



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0005376
(43) 공개일자 2009년01월13일

(51) Int. Cl.

C07D 225/06 (2006.01) *A61K 31/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7027545

(22) 출원일자 2008년11월10일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년11월10일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/054476

국제출원일자 2007년05월09일

(87) 국제공개번호 WO 2007/128829

국제공개일자 2007년11월15일

(30) 우선권주장

0609132.6 2006년05월09일 영국(GB)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

바이오티카 테크놀로지 리미티드

영국 에섹스 씨비10 1엑스엘 니어 세프론 웰덴 리
틀 체스터포드 체스터포드 리씨치 파크

(72) 발명자

마르틴, 크리스틴

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리씨치 파크, 바이
오티카 테크놀로지 리미티드

장, 링

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리씨치 파크, 바이
오티카 테크놀로지 리미티드

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 56 항

(54) 암 치료를 위한 18,21-디데스옥시막베신 유도체

(57) 요약

본 발명은 예를 들어 암, B-세포 악성 종양, 말라리아, 친균성 감염, 중추신경계 질환, 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리(pre-treatment)에 유용한, 18,21-디데스옥시막베신 유사체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물의 제조 방법 및 이들의 의약 용도, 특별히 암 또는 B-세포 악성 종양의 치료 및/또는 예방 용도를 제공한다.

(72) 발명자

코아테스, 나이젤

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰던,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리씨치 파크, 바이오
티카 테크놀로지 리미티드

보우스텐, 윌리암

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰던,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리씨치 파크, 바이오
티카 테크놀로지 리미티드

모쓰, 스테벤

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰던,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리씨치 파크

가이제르, 사비네

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰던,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리씨치 파크, 바이오
티카 테크놀로지 리미티드

(30) 우선권주장

0616637.5 2006년08월22일 영국(GB)

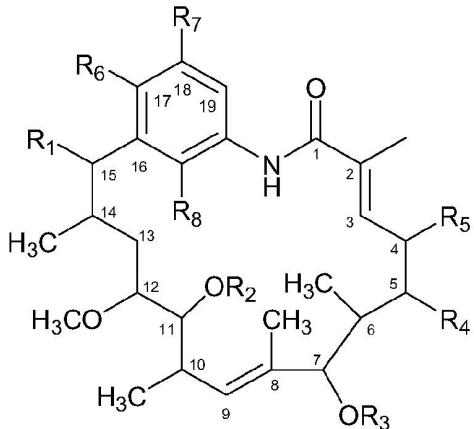
0622341.6 2006년11월09일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 식에서,

R₁은 H, OH, OMe^o이고;

R₂는 H 또는 Me^o이며;

R₃는 H 또는 CONH₂^o이고;

R₄ 및 R₅는 각각 모두가 H이거나 함께 하나의 결합(즉, C4 내지 C5는 이중 결합임)을 나타내며;

R₆는 H 또는 F^o이고;

R₇은 H 또는 F^o이며; 또한

R₈는 H 또는 F^o이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, R₁은 H인 화합물.

청구항 3

제 1항에 있어서, R₁은 OH인 화합물.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, R₂는 H인 화합물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, R₃는 CONH₂인 화합물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, R₄ 및 R₅는 함께 하나의 결합을 나타내는 화합물.

청구항 7

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, R₄ 및 R₅는 각각 H인 화합물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, R₆, R₇ 및 R₈은 모두 수소인 화합물.

청구항 9

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, R₆, R₇ 및 R₈은 모두 수소가 아닌 화합물.

청구항 10

제 1항에 있어서, R₁은 H이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H인 화합물.

청구항 11

제 1항에 있어서, R₁은 OH이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H인 화합물.

청구항 12

제 1항에 있어서, R₁은 H이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆, R₇ 및 R₈은 각각 H인 화합물.

청구항 13

제 1항에 있어서, R₁은 OH이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆, R₇ 및 R₈은 각각 H인 화합물.

청구항 14

제 1항에 있어서, R₁은 H이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 F이고 R₇ 및 R₈은 각각 H인 화합물.

청구항 15

제 1항에 있어서, R₁은 OH이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 F이고 R₇ 및 R₈은 각각 H인 화합물.

청구항 16

제 1항에 있어서, R₁은 H이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 H이고 R₇은 F이며 R₈은 H인 화합물.

청구항 17

제 1항에 있어서, R₁은 OH이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 H이고 R₇은 F이며 R₈은 H인 화합물.

청구항 18

제 1항에 있어서, R₁은 H이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆ 및 R₇은 각각 F이고 R₈은 H인 화합물.

