



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0003719  
(43) 공개일자 2015년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/48 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7025516

(22) 출원일자(국제) 2012년03월21일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2014년09월12일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/055022

(87) 국제공개번호 WO 2013/139391

국제공개일자 2013년09월26일

(71) 출원인

프라운호퍼-게젤샤프트 추르 퍼르데룽 데어 안제  
반텐 포르숨 에 파우

독일 80686 뮌헨 한자슈트라세 27 체

레이니쉬-웨스트펠리셰 테크니셰 호크슐레 아아켄

독일 아아켄 템플레르그라벤 55 (우: 55062)

(72) 발명자

바르트 슈데판

독일 80686 뮌헨 한자슈트라세 27 체 씨오 프라운  
호퍼-게젤샤프트 추르 퍼르데룽 데어 안제반텐 포  
르숨 에 파우

우어 메메트 케말

독일 52074 아헨파우벨쉬트라세 30 씨오 유니베르  
시타츠클리니쿰 아헨

후싸인 아흐마드

독일 52074 아헨파우벨쉬트라세 30 씨오 유니베르  
시타츠클리니쿰 아헨

(74) 대리인

리앤목특허법인

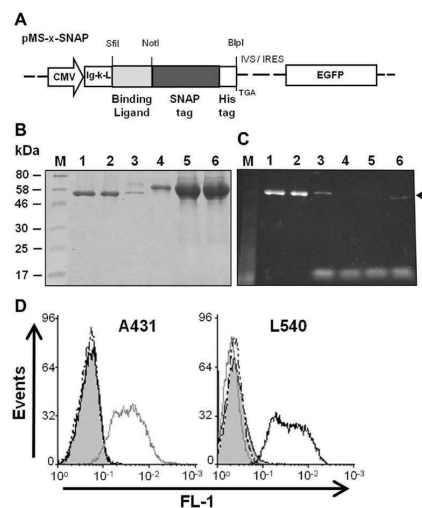
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 광역동 요법에 사용하기 위한 신규 광면역접합체

## (57) 요약

· CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로는ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합하는, · 항체 또는 그의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미토포프로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질에 · 공유적으로 연결된 광감작제를 포함하는 화합물로서, 상기 광감작제는 변형된 인간 DNA 복구 단백질, 06-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)를 통해 결합 단백질에 연결되는 것인 화합물.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로는 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합하는,
- 항체 또는 그의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미모토프로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질에
- 공유적으로 연결된 광감작제

를 포함하는 화합물로서,

상기 광감작제는 변형된 인간 DNA 복구 단백질, 06-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)를 통해 결합 단백질에 연결되어 있는 것인 화합물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 내재화(internalizing) 및 질환-특이적 세포 표면 수용체를 특이적으로 표적화하는 것인 화합물.

### 청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 티로신 키나제 성장인자수용체 결합 단백질은 scFv 항체 단편, 특히 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 서열번호 1의 scFv 항체 단편인 것인 화합물.

### 청구항 4

청구항 1 내지 3에 있어서, 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 것인 화합물.

### 청구항 5

청구항 1 내지 4에 있어서, 상기 광감작제는 06-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제의 활성 부위에 연결되는 것인 화합물.

### 청구항 6

청구항 1 내지 4에 있어서, 상기 광감작제는 포르피린, 클로로필 및 염료로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

### 청구항 7

항체 또는 그의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미모토프로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 단백질을 포함하는 화합물로서, 상기 결합 단백질은 CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합하고, 06-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)라 불리는 변형된 인간 DNA 복구 단백질에 공유적으로 연결되어 있는 것인 화합물.

### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 결합 단백질은 scFv 항체 단편, 특히 서열번호 1 및/또는 서열번호 3의 scFv 항체 단편인 것인 화합물.

### 청구항 9

특히 서열번호 2 및/또는 서열번호 4를 포함하는 청구항 7의 화합물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열.

#### 청구항 10

청구항 1의 화합물을 코딩하는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열의 폴리뉴클레오타이드.

#### 청구항 11

항체 또는 그들의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미모토프로 이루어진 군으로부터 선택된 결합 단백질과 06-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)를 융합하는 단계를 포함하는 청구항 7의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 결합 단백질은 CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합하는 단백질에 결합하는 것인 청구항 7의 화합물을 제조하는 방법.

#### 청구항 12

청구항 11에 있어서, scFv-425 DNA 서열이 N-말단 결합 리간드 (scFv-425) 및 C-말단 SNAP-태그 서열을 제공하는 진핵 발현 벡터 pMS-SNAP의 SfiI 및 NotI-절단(digested) 부위 내로 삽입되는 것인 방법.

#### 청구항 13

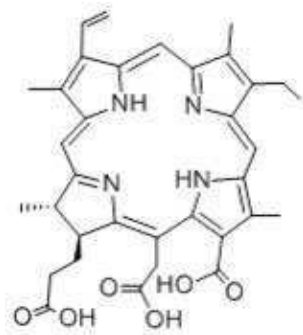
청구항 11 또는 12에 있어서, scFv-425-SNAP 융합 단백질이 인간 배아 신장 세포주, 특히 HEK-293T 세포 (ATCC: CRL-11268)에서 발현되는 것인 방법.

#### 청구항 14

청구항 11 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, scFv-425-SNAP 융합 단백질은 무세포 상등액(cell-free supernatant)으로부터 친화 크로마토그래피 특히 Ni-NTA 친화 크로마토그래피에 의해 정제되는 것인 방법.

#### 청구항 15

청구항 7의 화합물과 결합된 하기 화학식의 포르피린 유도체



#### 청구항 16

클로린 e6과 같은 포르피린 광감작제의 카르복실기가 적어도 부분적으로 활성화된 에스테르에 반응하거나 또는 커플링제에 의해 반응하고, 뒤이어 06-벤질구아닌, 02-벤질시토신 또는 조효소 A (CoA)와 반응하는, 청구항 15의 화합물의 제조 방법.

#### 청구항 17

청구항 16에 있어서, 06-벤질구아닌, 02-벤질시토신 또는 조효소 A (CoA)는 PEG-24-NH<sub>2</sub>와 같은 링커 분자에 연결되어 있고 및/또는 상기 활성화된 에스테르는 NHS와 같은 숙신이미드, 또는 EDC, EDAC 및 DCC와 같은 카르보디이미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 커플링제에 의해 형성되는 것인 방법.

#### 청구항 18

청구항 1 내지 8 중 하나 이상의 화합물 및 광면역요법과 연관된 약학적 효과를 개선시키거나 또는 가능하게 하는 약학적으로 허용가능한 아드juvant(adyuvant)를 포함하는 약제.

## 청구항 19

광면역요법에 의해 암을 치료하기 위한 청구항 1 내지 8 중 하나 이상의 화합물의 용도.

## 명세서

### 배경 기술

[0001]

광역동 요법 (Photodynamic therapy, PDT)은 암 치료를 위한 유망하고 최소로 침습적인(invasive) 접근법이다. 개선된 광감작제(photosensitizer) 및 임상 적용 프로토콜의 도입 후, 여러 FDA-승인된 PDT 약물이 이용가능하게 되었고 다른 것들은 다양한 단계의 전임상 및 임상 개발 중에 있다<sup>1</sup>. 광감작 작용제(photosensitizing agent)는 직접적인 무해한 빛에 의해, 세포독성적으로 되는 것에 의해, 또는 간접적으로 독성 자유 라디칼 또는 활성산소종 (ROS)의 인체투(in situ) 생산을 기동시키는(initiating) 것에 의해 활성화되는 경우 그것의 효과를 가할 수 있다. 이러한 과정은 세포에 손상을 초래하고, 궁극적으로 세포사멸(apoptosis) 또는 세포괴사(necrosis)에 의한 세포 죽음을 유도한다<sup>2</sup>. 세포 손상의 부위는 광감작제 종류, 인큐베이션 기간 및 전달 방식에 의존한다. 소수성 광감작제는 세포막을 손상시키는 경향이 있는 반면, 양이온성 광감작제는 미토콘드리아와 같은 막 소포(vesicle) 안에 축적되고, 국소 손상(local damage)을 유발한다<sup>3</sup>.

[0002]

PDT에서 가장 큰 도전 중 하나는 표적 특이성의 결여이다. 광감작제는 빛에 의한 활성화 후 종양 조직 뿐만 아니라 건강한 조직도 손상시키고, 이것은 장기적인 피부 광과민성(photosensitivity)을 초래할 수 있다<sup>4</sup>. PDT의 특이성을 증가시키기 위해, 광감작제는 종양-특이적 단일클론 항체 또는 단일 사슬 항체 단편 (scFv)에 접합되었고, 그 결과 종양 조직으로 광감작제를 직접적으로 전달하는 이른바 광면역접합체를 가져왔다. 이러한 접근법은 광면역요법(photoimmunotherapy, PIT)으로 알려져 있다<sup>5</sup>. 표준 커플링 반응은 항체-광감작제 접합체가 최적 화학량론 비(stoichiometric ratio)로 생산되는 것을 보장하는 믿을만한 방법이 없기 때문에 광감작제 및 항체의 접합에 부적절하다<sup>6</sup>. 또한, 광감작제의 화학적 특성 (예를 들면 소수성 및 하전된 기의 개수 및 배열)은 항체의 약동학적 특성 및 생체 내 분포(biodistribution)를 변화시켜, 최종적으로 비-특이적 결합 및 내재화(internalization) 거동을 초래할 수 있다. 또한 무작위(random) 접합은 광감작제-여기 상태의 자기-쿼칭(self-quenching)을 유도하여, 그에 따라 광역동 활성을 감소시킬 수 있다<sup>5</sup>. 그러므로 더 제어된 접합 반응이 이러한 제한을 극복하기 위해 요구된다.

