



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0085268
(43) 공개일자 2009년08월07일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0011071

(22) 출원일자 2008년02월04일

심사청구일자 2008년02월04일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원 춘천시 한림대학길 39

(72) 발명자

황순봉

강원 춘천시 퇴계동 967-1 주공아파트 101동 601호

최수호

경기 의정부시 의정부동 392-35

(74) 대리인

강성혜

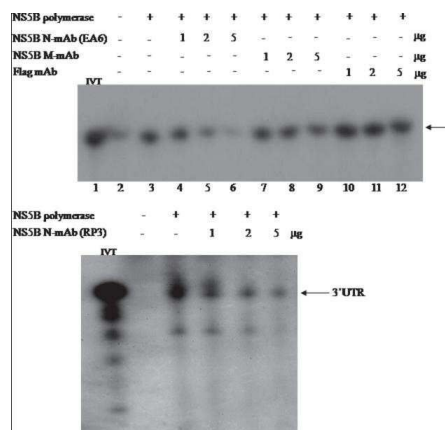
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 항 NS5B 항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개간질환 예방 및 치료제

(57) 요약

본 발명은 간질환 예방 및 치료제에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 NS5B 단백질에 대한 항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료제에 관한 것이다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

C형 간염 바이러스 NS5B 단백질의 N 말단 부위와 결합하는 항 NS5B 단일클론항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 N 말단 부위는 67-88 내의 아미노산 부위인 것을 특징으로 하는 항 NS5B 단일클론항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 C형 간염 바이러스 매개 간질환은 급성 C형 간염, 만성 C형 간염, 간경변 및 간암으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 간질환 예방 및 치료제에 관한 것으로서, 좀더 자세히는 NS5B 단백질에 대한 항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> C형 간염바이러스(Hepatitis C virus; HCV)는 1989년에 최초로 발견된 바이러스로 급성 또는 만성간염, 간경변 및 간암 등 간질환의 중요한 원인바이러스 중 하나이다(Choo Q, et al, Science 244: 359-362, 1989; Kuo, G. et al., Science, 244: 362-364, 1989). C형 간염바이러스는 주로 비경구적인 경로로 전파되며, B형 간염바이러스의 경우와 마찬가지로 바이러스에 오염된 주사침이나 바늘, 수혈, 오염된 혈액제제 등에 의해서 전파된다.
- <3> 세계인구의 최소한 2%가 HCV에 감염되었고, HCV 감염은 종종 간경변 및 간암으로 진행된다[Saito I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 6547-6549; Di Bisceglie AM et al., *J. Clin. Gastroenterol.* 1994; 19: 222-226; Shimotohno K. *Intervirolgy* 1995; 38: 162-169]. 급성 HCV 감염 환자의 약 80%가 만성 간염으로 진행되고 이중 20%는 간경변과 간암으로 진행된다.
- <4> 상기 C형 간염바이러스는 간염, 간경변 및 간암 등 간질환에 중요한 병원체로서, 그 예방이나 치료가 중요한 데에 비해 바이러스의 변이가 심하여 아직까지 효과적인 치료제나 백신이 개발되지 못하고 있다. 현재 C형 간염바이러스의 치료를 위해서 인터페론- α (interferon- α)를 단독 투여하거나 인터페론- α 를 리바비린(ribavirin)과 병용하여 투여하는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 이 두 가지 약물은 C형 간염바이러스에 특이적이지 않고, 심각한 부작용(예컨대 망막증, 갑상선염, 급성체장염 및 우울증)을 유발하며, 모든 C형 간염 환자에게 효과를 보는 것이 아니기 때문에 환자의 상태나 바이러스 계통(strain)에 따라 상이한 효과가 나타난다. 따라서, 이러한 한계를 극복한 C형 간염바이러스 감염 치료에 효과적인 새로운 항바이러스제의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- <5> HCV는 막(envelope)이 있고 그 안에 9.6kb의 게놈이 단선이며 양성(Positive-sense)의 RNA 형태로 존재하는데 이는 플라비바이러스와 페스티바이러스와 상동성이 있다[Miller R.H. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2057-2061; Takamizawa A. et al., *J. Virol.* 1991; 65: 1105-1113]. 게놈은 5' 말단과 [Brown E.A. et al., *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5041-5045; Chen P.J. et al., *Virology* 1992; 188: 102-113] 3' 말단에[Kolykhalov A.A. et al., *J Virol* 1996; 70: 3363-3371; Tanaka T. et al., *J Virol* 1996; 70: 3307-3312] 비해독 부위(Untranslated regions; UTRs)를 가지고 있고 3010개의 아미노산으로 이루어진 폴리프로틴 전구체를 코딩한다. 이 폴리프로틴은 최소한 10개의 기능이 있는 단백질로 프로세싱된다. N-말단에 존재하는 코어단백질과 외피단백질(E1, E2 및 p7)은 구조단백질들로 숙주세포의 시그널 절단효소에 의해 잘려지게 된다

[Hijikata M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5547-5551; Matsuura Y. et al., *Virology* 1994; 205: 141-150; Lin C. et al., *J Virol* 1994; 68: 5063-5073]. 나머지(NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 및 NS5B)들은 비구조 단백질들로 바이러스의 단백질분해효소에 의해 프로세싱된다[Grakoui A. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10583-10587; Bartenschlager R. et al., *J Virol* 1993; 67: 3835-3844; Tomei L. et al., *J Virol* 1993; 67: 4017-4026].

<6> HCV(hepatitis C virus)의 비구조단백질 5B(이하 "NS5B"라 함)는 바이러스에 의해 코딩되는 단백질로 NS5B 단백질은 HCV 복제에 중대한 역할을 하는 RNA-의존 RNA 중합효소(RNA-dependent RNA polymerase; 이하 "RdRp"라 함)로서 HCV-RNA 복제를 촉매하며, 바이러스 게놈 RNA의 5' UTR(untranslated region)을 인식하여 (-)사슬 RNA를 합성하며, 3' UTR을 인식하여 (+)사슬 RNA를 합성하게 된다.

<7> NS5B는 인산화 단백질로 세포질의 핵주강(perinuclear region)에 주로 위치하게 된다. NS5B의 생화학적 구조적 특징은 이미 보고되어 있으며[Lohmann V. et al., *J Virol* 1997; 71: 8416-8428; Lesburg C.A. et al., *Nat Struct Biol* 1999; 6: 937-943], C형 간염바이러스의 증식에 필수적인 NS3 또는 NS5B의 기능을 저해하여 C형 간염을 예방 또는 치료하려는 시도가 있어 왔으나(Stuyver L. et al., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003; 47: 244-254) 아직 효율적인 치료제는 개발되지 않은 실정이다. 현재 RdRp 측정방법 [Behrens S.E. et al., *EMBO J* 1996; 15: 12-22; Ferrari E. et al., *J Virol* 1999; 73: 1649-1654] 및 배양 조건[Wakita T. et al., *Nat Med* 2005; 11: 791-796] 등이 개발되어 있지만 자세한 HCV 복제 기작은 알려져 있지 않다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 따라서, 본 발명의 목적은 효과적인 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하려는 것이다.

과제 해결수단

<9> HCV 복제 기작을 규명하기 위해 본 발명자들은 NS5B 단백질에 특이적인 단일항체를 제작하였다. 본 발명에서는 이 NS5B에 특이적인 단일항체 10종류를 분리, 이용하여 NS5B의 N말단 및 중간 부분에 존재하는 두 인식부위를 확인하였고 그 중 N말단의 NS5B를 인식하는 항체가 RdRp의 활성을 저해함을 발견하였다. 종합해보건대, 본 발명자들은 NS5B가 67번과 88번의 아미노산 사이에 존재하는 B세포의 인식부위(epitope)를 포함하고 있다는 사실을 증명하였다. 또한, 이 인식부위가 항체와 결합되었을 때 NS5B의 효소활성이 억제됨을 밝혔다.

효과

<10> 본 발명에 의하면, HCV NS5B 단백질의 N-말단 인식부위에 결합하는 단일클론항체를 포함하는 HCV 매개 간질환 예방 및 치료제를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<11> 본 발명은 C형 간염 바이러스 NS5B 단백질의 N 말단 부위와 결합하는 항 NS5B 단일클론항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<12> 또한, 본 발명은 상기 N 말단 부위가 67-88 내의 아미노산 부위인 것을 특징으로 하는 항 NS5B 단일클론항체를 포함하는 C형 간염 바이러스 매개 간질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<13> 뿐만 아니라, 본 발명에서 상기 C형 간염 바이러스 매개 간질환은 급성 C형 간염, 만성 C형 간염, 간경변 또는 간암인 것을 특징으로 한다.