청구항 19

제 1항에 있어서, R₁은 OH이고, R₂는 H이며, R₃는 CONH₂이고, 또한 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆ 및 R₇은 각각 F이고

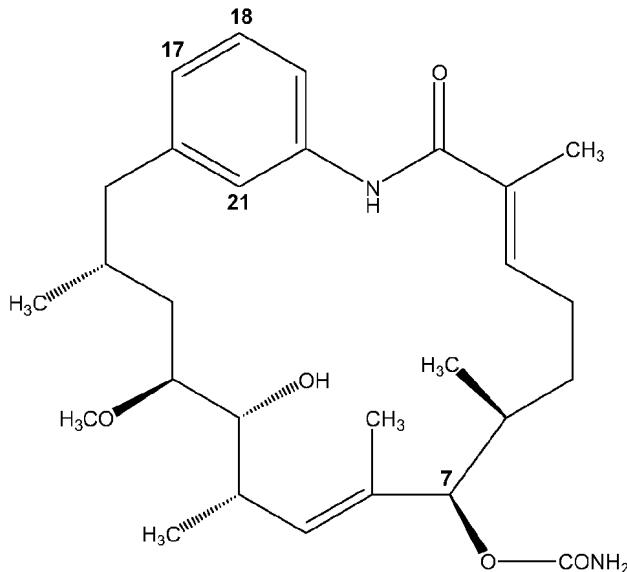
R_8 은 H인 화합물.

청구항 20

제 1항에 있어서, R_1 은 H이고, R_2 는 H이며, R_3 는 CONH_2 이고, 또한 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 , R_7 및 R_8 은 각각 F인 화합물.

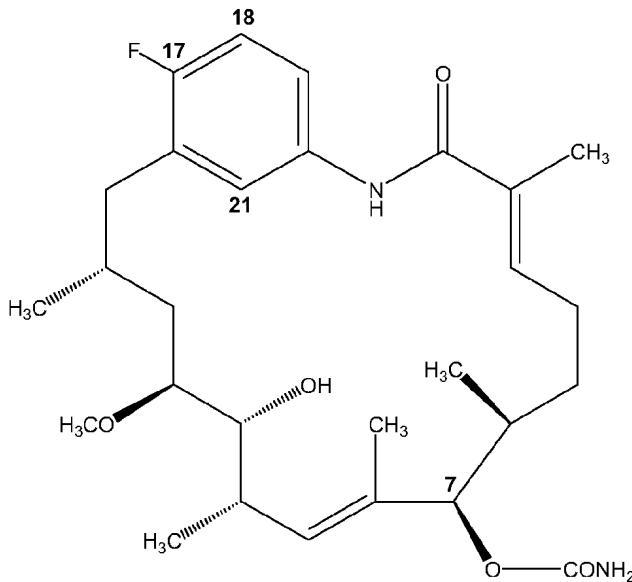
청구항 21

제 1항에 있어서, 하기 구조의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:



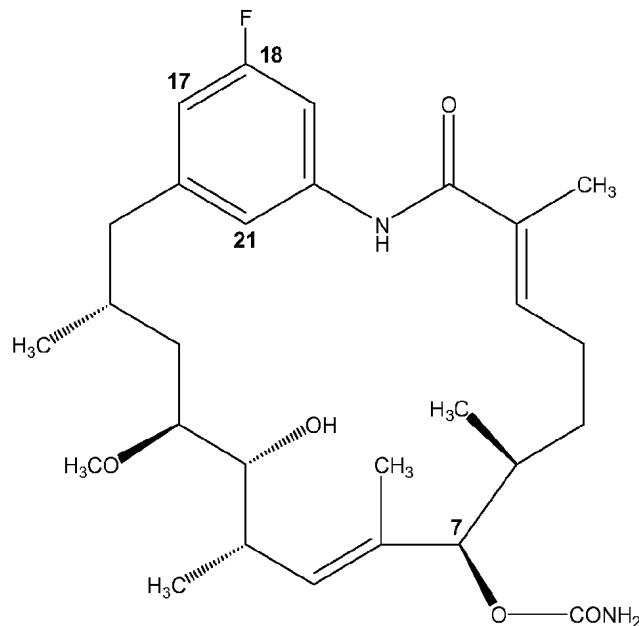
청구항 22

제 1항에 있어서, 하기 구조의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:



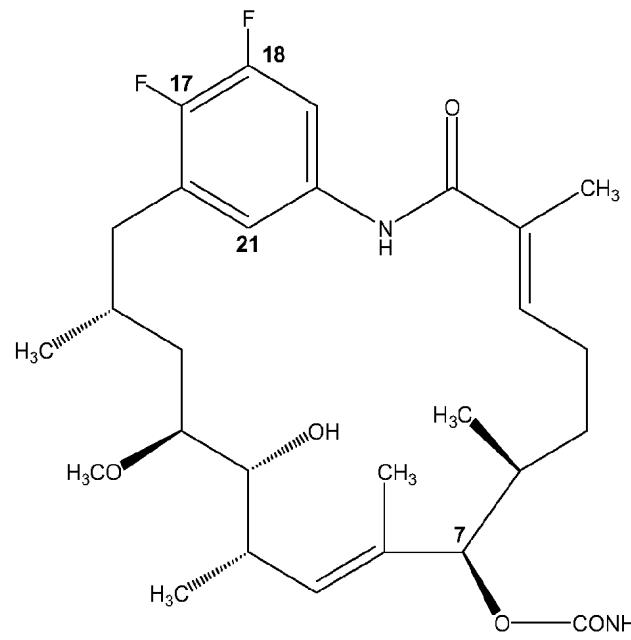
청구항 23

제 1항에 있어서, 하기 구조의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:



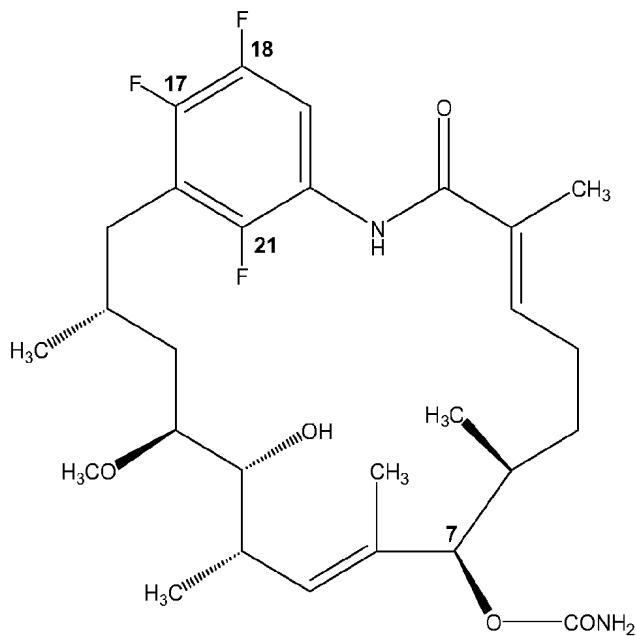
청구항 24

제 1항에 있어서, 하기 구조의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:



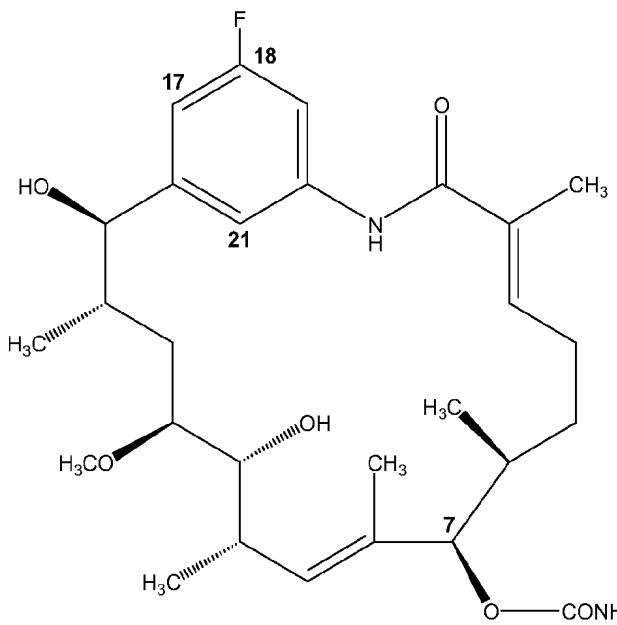
청구항 25

제 1항에 있어서, 하기 구조의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:



청구항 26

제 1항에 있어서, 하기 구조의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:



청구항 27

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 28

약제로서 사용하기 위한, 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 29

암, B-세포 악성종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리를 위한 의약품의 제조를 위한, 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도.

청구항 30

암, B-세포 악성종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리를 위한 의약품으로서 사용하기 위한, 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 31

제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 치료학적으로 유효한 양으로 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암, B-세포 악성종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리를 하는 방법.

청구항 32

18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염이 다른 치료와 병행하여 투여되는, 제 1항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 상기 다른 치료가 메토트렉사이트, 류코보린, 프레니손, 블레오마이신, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빙크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 독소루비신, 타목시펜, 토레미펜, 메게스트롤 아세테이트, 아나스트로졸, 고세렐린, 항-HER2 단일 클론 항체(예를 들어, 상표 Herceptin™), 카페시타빈, 라록시펜 염화수소, EGFR 억제제, VEGF 억제제, 프로테아좀 억제제(예를 들어, 상표 Velcade™), 방사선 치료 및 외과 수술로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 34