[0003]

PDT의 주요 문제점 중 하나는 종양 세포 뿐만 아니라 건강한 세포도 손상시키는 경향이 있는, 활성화된 광감작제의 비-선택적 효과이다. 항체를 이용한 표적화 치료는 암 치료에 변혁을 가져왔고, 종양 세포 항원에 결합하는 여러 항체들은 블록버스터 지위를 얻었다. 치료적 항체의 효능은, 이는 선택적 전달을 달성하고, 작은 분자 약물과 전통적으로 연관된 전신 독성을 감소시키기 때문에, 추가적인 이펙터 분자(effector molecule) (예를 들면 방사성 핵종, 약물 또는 독소)<sup>7</sup>와 그들의 공유 접합에 의해 개선될 수 있다<sup>8</sup>. 동일한 원리가 광감작제에 적용될 수 있다. 이펙터 분자는 일반적으로 시스테인 잔기의 환원된 설프히드릴기 또는 라이신 결사슬 내의 아미노기를 이용하여 항체와 접합된다. 그러나, 두 방법 모두 다른 부위에 부착된 이펙터를 갖는 접합 항체의 혼합물, 및 각 항체에 부착된 다양한 개수의 이펙터를 포함하는, 이질적(heterogeneous) 산물을 생산하고, 그로 인해 다양한 몰 비(molar ration) 및 매우 상이한 약동학적, 효능 및 안전성 프로파일을 초래한다.

[0004]

Hamblett 및 동료들은<sup>9</sup> 2, 4, 및 8개의 모노메틸-아우리스타틴 E (MMAE)의 접합된 분자를 포함하는 3개의 항체 분획(fraction)을 정제하는 것에 의해 이질적 항체-약물 접합체의 독성, 약동학적 특성 및 치료적 효능을 연구해왔다. 8개의 MMAE 그룹을 갖는 분획은 다른 분획과 비교하여 열악하게 관용적이고(tolerated) 빠르게 제거되었으며, 가장 낮은 효능을 보여주었다. 이는 항체-약물 접합체를 위한 핵심(key) 디자인 변수가 항체에 부착된 약물 분자의 개수라는 것을 제안한다. 그러나, 동일한 개수의 약물 분자를 지니는 정제된 항체라도 많은 선택 가능한 부착 부위 때문에 여전히 복잡한 혼합물을 구성한다. 예를 들면, 전형적인 항체 내에는 약 40개의 라이신 잔기가 있어, 잠재적으로 일백만개 이상의 상이한 접합 항체 종을 초래한다. 유사하게, 일반적으로 약 100개의 상이한 접합 변이체를 생성시키는, 1 내지 8개의 시스테인 잔기가 있다. 항체-약물 접합체(conjugant)의 각 버전은 일반적으로 유일하고 예측할 수 없는 약동학적 프로파일(pharmacokinetic profile)을 보여준다<sup>9</sup>.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 암 세포는 무제한 빛에 노출되는 경우 독성 효과를 유도하는 광감작제에 의해 살상될 수 있으나, 이것은 또한 주변의 건강한 세포에 유의성 있는 손상을 초래한다. 광역동 요법의 특이성은 종양-연관 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 및 항체 단편에 광감작 작용제를 접합하는(conjugating) 것에 의해 증가될 수 있다. 그러나, 표준 접합 반응은 표적 특이성 및 분광 특성이 절충될(compromised) 수 있는 이중의 산물을 생산한다.

[0006] 본 발명에서, 개선된 접합 전략으로서 SNAP-태그 융합물(fusion)의 용도를 조사하기 위한 모델로서 상피 성장인자 수용체 (EGFR)에 결합한 항체 단편 (scFv-425)을 이용하였다. scFv-425-SNAP-태그 융합 단백질은 EGFR<sup>+</sup> 암 세포에 특이적으로 전달되는 균질한(homogeneous) 산물을 생산하는, O(6)-벤질구아닌로 변형된(modified) 클로린 e6와 같은, 광감작제의 특이적 접합을 허용하였고, 그 결과 유의성 있는 종양-세포-특이적 세포독성을 유발하였다. 광역동 요법의 개발에 미치는 우리의 결과의 영향을 논의한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 항체 또는 그의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미모토프(mimotope)로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 구조물(binding structure)에 공유적으로 연결되는(coupled) 광감작제를 포함하는 화합물로서, 상기 결합 구조물은 CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합하고, 상기 광감작제는 변형된(modified) 인간 DNA 복구(repair) 단백질 O6-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)를 통해 내재화(internalizing) 수용체 결합 단백질(binding protein)에 연결된(coupled) 화합물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 구체예에서 상피 성장인자 수용체 결합 단백질은 scFv 항체 단편, 특히 서열번호 2의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 서열번호 1의 scFv 항체 단편이다.

[0009] 본 발명의 다른 구체예에서 본 발명의 화합물은 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 갖는다.

[0010] 본 발명의 화합물의 또 다른 구체예에서 광감작제는 O6-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제의 활성 부위에 연결된다(coupled).

[0011] 본 발명의 화합물에서 광감작제는 광감작력(photosensitizing power)을 갖는, 포르피린, 클로로필 및 염료로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 본 발명의 대상(Subject matter)은 또한 광감작제가 없는(devoid) 화합물이다. 화합물은 항체 또는 그들의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미모토프(mimotope)로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 단백질을 포함하고, 결합 단백질은 CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합하고, O6-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)라 불리는 인간 DNA 복구 단백질에 공유적으로 연결되어 있다.

[0013] 특히 상기 결합 단백질은 scFv 항체 단편, 특히 서열번호 1 및/또는 서열번호 3의 scFv 항체 단편이다. 이 화합물은 서열번호 2 및/또는 서열번호 4의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩될 수 있다. 특정 구체예는 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합한다.

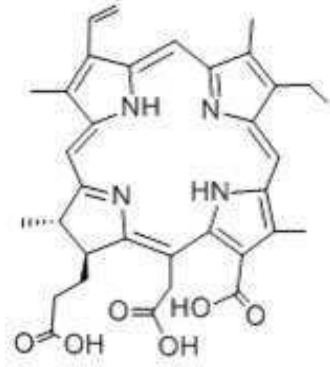
[0014] 상기 화합물의 특정 구체예는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열의 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩된다.

[0015] 본 발명의 다른 대상은 O6-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)와 항체 또는 그의 유도체 또는 그의 단편, scFv와 같은 합성 펩티드, 미모토프로 이루어진 군으로부터 선택되는 결합 단백질과 융합하는 단계를 포함하는 본 발명의 화합물을 제조하는 방법으로, 결합 단백질은 CD 항원, 사이토카인 수용체, 인터류킨 수용체, 호르몬 수용체, 성장인자 수용체, 더욱 구체적으로 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체에 결합한다. 특히, scFv-425 DNA 서열은 N-말단 결합 리간드(binding ligand) (scFv-425) 및 C-말단 SNAP-태그 서열을 제공하는 진핵 발현 벡터 pMS-SNAP의 SifI 및 NotI-절단 부위 안으로 삽입된다.

[0016] 특히, His<sub>6</sub> 태그는 또한 상기 단백질과 융합된다. 융합된 단백질은 인간 세포 특히 HEK-293T 세포 (ATCC: CRL-11268)와 같은 배아 신장 세포주에서 발현될 수 있고, 태그에 대한 친화성 레진, 예를 들면 Ni-NTA 개질 레진을

이용하여 정제될 수 있다.

[0017] 또한 본 발명의 대상은 다음 화학식의 포르피린 유도체로,



[0018]

[0019] 클로린 e6 ( $C_{34}H_{36}N_4O_6$ )

[0020] 식 중에서 클로린 e6와 같은 포르피린 광감작제의 카르복실기는 적어도 부분적으로 활성화된 에스테르에 반응하거나 또는 커플링제에 의해 반응한 다음, 뒤이어 O6-벤질구아닌, O2-벤질시토신 또는 조효소 A (CoA)에 의해 반응한다.

[0021] 본 발명의 방법에서 O6-벤질구아닌, O2-벤질시토신 또는 조효소 A (CoA)는 PEG-24-NH<sub>2</sub>와 같은 링커 분자에 연결되고(coupled) 및/또는 상기 활성화된 에스테르는 NHS와 같은 숙신이미드, 또는 EDC, EDAC 및 DCC와 같은 카르보디이미드로 이루어진 군으로부터 선택되는 커플링제에 의해 형성된다.

[0022] 본 발명의 대상은 또한 본 발명의 화합물 및 광면역요법과 연관된 약학적 효과를 개선시키거나 또는 가능하게 하는 약학적으로 허용가능한 아주반트를 포함하는 약제이다.

[0023] 본 발명은 또한 광면역요법에 의해 암을 치료하기 위한 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다.

[0024] 통상의 기술자는 용어 "포함하다(comprising)"가 본 명세서에서 기재된 대상을 넘어서는 새로운 대상의 도입 없이 "구성하다(consisting)"로 대체될 수 있음을 알고 있다.

[0025] 본 발명의 화합물의 효과는 구체적인 실시예에 의해 하기에서 설명되고, 더욱 구체적으로 기술된다. 티로신 키나제 성장인자 수용체의 ErbB 패밀리의 4개의 구성원 중 하나인, 상피 성장인자 수용체 (EGFR, erbB1, HER1)는 약 30%의 상피암(epithelial cancer)에서 과발현되고, 따라서 암 면역요법을 위한 매력적인 표적이 된다<sup>10</sup>. 재조합 항-EGFR 항체 단편 scFv-425는 암세포의 표면 상의 EGFR에 결합하고, 효율적으로 수용체 내재화를 유도한다<sup>11</sup>. scFv-425는 PIT의 특이성 및 효능을 개선하기 위한 새로운 접합 전략의 개발을 위한 모델로서 이용된다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 처음에 시각적-활성 분자로 항체의 부위-특이적 표지(labeling)를 위해 개발된, O6-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (hAGTm)라 불리는 20-kD의 변형된 인간 DNA 복구 단백질에 기반한 SNAP-태그 기술이 이용되었다<sup>11</sup>. SNAP-태그는 수용기(acceptor group) O(6)-벤질구아닌 (BG)으로 변형된 임의의 기질과 효율적인 공유적 연결(coupling)을 허용한다. SNAP-태그는 친핵성 치환 반응을 통한 활성 부위로 치환된 벤질기의 이동(transferring) 및 유리(free) 구아닌의 방출에 의해 파라-치환된 BG 유도체와 반응한다<sup>11</sup>.