<14> C형 간염바이러스의 NS5B는 C형 간염 바이러스(본 명세서에서 "HCV"와 혼용함)의 복제를 담당하는 RdRp를 코딩한다. HCV의 복제에 관여하는 숙주인자를 분리하고 특성을 연구하기 위해 HCV NS5B 단백질에 특이적인 단일클론항체를 제작하였다. 단일클론항체는 효소활성을 갖는 항원인 NS5B를 재조합 배칼로바이러스 발현시스템을 이용하여 곤충세포 내에서 발현하여 얻었다. 이는 곤충세포 내에서 발현되는 단백질들이 발현 후 변형(post-translational modifications) 과정을 거치기 때문이다[Hwang SB et al., *Virology* 1992; 190:413-422]. NS5B 단백질은 곤충세포에서 잘 발현되었으며 진위 여부도 HCV 환자의 혈청을 가지고 확인하였다. 온전한 항원을 분

리하기 위해 NS5B 단백질에 6개의 히스티딘을 결합시켜 Ni-NTA 아가로스 컬럼에서 단일과정으로 거의 순수하게 정제하였다. 21개의 아미노산으로 구성된 NS5B 단백질의 C-말단부분은 소포체에 부착되는 것으로 알려져 있다 [Schmidt-Mende J. et al., *J Biol Chem* 2001; 276: 44052-44063]. 실제 본 실험의 경우에서도 대부분의 단백질들이 곤충세포에서 비가용성 침전물(inclusion pellet)로 발현되었다. 기존 보고에 의하면 HCV-RNA 중합효소 C-말단의 막투과 부분은 중합활성에 필수적이지는 않지만[Yamashita T. et al., *J Biol Chem* 1998; 273: 15479-15486], HCV의 복제에는 필수적이다[Lee K.J. et al., *J Virol* 2004; 78:3797-3802]. 본 발명에서 발명자들은 효소활성을 갖는 HCV-RNA 중합효소를 생산하였다. 그리고 최종적으로 다른 아이소타입(isotype)을 보이는 단일클론항체를 선별하였다. 또한 GST(glutathione S-transferase)가 융합된 단백질을 사용하여 각 단일클론항체의 인식부위를 맵핑하였다. 이 융합단백질들은 원핵세포에서 발현되었기 때문에 적절한 번역 후 변형과정을 거치지 않았기 때문에 원래의 구조를 갖고 있지 않을 것이다. 따라서 NS5B의 단일클론항체가 인식하는 부위는 대부분 선형일 것이며 3차 구조를 띤 인식부위를 의미하지 않을 것이다. 8종류의 단일클론항체는 240-263부분의 중간 부분을 인식하며 두 종류는 67-88번의 N-말단부분을 인식한다. 따라서 현재로서는 C-말단부분을 인식하는 항체는 만들어지지 않았다. 이는 아마도 NS5B의 C-말단부분이 막을 투과하는 부분이라는 성질과 어느 정도의 관련이 있을 것으로 생각된다.

<15> C형 간염 바이러스는 전사 및 복제에 필요한 RdRp를 코딩한다. 우리는 배칼로바이러스에서 발현된 NS5B 단백질을 사용하여 인비트로(in vitro) RdRp 분석방법을 개발하였다. 실제 NS5B 단백질은 전체 게놈 RNA를 합성하였으며 생산된 RNA는 드노보(de novo) 합성에 의해 확장된 것이었다. 그 단백질은 또한 프라이머와는 무관하게 전체 HCV-RNA를 합성하였다. HCV 게놈은 양의 센스(positive-sense) 단일쇄(single-stranded) RNA이기 때문에 마이너스 채(minus-strand) RNA는 게놈 RNA의 3' 말단을 주형으로 하여 합성되어야 한다. 기존에 X 부위가 생체 내(in vivo)에서 바이러스의 복제에 중요한 부분임이 알려져 있다[Kolykhalov AA et al., *J Virol* 2000; 74:2046-2051]. 3'-UTR +X를 주형으로 사용한 인비트로 RdRp 분석법은 이러한 개념을 강력하게 뒷받침하고 있다(도 5). 이 시스템을 이용하여 우리는 NS5B 단일클론항체가 RdRp 활성을 저해함을 밝혔다. NS5B의 중간 부분이 아닌 N-말단부분을 인식하는 단일클론항체가 인비트로에서 HCV-RNA 합성을 양에 비례하여 저해하는 것이다. 어떻게 이 단일클론항체가 RdRp활성의 억제에 관여하는지는 명확하지 않지만, 단지 N-말단 인식 단일클론항체가 결합하면 NS5B 단백질의 구조가 변하고 따라서 RdRp 활성이 변화될 가능성이 있다. 그럼에도 불구하고 중간 부분을 인식하는 단일클론항체나 HA에 대한 항체는 RdRp 활성에 영향을 주지 않았다. 인비트로 중합활성과 바이러스의 복제와는 강한 상관관계가 존재하기 때문에[Cheney IW et al., *Virology* 2002; 297: 298-306], N-말단 인식부위는 아마도 HCV 복제활성도 갖고 있을지 모른다. NS5B의 67-88 부위는 비교적 전하를 띠지 않고 서열이 상당히 보존되어 있다. 이 인식부위는 NS5B의 3차 구조상에서 핑거도메인에 위치하며 따라서 HCV의 복제에 관여하는 복제기구의 한 세포인자와 결합할 수 있다. 또한 이 부위는 HCV 복제에 관여하는 새로운 구조도메인으로 명명할 수 있다.

<16> NS5B의 N-말단에 존재하는 중요인식부위의 발견은 HCV의 복제 기작을 설명하고 HCV에 대한 항바이러스제 및 이를 포함하는 간질환 예방 및 치료제로 이용될 수 있다.

<17> 본 발명의 약학적 조성물에는 상기 HCV NS5B 단백질의 N-말단, 더욱 바람직하게는 67-88 아미노산 부위 내의 부분을 인식하는 단일클론항체를 활성성분으로 하고, 이와 더불어 약학적으로 허용되는 염이 사용될 수 있다. 이때, 약학적으로 허용되는 염이라 함은 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때 활성성분의 작용이 저해되지 않으며 통상 위장 장애, 현기증과 같은 알러지 반응이나 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 염, 예컨대 알칼리 금속염, 알칼리 토금속염, 암모늄염, 아민염, 산 부가염 또는 수화물 염 등을 의미하며, 비독성 및 수용성인 것이 바람직하다.

<18> 상기 약학적으로 허용되는 염으로는 칼륨 또는 나트륨염과 같은 알칼리 금속염; 칼슘 또는 마그네슘염과 같은 알칼리 토금속염; 암모늄염; 트리에틸아민, 메틸아민, 다이메틸아민, 시클로헥틸아민, 벤질아민, 펜에틸아민, 피페리딘, 모노에탄올아민, 다이에탄올아민, 트리스(히드록시메틸)아미노메탄, 리신, 아르기닌 또는 N-메틸-D-글루카민과 같은 아민염; 염산염, 브롬화수소산염, 요오드화수소산염, 황산염, 인산염, 질산염과 같은 무기산염; 아세트산염, 유산염, 주석산염, 안식향산염, 구연산염, 메탄설폰산염, 에탄설폰산염, 벤젠설폰산염, 톨루엔설폰산염, 이세티온산염, 글루쿠론산염, 글루콘산염과 같은 유기산염 등이 바람직하다.

<19> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 상기 단일클론항체를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 유효한 양이라 함은 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 C형 간염바이러스에 의해 매개되는 간질환을 치료 또는 예방

하기에 충분한 양을 말한다.

- <20> 본 발명에 따른 상기 단일클론항체의 약학적으로 유효한 양은 $0.1\mu\text{g} \sim 100\text{mg/day/체중kg}$, 바람직하게는 $1\mu\text{g} \sim 10\text{mg/day/체중kg}$ 이다. 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 및 이의 중증 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- <21> 상기 약학적으로 허용되는 담체로는 모든 약제학적으로 사용되는 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수에멀전, 수성 조성물, 리포솜, 마이크로비드 및 마이크로솜이 포함될 수 있다.
- <22> 본 발명의 약학적 조성물이 적용될 수 있는 질환은 C형 간염바이러스 매개 간질환이다. 상기 간질환이라 함은 C형 간염바이러스에 의해 유발되며, 급성 C형 간염, 만성 C형 간염, 간경변, 간암 등을 포함하며, 나열된 질환의 종류로만 제한되는 것은 아니다.
- <23> C형 간염바이러스는 (+)쇄인 RNA 게놈을 가진 바이러스이며, 게놈의 복제를 위해서는 주형 역할을 하는 (-)쇄 RNA가 합성되어야 하며, (-)쇄 RNA에서 (+)쇄 RNA가 합성되어야 한다. 이러한 합성에 관여하는 단백질이 C형 간염바이러스가 가지고 있는 NS5B, 즉 RdRp(RNA 의존적 RNA 중합효소; RNA dependent RNA polymerase)이다. 따라서, 상기 RNA 중합효소의 활성을 저해하면 C형 간염바이러스의 증식이 억제되며, 그 결과 C형 간염바이러스에 의해 유발되는 간질환 등 각종 질환을 예방 또는 치료할 수 있게 되는 것이다.
- <24> 한편, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 투여 경로에 따라 적합한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적 투여 경로는 예컨대, 경피, 비강, 복강, 근육, 피하 또는 정맥 등의 여러 경로를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 경구 투여용 담체와 함께 당 업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액 등의 형태로 제형화될 수 있다. 적합한 담체의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 필요에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 상기 약학적 조성물은 윤활제, 습윤제, 향료, 향유집제, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- <25> 또한, 비경구적으로 투여하는 경우 본 발명의 약학적 조성물은 적합한 비경구용 담체와 함께 주사제, 경피 투여제와 같은 형태로 당 업계에 공지된 방법에 따라 제형화될 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물성 오일을 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 좀더 바람직하게는, 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로즈와 같은 등장 용액 등을 적합한 담체로 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올 등의 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 당 또는 NaCl 등의 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- <26> 기타 약학적으로 허용되는 담체로는 Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed.(Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다.
- <27> 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 하나 이상의 완충제 예컨대, 식염수 또는 PBS, 글루코스, 만노즈, 슈크로즈 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 항산화제, EDTA 등의 킬레이트제, 현탁제, 농후제 및/또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- <28> 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속한 방출, 지속적인 방출 또는 방출을 지연시킬 수 있도록 본 발명이 속하는 분야에 공지된 방법을 사용하여 제형화할 수 있다.
- <29> 뿐만 아니라, 본 발명의 약학적 조성물은 간질환 예방 및/또는 치료 효과를 나타내는 인터페론- α 또는 리바비린과 같은 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.
- <30> 아래에서는 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