제 32항에 있어서, 상기 다른 치료가 블레오마이신, 카페시타빈, 시스플라틴, 사이타라빈, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 5-플루오로우라실, 켐시타빈, 류코보린, 메토트렉사이트, 미토잔톤, 파클리탁셀과 도세탁셀을 포함하는 탁산, 빙크리스틴, 빈블라스틴 및 비노렐빈; 아나스트로졸, 고세렐린, 메게스트롤 아세테이트, 프레니손, 타목시펜 및 토레미펜과 같은 호르몬 치료제; 트라스투주맙(항-HER2), 세툭시맙(항-EGFR) 및 베바시주맙(항-VEGF)과 같은 단일클론항체 치료제; 이마티닙, 다사티닙, 게피티닙, 엘로티닙, 라파티닙 및 템시로리무스와 같은 단백질 키나아제 억제제; 보르테조맙과 같은 프로테아좀 억제제; 보리노스타트와 같은 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제; 수니티닙, 소파레닙, 레나리도미드와 같은 혈관신생 억제제; 방사선 치료; 및 외과 수술로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 35

제 32항에 있어서, 상기 다른 치료가 시스플라틴, 사이타라빈, 사이클로헥시클로로에틸니트로스우레아, 사이클로포스파미드, 켐시타빈, 이포스프아미드, 류코보린, 미토마이신, 미토잔톤, 옥살리플라틴, 및 탁솔과 빈데신을 포함하는 탁산과 같은 통상적인 화학치료제; 아나스트로졸, 고세렐린, 메게스트롤 아세테이트 및 프레니손과 같은 호르몬 치료제; 세툭시맙(항-EGFR)과 같은 단일클론항체 치료제; 다사티닙, 라파티닙과 같은 단백질 키나아제 억제제; 보리노스타트와 같은 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제; 수니티닙, 소파레닙, 레나리도미드와 같은 혈관신생 억제제; 템시로리무스와 같은 mTOR 억제제; 및 이마티닙로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인, 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 조성물, 용도 또는 방법.

청구항 36

하기의 단계를 포함하는, 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 제조방법:

- a) 적절한 조건에서 배양시 막베신 또는 이의 유사체를 생산하는 첫번째 숙주 균주를 제공하는 단계;
- b) 상기 균주에 인공적인 스타터 유닛을 주입하는 단계;
- c) 상기 숙주 균주를 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 제조를 위한 적절한 조건에서 배양하는 단계; 및 선택적으로, d) 제조된 화합물을 분리하는 단계.

청구항 37

제 36항에 있어서, 상기 방법은 추가적으로 하기 단계를 포함하는 방법:

- e) 일반적으로 상기 단계 c) 이전에 수행되며, 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자 또는 이의 상동체인 유전자를 결실시키거나 불활성화시키는 단계.

청구항 38

제 36항 또는 제 37항에 있어서, 상기 방법은 추가적으로 하기 단계를 포함하는 방법:

- f) 일반적으로 상기 단계 c) 이전에 수행되며, 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자를 결실시키거나 불활성화시키는 단계.

청구항 39

제 36항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 b)의 인공적인 스타터 유닛은 3-아미노-벤조산인 방법.

청구항 40

제 36항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 b)의 인공적인 스타터 유닛은 5-아미노-2-플루오로벤조산인 방법.

청구항 41

제 36항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 b)의 인공적인 스타터 유닛은 5-아미노-3-플루오로벤조산인 방법.

청구항 42

제 36항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 b)의 인공적인 스타터 유닛은 5-아미노-2,3-디-플루오로벤조산인 방법.

청구항 43

제 36항 내지 제 38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 b)의 인공적인 스타터 유닛은 5-아미노-2,3,6-트리-플루오로벤조산인 방법.

청구항 44

제 36항 내지 제 43항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 상기 균주는 막베신 생산 균주인 방법.

청구항 45

제 36항 내지 제 44항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 상기 균주는 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주인 방법.

청구항 46

제 36항 내지 제 45항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 상기 균주는 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주인 방법.

청구항 47

제 46항에 있어서, 단계 a)에서 상기 균주는 $mbcM$ 및 선택적으로 추가적인 post-PKS 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주인 방법.

청구항 48

제 47항에 있어서, 단계 a)에서 상기 균주는 $mbcM^0$ 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주인 방법.

청구항 49

제 47항에 있어서, 단계 a)에서 상기 균주는 $mbcM$, $mbcMT1$, $mbcMT2$, $mbcP$ 및 $mbcP450^0$ 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주인 방법.

청구항 50

$mbcM$ 및 선택적으로 추가적인 post-PKS 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주.

청구항 51

$mbcM$ 및 선택적으로 추가적인 post-PKS 유전자 및/또는 스타터 유닛 생합성 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주.

청구항 52

제 50항 또는 제 51항에 있어서, $mbcM^0$ 결실되거나 또는 비활성화된, 조작된 균주.

청구항 53

제 50항 또는 제 51항에 있어서, $mbcM$, $mbcMT1$, $mbcMT2$, $mbcP$ 및 $mbcP450^0$ 결실되거나 또는 비활성화된, 조작된 균주.

