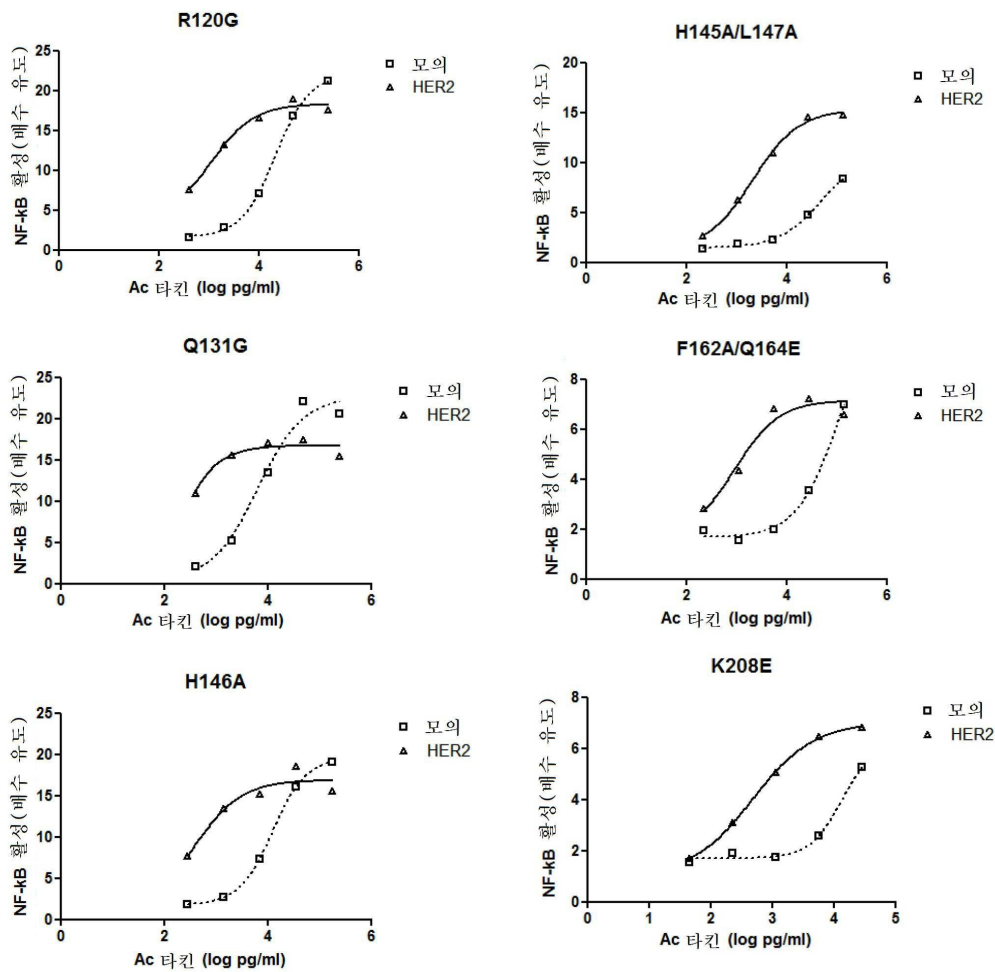
도면1



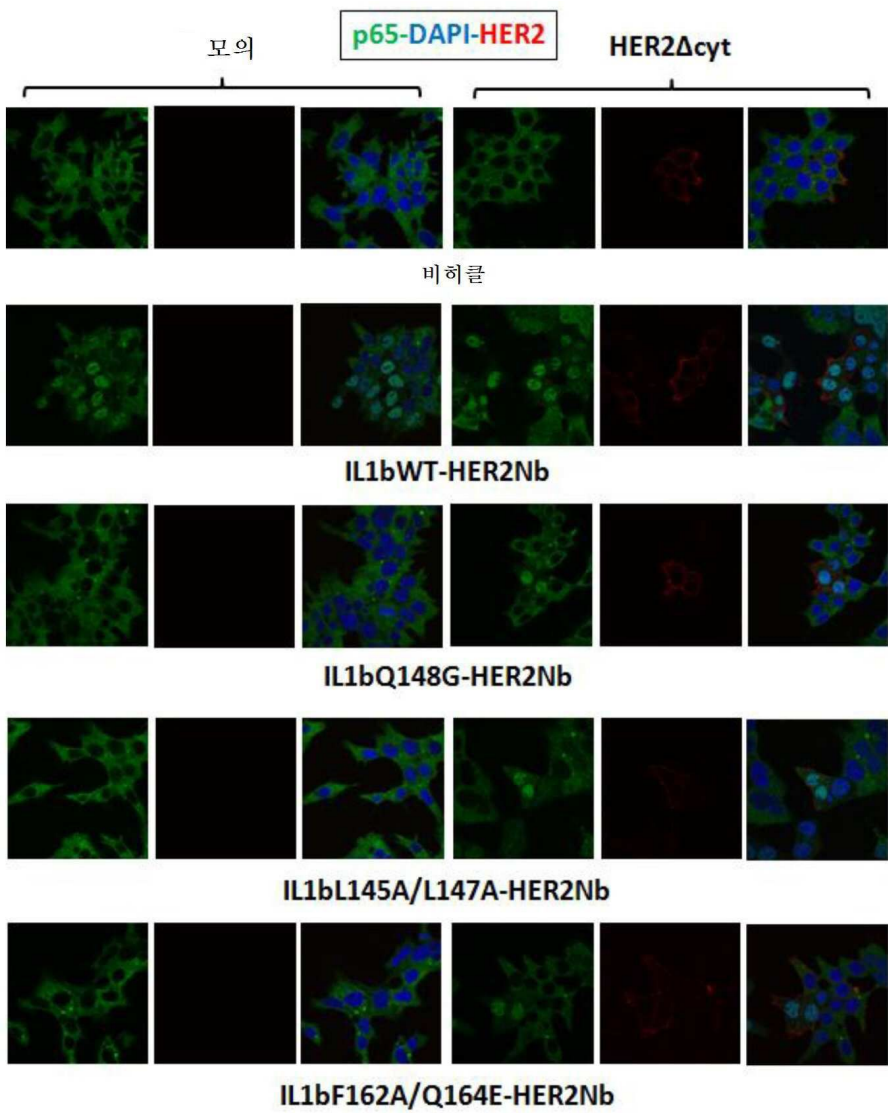