<31> **실시예 1: NS5B 발현백터와 재조합 배칼로바이러스의 구성**

<32> 한국인으로부터 분리한 HCV[Cho YG et al., *Mol Cells* 1993; 3: 195-202]의 NS5B에 대한 재조합 배칼로바이러스 전이 백터의 구성은 폴리히스티딘이 NS5B의 N 말단에 결합된 것을 제외하고는 선행 논문[Hwang SB et al., *Virology* 1997; 227: 439-446]에 기재된 것과 같다. pAcHLT-C(www.bdbiosciences.com 참조)의 Bgl II 부위에 클로닝하였다. 다이디옥시뉴클레오타이드 사슬 종료법(Dideoxynucleotide chain termination)으로 서열을 확인한 오토그래프와 캘리포니카 핵다면체 바이러스(AcNPV) DNA(BD Biosciences Pharmingen site 참조)와 NS5B의 재조합 백터 DNA를 스포도테라 프루기페다(이하 "Sf9") 세포에 주입하였다. DNA 트랜스팩션은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자들에게 널리 알려진 calcium phosphate precipitation 방법으로 수행하였다(*Virology* 101: 286-290, 1980). 재조합 배칼로바이러스를 선택하여 기존의 방법대로 플라크정법(plaque assay)을 통해 증폭하였다[Hwang SB et al., *Virology* 1997; 227: 439-446; Hwang SB et al., *Virology* 1992; 190: 413-422]. NS5B를 곤충세포에서 발현하기 위해 Sf9세포를 재조합 배칼로바이러스로 감염시킨 후 감염 3일 후에 수확하였다. 세포추출물을 SDS-PAGE 전기영동법으로 분석하였고, 단백질의 발현은 쿠마지 용액으로 염색하거나, 환자의 혈청이나 토끼에서 생산한 NS5B 폴리클론항체를 이용한 면역블랏을 통해 확인하였다. 인식부위 조사를 위해 PCR 방법으로 NS5B 적중 변이주를 생산하여 GST를 융합하여 대장균 BL21 (DE3)균주(Novagen, San Diego, CA, USA)에서 발현시켰다.

<33> **실시예 2: 세포 및 바이러스 세포**

<34> Sf9는 Graces 곤충조직배양액(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% FBS를 첨가하여 27℃에서 배양하였다. 재조합 배칼로바이러스는 기존의 방법 [Hwang SB et al., *Virology* 1997; 227: 439-446; Hwang SB et al., *Virology* 1992; 190: 413-422]대로 유지하였으며 감염 다중치(m.o.i)를 9-10 정도로 하여 곤충세포를 감염하는데 사용하였다. 하이브리도마 세포는 10% FBS와 100units/ml의 스트렙토마이신, 100units/ml의 페니실린(Invitrogen)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다.

<35> **실시예 3: 쥐면역 실험**

<36> 8주된 암쥐 BALB/c에 50μg의 기능적으로 활성 있는 재조합 NS5B 단백질과 동일부피의 프로인드 완전 어쥬번트(Complete Freund's Adjuvant)를 혼합하여 복강주사하였다. 2-3주간격으로 프로인드 불완전 어쥬번트와 50μg의 단백질 혼합액을 4회 주사하여 면역반응을 촉진시켰다. 레트로오비탈 정맥총(retro-orbital plexus)으로부터 피를 채취하여 항체 생산여부를 조사하였다.

<37> **실시예 4: NS5B 특이 단일클론항체 생산**

<38> 마지막 주사 3일 후 쥐를 희생시켜 비장을 절취하였다. PEG 1500을 넣고 약하게 흔들어주면서 비장세포를 SP2/0 골수종 세포와 융합시킨 후 PEG 용액은 1100g에서 5분간 원심분리하여 제거하였다. 융합세포들을 96-웰 마이크로 타이터플레이트에 깔고 상층액을 취하여 NS5B의 항체 존재여부를 면역블랏터(Immunetics, Cambridge, MA, USA)를 이용한 블랏방법으로 조사하였다. 양성반응을 보이는 클론들을 제한적 희석방법을 통해 2회에 걸쳐 선별하였다. 그리고 최종 단백질 A 세파로스 걸림을 이용하여 단일클론항체를 정제하였다.

<39> **실시예 5: NS5B 단일클론항체의 아이소타입핑(isotyping)**

<40> 아이소스트립(IsoStrip) 단일클론항체 아이소타입핑(isotyping) 키트 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)를 이용하여 기존의 방법대로 NS5B 단일클론항체의 종류를 결정하였다. 간단히 말하자면, 각각의 단일클론항체를 PBS를 이용하여 100배 희석하였다. 150μl의 희석용액을 현상튜브에 색깔을 띠는 라텍스구슬과 섞은 후 1분간 약하게 저은 후 상온에서 보관하였다. 그 후 아이소타입핑 스트립을 현상튜브에 놓은 다음 5-10분간 반응시켜 아이소타입 종류가 눈에 보이게 하였다.

<41> **실시예 6: HCV-RNA 중합효소의 정제**

<42> Sf9 곤충세포를 재조합 배칼로바이러스로 감염시킨 다음 3일 후에 수확하여 PBS로 2회 세척하였다. 세포 침전물을 결합 완충액[1% Nonidet P-40, 10% 글리세롤, 50mM 인산나트륨(pH 7.5), 300mM NaCl, 10mM 머캅토에탄올, 10mM 이미다졸, 1mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)]에 풀어준 후 얼음에 놓은 채 초음파로 파괴하였다. 180,000g에서 15분 동안 원심분리하여 맑은 세포추출물을 얻었다. 침전물은 결합완충액에 넣고 풀어준 후 초음파로 파쇄하고 다시 한번 맑은 추출물을 얻었다. 두 추출물들을 섞은 후 미리 평형화시킨 Ni-NTA 아가로스 걸림(Qiagen, Hilden, Germany)에 통과시켰다. 50mM 이미다졸 용액으로 충분히 세척한 후 결합된 NS5B 단백질을 이미다졸 농도로 50~300mM까지 구배를 주어 용출하였다. NS5B의 농도가 높은 분획들을 모아 10% 글리세롤, 50 mM

Tris-HCl (pH 7.5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT(dithiothreitol) 및 1mM PMSF로 구성된 용액에 대해 투석하였다. 단백질 정량은 Bio-Rad 정량키트(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행하였으며 효소를 분획하여 영하 80℃에서 보관하였다.

<43> **실시예 7: 면역블랏 분석**

<44> Sf9 곤충세포를 재조합 배콜로바이러스로 감염시킨 후 3일 후에 수확하여 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 라멜리 샘플 완충액에 넣어 5분간 끓인 후 15분간 원심분리하였다. 세포 추출액 또는 정제된 NS5B단백질을 10% SDS-PAGE 겔에서 전개시킨후 나이트로셀룰로스 멤브레인에 4℃에서 1시간 동안 이동시켜 붙였다. 멤브레인을 5% 탈지분유와 상온에서 1시간 반응시킨 후 HCV 환자혈청 또는 토끼에서 생산한 NS5B 항체와 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. TNT 완충액[10mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20]으로 세척한 멤브레인을 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 부착된 항인간 2차 항체와 2시간 동안 반응시킨 후 ECL 키트(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)를 이용하여 단백질을 동정하였다.