청구항 54

제 50항 내지 제 53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막베신 생산 균주는 A. 프레티오섬 또는 A. 미럼인, 조작된 균주.

청구항 55

18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 제조를 위한, 제 50항 내지 제 54항 중 어느 한 항에 따른 조작된 균주의 용도.

청구항 56

제 55항에 있어서, 상기 18,21-디데스옥시막베신 유사체는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 의해 정의되는 것인 용도.

명세서

기술 분야

<1>

본 발명은 예를 들어 암, B-세포 악성 종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환, 퇴행성 신경질환, 혈관 신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리(pre-treatment)에 유용한, 18,21-디데스옥시막베신 유사체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물의 제조 방법 및 이들의 의약 용도, 특별히 암 또는 B-세포 악성 종양의 치료 및/또는 예방 용도를 제공한다.

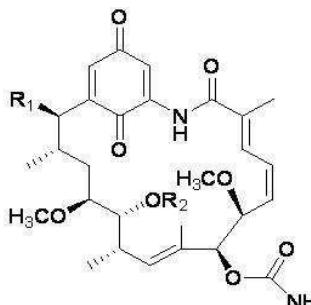
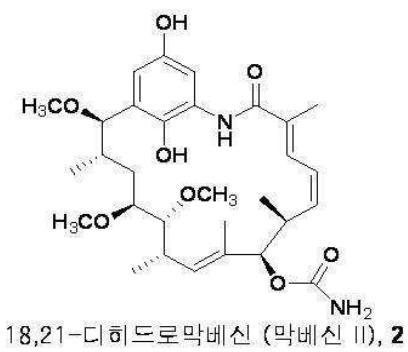
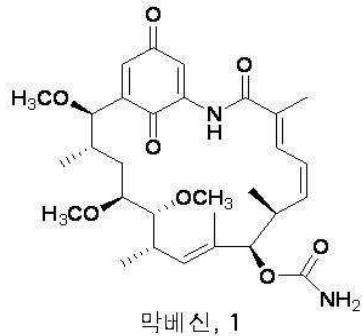
배경 기술

<2>

90 kDa 열충격단백질(Hsp90)은 단백질의 접힘 및 조립과 관련된 풍부한 분자 샤페론인데, 이들 다수가 신호 전달 경로와 관련되어 있다(Neckers, 2002; Sreedhar et al., 2004a; Wegele et al., 2004 및 이들의 참고문헌). 지금까지 거의 50 여종의 이러한 소위 클라이언트 단백질(client proteins)이라 일컫는 단백질이 확인되었으며, 스테로이드 수용체, 예를 들어 *src* 류와 같은 비수용체성 티로신 키나아제, 예를 들어 cdk4 및 cdk6과 같은 사이클린-의존성 키나아제, 낭포성 막횡단 조절자(cystic transmembrane regulator), 산화질소 합성효소 및 이외의 것들을 포함한다(Donze and Picard, 1999; McLaughlin et al., 2002; Chiosis et al., 2004; Wegele et al., 2004; <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>). 또한, Hsp90은 스트레스 응답(stress response) 및 돌연변이 영향에 대한 세포 보호에서 중요한 역할을 한다(Bagatell and Whitesell, 2004; Chiosis et al., 2004). Hsp90의 기능은 복잡하고 이는 동적인 다중-효소 복합체의 형성에 관여한다(Bohen, 1998; Liu et al., 1999; Young et al., 2001; Takahashi et al., 2003; Sreedhar et al., 2004; Wegele et al., 2004). Hsp90은 클라이언트 단백질의 분해, 세포 주기 조절장애 및 아포토시스(apoptosis)를 야기하는 억제제를 위한 표적이다(Fang et al., 1998; Liu et al., 1999; Blagosklonny, 2002; Neckers, 2003; Takahashi et al., 2003; Beliakoff and Whitesell, 2004; Wegele et al., 2004). 더욱 최근에, Hsp90은 종양의 전이를 위한 중요한 세포외 매개체임이 확인되었다(Eustace et al., 2004). Hsp90은 이의 기능에 대한 심도 있고 상세한 연구(Blagosklonny et al., 1996; Neckers, 2002; Workman and Kaye, 2002; Beliakoff and Whitesell, 2004; Harris et al., 2004; Jez et al., 2003; Lee et al., 2004) 및 고속처리 스크리닝 분석의 개발(Carreras et al., 2003; Rowlands et al., 2004)에 반영되는, 암 치료법을 위한 새로운 주요 치료 표적으로서 확인되었다. Hsp90 억제제는 안사마이신, 마크로리드(macrolides), 퓨린, 피라졸, 쿠마린 항생제 및 그외의 것들과 같은 화합물 종류를 포함한다(Bagatell and Whitesell, 2004; Chiosis et al., 2004 및 이들의 참고문헌).