[0026] 본 발명에 따라 scFv-425-SNAP-태그 융합 단백질을 설계하고 합성하였다. BG-변형된 클로린 e6 (Ce6) 광감작제를 EGFR<sup>+</sup> 암 세포로 전달하였다. 구조물은 또한 광감작제 및 단백질 사이의 거리를 증가시키도록 링커 영역 및 24 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 사슬을 포함한다. BG-변형된 Ce6는 항체의 결합 및 내재화 활성화에 해로운 영향 없이 scFv-425-SNAP-태그 융합 단백질에 특이적으로 및 공유적으로 접합되었다. Ce6은 특이적으로 4개의 EGFR<sup>+</sup> 암종 세포주 (A431, MDA-MB-231, MDA-MB-468 및 SiHa)에 전달되었고, 그 결과 유의성 있는 종양 세포-특이적 세포독성을 초래한다.

[0027] 본 발명은 또한 광감작제로서 Ce6 및 결합제로서 ErbB 패밀리의 티로신 키나제 성장인자 수용체를 이용하여 더욱 구체적으로 예시적 기술된다.



## 도면의 간단한 설명

[0028]

도 1: SNAP-태그 융합 단백질의 구축, 발현 및 결합. (a) 재조합 SNAP-태그 융합 단백질을 위한 바이시스트로닉(bicistronic) 진핵 발현 카세트의 모식도. pMS-scFv-425-SNAP 벡터는 CMV 프로모터의 전사조절(transcriptional control) 하에 있고, SNAP-태그에 인-프레임(in-frame) 연결된 결합 리간드(scFv-425)를 코딩한다. 번역글로불린  $\kappa$  선도 서열(Ig- $\kappa$ -L)은 단백질 분비를 용이하게 하고, TGA 종결 코돈은 C-말단 His<sub>6</sub>-태그 이후 바로 위치한다. 대조군 벡터를 위한 발현 카세트는 PMS-scFv-425-SNAP과 동일하나, 결합 리간드로서 scFv-425 대신에 scFv-Ki4를 함유한다. (b) scFv-425-SNAP 단백질의 정제 분획을 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 그리고 나서 쿠마쉬 브릴리언트 블루로 염색하였다, (c) scFv-425-SNAP를 BG-Vista green으로 인큐베이션시키고, 단백질을 자외선(UV light)으로 시각화하였다. M: 단백질 마커, 1: 250mM 이미다졸로 용리된 scFv-425-SNAP의 3  $\mu$ l, 2: 250mM 이미다졸로 용리된 scFv-425-SNAP의 1.5  $\mu$ l, 3: 40mM 이미다졸로 용리된 scFv-425-SNAP의 10  $\mu$ l, 4: 10mM 이미다졸로 용리된 단백질, 5: 통과액(flow through), 6: HEK-293T 세포 상등액. scFv-425-SNAP 및 scFv-Ki4-SNAP의 결합 분석을 EGFR<sup>+</sup> A431 (d) 및 EGFR<sup>-</sup> L540 세포 (e)를 이용하여 유세포 분석기로 평가하였다. 채워진 회색 곡선은 처리되지 않은 세포를 나타낸다. 세포를 0.5  $\mu$ g/ml의 정제된 융합 단백질 scFv-425-SNAP (밝은 회색 곡선) 및 Ki4-SNAP (검정 곡선)으로 인큐베이션하였다. 이차 항체로서 펜타-His Alexa Fluor 488 Conjugate (1/500 희석) (Qiagen)를 사용하였다. 항-His Alexa Fluor 488 탐지 항체의 비특이적 염색을 배제하기 위해, His-태그된 융합 단백질의 생략(omission)을 대조군으로서 사용하였다 (검정으로 된 검정 곡선).

도 2: 벤질구아닌 (BG)으로 변형 전 및 후의 질량 분석기에 의한 Ce6 광감작제의 분석. (a) Ce6, BG-PEG24-NH<sub>2</sub>, 및 BG-PEG24-Ce6의 ESI 질량 스펙트럼. 상단 패널은 Ce6 (597.215 Da)을 나타내고, 중간 패널은 BG-PEG24-NH<sub>2</sub> (1398.761 Da)를 나타내며, 하단 패널은 BG-PEG24-Ce6 (1979.004 Da)를 나타낸다. (b) BG-PEG24-Ce6과 scFv-425-SNAP의 연결(coupling). M, 단백질 마커; 1, 1.5-배 물 초과 BG-VistaGreen으로 인큐베이션시킨 scFv-425-SNAP; 2, 3-배 물 초과 브로모테닐프테리딘(bromothetylpteridine, BTP)으로 차단하고, BG-Ce6으로 2 h 동안 인큐베이션시키고, 최종적으로 BG-VistaGreen과 혼합시킨 scFv-425-SNAP; 3, 1.5-배 물 초과 BG-Ce6으로 2 h 동안 인큐베이션시키고, 그 다음 1.5-배 물 초과 BG-VistaGreen으로 인큐베이션시킨 scFv-425-SNAP. 연결된 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, CRi Maestro 이미징 시스템으로 시각화하였다. 상이한 염료 스펙트럼을 Maestro 소프트웨어를 이용하여 분리하고(unmixed), 해당 젤을 쿠마쉬 브릴리언트 블루로 염색하였다 (c).

도 3: EGFR<sup>+</sup> 세포를 특이적으로 인식하는, scFv-425-SNAP-VistaGreen 및 scFv-425-SNAP-Ce6의 결합 활성. PBS 중 37°C에서 20분 동안 각 융합 단백질로 4 x 10<sup>5</sup> 세포를 인큐베이션시킨 후 유세포 분석기 분석을 수행하였다. (a) scFv-425-SNAP-VistaGreen (밝은 회색 곡선)을 A431, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SiHa, L540, 및 CHO-K1 세포 (채워진 회색 곡선)에 대해 테스트하였다. 대조군으로, scFv-Ki4-SNAP를 BG-VistaGreen (검정 곡선)으로 표지하였고, 그것의 결합 활성을 A431, L540 및 CHO-K1 세포 (채워진 회색 곡선)에 대해 테스트하였다. (b) scFv-425-SNAP-Ce6 (밝은 회색 곡선)의 결합 효율을 A431, MDA-MB-468, MDA-MB-231, SiHa, L540 및 CHO-K1 세포 (채워진 회색 곡선)에 대해 테스트하였다. 대조군으로, BG-Ce6 (검정 곡선)로 표지된 scFv-Ki4-SNAP를 A431, L540 및 CHO-K1 세포 (채워진 회색 곡선)에 대해 테스트하였다.

도 4: 공초점 현미경(confocal microscopy)에 의해 분석된 융합 단백질의 내재화. 4°C에서 30분 동안 (a) 또는 37°C에서 60분 동안 (b) 0.5  $\mu$ g scFv-425-SNAP-Ce6로 인큐베이션시킨 EGFR<sup>+</sup> 세포주 A431, MDA-MB-468, MDA-MB-231 및 SiHa에 대한, 및 EGFR<sup>-</sup> 세포주 L540 및 CHO-K1에 대한 공초점 이미지를 획득하였다. (1) Ce6 형광 신호; (2) 투과광(transmitted light); (3) 형광 신호 및 투과광의 오버레이.

도 5: 광역동 치료 효율의 평가. 세포 증식 및 세포사멸 분석을 scFv-425-SNAP-Ce6를 이용하여 수행하였다. scFv-425-BG-Ce6의 세포독성을 (a) 조사된 세포(irradiated cell) 및 (b) 비-조사된 세포에의 XTT 분석을 이용하여, 세포주 A431 (■), MDA-MB-468 (▲), MDA-MB-231 (◆), SiHa (●) 및 CHO-K1 (▼)에 대해 측정하였다. 대조군으로 A431 세포 (x)에 대한 scFv-Ki4-SNAP-Ce6의 세포독성을 테스트하였다. 동일한 세포를 상이한 농도의 BG-Ce6으로 처리하고, 세포 생존능력(viability)을 광 활성화를 포함 (c) 및 광활성화 포함 없이 (d) 분석하였다. (e) 세포사멸을 50 nM BG-Ce6, 200 nM scFv-SNAP-Ce6 및 200 nM scFv-Ki4-SNAP-Ce6과 함께, Apo-ONE<sup>TM</sup> 균질한(Homogeneous) 카스파제-3/7 분석을 이용하여 평가하였다. (f) 광감작화된 A431 세포의 조광