도면2a



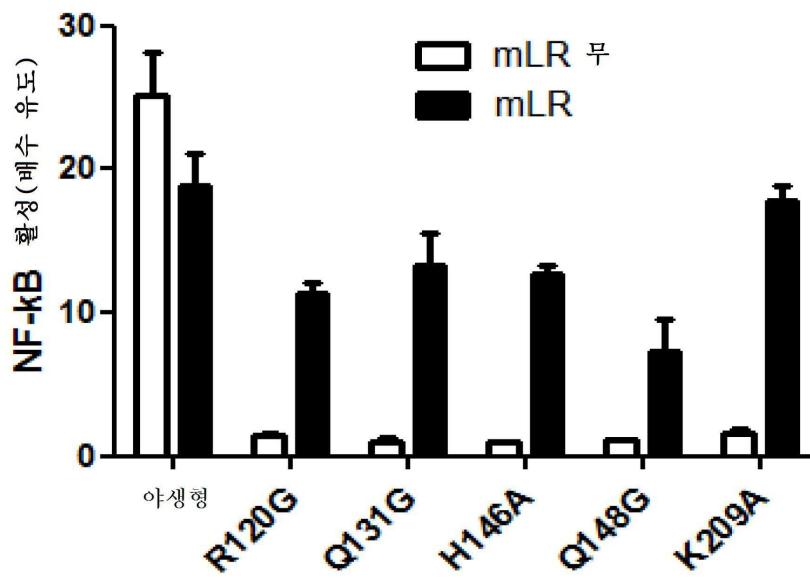
도면2b



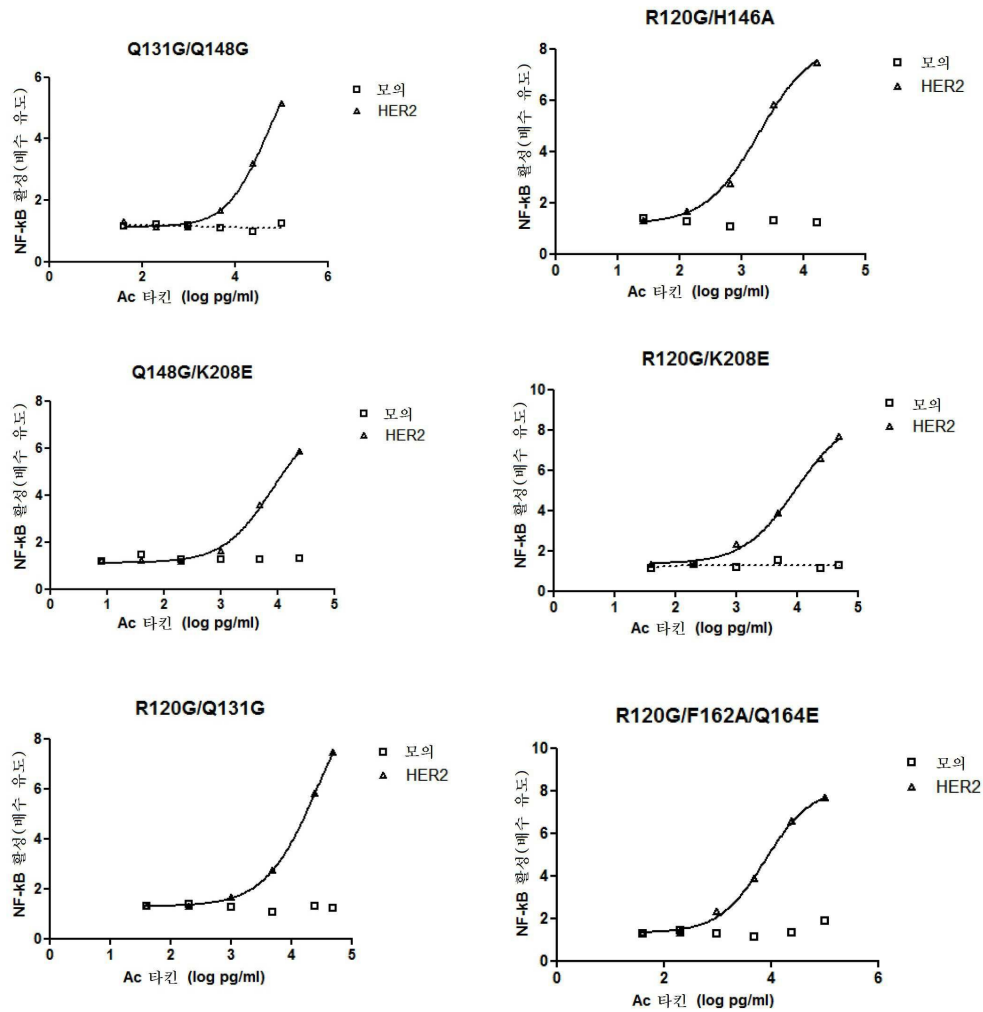
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> VIB VZW