<3>

벤제노이드 안사마이신은 방향족 고리 구조의 어느 한쪽에 결합된 다양한 길이의 지방족 고리에 의해 특징지어지는 화학적 구조의 광범위한 부류이다. 자연적으로 발생하는 안사마이신은 하기를 포함한다: 막베신(macbecin) 및 18,21-디하이드로막베신(또한 막베신 I 및 막베신 II로 각각 알려져있음)(1 & 2; Tanida et al., 1980), 젤다나마이신(3; DeBoer et al., 1970; DeBoer and Dietz, 1976; WO 03/106653 및 이들의 참고문헌), 및 허비마이신 류(4; 5, 6, Omura et al., 1979, Iwai et al., 1980 and Shibata et al., 1986a, WO 03/106653 및 이들의 참고문헌).



<4>

<5>

안사마이신은 원래 이들의 항균 및 항바이러스 활성이 규명되었으나, 최근에 항암제로서의 이들의 잠재적 유용

성이 더 큰 관심의 대상이 되고 있다(Beliakoff and Whitesell, 2004). 많은 Hsp90 억제제가 최근에 임상 실험에서 평가되고 있다(Csermely and Soti, 2003; Workman, 2003). 특히, 젤다나마이신은 나노몰 수준의 효능(nanomolar potency)을 나타내고 종양 세포 의존적으로 변형된 단백질 키나아제에 대해 명백한 특이성을 갖는다(Chiosis *et al.*, 2003; Workman, 2003).

<6> Hsp90 억제제를 이용한 치료는 방사선 조사에 의한 종양 세포 사멸의 유도를 증진시키는 것으로 나타났고, Hsp90 억제제와 세포독성 약물의 조합에 의해 세포 사멸(예를 들어, 유방암, 만성 골수성 백혈병 및 비소세포 폐암)이 증가됨이 또한 설명되었다(Neckers, 2002; Beliakoff and Whitesell, 2004). 항-신생혈관생성 활성에 대한 가능성 또한 관심의 대상이다: Hsp90 클라이언트 단백질 HIF-1 α 는 고령 종양의 진행에 중요한 역할을 한다(Hur *et al.*, 2002; Workman and Kaye, 2002; Kaur *et al.*, 2004).

<7> Hsp90 억제제는 또한 면역억제제로서 작용하고 Hsp90 억제 후의 다양한 종류의 종양 세포의 보체-매개성 용해와 관련되어 있다(Sreedhar *et al.*, 2004). Hsp90 억제제를 이용한 치료는 또한 면역 세포-매개성 용해(Sreedhar *et al.*, 2004)와 관련된, 유도 과산화물 생산(Sreedhar *et al.*, 2004a)을 야기할 수 있다. 잠재적 항말라리아 약물로서의 Hsp90 억제제의 용도가 또한 논의되었다(Kumar *et al.*, 2003). 또한, 젤다나마이신이 복합적으로 글리코실화된 포유류 프리온 단백질 PrP^c의 형성을 방해하는 것으로 나타났다(Winklhofer *et al.*, 2003).

<8> 상기에서 기술한 바와 같이, 안사마이신이 잠재적 항암 및 항-B-세포 악성종양 화합물로서 관심을 받고 있으나, 최근 이용가능한 안사마이신은 양호하지 않은 약학적 또는 약제학적 성질, 예를 들면 양호하지 않은 용해도, 양호하지 않은 대사 안정성, 양호하지 않은 생체이용도 또는 양호하지 않은 제형능을 보인다(Goetz *et al.*, 2003; Workman 2003; Chiosis 2004). 허비마이신 A 및 젤다나마이신 모두는 이들의 강한 간독성으로 인해 임상 실험에 좋지 않은 후보 물질로서 확인되었고(Workman, 2003), 젤다나마이신은 간독성으로 인해 임상 1상에서 탈락되었다(Supko *et al.*, 1995, WO 03/106653).