<45> **실시예 8: RNA 주형 준비**

<46> 전체 RNA 계층을 얻기 위해 gHCV cDNA[Cho YG et al., *Mol Cells* 1993; 3: 195-202]를 Xho I으로 절단하고 T7 RNA 중합효소(Promega Madison, WI, USA)를 사용하여 37℃에서 2시간 동안 시험관 전사를 행하였다. 그 후 DNA 주형을 37℃에서 20분간 RQ1 DNase(Promega)로 처리하여 제거하였다. T7 RNA 중합효소를 제거하기 위해 시료를 페놀-클로로포름용액으로 2회, 클로로포름으로 1회 추출하였고, RNA를 에탄올에서 침전시켜 회수하였다. 3' UTR-X RNA를 회수하기 위해 HCV의 3'-X부분에 해당하는 cDNA를 pcDNA 3 벡터 내 BamHI 부위에 클로닝하였다. EcoRI으로 절단한 후 전사체를 T7 RNA 중합효소로 합성하고 RNA를 위에 설명한 바와 같이 회수하였다.

<47> **실시예 9: 시험관 내(In vitro) RdRp 측정**

<48> RNA-의존 RNA 중합효소측정을 기존의 방법[Oh JW et al., *J Virol* 1999; 73: 7694-7702]에서 약간 변형하여 행하였다. 간단히 말하면, 반응은 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 5mM MgCl₂, 50mM NaCl, 100mM KCl, 1mM DTT, 10% 글리세롤, 50μg/ml 액티노마이신 D(actinomycin D), 40units의 RNase 억제제, 0.5mM의 각 ATP, CTP 및 GTP, 5uM의 UTP, 10uCi의 [α -32P] UTP, 그리고 1.5μg의 주형 RNA 용액 50μl에 200ng의 NS5B 단백질을 넣어 22℃에서 2시간 동안 반응시켜 전체 RNA 합성을 시행하고 20분간 반응시켜 3'-UTR-X RNA 합성을 시행하였다. 반응 후 만들어진 RNA를 페놀-클로로포름용액(Ambion Foster City, CA, USA)으로 추출하였고 다시 암모늄아세테이트-이소프로판올 용액으로 침전시켰다. 그 후 다시 변성완충액(95% 포름아마이드, 10mM EDTA)에서 95℃로 2분간 가열하여 0.9% 아가로스 겔 또는 8M 우레아가 들어있는 SDS-PAGE 겔에서 분석하였다. 겔을 고정한 후 건조시켜 X-레이 필름에 감광시키는데 사용하였다.

<49> 상기 실시예에 의하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

<50> **결과 1: HCV NS5B 단백질의 발현 및 정제**

<51> NS5B 특이 단일클론항체를 얻기 위한 항원을 준비하기 위해 NS5B를 코딩하는 gHCV의 cDNA를 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터가 있는 배콜로바이러스의 서플렉터에 클로닝하였다. 단백질 정제를 용이하게 하기 위해 폴리히스티딘기를 NS5B의 N-말단에 붙였다. 그 다음 재조합 배콜로바이러스를 얻기 위해 기존의 방법대로 NS5B 유전자를 포함하는 벡터(pAcHLT-NS5B)와 야생형 AcNPV-DNA를 동시에 주입하였다. 그 결과 만들어진 재조합 바이러스를 사용하여 Sf9세포를 감염시켰으며 단백질 발현을 조사하였다. 도 1의 왼쪽에서 보는 바와 같이 약 68kDa의 크기를 갖는 주요단백종이 검출되었고 바이러스감염된 세포에서 NS5B 단백질이 가장 많은 양을 차지하였다. NS5B의 진위 여부는 토끼에서 생산한 NS5B 폴리클론항체(도 1의 오른쪽) 또는 환자혈청(결과제시 안함)을 이용한 면역블랏으로 확인하였다. 토끼에서 생산한 항체는 NS5B 단백질만을 인지하였으나 실험군이나 HCV 코아단백질에는 반응을 하지 않았다(도 1의 오른쪽). 또한 NS5B 단백질이 정상인의 혈청과는 반응하지 않음을 확인하였다(결과제시 안함). 또한 재조합 배콜로바이러스 감염세포 내에서 NS5B 단백질이 비교적 안정함도 관찰하였다.

<52> 비교적 손상되지 않은 단백질을 얻기 위해 NS5B 단백질을 Ni-NTA 아가로스 친화컬럼을 이용하여 단일과정으로 정제하였다. 컬럼에 결합된 NS5B 단백질을 50mM 이미다졸로 충분히 세척한 후 50~300mM의 이미다졸 농도구배에서 용출시켰다(도 2 위쪽). 정제된 단백질의 성질은 HCV 환자의 혈청으로 확인하였다(도 2 아래쪽).

<53> **결과 2: 재조합 배콜로바이러스가 감염된 곤충세포로부터 정제된 NS5B 단백질은 드노보(de novo) RNA 합성에 기능적으로 활성적임**

<54> 면역 전에 NS5B단백질이 효소적으로 활성이 있는지 알아보기 위해 HCV-RNA의 전사체를 주형으로 하여 RdRp 분석을 시행하였다. 세포추출물로부터 나온 DNA-의존 RNA 중합효소가 섞일 가능성을 배제하기 위해, 액티노마이신 D를 반응액에 첨가시켰다. 도 3에서 보는 바와 같이 NS5B 단백질은 외부에서 프라이머를 넣지 않아도 RNA를 합성하였다. 새로 합성된 RNA의 크기가 시간에 따라 증가하여 22℃에서 2시간 내에 9.5kb까지 도달하였다(도 3의 2, 3번째 레인). 이 결과는 새로운 RNA 생성물이 처음부터 생산된 것으로 재조합 배클로바이러스가 감염된 곤충세포로부터 정제된 NS5B 단백질이 기능적으로 활성이 있으며, 따라서 동물의 면역반응에 효율적인 항원임을 말해주고 있다. 실험군으로 HCV 코어 단백질을 같은 세포에서 정제하여 사용한 결과 어떤 RNA도 생성되지 않았다(결과 제시 안함).

<55> **결과 3: 재조합 배클로바이러스에서 생산된 NS5G 단백질을 면역주입한 쥐로부터 NS5B에 특이적인 단일클론항체의 생산 및 특성연구**

<56> HCV 복제기작을 조사하기 위해 NS5B 단백질 특이 단일클론항체를 제작하였다. 기존에 설명한 바와 같이 효소활성이 있는 NS5B 단백질을 준비하여 쥐의 면역에 사용하였다. 하이브리도마 세포를 다채널 미니블랏터를 사용하여 스크리닝하여 NS5B 단백질에 대한 항체를 만들었다. 그 결과 NS5B 단백질에 특이적인 10종류의 단일클론항체를 분리하였다. 1-197, 198-394, 395-591 부분이 제거된 세 종류의 NS5B 변이단백질을 사용하여 각 단일클론항체가 결합하는 부위를 결정하였다. 8종류의 항체는 NS5B 단백질의 중간 부분을 인식하였고 두 종류는 N-말단부위를 인식하였다. 이 항체들의 특성은 표 1에 요약되어 있다.

표 1

단일클론항체	아이소타입	인식부위(아미노산)	RdRp 억제
AG2	IgG 1κ	240-263	-
BD2	IgG 1κ	240-263	-
BD7	IgG 2bκ	240-263	-
CC3	IgG 1κ	240-263	-
DE9	IgG 1κ	240-263	-
EA6	IgG 1κ	67-88	+
EB3	IgG 1κ	240-263	-
FD8	IgG 1κ	240-263	-
RP3	IgG 2aκ	67-88	+
RP5	IgG 2bκ	240-263	-

<58> **결과 4: NS5B 단백질의 중간 인식부위 맵핑**

<59> NS5B 단백질의 중간부분중 정확한 인식부위를 결정하기 위해 도 4a와 같이 NS5B 변이단백질을 구축하여 각각의 부분을 GST에 융합시켜 대장균에서 발현시켰다. 야생형 및 변이단백질을 10% SDS-PAGE 겔에서 전개하였다. 쿠마지 브릴리언트 블루로 염색해 본 결과(도 4b), 이 융합단백질들이 대장균에서 다량으로 발현됨을 확인하였고 각각 변이단백질의 진위 여부는 토끼에서 생산한 NS5B 단백질의 폴리클론항체를 사용하여 면역블랏으로 확인하였다(결과 제시 안함). 도 4c에서 보는 바와 같이 단일클론항체 RP5는 1-263 및 240-394 아미노산으로 구성된 NS5B 변이단백질에 결합하였다. 그러나 220-239 및 264-394에 해당하는 변이주와는 결합하지 않았다. 이 결과를 통해 아미노산 240-263부분이 인식부위임을 확인하였다. 아이소타입이 다른 7개의 단일클론항체를 조사한 결과는 RP5의 결과와 동일하였다.