(illuminating)에 의한 활성산소종의 생성을 디클로로플루오레세인 유도체 카르복시-H2DCFDA를 이용하여 탐지하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 광역동 요법 (PDT)은 세포사멸 및/또는 세포괴사에 의해 악성 세포를 살상하는 세포독성 활성산소종을 생산하도록 산소와 함께 비-독성 광감작제 및 해가 없는 가시광선을 이용하는 최소 침습 치료이다<sup>12</sup>. 많은 상이한 광감작제가 개발되었으나, Ce6이 PDT 연구에서 광범위하게 평가되었고 또한 이로운 물리적 및 화학적 특성을 가지기 때문에 모델로서 선택되었다. Ce6은 광자 효능 및 세포 침투(penetration) 사이의 좋은 절충인, 664 nm에서 최대 흡수를 가지고, 카르복실기의 존재는 추가적인 기능화(functionalization)를 허용한다<sup>5</sup>.
- [0030] 본 발명의 SNAP-태그 기술의 이용은 균질한 접합체 제조물의 생산을 가능하게 하도록, 항체에 유일한 접합 부위를 제공한다. EGFR에 특이적으로 결합하는 scFv 항체의 코딩 서열이 hAGT 카세트에 유전적으로 융합된 본 발명의 구조물은 항체에 SNAP-태그를 부여하고, 그에 따라 부위-특이적 접합 BG-변형 기질, 특히 Ce6을 허용한다. 이러한 접합 방법은 항체가 SNAP-태그를 지니고 기질이 BG기로 변형되는 한 임의의 항체-광감작제 조합에 적용될 수 있다.
- [0031] 접합 반응은 scFv-425-SNAP-Ce6 및 scFv-Ki4-SNAP-Ce6의 균질한 시료의 제조물을 가능하게 하는데 효율적이다. 이 제조물들은 종양 세포를 특이적으로 살상하는 그들의 능력에 대해 테스트되었다. scFv-425-SNAP-Ce6가 빛에 노출 후 상피세포암, 유방암 및 자궁경부암 을 대표하는 4개의 인간 종양-유래 세포주(A431, MDA-MB-231, MDA-MB468 및 SiHa)에서 EGFR<sup>+</sup> 세포를 선택적으로 살상하는 것을 발견하였다. scFv-425-SNAP-Ce6의 광독성은 EGFR 및 빛의 존재에 의존하고, 독성은 가장 많은 양의 수용체 ( $1-1.3 \times 10^6$  수용체/세포)를 발현시키는 A431 및 MDA-MB468 세포에서 가장 강력하다<sup>14,15</sup>. 다른 세포주는 더 적게 EGFR를 더 적게 발현하고 (MDA-MB-231에 대해  $1.3 \times 10^5$  수용체/세포 및 SiHa에 대해  $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  수용체/세포)<sup>15,16</sup>, 비록 융합 단백질이 치료적으로 비효과적 지점이 아니더라도, scFv-425-SNAP-Ce6의 독성은 부수적으로 감소된다. 이것은 scFv-425-SNAP-Ce6가 가장 높은 발현 수준을 갖는 것만이 아닌, 다양한 EGFR<sup>+</sup> 세포를 표적화할 수 있음을 의미한다. EGFR<sup>-</sup> 세포 (CHO-K1)가 scFv-425-SNAP-Ce6에 노출될 경우에는 어떠한 독성도 관찰되지 않았다.
- [0032] scFv-425-SNAP가 신장 여과에 의한 클리어런스(clearance)를 나타내는, 주입 후 직접적으로 마우스 신장에 축적되고, 이어서 방광에서 탐지되는 것이 이전에 입증되었다<sup>10</sup>. 빠른 클리어런스에 불구하고, 종양 조직 내 scFv-425-SNAP의 축적 및 체류는 10 h 후-주입 (post-injection)에서 매우 높은 종양 대 배경 비 (background ratio)를 생산하는데 명백히 충분하다.
- [0033] scFv/SNAP-태그 융합 단백질의 발현, 정제 및 기능적 분석
- [0034] EGFR-특이적 scFv-425 항체 단편<sup>10</sup> 및 상이한 항원 (CD30)에 결합하는 대조군 단편 (scFv-Ki4)<sup>17</sup>에 대한 코딩 서열을 (도 1a)에서 보여준 바와 같이, 완전한 scFv-425-SNAP 및 scFv-Ki4-SNAP 카세트를 생성하기 위해, pMS-SNAP 바이시스트로닉 벡터로 이전하였다. 구조물을 형질감염(transfection)에 의해 HEK-293T 세포로 도입하였고, 안정하게 형질전환된 세포를 제오신에서 선별 및 녹색형광단백질 (GFP) 활성을 모니터링하는 것에 의해 동정하였다. 융합 단백질을 친화성 크로마토그래피에 의해 (C-말단 His<sub>6</sub> 태그 이용) ~90%의 최종 순도로 세포 상등액으로부터 분리하였고, 최종 수율은 상등액에서 18 mg/L의 단백질이었다 (도 1b).
- [0035] SNAP-태그의 활성을 가공되지 않은 배양 상등액, 통과액 분획, 및 크로마토그래피 단계로부터 용리물을 BG-변형된(modified) Vista Green과의 혼합에 의해 각각의 융합 단백질에서 확인하였다 (도 1c). scFv-425-SNAP 단백질의 결합 활성을 EGFR를 발현하는 표적 세포주 (A431) 및 이러한 항원은 결여되었으나 CD30을 발현하는 대조군 세포주 (L540)를 이용하여 유세포 분석기로 확인하였다. 결합을 이차 항-His<sub>6</sub> Alexa 488 항체로 검출하였다. 유세포 분석기 데이터는 빠르고 효율적인 scFv-425-SNAP의 EGFR<sup>+</sup> 표적 세포에 특이적인 결합을 확인하였으나(도 1d), 반면 scFv-Ki4/SNAP는 CD30<sup>+</sup> L540 세포에만 결합하였다(도 1e).



- [0036] 벤질구아닌에 의한 광감작제 클로린 e6의 변형
- [0037] 광감작제 클로린 e6 (Ce6)을 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC), 히드록시술포숙신이미드의 소듐 염 (술포(sulfo)-NHS) 및 BG-PEG24-NH<sub>2</sub> 링커를 이용하여 성공적으로 변형시켰다 (modified). Ce6 카르복실기를 BG기로 변형시키고, 반응의 효율을 HPLC로 측정하였다 (데이터 미표시). BG-PEG24-Ce6의 고순도를 질량 분석계로 확인하였다. Ce6, BG-PEG24-NH<sub>2</sub> 및 BG-PEG24-Ce6의 정확한 질량을 Micromass QTOFII 질량 분석계에서 탐지하고, 정제된 BG-PEG24-Ce6가 연결된 Ce6 및 BG-PEG24-NH<sub>2</sub>에 대해 계산된 이론적 질량과 동일한 질량을 갖는 것을 확인하였다 (도 2a).
- [0038] BG-변형된 형광단(fluorophore) 및 Ce6으로 단백질 표지(labeling)
- [0039] SNAP-태그의 기능성을 BG-변형 형광 염료와 커플링에 의해 테스트하였고, 실온에서 2-h 인큐베이션 후 85-90%의 표지 효율을 나타냈다 (데이터 미표시). 반응을 BG-변형 Ce6를 이용하여 반복하였다. 광감작제는 용합 단백질 내 활성적 SNAP-태그와 오직 반응하였고, 반응은 1.5-배 물 초과와 BG-Vista Green으로 인큐베이션-후(post-incubation)에 의해 보여준 바와 같이, 브로모테닐프테리딘 (BTP)으로 비가역적으로 차단될 수 있다. CRi Maestro 이미징 시스템으로의 분석은 이전에 차단된 용합 단백질과 연관된 어떠한 형광도 나타내지 않았다 (도 2b,c).
- [0040] 유세포 분석기 및 공초점 현미경
- [0041] 표지된 scFv-425-SNAP 용합 단백질의 활성을 측정하기 위해, 유세포 분석기 분석을 BG-Vista Green 또는 BG-Ce6으로 표지된 단백질을 이용하여 수행하였다. 모든 표지된 단백질은 얼음에서 30-분 인큐베이션 후 해당 표적 세포주 (A431, MDA-MB-231, MDA-MB-468 및 SiHa)에서 강한 형광 신호를 보여주었으나, 대조군 세포 (L540 및 CHO-K1)에서는 보여주지 않았다. 예측되는 바와 같이, 표지된 scFv-Ki4-SNAP는 L540에서 강한 형광 신호를 보여주었으나, A431 및 CHO-K1 세포에서는 보여주지 않았다 (도 3).
- [0042] 공초점 현미경은 scFv-425-SNAP-Ce6으로 인큐베이션된 A431, MDA-MB-231, MDA-MB468 및 SiHa 세포에서 강하고, 특이적이고, 균질한 막 염색을 나타냈다 (도 4a). 표지된 용합 단백질은 37℃에서 30-분 인큐베이션 후 A431, MDA-MB-231, MDA-MB468 및 SiHa 세포 안으로 특이적이고 효율적으로 흡수되었으나, 4℃에서는 그렇지 않았다 (도 4b). 대조적으로, EGFR<sup>-</sup> 세포주 L540 및 CHO-K1는 동일한 조건 하에서 scFv-425-SNAP-Ce6로 인큐베이션된 경우 어떠한 신호도 탐지되지 않았다 (도 4a,b).
- [0043] scFv-425-SNAP-Ce6의 광세포독성(photocytotoxicity)
- [0044] scFv-425-SNAP-Ce6 및 비접합된 BG-Ce6의 농도-의존적 세포독성 효과를 4개의 EGFR<sup>+</sup> 세포주 및 음성 대조군으로서 CHO-K1를 가지고 XTT-기반 비색(colorimetric) 세포 증식 분석을 이용하여 평가하였다. scFv-425-SNAP-Ce6로 처리된 A431, MDA-MB-231, MDA-MB-468 및 SiHa 세포의 생존력은 24-h 인큐베이션 및 뒤이은 광 활성화 후, 농도-의존 방식으로 유의성있게 감소하였다. IC<sub>50</sub> 값은 48 nM (A431), 200 nM (MDA-MB-231), 38 nM (MDA-MB-468) 및 218 nM (SiHa)이었다. CHO-K1 세포는 800 nM의 접합된 용합 단백질에 노출된 경우에도 영향받지 않았고, 대조군 구조물 scFv-Ki4-SNAP-Ce6은 A431 및 CHO-K1 세포 모두에서 무시할만한 효과를 가졌다. 대조적으로, 비접합된 Ce6은 모든 세포주에 대해 독성적으로, 16 nM (A431), 22 nM (MDA-MB-231), 22 nM (MDA-MB-468), 26 nM (SiHa) 및 18 nM (CHO-K1)의 IC<sub>50</sub> 값을 갖는다. 이러한 데이터는 (도 5a,c)에서 보여준다.
- [0045] 광 활성화 단계가 없는 평행의(parallel) 실험을 수행하는 것에 의해 확인된 바와 같이, Ce6 접합 및 비접합 형태 모두 광 활성화 이후에서만 독성적이다. 어느 세포주에서도 생존력에서 어떤 유의성 있는 감소가 관찰되지 않았다 (도 5b,d).
- [0046] scFv-425-SNAP-Ce6이 세포사멸 경로를 작동시키는(triggering) 것에 의해 표적 세포에서 선택적으로 예정세포사(programmed cell death)를 유도하였는지를 결정하기 위해, 카스파제-3 및 카스파제-7의 활성을 광 활성화 후

24 h 지나서 A431, MDA-MB-231, MDA-MB468, SiHa 및 CHO-K1 세포에서 분석하였다. scFv-425-SNAP-Ce6 (200 nM) 및 비접합 Ce6 (50 nM) 모두 카스파제-3 및 카스파제-7의 수준이 증가한 반면, 200 nM scFv-Ki4-SNAP-Ce6로 처리된 A431에서는 어떠한 유의성 있는 증가도 관찰되지 않았다 (도 5e).