<9> 젤다나마이신은 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)의 배양 여과물로부터 분리되었고, 시험관 내에서 원생생물에 대해서는 강한 활성을 보였고, 세균과 곰팡이에 대해서는 약한 활성을 보였다. 1994년, 젤다나마이신과 Hsp90과의 조합이 제시되었다(Whitesell *et al.*, 1994). 젤다나마이신에 대한 생합성 유전자 클러스터가 클론화되고 서열분석되었다(Allen and Ritchie, 1994; Rascher *et al.*, 2003; WO 03/106653). DNA 서열은 NCBI 허가번호 AY179507에서 이용가능하다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스(*S. hygroscopicus* subsp. *duamycteticus*) JCM4427로부터 유래된 유전공학적으로 제작된 젤다나마이신 생산 균주의 분리, 및 4,5-디히드로-7-0-데스실시태양일-7-히드록시젤다나마이신 및 4,5-디히드로-7-0-데스실시태양실시태양0-데메틸젤다나마이신의 분리가 최근에 기술되었다(Hong *et al.*, 2004). 허비마이신 생산 균주 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) AM-3672에 젤다나마이신을 처리함으로써 화합물 15-히드록시젤다나마이신, 3중고리 젤다나마이신 유사체 KOSN-1633 및 메틸-젤다나마이신이 분리되었다(Hu *et al.*, 2004). 두 화합물 17-포밀-17-데메톡시-18-0-21-0-디히드로젤나마이신 및 17-히드록시메틸-17-데메톡시젤다나마이신이 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*S. hygroscopicus*) K279-78로부터 분리되었다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 K279-78은, 허비마이신 생산 균주인 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 AM-3672 기원의 다양한 유전자를 함유하는 44kbp 크기의 삽입체를 갖는 코스미드 pKOS279-78을 포함하고 있는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 NRRL 3602이다(Hu *et al.*, 2004). 젤다나마이신 생합성 클러스터의 폴리케티드 합성효소의 네 가지 모듈 내에서 아실트랜스퍼라제(AT) 도메인을 치환시켰다(Patel *et al.*, 2004). AT 치환은 완전하게 가공된 유사체 14-데스메틸-젤다나마이신, 8-데스메틸-젤다나마이신 및 6-데스메톡시-젤다나마이신과 완전하게 가공되지 않은 4,5-디히드로-6-데스메톡시-젤다나마이신을 이끌어내는 모듈 1, 4 및 5 내에서 수행되었다. 모듈 7 AT의 치환은 세 종류의 2-데스메틸 화합물, KOSN1619, KOSN1558 및 KOSN1559을 생산해내는데, 이중 하나(KOSN1559)인, 젤다나마이신의 2-데스메틸-4,5-디히드로-17-데메톡시-21-데옥시 유도체는 젤다나마이신보다 4배 이상, 17-AAG보다 8배 이상의 결합력으로 Hsp90과 결합한다. 그러나 이는 SKBr3을 사용한 IC₅₀ 측정에서의 향상에 반영되지 않는다. 또 다른 유사체인 신규한 비벤조퀴노이드 젤다나마이신 KOS-1806은 단일페놀(monophenolic) 구조를 가진다(Rascher *et al.*, 2005). KOS-1806에 대한 활성 데이터는 주어지지 않았다.

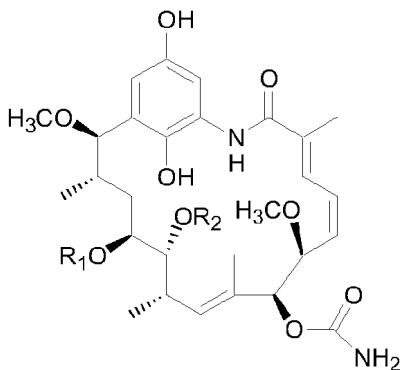
<10> 1979년에 안사마이신 항생제 허비마이신 A가 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 균주 No. AM-3672의 발효 배지로부터 분리되었고, 이의 잠재적 제초 활성에 따라 명명되었다. 항암활성은 세포의 변형된 형태를 되돌리는 약물을 스크리닝하기 위해 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV)의 온도감수성 변이체로 감염된 랫 신장 세포를 사용하여 평가되었다(Uehara, 2003). 허비마이신 A는 Hsp90 사페론 단백질에 결합하여 일차적으로 작용하는 것으로 주장되었지만, 보존된 시스테인 잔기에 직접 결합하고, 이어 키나아제를 불활성화시킨다는 것

도 논의되었다(Uehara, 2003).

<11> 화학적 유도체가 분리되었고 벤조퀴논 핵의 C19의 치환체가 변경된 화합물 및 고리 사슬 내에서 할로겐화된 화합물이 허비마이신 A보다 독성이 더 적고 항암활성이 더 높은 것으로 나타났다(Omura *et al.*, 1984; Shibata *et al.*, 1986b). 허비마이신 생합성 유전자 클러스터의 서열은 WO 03/106653 및 최근 논문에서 확인되었다(Rascher *et al.*, 2005).

<12> 항진균 및 항원충 활성을 의해 확인된 안사마이신 화합물 막베신(1) 및 18,21-디히드로막베신(2) (C-14919E-1 및 C-14919E-1)은 노카르디아(*Nocardia*) 종 No. C-14919 (*Actinosynnema pretiosum* subsp *pretiosum* ATCC 31280)의 배양물 상층액으로부터 분리되었다(Tanida *et al.*, 1980; Muroi *et al.*, 1980; Muroi *et al.*, 1981; US 4,315,989 및 US 4,187,292). 18,21-디히드로막베신은 디히드로퀴논 형태의 핵을 포함하는 특징을 가진다. 막베신 및 18,21-디히드로막베신 모두 젖과 백혈병 P388 세포주와 같은 암세포주에 대해 유사한 항균 및 항암 활성을 가지는 것으로 나타났다(Ono *et al.*, 1982). 역전사 효소 활성 및 말단 태옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 활성을 막베신에 의해 억제되지 않았다(Ono *et al.*, 1982). 막베신의 Hsp90 억제기능은 문헌으로 보고된 바 있다(Bohen, 1998; Liu *et al.*, 1999). 막베신 및 18,21-디히드로막베신이 미생물 배양액에 첨가된 후, 화합물의 특정 위치 또는 위치들에서 메톡시기 대신에 히드록시기를 가진 화합물로 전환되는 것은 US 4,421,687 및 US 4,512,975 특허에 기술되어 있다.