<60> **결과 5: NS5B 단백질 N-말단 맵핑**

<61> 그 다음 NS5B 단백질의 N-말단 인식부위를 결정하고자 했다. 도 4d에서 보는 바와 같이 GST가 융합된 NS5B 변이체를 제작하여 대장균에서 발현하였다. 야생형 및 변이단백질들을 SDS-PAGE에서 전개하여 쿠마지 브릴리언트 블루로 염색하여 확인하였고(도 4e) 진위 여부는 토끼에서 생산한 NS5B 단백질의 폴리클론항체를 사용하여 면역블랏으로 확인하였다(결과 제시 안함). 도 4f에서 보는 바와 같이, 아미노산 67-132에 해당하는 변이 단백질이 단일클론항체 RP3와 결합하였다. 하지만 아미노산 1-66 및 89-197에 해당하는 단백질과는 결합하지 않았다. 따라서 아미노산 67-88에 해당하는 부분이 NS5B 단백질의 인식부위임을 확인하였다. 또한 67-88부분에 해당하는 펩타이드를 합성하여 결합실험을 하여 이를 확인하였다(결과 제시 안함). 또한 다른 단일클론항체 EA6도 같은 부

위를 인식함을 확인하였다(표 1). EA6와 Rp3는 다른 아이소타입이므로 다른 하이브리도마 세포로부터 유래됨을 나타내는 것이다.

<62> 결과 6: N-말단 특이적인 단일클론항체에 의한 RdRp 활성 억제

<63> HCV 게놈의 3' 말단에 있는 X부위가 RNA 합성에 중요함이 보고되었다[Kolykhalov AA et al., *J Virol* 1996; 70: 3363-3371]. 따라서 제작된 단일클론항체 중에 RNA 합성을 저해하는 종류가 있는지 조사하기 위해 시험관내 (in vitro)에서 합성된 3'UTR-X를 주형 RNA로 하고 단일클론항체의 농도를 기록한 대로 바뀌가며 RdRp 분석을 시행하였다. 도 5의 위쪽 사진에서 보는 바와 같이 주형과 같은 사이즈의 RNA가 NS5B RNA 중합효소에 의해 효과적으로 합성되었다(3번째 레인). NS5B의 중간 부분을 인식하는 단일클론항체나 플래그(Flag)에 대한 단일클론항체는 비록 고농도 존재시 중합활성을 약간 감소시켰지만 HCV RNA 합성을 완전 저해시키지는 않았다. 이는 HCV의 전체 게놈 RNA를 주형으로 한 실험을 통해서도 확인하였다(결과 제시 안함). 놀랍게도, EA6 단일클론항체가 처리농도에 비례하여 RdRp 활성을 저해하였다(도 5a의 4-6 레인). RP3도 같은 저해효과가 있음을 확인하였다(도 5의 아래쪽 사진). 이 두 단일클론항체는 모두 같은 NS5B 단백질의 N-말단부위를 인식하기 때문에, 이 인식부위가 HCV 복제에 있어 중요한 생물학적 활성부위임을 알 수 있었다. 하지만 NS5B의 중간 부분을 인식하는 다른 단일클론항체들은 HCV-RNA 합성을 저해할 수 없었다(결과 제시 안함). 이러한 결과는 NS5B의 N-말단부위를 인식하는 단일클론항체가 시험관내 RNA 합성을 저해함을 분명하게 보여주고 있다.

도면의 간단한 설명

<64> 도 1은 야생형 NS5B 단백질 발현 및 정제에 관한 도면이다.

<65> 좌측 사진: Sf9 곤충 세포를 HCV NS5B 단백질(레인 2)이나 HCV 코어 단백질(레인 3)을 발현하는 재조합 배클로 바이러스로 감염시켜 감염 3일 후 수확하였다. 총 세포 용균액은 10% SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하였고, 단백질은 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. 화살표는 Sf9 세포에서 발현된 NS5B 단백질을 나타낸다.

<66> 우측 사진: 동일한 세포 용균액을 분리하여 나이트로셀룰로즈 막에 전기이동 시켰다. NS5B 단백질은 토끼 항-HCV NS5B 항체로 면역블랏팅하였다. M: 대조군(mock-infected cells).

<67> 도 2는 Sf9 곤충 세포에서 발현된 HCV NS5B 단백질을 Ni-NTA 아가로스-친화 크로마토그래피로 원스텝으로 정제한 것을 나타내는 사진이다. 각각 다른 농도의 이미다졸(Id)로 정제한 단백질을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동으로 분리하고 쿠마시 브릴리언트 블루(위쪽 사진) 또는 환자의 혈장(아래쪽 사진)으로 면역블랏팅하여 분리하였다.

<68> 도 3은 재조합 배클로바이러스-감염 곤충 세포로부터 정제한 NS5B 단백질에 의한 전장 HCV-RNA 합성을 나타낸 도면이다. RdRp 활성 측정은 인비트로 합성된 9.5kb HCV RNA를 주형으로 10 μ Ci의 [α -32P] UTP의 존재 하에 실시예 기재와 같이 수행하였다. 반응은 지정된 시각에 종료되고 RNA 산물은 페놀-클로로포름으로 추출하였고, 아세트산암모늄-아이스프로판올로 침전시켰다. 시료는 0.9% 아가로스 젤 상에서 분석하고, 새로 합성된 RNA는 방사선 사진 촬영으로 측정하였다.

<69> 도 4는 NS5B 단백질의 M과 N 인식부위(epitope)를 맵핑한 결과이다.

<70> 도 4a는 NS5B 중앙 도메인의 인식부위 맵핑에 사용된 HCV NS5B 돌연변이체의 개요도이다. 결합 결과는 오른쪽 패널에 나타나있다.

<71> 도 4b는 이콜라이(E. coli) 박테리아에서 발현된 GST-NS5B 융합단백질을 나타낸다. 부분 정제된 단백질은 SDS-PAGE로 분리하여 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. GST-NS5B 융합단백질은 화살표로 나타내었다.

<72> 도 4c는 GST-NS5B 융합단백질을 단일클론항체 RP5(mAb RP5)로 면역블랏 분석한 것이다.

<73> 도 4d는 NS5B 단백질의 N-말단 도메인의 인식부위 맵핑에 사용된 HCV NS5B 돌연변이체 구조의 개요도이다.

<74> 도 4e는 이콜라이(E. coli) 박테리아에서 발현된 GST-NS5B 융합단백질을 나타낸다. 부분 정제된 단백질은 SDS-PAGE로 분리하여 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다. GST-NS5B 융합단백질은 화살표로 나타내었다.

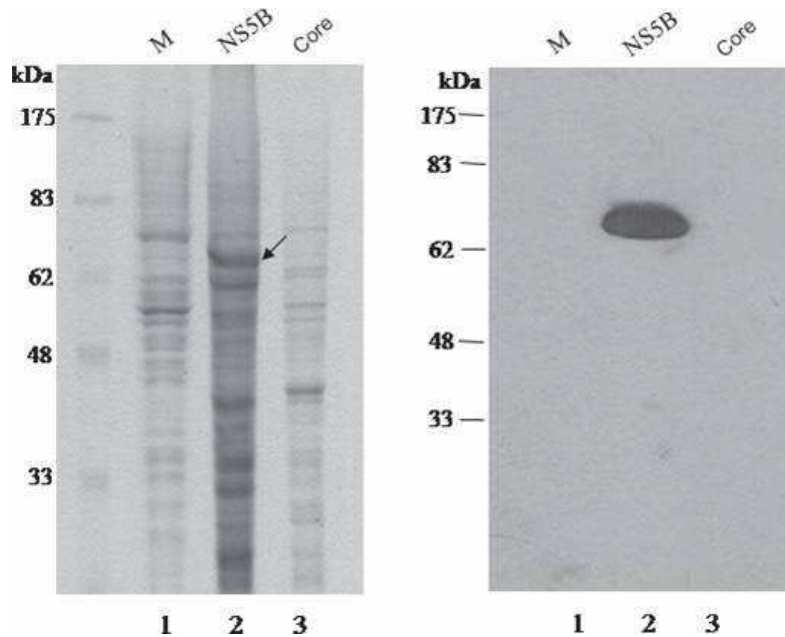
<75> 도 4f는 GST-NS5B 융합단백질을 단일클론항체 RP3(mAb RP3)로 면역블랏 분석한 것이다.

<76> 도 5는 NS5B N-말단-특이적 단일클론항체에 의한 RdRp 활성 억제를 나타낸다.

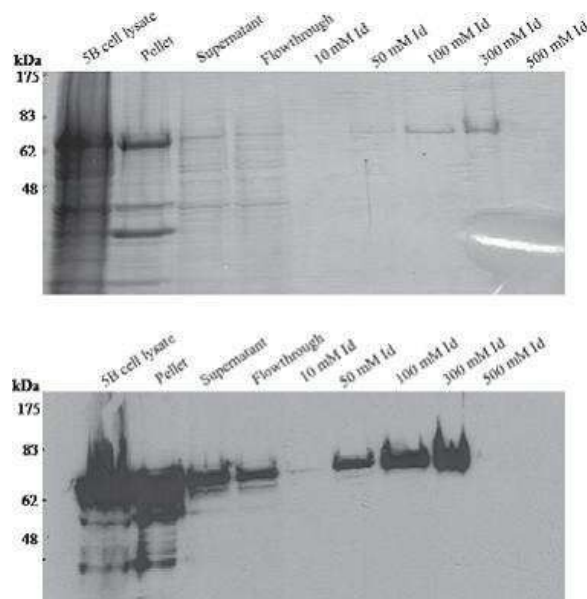
- <77> 윗부분 사진에서 RdRp 활성 측정은 인비트로 합성된 차가운 3' UTR-X RNA 주형을 이용하여 수행하였다. 제조합 배칼로바이러스 감염 Sf9 세포로부터 정제된 HCV NS5B 단백질을 지시된 양의 단일클론항체와 함께 10분간 배양하고 NTPs와 주형 RNA를 더하여 25℃에서 20분간 RdRp 반응을 수행하였다. 신규 합성된 RNA 산물은 8M 우레아를 함유한 8% 폴리아크릴아마이드 겔에서 분석하고 방사선 사진촬영으로 측정하였다.
- <78> 아랫부분 사진은 NS5B N-말단-특이적 단일클론항체 RP3에 의한 RdRp 활성 억제를 나타낸다. RdRp 활성측정은 RP3 단일클론항체의 양을 늘려가며 수행하였다. 화살표는 주형 크기의 RNA 산물을 나타낸다 (208 뉴클레오타이드).
- <79> IVT: 사이즈 마커로 사용된 인비트로 전사된 RNA.