[0047] 광활성화된 A431 세포 내 ROS의 생산을 6-카르복시-20,70-디클로로디히드로플루오레세인디아세타테디-(아세톡시-메틸)에스테르 ( $H_2DCFDA$ )의 산화 및 탈아세틸화에 의해 생산된, DCF의 485/535-nm 형광을 측정하는 것에 의해 조사하였다. 200 nM의 접합된 Ce6 및 50 nM의 비접합된 Ce6의 존재에서 광 활성화 뒤에 폭발적인 ROS 합성이 있으나, 비-조사된 세포에서는 광감작제로 처리되지 않은 세포에서 관찰된 배경 수준을 간신히 넘은, ROS 수준에서의 작은 증가만이 있음을 발견하였다 (도 5f).

[0048] 방법

[0049] 세포 배양

[0050] EGFR<sup>+</sup> A431, MDA-MB-231, MDA-MB468 및 SiHa 세포, 그리고 EGFR<sup>-</sup> L540, CHO-K1 및 HEK-293T 세포를 포함하는 모든 세포주는 인간 기원이다. A431, L540, CHO-K1 및 HEK-293T 세포를 2 mM L-글루타민, 10% (v/v) 소태아혈청 (FBS) 및 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. MDA-MB-231, MDA-MB468 및 SiHa 세포를 10% (v/v) 소태아혈청 (FBS) 및 100 U/ml 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 DMEM에서 배양하였다. 모든 세포를 5% CO<sub>2</sub> 대기 내 37°C에서 인큐베이션하였다. 모든 배지 및 첨가제는 Invitrogen, Darmstadt, 독일로부터 구입하였다.

[0051] 단백질 발현 및 정제.

[0052] 각 scFv의 서열을 N-말단 결합 리간드 (scFv-425 또는 scFv-Ki4) 및 C-말단 O6-알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제 (SNAP-태그) 서열을 제공하는 발현 카세트 안으로 삽입하였다. TGA 종결 코돈은 His<sub>6</sub> 태그 서열 다음에 바로 생성된다. His<sub>6</sub>-태그된 용합 단백질을 Ni-NTA 금속 친화 크로마토그래피에 의해 무-세포(cell-free) 상등액으로부터 정제하였다. 더 많은 부피를 Akta FLPC 시스템에서 5-mL Ni-NTA Superflow 카트리지를 (Qiagen, Hilden, 독일)로 4x 버퍼 (200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 M NaCl, 40 mM 이미다졸, pH 8)로 평형화(equilibration) 후 정제하였다. 결합된 His-태그된 단백질을 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM 이미다졸, pH 8에서 용리하였다. 용리 후, 단백질을 4°C에서 밤새 1 mM 디티오에리스리톨 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, 독일)을 함유한 인산완충식염수 (PBS)에 투석시켰다. 엑토인(Ectoine) 냉동보존제를 50 mM의 최종 농도로 첨가하고, 분취량(aliquot)을 -20°C에서 저장하였다.

[0053] 벤질구아닌에 의한 Ce6의 변형

[0054] Ce6의 카르복실기 (포르피린 산물, Logan, UT)를 30분 동안 실온에서 디메틸포름아미드 중에 2mg Ce6과 5-배 물 초과와 EDC 및 술포-NHS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)를 혼합하는 것에 의해 벤질구아닌으로 변형시켰다 (modified). 활성화된 혼합물을 그리고 나서 어두움 속에서 밤새 실온에서 4-배 물 초과와 벤질구아닌 링커 BG-PEG24-NH<sub>2</sub>(Covalys Biosciences AG, Witterswil, 스위스)와 혼합시켰다. 변형된 Ce6을 Shimadzu Prominence HPLC 시스템 및 1 mL/분의 유속에서 2.5 μm (4.6 x 50 mm) Water XBridge<sup>TM</sup> OSTC<sub>18</sub> 컬럼 (Waters, Milford, MA)으로 정제하였다. 분리를 100% 0.1 M TEAA에서 100% 아세토니트릴까지, 20-분 구배를 이용하여 수행하였으며, 280 및 410 nm에서 모니터링하였다. Ce6, BG-PEG24-NH<sub>2</sub> 및 BG-PEG24-Ce6의 질량을 전기방사 이온 소스 Advion Nanomate (Advion, Ithaca, NY, USA) 7 μl 시료 부피, 1.4 kV를 갖는 Micromass QTOFII 질량 분석계를 이용하여 확인하였다. 정확한 질량을 400-2000 Da 범위에서 MaxEnt3<sup>TM</sup> 알고리즘 (Micromass)을 이용하여 300-2500 m/z 범위의 질량 스펙트럼으로부터 얻었다.

[0055] 단백질 표지

[0056] 정제된 SNAP-태그 용합 단백질을 실온에서 2 h 동안 어두움 속에서 1.5-3 배 물 초과와 염료로 인큐베이션에 의해 BG-변형된 염료 (Covalys Biosciences AG, Witterswil, 스위스) 또는 BG-변형된 Ce6과 접합시켰다. 잔류 염료를 제바 스핀 탈염(zebra spin desalting) 컬럼, 7K MWCO (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL)을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 커플링 효율을 해당 염료의 흡광 계수(extinction

coefficient) 및 융합 단백질의 이론적 흡광 계수를 이용하여 광도측정으로(photometrically) 측정하였다. 표지된 단백질을 SDS-PAGE에 의한 분리 후, UV 트란스일루미네이터 Gel Doc XR 젤 다크멘테이션 (Bio-Rad Laboratories, 뮌헨, 독일) 또는 청색 및 황색 필터 세트를 이용하여 CRi Maestro 이미징 시스템 (CRi, Woburn, MA, USA)으로 시각화하였다.

[0057] 유세포 분석기

[0058] 표지된 및 표지되지 않은 융합단백질의 결합 효율을 FACSCalibur (Becton & Dickinson, 하이델베르그, 독일) 및 CellQuest 소프트웨어를 이용하여 유세포 분석기로 측정하였다. EGFR<sup>+</sup> 세포주 A431, MDA-MB-231, MDA-MB468 및 SiHa를 scFv-425-SNAP의 결합 효율을 테스트하기 위해 사용하였고, EGFR<sup>-</sup> 세포주 L540 및 CHO-K1을 음성 대조군으로 사용하였다. 대조군 융합 단백질 scFv-Ki4-SNAP는 항원 CD30을 인식하고, 따라서 L540 세포에는 결합하지만 다른 세포주에는 결합하지 않아야 한다. 대략  $4 \times 10^5$  세포를 0.5  $\mu$ g의 표지된 단백질을 함유하는 200  $\mu$ L PBS 중에서 20분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 그 다음 세포를 전통적 세포 세척기에서 1.8 mL PBS로 2회 세척하고, 유세포 분석기로 분석하였다.

[0059] 공초점 현미경

[0060] 이미지를 TCS SP5 공초점 현미경 (LEICA Microsystem, 베를린, 독일)으로 시각화하였다. 세포를 유세포 분석기를 위해 전술된 바와 같이 준비하였다. 결합 효율을 얼음 위에서 30분 동안 표지된 융합 단백질로 세포를 인큐베이션하는 것에 의해 측정하였다. 내재화를 37°C에서 30 분 동안 세포를 표지된 융합 단백질로 인큐베이션하는 것에 의해 모니터하였다.

[0061] scFv-425-SNAP-Ce6의 광독성

[0062] 전술된 A431, MDA-MB-231, MDA-MB468, SiHa 및 CHO-K1 세포의 분취량 ( $2 \times 10^4$ )을 PBS에서 2회 세척하고, 그리고 나서 Ce6, scFv-425-SNAP-Ce6 또는 Ki4-scFv/SNAP-Ce6의 증가하는 농도로 처리하고, 이어서 37°C에서 3 h 동안 인큐베이션 하였다. 대조군 배양물을 광감작제 대신에 500  $\mu$ g/ml 제오신으로 인큐베이션하였다. 그 다음 세포를 하이드로션(Hydrosun) 타입(type) 505, 7-mm 워터 큐벳(water cuvette) 및 580-1400 nm 범위의 스펙트럼, 오렌지색 필터 OG590 (Hydrosun Medizintechnik GmbH, Mulheim, 독일)을 이용하여 24 J/cm<sup>2</sup> 브로드밴드(broadband) 가시광선/ 근적외선으로 조사하였고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 추가 24 h 동안 인큐베이션시켰다.

[0063] 세포 생존력을 광 활성화 후 24 h 지나서 XTT 세포 증식 키트 II (Roche, 만하임 독일)를 이용하여 측정하였다. 세포를 2,3-비스(2-메톡시-4-니트로-5술포닐)-5[(페닐-아미노)카르보닐]-2H-테트라졸리움 히드록사이드 시약(1mg/ml)으로 인큐베이션시켰고, 37°C에서 2 h 동안 인큐베이션시켰다. 생존 종양 세포(viable tumor cell)에 의한 XTT의 포르마잔으로 환원을 ELISA 플레이트 리더 Elisareader ELx808 (Bio-TEK, Bad Friedrichsahl, 독일)을 이용하여 450 nm의 흡수 파장 및 630 nm의 기준 파장에서 비색적으로(colorimetrically) 모니터하였다.

[0064] 세포 용해물 내 카스파제-3/7 활성을 광 활성화 후 24 h에 Apo-ONE 카스파제-3/7 분석 (Promega, 만하임, 독일)을 이용하여 측정하였다. 간략하게, Apo-ONE 시약의 100  $\mu$ l를 세포에 첨가하고, 6 h 동안 인큐베이션한 후, 485 nm의 여기 파장 및 535 nm의 발광 파장을 이용하여 ELISA 플레이트 리더 Elisareader ELx808 (Bio-TEK, Bad Friedrichsahl, 독일)로 형광 판독을 수행하였다. ROS의 농도를 H2DCFDA (Invitrogen, Darmstadt, 독일)의 485/535 nm 형광 비의 측정에 의해 결정하였다. 간략하게,  $2 \times 10^4$  세포를 1% FCS를 함유하는 PBS 중에 30분 동안 50 nM Ce6 또는 200 nM scFv-425-SNAP-Ce6 및 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA의 존재에서 인큐베이션하였다. 세포를 2.5% FCS를 함유하는 따뜻한 PBS로 2회 세척하고, RPMI-160 배지에서 2 h 동안 배양하고, 전술된 바와 같이 조광하였다. 형광 판독을 조도(illumination) 후 바로 수행하였다. 블랭크 프로브 (세포 및 배지) 판독값을 배경(blankground)으로 사용하고 모든 시료 판독값으로부터 감하였다(subtracted).