UNIVERSITEIT GENT

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MONTPELLIER 2

CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER

<120> TARGETED MODIFIED IL-1 FAMILY MEMBERS

<130> WO2015/007542

<140> PCT/EP2014/064283

<141> 2014-07-04

<150> EP 13306047.5

<151> 2013-07-19

<160> 108

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

ccgactacgc tggcggcagt gacggtgtca gaagcctgaa ctgc 44

<210> 2

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

ctggcggcag cgccccctgc gctagcctga actgcacct gcg 43

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc 39

<210> 4

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

cgctggcggc agtgcccctg tcagaagcgc gaactgcacc ctgcgggaca gc 52

<210> 5

<211> 52

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5
 cgccctgtc agaagcctga actgcggcgg ccgggacagc cagcagaaaa gc 52
 <210> 6
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 agaagcctga actgcacact gggggacagc cagcagaaaa gcctggtc 48
 <210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 ccctgcggga cagcgcgcag aaaagcctgg 30
 <210> 8
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 8
 ctgcaccctg cgggacagct ggcagaaaag cctggtcatg agc 43
 <210> 9
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 9
 ctgcgggaca gccaggggaa gagcctggtc atgagcg 37
 <210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

gcacctgcg ggacagccag caggctagcc tggcatgag cggcc 45

<210> 11

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

cagcagaaaa gcctgggtcat ggggtacccc tacgagctga aggcactgc 49

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

gcccctacga gctgaaggca ggtcatctgc agggccagga catgg 45

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Primer

<400> 13

cgagctgaag gcactggctc ttcagggcca ggacatgg 38

<210> 14

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 14

cctacgagct gaaggcactg ggtctgcagg gccaggacat gg 42

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 15

gctgaaggca ctggagctgc agggccagg 29

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

agctgaaggc actgaatctg cagggccag 29

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 17

ctgaaggcac tgcgtctgca gggccag 27

<210> 18

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 18

gcggccccta cgagctgaag gcagcgcatt gcagggcca ggacatgg 48

<210> 19

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 19
 ggcaactgcat ctggagggcc aggacat 27
 <210> 20
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 20
 gaaggcactg catctgggtg gccaggacat ggaacagc 38
 <210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 21
 gcactgcatc tgctgggccca ggacatg 27
 <210> 22
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 22
 cgagctgaag gcactgcatc tggggggcgg ggacatggaa cagcagg 47
 <210> 23
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 23
 gcactgcatc tgcagggcgg ggccatggaa cagcaggtcg tgttcagc 48
 <210> 24
 <211> 54
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 24

gcactgcatc tgcagggcca ggacggggaa cagcaggtgg tgttcagcat gagg 54

<210> 25

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 25

catggaacag caggtggtgt tcagcatgag cgccgtgcag ggcgaggaaa gcaacgac 58

<210> 26

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 26

gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga ggcgaggaaa agcaatgaca agatcc 56

<210> 27

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 27

ccgacttcac catgcaggcc gtctccagcg gcggcagcag atctgg 46

<210> 28

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 28

gcatgagctt cgtggggggc aaggaaagca atgacaagat ccccgtagcc 50

<210> 29

<211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 29
 gcaggcgag gaaagcgcg gcaagatccc cgtggcccta ggcctgaaag agaag 55
 <210> 30
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 30
 gaaagcaacg acaaggcccc cgtggccctg gg 32
 <210> 31
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 31
 gcaacgacaa gatccccgcg gccctgggcc tgaaag 36
 <210> 32
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 32
 gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc 55
 <210> 33
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 33
 cccaagaac tacccaagg caaagatgga aaagcgttc gtgttcaac 49

<210> 34

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 34

gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta cccaaggac aagatggaaa aacgc 55

<210> 35

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 35

ccccaagaac tacccaagg cagcgaatga aaaacgcttc gtgttc 46

<210> 36

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 36

aaaaacgctt cgtgttcaac agcatcgaga tcaacaacaa gctc 44

<210> 37

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 37

aaaaacgctt cgtgttcaac cagatcgaga tcaacaacaa g 41

<210> 38

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 38
gcttcgtgtt caacaagatc tcgatcaaca acaagctcga gt 42