도면

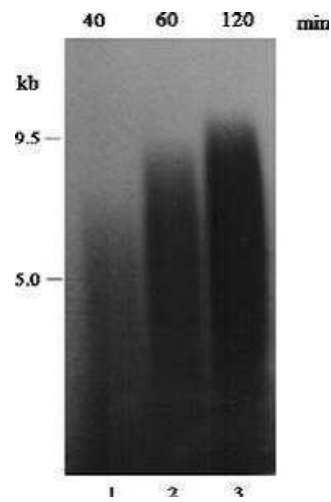
도면1



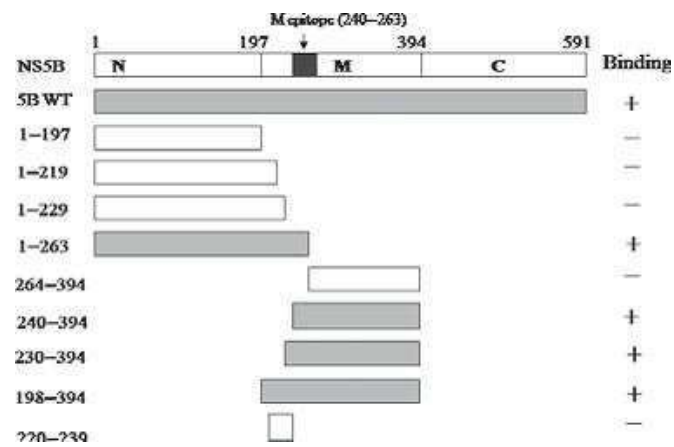
도면2



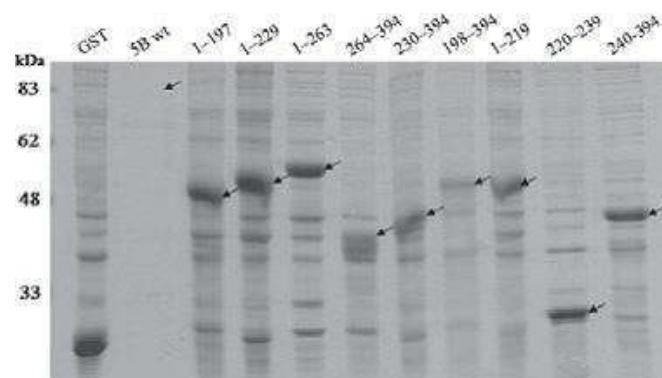
도면3



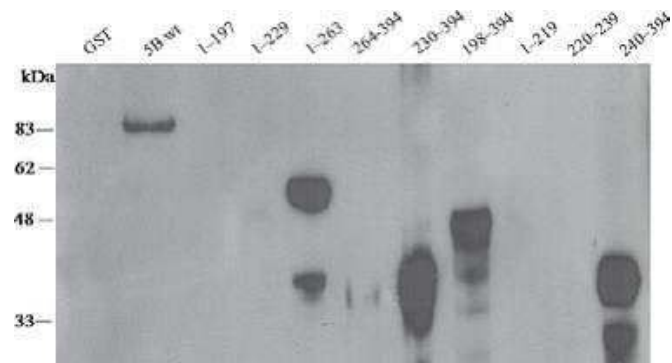
도면4a



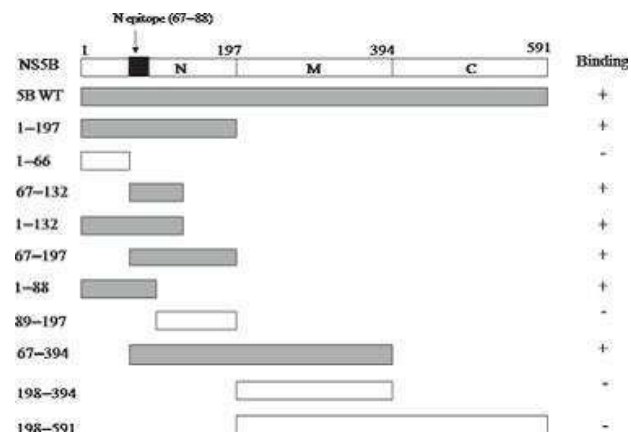
도면4b



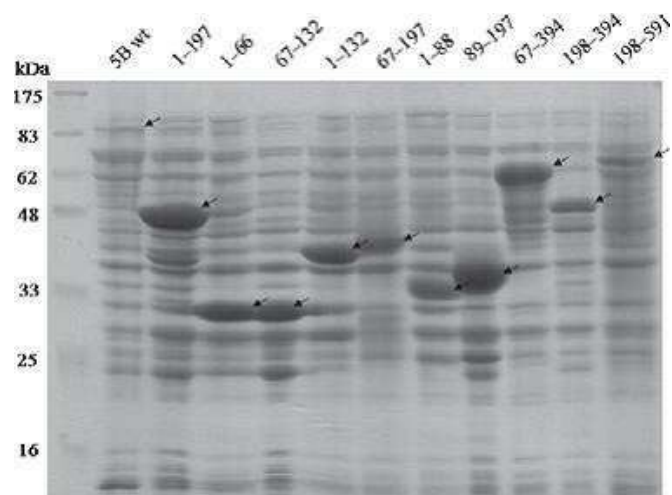
도면4c



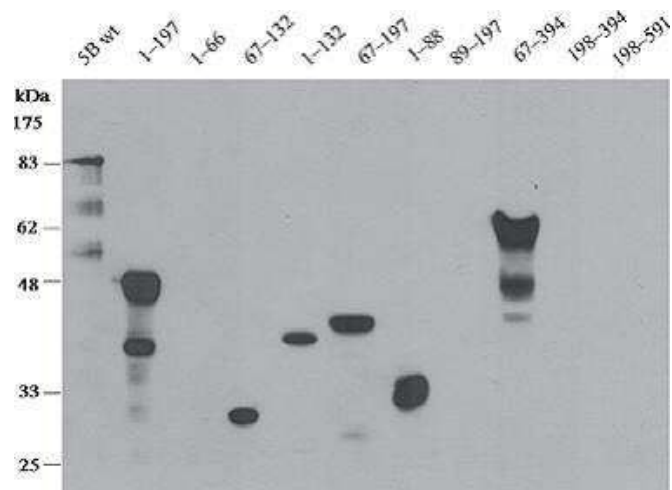
도면4d



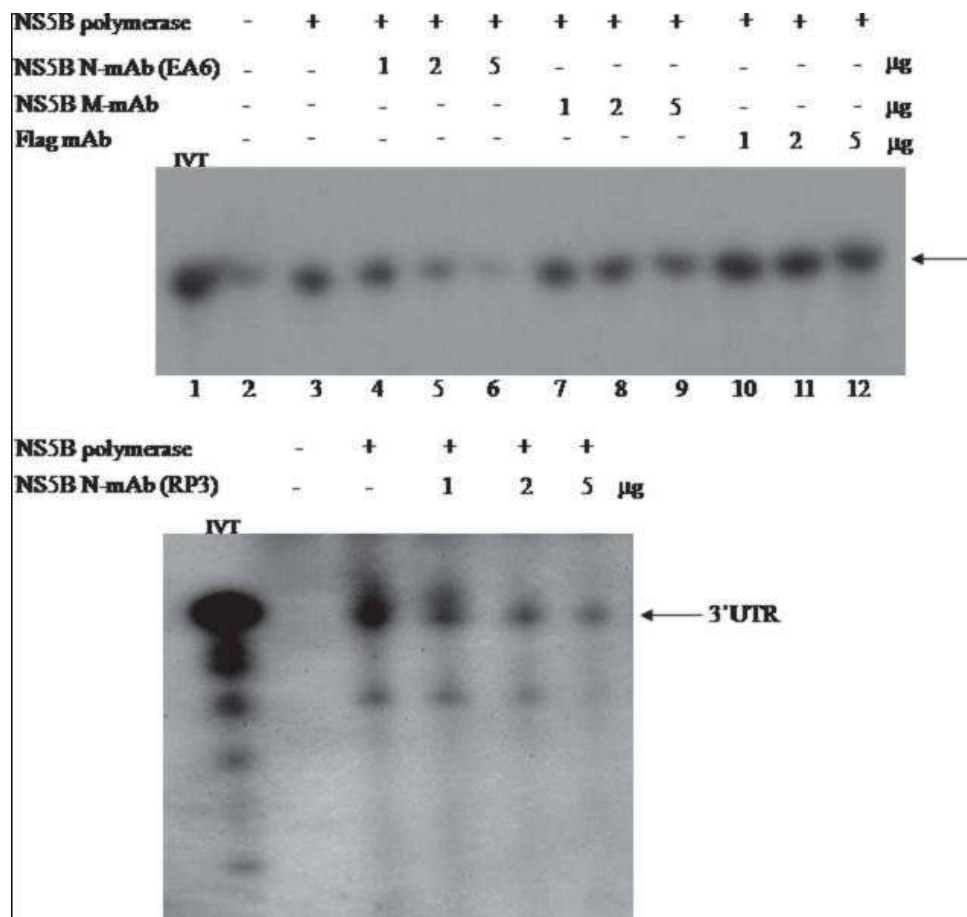
도면4e



도면4f



도면5



서열 목록

- <110> Industrial Academic Cooperation foundation, Hallym University
 <120> Pharmaceutical composition for prevention and treatment of