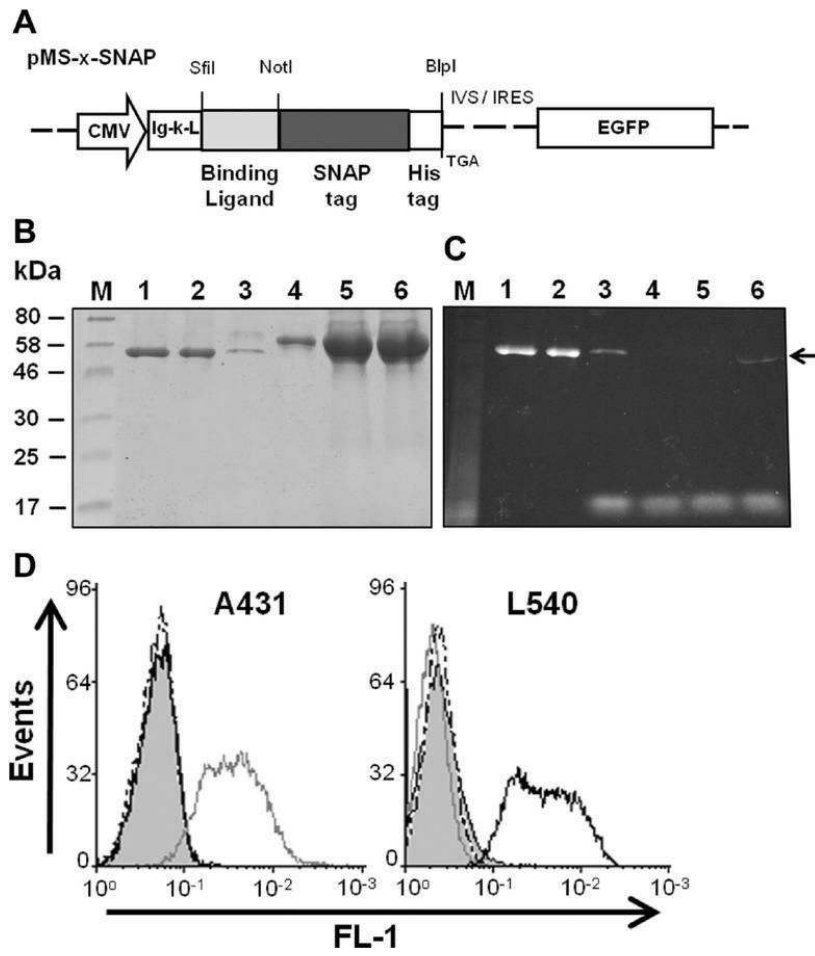
[0065] 데이터 분석

[0066] 통계적 분석 및 곡선 피팅(curve fitting)을 GraphPad Prism 소프트웨어 (GraphPad, San Siego, CA)로 수행하였다. 데이터를 평균  $\pm$  MES으로서 제시하였다. t-검정(Student's *t* test) 및 이원분산분석(two-way analysis of variance)을 독립적인 실험의 유의성을 평가하기 위해 사용하였다. 기준  $p < 0.05$ 를 통계적 유의성을 결정하기 위해 사용하였다.

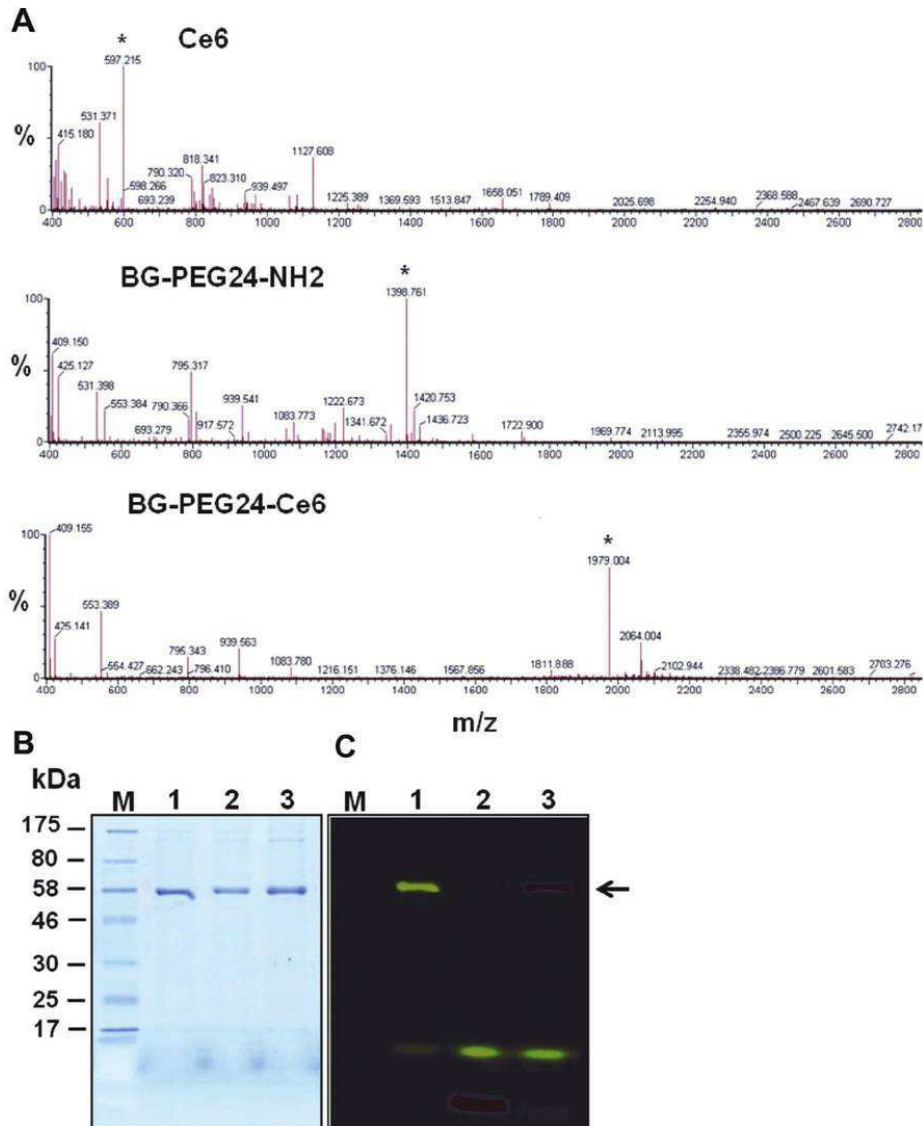
- [0067] 참조문헌:
- [0068] 1. Huang, Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 4, 283-293 (2005).
- [0069] 2. Palumbo, G. Photodynamic therapy and cancer: a brief sightseeing tour. *Expert Opin. Drug Deliv.* 4, 131-148 (2007).
- [0070] 3. Castano, A.P, Demidova, T.N. & Hamblin, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 1, 279-293 (2004).
- [0071] 4. Olivo, M., Bhuvaneswari, R., Lucky, S.S., Dendukuri, N. & Thong, P.S. Targeted Therapy of Cancer Using Photodynamic Therapy in Combination with Multi-faceted Anti-Tumor Modalities. *Pharmaceuticals* 3, 1507-1529 (2010).
- [0072] 5. Van Dongen, G.A.M.S., Visser, G.W.M. & Vrouenraets, M.B. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 56, 31-52 (2004).
- [0073] 6. Jeger, S. *et al.* Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 9995-9997 (2010).
- [0074] 7. Adams, G.P. & Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat. Biotechnol.* 23, 1147-1157 (2005).
- [0075] 8. Junutula, J.R. *et al.* Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* 26, 925-932 (2008).
- [0076] 9. Hamblett, K.J. *et al.* Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin. Cancer Res.* 10, 7063-7070 (2004).
- [0077] 10. Kampmeier, F. *et al.* Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 37, 1926-1934 (2010).
- [0078] 11. Gronemeyer, T., Chidley, C., Juillerat, A., Heinis, C. & Johnsson, K. Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling. *PEDS* 19, 309-16 (2006).
- [0079] 12. Bhatti, M. *et al.* Targeted photodynamic therapy with multiply-loaded recombinant antibody fragments. *Int J Cancer* 1,122:1155-63 (2008).
- [0080] 13. Douillard, S., Olivier, D. & Patrice, T. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol. Sci* 8, 405-413 (2009).
- [0081] 14. Gamou, S., Kim, Y. S. & Shimizu, N. Different responses to EGF in two human carcinoma cell lines, A431 and UCVA-1, possessing high numbers of EGF receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 37, 205-213 (1986).
- [0082] 15. Cai, K. *et al.* Relationship between induction of phosphorylated H2AX and survival in breast cancer cells exposed to <sup>111</sup>In-DTPA-hEGF. *J Nucl Med.* 49, 1353-1361 (2008).
- [0083] 16. Nida, D.L., Rahman, M.S., Carlson, K.D., Richards-Kortum, R. & Follen, M. Fluorescent nanocrystals for use in early cervical cancer detection. *Gynecologic Oncology* 99, 89-94 (2005).
- [0084] 17. Kampmeier, F. *et al.* Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-Oalkylguanine DNA alkyltransferase. *Bioconjug Chem.* 20, 1010-1015 (2009).