<210> 39
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
<400> 39
cttcgtgttc aacaagatca agatcaacaa caagctcga 39

<210> 40
<211> 53
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
<400> 40
ggaaaaacgc ttctgtttca acagcatctc gatcaacaac aagctcgagt tcg 53

<210> 41
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
<400> 41
cgcttcgtgt tcaacaagat ctgatcaac gccaaagctcg agttcgag 48

<210> 42
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
<400> 42
caacaagatc gagatcaaca gcagcctcga attcgagagc gcccg 46

<210> 43
<211> 50
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 43

ccccaactgg tacatcagta ctagtcaggc caagaatatg cccgtgttcc 50

<210> 44

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 44

cagcactagt caggccgagc agatgcccgt cttcctgggc ggcacc 46

<210> 45

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 45

catcagcact agtcaggcca agcagatgcc cgtcttcctg ggcggcacc 49

<210> 46

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 46

gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc 39

<210> 47

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 47

cgagctgaag gcactggctc ttcaggcca ggacatgg 38

<210> 48

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 48

gcggccccta cgagctgaag gcagcgcattg cgcagggccca ggacatgg 48

<210> 49

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 49

gcggcagcgc ccctgtcgga agcttgaact gcaccctgc 39

<210> 50

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 50

gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga ggcgcaggaa agcaatgaca agatcc 56

<210> 51

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 51

gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc 55

<210> 52

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 52

ctgcgggaca gccaggggaa gagcctggtc atgagcg	37
<210> 53	
<211> 56	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 53	
gcaggtcgtg ttcagcatga gcgccgtgga gggcgaggaa agcaatgaca agatcc	56
<210> 54	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 54	
gcagctggaa agcgtggatc ccaagaacta ccccgagaaa aagatggaaa aacgc	55
<210> 55	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 55	
gcagttcagg cttctgacac cgtcactgcc gccagcgtag tcgg	44
<210> 56	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 56	
cgcagggtgc agttcaggct agcgacaggg gcgctgccgc cag	43
<210> 57	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	

<400> 57
gcagggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc 39

<210> 58
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
<400> 58
gtgtgccgc aggtgagct tcgcgttct gacaggggca ctgccgccag cg 52
<210> 59
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 59
gctttttgc tggtgtccc ggccgccga gttcagctt ctgacagggg cg 52
<210> 60
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 60
gaccagctt ttctgtggc tgteccccag tgtgcagttc aggtttct 48
<210> 61
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
<400> 61
ccaggtttt ctgcgcgtg tccgcaggg 30
<210> 62
<211> 43
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 62

gctcatgacc aggttttct gccagctgtc ccgcagggtg cag 43

<210> 63

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 63

cgctcatgac caggctcttc ccctggctgt cccgcag 37

<210> 64

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 64

ggccgctcat gaccaggcta gcctgctggc tgtcccgcag ggtgc 45

<210> 65

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 65

gcagtgcctt cagctcgtag gggtagccca tgaccaggt tttctgctg 49

<210> 66

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 66

ccatgtcctg gccctgcaga tgacctgcct tcagctcgta ggggc 45

<210> 67

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 67

ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg 38

<210> 68

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 68

ccatgtcctg gccctgcaga cccagtgcct tcagctcgta gg 42

<210> 69

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 69

cctggccctg cagctccagt gccttcagc 29

<210> 70

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 70

ctggccctgc agattcagtg ccttcagct 29

<210> 71

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 71

ctggccctgc agacgcagtg ccttcag 27

<210> 72
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 72
 ccatgtcctg gccctgcgca tgcgctgcct tcagctcgta ggggccgc 48
 <210> 73
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 73
 atgtcctggc cctccagatg cagtgcc 27
 <210> 74
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 74
 gctgttccat gtctggcca cccagatgca gtgccttc 38
 <210> 75
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 75
 catgtcctgg cccagcagat gcagtgc 27
 <210> 76
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer

<400> 76
cctgctgttc catgtcccg ccccccagat gcagtgcctt cagctcg 47
<210> 77
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 77
gtggaacacg acctgctgtt ccatggcccc gccctgcaga tgcagtgc 48
<210> 78
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 78
gtctatgtg aacaccacct gctgttcccc gtccctggccc tgcagatgca gtgc 54
<210> 79
<211> 58
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 79
gtcgttgctt tctcgcctt gcacggcgct catgtgaac accacctgct gttccatg 58
<210> 80
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 80
ggatcttgtc attgctttcc tcgcctcca cggcgctcat gctgaacacg acctgc 56
<210> 81
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 81

ccagatctgc tgccgccgct ggagacggcc tgcattgtga agtcgg 46

<210> 82

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 82

ggccacgggg atcttgcac tgccttcctt gccccccacg aagctcatgc 50

<210> 83

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 83

cttctctttc aggcctaggc ccacggggat cttgccgccg ctttcctcgc cctgc 55

<210> 84

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 84

cccagggccca cgggggcctt gtcgttgctt tc 32

<210> 85

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 85

ctttcaggcc cagggccgcg gggatcttgt cgttgc 36

<210> 86

<211> 55

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 86
 gcgtttttcc atctttttct cgggtagtt cttgggatcc acgtttcca gctgc 55
 <210> 87
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 87
 gttgaacacg aagcgctttt ccatctttgc cttgggtag ttcttgggg 49
 <210> 88
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 88
 gcgtttttcc atcttgtcct tgggtagtt cttgggatcc acgtttcca gctgc 55
 <210> 89
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 89
 gaacacgaag cgtttttcca tcgctgcctt ggggtagttc ttgggg 46
 <210> 90
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 90
 gagcttggtt ttgatctcga tgctgttgaa cacgaagcgt tttt 44
 <210> 91

<211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 91
 cttgttggtg atctcgatct gggtgaacac gaagcgttt t 41
 <210> 92
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 92
 actcgagctt gttgttgatc gagatcttgt tgaacacgaa gc 42
 <210> 93
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 93
 tcgagcttgt tgttgatctt gatcttggtg aacacgaag 39
 <210> 94
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 94
 cgaactcgag cttgttggtg atcgagatgc tgtgaagac gaagcgttt tcc 53
 <210> 95
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 95

ctcgaactcg agcttggcgt tgatcgagat cttgttgaac acgaagcg 48

<210> 96

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 96

ctgggcgctc tcgaattcga ggctgctgtt gatctcgatc ttgttg 46

<210> 97

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 97

ggaacacggg catattcttg gcctgactag tactgatgta ccagttgggg 50

<210> 98

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 98

ggtgccgccc aggaagacgg gcatctgctc ggcctgacta gtgctg 46

<210> 99

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 99

ggtgccgccc aggaagacgg gcatctgctt ggcctgacta gtgctgatg 49

<210> 100

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 100
 gcagggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc 39
 <210> 101
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 101
 ccatgtcctg gccctgaaga gccagtgcct tcagctcg 38
 <210> 102
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 102
 ccatgtcctg gccctgcgca tgcctgcct tcagctcgta ggggccgc 48
 <210> 103
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 103
 gcagggtgca gttcaagctt ccgacagggg cgctgccgc 39
 <210> 104
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 104
 ggatcttgtc attgctttcc tcgccctcca cggcgctcat gctgaacacg acctgc 56
 <210> 105
 <211> 55
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 105

gcgtttttcc atctttttct cggggtagtt cttgggatcc acgctttcca gctgc 55

<210> 106

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 106

cgctcatgac caggctcttc cctgggctgt cccgcag 37

<210> 107

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 107

ggatcttgtc attgctttcc tcgccctcca cggcgctcat gctgaacacg acctgc 56

<210> 108

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 108

gcgtttttcc atctttttct cggggtagtt cttgggatcc acgctttcca gctgc 55