hepatitis C virus-mediated liver disease

<130> hallym-sbhwang01

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 9075

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cDNA for HCV-NS5B

<400> 1

ccatgagcac gaatcctaaa cctcaaagaa aaaccaaagc taacaccaac cgccgcccac 60

aggatattaa gttcccgggc ggtggtcaga tcgttgggtg agtttacttg ttgccgcgca 120

ggggccccag gttgggtgtg cgcgcgacta ggaagacttc cgagcggtcg caacctcgtg 180

gaaggcgaca gcctatcccc aaggctcgcc ggcccagagg cagggcctgg gtcagccccg 240

ggtacccttg gccctctat ggcaatgagg gcttgggtg ggcaggatgg ctctgtcac 300

cccgcggctc cggcctagt tggggcccca cggacccccg gcgtaagtcg cgtaatttgg 360

gtaaggtcat cgacaccctc acatgcggct tcgccgacct catgggttac attccgctcg 420

tcggcgcgcc cctagggggc gttgccaggg ccctggcaca tgggtgccgg gtgctggagg 480

acggcgtgaa ctatgaaca gggaatctgc ccggttgctc tttctctatc ttctcttgg 540

ctctgtgtc ttgtttgacc accccagttt ccgcttatga agtgcgtaac gcgtccggga 600

tgtaccatgt cacgaacgac tgctccaact caagcattgt gtatgaggca gcggacatga 660

tcatgcacac tcccgggtgc gtgccctgcg ttcgggagga caactcctcc cgttgctggg	720
tggcacttac tcccacgtc gcggccagga atgccagcgt cccactacg acattgcgac	780
gccatgtcga ctigctcgtt ggggtagctg ctttctgttc cgctatgtac gtgggggacc	840
tctgcggatc tgttttctt gtttcccagc tgttcacctt ttcgcctcgc cggcatgaga	900
cggtagagga ctgcaactgc tcaatctatc ccggccgcgt atcaggtcac cgcattgcct	960
gggatatgat gatgaactgg tcgcctacaa cagccctagt ggtatcgag ctactccgga	1020
tcccacaagc tgtcgtggac atggtgacag ggtccactg gggaatcctg gcgggccttg	1080
cctactattc catggtgggg aactgggcta aggtcttaat tgcgatgcta ctctttgccg	1140
gcgttgacgg aaccacccac gtgacagggg gggcgcaagg tcgggccgct agctcgctaa	1200
cgccccctt tagccccggg ccggttcagc acctccagct cataaacacc aacggcagct	1260
ggcatatcaa caggaccgcc ctgagctgca atgactccct caacactggg ttgtgtgccg	1320
cgctgttcta caaatacagg ttcaacgcgt ccgggtgccc ggagcgcttg gccacgtgcc	1380
gccccattga tacattcgcg caggggtggg gtcccatcac ttacactgag cctcatgatt	1440
tggatcagag gcctattgc tggcactacg cgcctcaacc gtgtggtatt gtgccacgt	1500
tgcaggtgtg tggcccagta tactgcttca ccccgagtcc tgttcgggtg gggactaccg	1560
atcgtttcgg tgccccata tacagatggg gggcaaatga gacggacgtg ctgctcctta	1620
acaacgccgg gccgccgcaa ggcaactggt tcggctgtac atggatgaat ggcactgggt	1680
tcaccaagac atgtgggggc cccccgtga acatcggggg ggtcggaac aataccttga	1740
cctgccccac ggactgcttc cgaaagcacc ccggggccac ttacacaaa tgcggttcgg	1800
ggccttggtt aacaccagg tgcttagtcg actaccgta caggtcttgg cattaccct	1860

gcactgtcaa ctttaccatc ttttaaggta ggatgtacgt ggggggcgcg gagcacaggc	1920
tcgacgccgc atgcaactgg actcggggag agcgtttga cctggaggac agggataggt	1980
cagagcttag cccgtgtctg ctgtctacaa cagagtggca ggtactgccc tgttccttca	2040
caacctacc ggctctgtcc actggtttga ttcattccca tcagaacatc gtggacatac	2100
aatacctgta cggtataggg tcggcgggtg tctcctttgc gatcaaatgg gagtatattg	2160
tgtgtctctt ctttcttctg gcggacgcgc gcgtctgcgc ttgcttgtgg atgatgctgc	2220
tggtagcgca agccgaggcc gccttagaga acctggtggt cctcaatgca gcgtccgtgg	2280
ccggagcgca tggcattctt tcttcattg tgttcttctg tgtgcctgg tacatcaagg	2340
gcaggtggt tcccgagcg gcatacgccc tctatggcgt atggccgtg cttctgcttc	2400
tgttgcggtt accaccacgg gcgtacgcca tggaccgga gatggcgca tcgtgcggag	2460
gcgcggtttt tgiaggctg gtactcttga ccttgtcacc aactataaa gtgttccttg	2520
ccaggttcat atggtggcta caatatctca tcaccagaac cgaagcgcat ctgcaagtgt	2580
gggtccccc tcicaacgtt cgggggggtc gcgatgcat catctcttc acatgcgtgg	2640
tccaccaga gctaattctt gacatcaca aatatttct cgccatattc ggcccgtca	2700
tggtgtcca ggccggcata actagagtgc cgtacttct gcgcgcacaa gggtcattc	2760
gtgcatgcat gttggcgcg aaagtcgtgg ggggtcatta cgtccaaatg gtcttcatga	2820
agctggccgc actagcaggt acgtacgtt atgaccatct tactccactg cgagattggg	2880
ctcacacggg cttacgagac cttgcagtgg cagtagagcc cgttgtcttc tctgacatgg	2940
agaccaaagt catcacctgg ggggcagaca ccgcggcgtg cggggacatc atcttggcct	3000

gccctgcttc cgcccgagg gggaaggaga tacttctggg accggccgat agtcttgaag	3060
gacaggggtg gcgactcctt gcgcccata cggcctact ccaacaaacg cgaggcctgc	3120
ttggttgcat catcactagc cttacaggcc gggacaagaa ccaggttgag ggggaggttc	3180
aagtgtttc caccgaaca caatctttcc tggcgacctg catcaatggc gtgtgttga	3240
ctgtcttcca cggcgccggc tcaaagacc tagccggccc aaagggtcca atcacccaaa	3300
tgtacaccaa ttagaccag gacctgttg gctggccggc acctcctggg gcgcgttccc	3360
tgacaccatg cacttgcggc tctcggacc ttacctggt cagagacat gctgatgtca	3420
ttccggtgcg cggcggggt gacgtaggg ggagcctact ccccccagg cctgtctcct	3480
acttgaaggg ctctcgggt ggtccactgc tctgcccttc ggggcacgct gtcggcatac	3540
ttccggtgc tgtatgcacc cggggggttg ccatggcggg ggaattcata cccgttgagt	3600
ctatggaac tactatgcgg tctccggtct tcacggacaa tccgtctccc ccggtgtac	3660
cgcagacatt ccaagtggc cacttacacg ctcccaccgg cagcggcaag agcactaggg	3720
tgccggtgc atatgcagcc caagggtaca aggtgctcgt cctaaatccg tccgtcgccg	3780
ccaccttggg ttttggggcg tataatgtcca aggcacatgg tatcgacccc aaccttagaa	3840
ctggggtgag gaccatcacc acaggtgccc ctatcacata ctccacctat ggcaagtcc	3900
ttgccgacgg tggcggctcc gggggcgctt atgacatcat aatgtgtgat gagtgccact	3960
caactgactc gactaccatt tatggcatcg gcacagtcct ggaccaagcg gagacggctg	4020
gagcgggct cgtggtgctc tccaccgcta cgcctccggg atcggtcacc gtgccacacc	4080
tcaatatcga ggaggtggcc ctgtctaata ctggagagat ccccttctac ggcaaagcca	4140
ttcccatcga ggctatcaag gggggaaggc atctcatctt ctgccattcc aagaagaagt	4200