도면

도면1

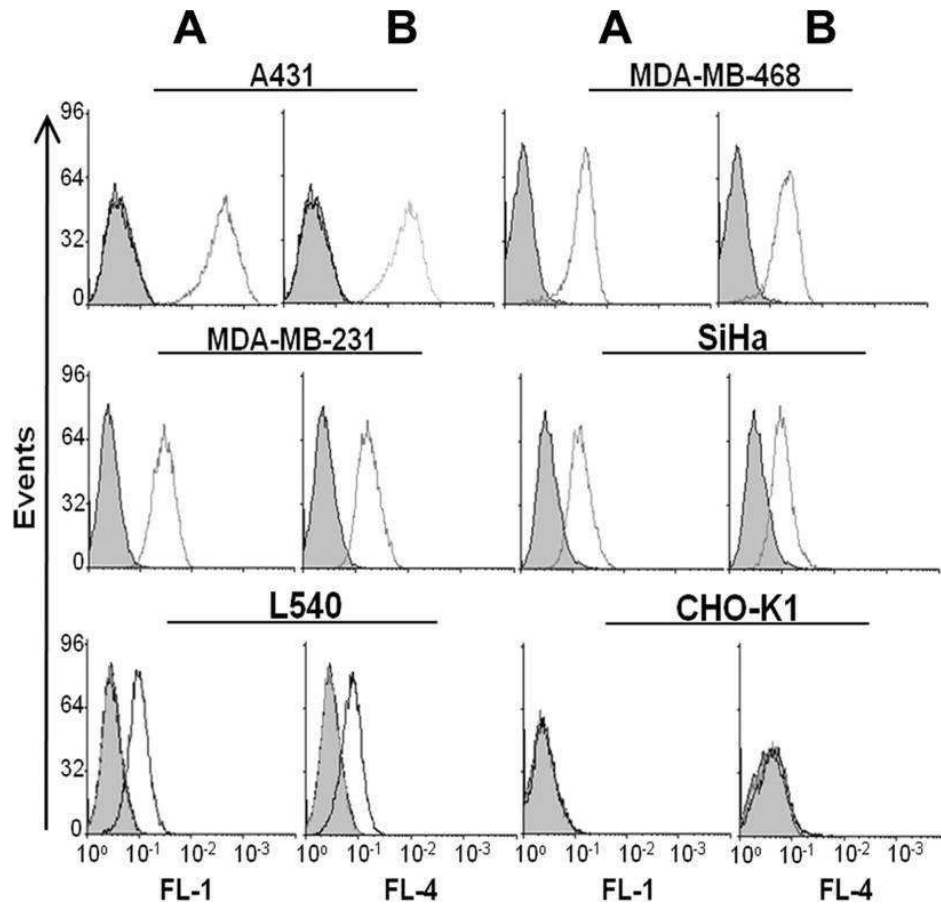


도면2

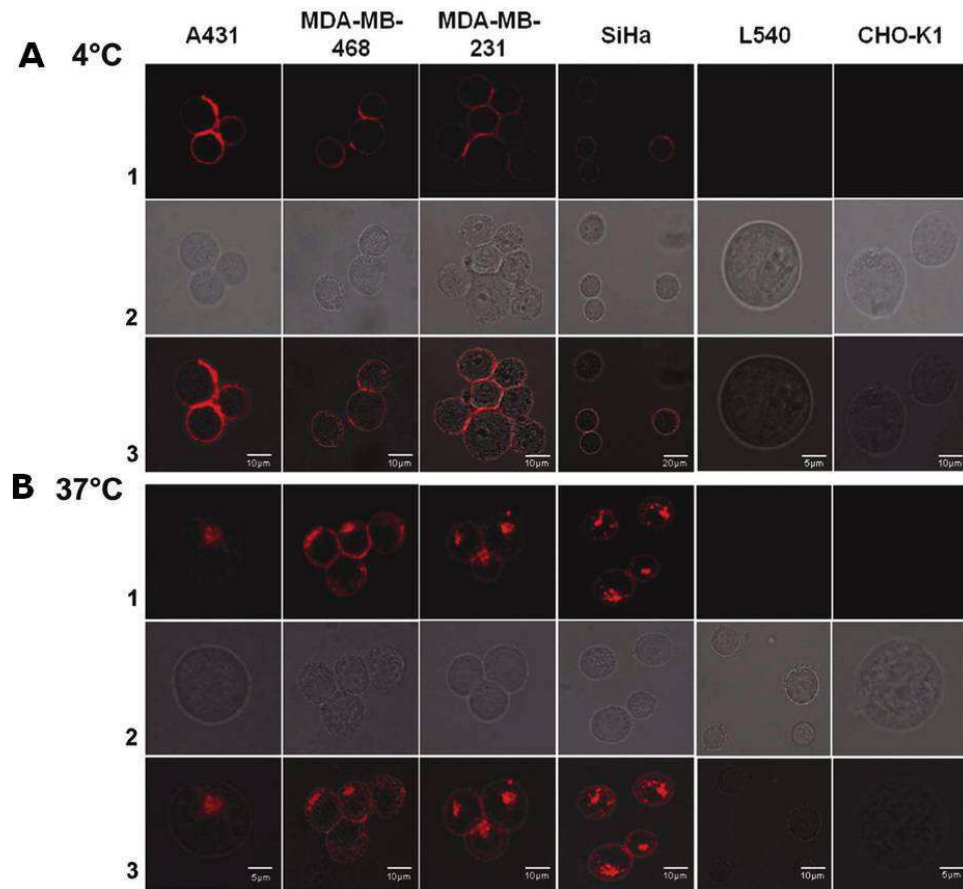




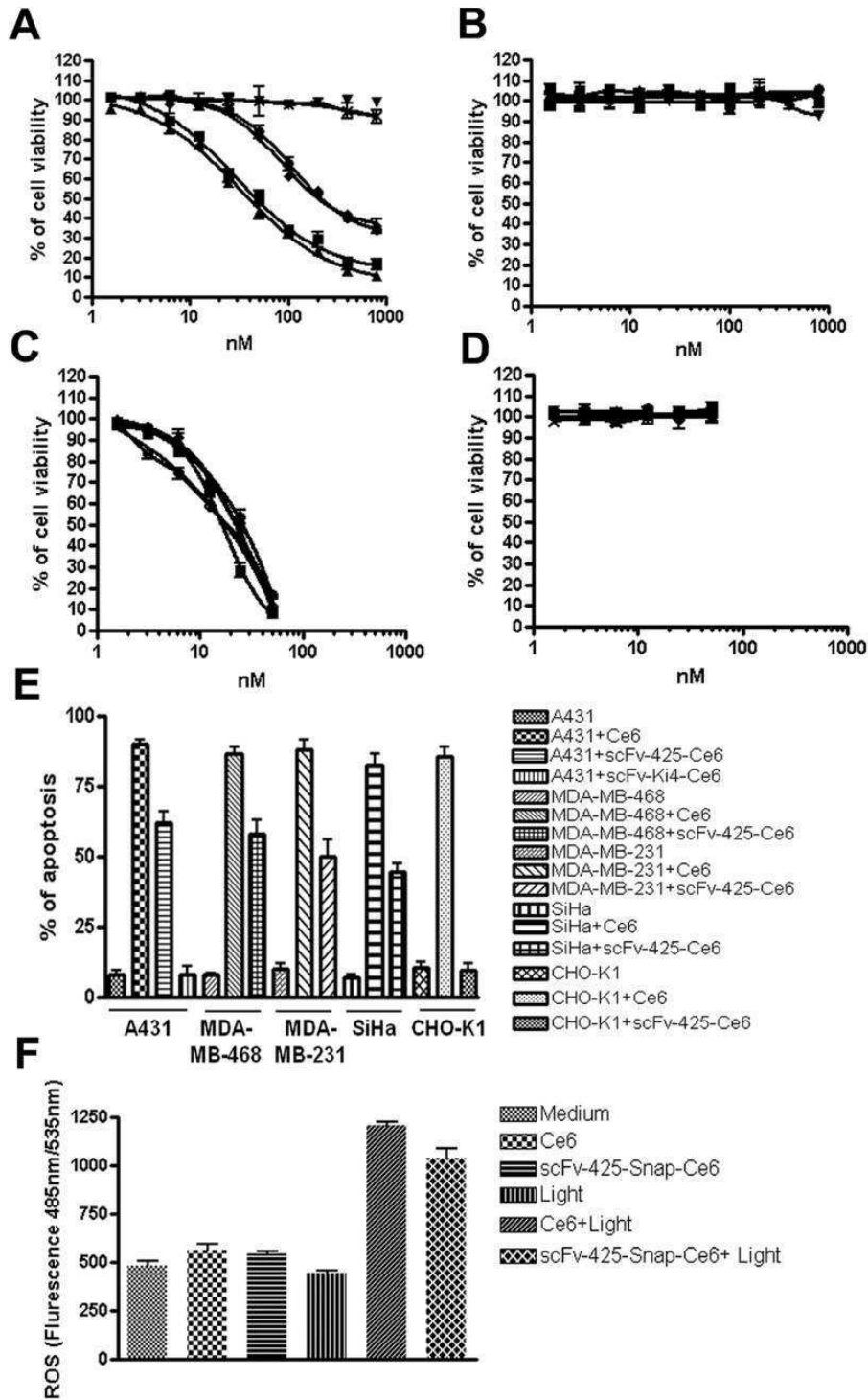
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Fraunhofer Gesellschaft zu Förderung der angewandten  
Forschung e. V.

<120> Novel Photoimmunoconjugates for Use in Photodynamic Therapy

<130> 110709ep

<140> PCT/EP2012/055022

<141> 2012-03-21

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 245

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> fusion protein

<400> 1

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro

1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu

50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln

130 135 140

Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr

145 150 155 160

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys  
165 170 175

Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala  
180 185 190

Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr  
195 200 205

Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
210 215 220

Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Ile Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Glu  
225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys Arg  
245

<210> 2

<211> 737

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> coding for fusion protein

<400> 2

atggcgcagg tgcaactgca gcagtctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 60

aagttgtcct gcaaggcttc cggtacacc ttcaccagcc actggatgca ctgggtgaag 120

cagagggctg gacaaggcct tgagtggatc ggagagtta atcccagcaa cgcccgctact 180

aactacaatg agaaattcaa gagcaaggcc aactgactg tagacaaatc ctccagcaca 240

gcctacatgc aactcagcag cctgacatct gaggactctg cggtctatta ctgtgccagt 300

cgggactatg attacgacgg acggtacttt gactactggg gccaaaggac cacggtcacc 360

gtctcctcag gtggcgggtg ctggggcggg ggtgggtcgg gtggcggcgg atctgacatc 420

gagctcacc agtctccagc aatcatgtct gcactctccag gggagaaggt cactatgacc 480

tgcagtgcc gctcaagtgt aacttacatg tattggtacc agcagaagcc aggatcctcc 540

cccagactcc tgatttatga cacatccaac ctggcttctg gagtccctgt tcgtttcagt 600

ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc acaatcagcc gaatggaggc tgaagatgct 660

gccacttatt actgccagca gtggagtagt cacatattca cgttcggctc ggggacagaa 720

ctcgagatca aacgggc 737

<210> 3

<211> 465

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> fusion protein

<400> 3

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro

1 5 10 15

Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20 25 30

Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala Gly Gln Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Ile Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu

50 55 60

Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln

130 135 140

Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr

145 150 155 160

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175

Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Leu Ala

180 185 190

Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr

195 200 205



Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Ile Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Ala  
 245 250 255  
 Leu Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Gly Gly Pro  
 260 265 270  
  
 Tyr Val His Asp Glu Val Asp Arg Gly Pro Pro Gly Ser Arg Met Asp  
 275 280 285  
 Lys Asp Cys Glu Met Lys Arg Thr Thr Leu Asp Ser Pro Leu Gly Lys  
 290 295 300  
 Leu Glu Leu Ser Gly Cys Glu Gln Gly Leu His Glu Ile Lys Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gly Thr Ser Ala Ala Asp Ala Val Glu Val Pro Ala Pro Ala  
 325 330 335  
  
 Ala Val Leu Gly Gly Pro Glu Pro Leu Met Gln Ala Thr Ala Trp Leu  
 340 345 350  
 Asn Ala Tyr Phe His Gln Pro Glu Ala Ile Glu Glu Phe Pro Val Pro  
 355 360 365  
 Ala Leu His His Pro Val Phe Gln Gln Glu Ser Phe Thr Arg Gln Val  
 370 375 380  
 Leu Trp Lys Leu Leu Lys Val Val Lys Phe Gly Glu Val Ile Ser Tyr  
 385 390 395 400  
  
 Gln Gln Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Pro Ala Ala Thr Ala Ala Val  
 405 410 415  
 Lys Thr Ala Leu Ser Gly Asn Pro Val Pro Ile Leu Ile Pro Cys His  
 420 425 430  
 Arg Val Val Ser Ser Ser Gly Ala Val Gly Gly Tyr Glu Gly Gly Leu  
 435 440 445  
 Ala Val Lys Glu Trp Leu Leu Ala His Glu Gly His Arg Leu Gly Lys

450  
Pro  
465  
<210> 4  
<211> 1411  
<212> DNA  
<213> Unknown  
<220><223> coding for fusion protein  
<400> 4  
atggcgcagg tgcaactgca gcagctctggg gctgaactgg tgaagcctgg ggcttcagtg 60  
aagttgtcct gcaaggcttc cggctacacc ttaccagccc actggatgca ctgggtgaag 120  
cagagggctg gacaaggcct tgagtggatc ggagagtta atcccagcaa cggccgtact 180  
aactacaatg agaaattcaa gagcaaggcc aactgactg tagacaaatc ctccagcaca 240  
gcctacatgc aactcagcag cctgacatct gaggactctg cggctctatta ctgtgccagt 300  
cgggactatg attacgacgg acggtacttt gactactggg gccaagggac cacggtcacc 360  
  
gtctcctcag gtggcgggtg ctggggcggg ggtgggtcgg gtggcggcgg atctgacatc 420  
gagctcacc agtctccagc aatcatgtct gcactctcag gggagaaggt cactatgacc 480  
tgcagtgcc gctcaagtgt aacttacatg tattggtacc agcagaagcc aggatcctcc 540  
cccagactcc tgatttatga cacatccaac ctggcttctg gagtccctgt tcgtttcagt 600  
ggcagtgggt ctgggacctc ttactctctc acaatcagcc gaatggaggc tgaagatgct 660  
gccacttatt actgccagca gtggagtagt cacatattca cgttcggctc ggggacagaa 720  
ctcgagatca aacgggcggc cgctggaggt ggaggcagcg cgctggcgct gcccttatcg 780  
  
tcaatcttct cgcgatttgg ggaccctggg ggcccgtatg ttacgatga agtcgatcgt 840  
ggtcctcccg ggtctagaat ggacaaagac tgcgaaatga agcgcaccac cctggatagc 900  
cctctgggca agctggaact gtctgggtgc gaacagggcc tgcacagat caagctgctg 960  
ggcaaaggaa catctgccgc cgacgccgtg gaagtgcctg cccagccgc cgtgctgggc 1020  
ggaccagagc cactgatgca ggccaccgcc tggtcaacg cctactttca ccagcctgag 1080  
gccatcgagg agttccctgt gccagccctg caccaccag tgttcagca ggagagcttt 1140  
acccgccagg tgctgtggaa actgctgaaa gtggtgaagt tcggagaggt catcagctac 1200  
  
cagcagctgg cggccctggc gggcaatccc gccgccaccg ccgccgtgaa aaccgccctg 1260  
agcggaaatc ccgtgcccat tctgatcccc tgccaccggg tgggtgtctag ctctggcgcc 1320

gtgggggct acgagggcgg gctcgccgtg aaagagtggc tgctggccca cgagggccac 1380  
agactgggca agcctgggct gggcgctgag c 1411  
<210> 5  
<211> 3263  
<212> DNA  
<213> Unknown  
<220><223> coding for fusion protein  
<400> 5  
gctagccacc atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg 60  
ttccactggg gacgcggccc agccggccat ggcgaggtg caactgcagc agtctggggc 120  
  
tgaactgggt aagcctgggg cttcagtga gttgtcctgc aaggcttccg gctacacctt 180  
caccagccac tggatgcact gggatgaagc gagggctgga caaggccttg agtggatcgg 240  
agagttaaat cccagcaacg gccgtactaa ctacaatgag aaattcaaga gcaaggccac 300  
actgactgta gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcaa ctcagcagcc tgacatctga 360  
ggactctgcg gtctattact gtgccagtgc ggactatgat tacgacggac ggtactttga 420  
ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcaggt ggcggtggct cgggcgggtg 480  
tgggtcggtt ggccggcgat ctgacatcga gctcaccag tctccagcaa tcatgtctgc 540  
  
atctccaggg gagaaggta ctatgacctg cagtgccagc tcaagtgtaa cttacatgta 600  
ttggtaccag cagaagccag gatcctcccc cagactcctg atttatgaca catccaacct 660  
ggcttctgga gtcctgttc gtttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac 720  
aatcagccga atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccagcagt ggagtagtca 780  
catattcacg ttccgctcgg ggacagaact cgagatcaaa cgggcggccg ctggaggtgg 840  
aggcagcgcg ctggcgctgc ccttatcgtc aatcttctcg cgatttgggg accctggggg 900  
cccgtatgtt cacgatgaag tcgatcgtgg tctcccggg tctagaatgg acaaagactg 960  
  
cgaaatgaag cgcaccaccc tggatagccc tctgggcaag ctggaactgt ctgggtgcga 1020  
acagggcctg cagagatca agctgctggg caaaggaaca tctgcccgcc acgccgtgga 1080  
agtgcctgcc ccagcccgcc tgctgggcgg accagagcca ctgatgcagg ccaccgcctg 1140  
gctcaacgcc tactttcacc agcctgaggc catcgaggag ttccctgtgc cagccctgca 1200  
ccaccagtg ttccagcagg agagctttac ccgccaggtg ctgtggaac tgctgaaagt 1260  
ggtgaagttc ggagaggtca tcagctacca gcagctggcg gccctggcgg gcaatccgc 1320  
cgccaccgcc gccgtgaaaa ccgcctgag cggaaatccc gtgcccatc tgatccctg 1380

ccaccgggtg gtgtctagct ctggcgccgt ggggggctac gagggcgggc tcgccgtgaa 1440  
agagtggctg ctggcccacg agggccacag actgggcaag cctgggctgg gcgctgagca 1500  
cgaatttcga ggagggcccg aacaaaaact catctcagaa gaggatctga atagcgccgt 1560  
cgaccatcat catcatcatc attgagtttt gagcacgaat tctggaatta attcgctgtc 1620  
tgcgagggcc agctgttggg gtgagtactc cctctcaaaa gcgggcatga cttctgcgct 1680  
aagattgtca gtttcaaaa acgaggagga ttgatattc acctggcccg cggatgatgcc 1740  
tttgagggtg gccgcgtcca tctggtcaga aaagacaatc tttttgttgt caagcttgag 1800

gtgtggcagg cttgagatct ggccatacac ttgagtgaca atgacatcca ctttgccctt 1860  
ctctccacag gtgtccactc ccaggtcaca ctgcaggctg agcatgcac tagggcggcc 1920  
aatccgccc ctctccctcc cccccctc acgttactgg ccgaagccgc ttggaataag 1980  
gccggtgtgc gtttgtctat atgtgatttt ccaccatatt gccgtctttt ggcaatgtga 2040  
gggcccggaa acctggccct gtcttcttga cgagcattcc taggggtctt tccctctcg 2100  
ccaaaggaat gcaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc agttcctctg gaagcttctt 2160  
gaagacaaac aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg gaacccccca cctggcgaca 2220

ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc tgcaaaggcg gcacaacccc 2280  
agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg aaagagtcaa atggctctcc tcaagcgtat 2340  
tcaacaaggg gctgaaggat gccagaagg tacccattg tatgggatct gatctggggc 2400  
ctcggtgcac atgctttaca tgtgtttagt cgaggttaaa aaaacgtcta ggcccccgga 2460  
accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa cacgatgata agcttgccac aacccgggat 2520  
ccaccggtcg ccaccatggt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc 2580  
ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgaggcgag 2640

ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccacgg caagctgccc 2700  
gtgcctggc ccaccctcgt gaccaccctg acctacggcg tgcagtgtt cagccgctac 2760  
cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag 2820  
gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc 2880  
gaggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 2940  
aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc 3000  
gacaagcaga agaacggcat caaggtgaac ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc 3060

agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag aacaccccca tcggcgacgg ccccgctgtg 3120  
ctgcccgaca accactacct gagcaccag tccgccctga gcaaagacc caacgagaag 3180  
cgcgatcaca tggctctgct ggagttcgtg accgccgccg ggatcactct cggcatggac 3240

gagctgtaca agtaagttta aac

3263