gtgacgaact cgccgcaaag ctgtcaggcc tcggactcaa tgccgtagcg tattaccggg	4260
gtcttgacgt gtccgtcata ccgaccagcg gagacgttgt tgtcgtggcg acggacgctc	4320
taatgacggg ctttaccggc gactttgact cagtgatcga ctgtaatacg tgtgtcaccc	4380
agacagtcca tticagcttg gacccacact tcaccattga gacgacgacc gtgcccgaag	4440
acgcagtgtc gcgctcgag aggcgaggca ggactggttag gggcagggct ggcatataca	4500
ggtttgtgac tccaggagaa cggccctcgg gcatgttcca ttcttcggtc ctgtgtgagt	4560
gttatgacgc gggttgtcgc tggtagaac tcacgcccgc tgagacctcg gttaggttgc	4620
gggcgtacct aaacacacca gggttgcccg tctgccagga ccatctggag ttctcggagg	4680
gtgtcttcac aggccctacc cacatagatg cccacttctt atcccagact aaacaggcag	4740
gagagaactt ccctacttg gtagcatacc aggctacagt gtgcgccagg gctcaagccc	4800
cacctccatc gtgggatgaa atgtggaggt gtctcatacg gctgaaacct acgtgcacg	4860
ggccaacacc cctgctgtat aggttaggag ccgtccaaaa tgaggtcacc ctacacacc	4920
ccataaccaa atcatcatg acatgtatgt cggctgacct ggaggtcgtc accagcacct	4980
gggtgctggt aggcggagtc ctgcgagtc tggccgcgta ctgcctgaca acaggcagcg	5040
tggtcattgt gggcaggatc atcctgtccg ggaagccggc tatcatccc gataggaag	5100
ttctctacca ggagttcgac gagatggagg agtgtgcctc acacctcct tacttcgaac	5160
agggaatgca gctcgccgag caattcaaac agaaggcgct cgggttgctg caaacagcca	5220
ccaagcaggc ggaggctgct gctcccgtgg tggagtccaa gtggcgagcc cttagacct	5280
tctggcgaa gcacatgtgg aacttcatta gtgggataca gtacttgga ggcttgtcca	5340

ctctgcctgg gaaccccgca atacgatcac cgaatggcatt cacagcctcc atcaccagcc	5400
cgctcaccac ccagcatacc ctcttgttta acatcttggg gggatgggtg gctgccaac	5460
tcgcccccc cagcgtgcc tcagctttcg tgggcgccgg catcgtgga gccgctgtg	5520
gcacgatagg ccttgggaag gtgcttgtgg acattctggc aggttatgga gcaggggtgg	5580
cgggcgcact tgggccttt aagatcatga gcggcgagat gccttcagcc gaggacatgg	5640
tcaacttact ccttgcctc ctttctccg gtgccctggt cgtcgggatt gtgtgtcag	5700
caatactgcg tcggcatgtg ggcccagggg aagggctgt gcagtggatg aaccgctga	5760
tagcgttcgc ctgcgggggt aaccacgtct cccccaggca ctatgtcca gagagcgagc	5820
ctgcagcgcg tgttaccag atcctttcca gcctcaccat cactcagctg ttgaagagac	5880
tccaccagtg gattaatgag gactgctcta cgccatgctc cagctcgtgg ctaagggaga	5940
tttgggactg gatctgcag gtgttgactg acttcaagac ctggctccag tccaagctcc	6000
tgccgcgatt accgggagtc cttttttct catgccaacg cgggtataag ggagtctggc	6060
ggggggacgg catcatgcac accacctgcc catgcggagc acagatcacc ggacacgtca	6120
aaaacggttc catgaggatc gttgggccta aaacctgcag caacacgtgg tacgggacat	6180
tccccatcaa cgcgtacac acgggccct gcacacctc cccggcgcca aactattcca	6240
aggcattgtg gagagtggcc gctgaggagt acgtggaggt cacgcgggtg ggagattttc	6300
actacgtgac gggcatgacc actgacaacg tgaagtgtcc atgccaggtt ccggcccccg	6360
aattcttcac ggaggtggat ggagtgcgtg tgcacaggta cgctccggcg tgcagacctc	6420
tcctacggga ggaggtcgta ttccaggtcg ggtccacca gtacctgttc gggtcacagc	6480
tcccatgga gccgaaccg gatgtagcag tgetcacttc catgetcact gacctctcc	6540

acattacagc agagacggct aagcgtaggc tggccagggg gtctccccc tccttggcca	6600
gtctttcagc tagccagttg tctgcgcctt ccttgaaggc gacatgact acccatcatg	6660
actccccgga cgctgacctc attgaggcca acctcttgtg gcggcaagag atgggcggga	6720
acatcacccg cgtggagtca gagaataagg tggtaatcct ggactctttc gacccgctcc	6780
gagcggagga tgatgagggg gaaatatccg ttcggcgga gatcctgcgg aaatccagga	6840
aattccccc agcgctgccc atatgggcgc cgccgatta caacctccg ctgctagagt	6900
cctggaagga cccggactac gttcctccgg tggtaacgg gtgcccgttg ccgccacca	6960
aggccctcc aataccacct ccacggagga agaggacggt tgtcctgaca gaatccaccg	7020
tgtcttctgc cttggcggag ctgctacta agaccttcgg cagctccgga tcgtcggcca	7080
tcgacagcgg tacggcgacc gccctcctg accaagctc cggtagcgc gacagagagt	7140
ccgacgttga gtcgtttcc tccatgccc ccttgaggg agagccggg gaccccgatc	7200
tcagcgacgg atcttggacc accgtgagcg aggaggctag tgaggacgtc gtctgtgtt	7260
cgatgtccta cacatggaca ggcgccctga tcacgccatg cgctcggag gaaagcaagt	7320
tgcccatcaa cccgttgagc aattctttgc tacgtacca caacatggtc tatgtacaa	7380
catcccgag cgcaggcctg cggcagaaga aggtcacctt tgacagactg caagtctgg	7440
acgaccacta cgggacgtg cttaaggaga tgaaggcgaa ggctgccaca gttaaggcta	7500
aattctatc tgtagaagaa gctgcaaac tgacgcccc acattcgcc aaatccaat	7560
ttggctacgg ggcgaaggac gtccggagcc tatccagcag ggccgttacc cacatccgt	7620
ccgtgtggaa ggacctgtg gaagacactg aaacaccaat tagcactacc atcatggcaa	7680

aaaatgaggt tttctgtgtc caaccagaga agggaggccg caagccagct cgccttatcg	7740
tgttcccaga tctgggagtt cgtgtatgcg agaagatggc cctttatgac gtggtctcca	7800
cccttcctca ggccgtgatg ggctcctcat acggattcca gtactctcct aagcagcggg	7860
tcgagttcct ggigaatacc tggaaatcaa agaaatgccc catgggcttc tcatatgaca	7920
cccgtgttt tgactcaacg gtcactgaga atgacatccg tgttgaggag tcaatttacc	7980
aatgttgtga ctggccccc gaagccaaac tggccataaa gtcgctcaca gagcggctct	8040
atatcggggg tcccctgact aattcaaaag ggcagaactg cggttaccgc cgggtccgcg	8100
cgagcggcgt gctgacgact agctgcggta ataccctcac atgttacctg aaagccactg	8160
cggcctgtcg agctgcgaag ctccgggact gcacgatgct cgtgaacgga gacgaccttg	8220
tcgttatctg tgaagcgcg ggaacccaag aggatgcggc gagcctacga gtcttcacgg	8280
aggctatgac taggtactct gcccccttg gggaccgcgc tcaaccggaa tacgacttgg	8340
agttgataac atcatgttcc tccaatgtgt cggtcgcaca cgatgcatct ggtaaaaggg	8400
tgtactacct caccctgac cctaccacc cccttgacg ggctgcgtgg gagacagcta	8460
gacacactcc agtcaactcc tggctaggca acatcatcat gtatgcgccc accttatggg	8520
caaggatgat tctgatgact catttcttct ccatccttct agctcaggag caacttga	8580
aaaccctaga ttgtcagatc tacggggcct gttactccat tgaaccactt gatctac	8640
agatcattga gcgactccat ggtcttagcg cattttcact ccatagttac tctccaggcg	8700
agatcaatag ggtggcttca tgccctcagaa aacttggggg accacccttg cgagcctgga	8760
gacatcgggc cagaagtgtc cgcgctaagc tactgtccca gggggggagg gccgccactt	8820
gtggcaagta cctcttcaac tgggcggtga ggaccaagct caaactcact ccaatcccag	8880

ccgcgtcccg gttggacttg tccgctggt tcgttgctgg ttacagcggg ggagacatat	8940
atcacagcct gtctcgtgcc cgaccccgt ggttcatggt gtgcctactc ctactttccg	9000
tggggtagg catctacctg ctccccaacc gatgaatggg gagctaaaca ctccaggcca	9060
ataggccgtt tctct	9075