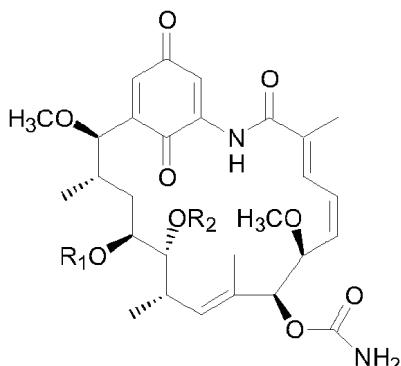
<13> 매우 다양한 토양 미생물을 선별하는 가운데, 스트렙토마이세스 속에 속하는 생산균주로부터 화합물 TAN-420A 내지 E가 확인되었다(7-11, EP 0 110 710).



TAN-420A, 7 R₁=H, R₂=H

TAN-420C, 9 R₁=H, R₂=CH₃

TAN-420E, 11 R₁=CH₃, R₂=CH₃



TAN-420B, 8 R₁=H, R₂=H

TAN-420D, 10 R₁=H, R₂=CH₃

<14>

<15> 2000년에 스트렙토마이세스 종 S6699의 세포 배양액으로부터 겔다나마이신과 관련이 있는 비-벤조퀴논 안사마이신 대사체인 레블라스틴의 분리 및 류마티스 관절염 치료에 있어서 이의 잠재적 치료 가치가 기술되었다(Stead *et al.*, 2000).

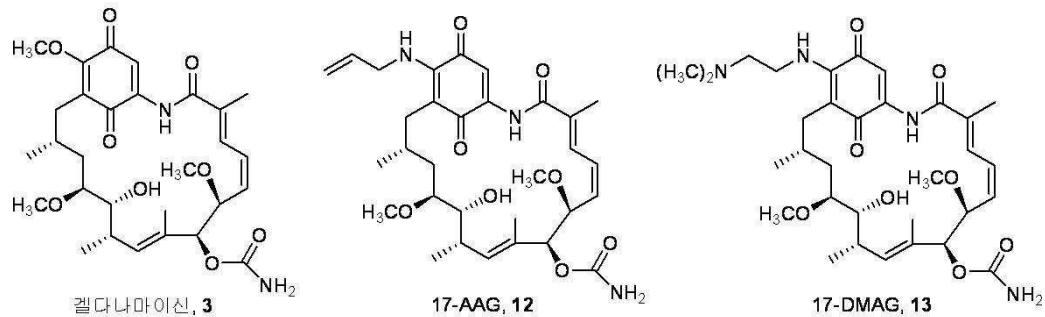
<16>

화학적으로 관련이 없는 벤조퀴논 안사마이신과 구별되는 또 다른 Hsp90 억제제인 라디시콜(모노르텐)은 곰팡이 모노스포리움 보노르텐(*Monosporium bonorden*)으로부터 그것의 항진균 활성이 처음 발견되었고(Uehara, 2003), 그 구조는 넥트리아 라디시콜라(*Nectria radicicola*)로부터 분리된 14-원의(14-membered) 마크롤리드와 동일한 것으로 밝혀졌다. 이의 항진균, 항균, 항원충 및 세포독성 활성이 이외에, 이어서 Hsp90 샤페론 단백질의 억제제로서도 확인되었다(Uehara, 2003; Schulte *et al.*, 1999). 라디시콜의 항-신생혈관생성 활성(Hur *et al.*, 2002) 및 이의 반-합성 유도체(Kurebayashi *et al.*, 2001)가 또한 기술된 바 있다.

<17>

최근의 관심은 안사마이신 항암 화합물의 새로운 세대로서 겔다나마이신의 17-아미노 유도체, 예를 들면 17-(알릴아미노)-17-데스메톡시 겔다나마이신(17-AAG, 12)(Hostein *et al.*, 2001; Neckers, 2002; Nimmanapalli *et al.*, 2003; Vasilevskaya *et al.*, 2003; Smith-Jones *et al.*, 2004) 및 17-데스메톡시-17-N,N-디메틸아미노에틸아미노-겔다나마이신(17-DMAG, 13)(Egorin *et al.*, 2002; Jez *et al.*, 2003)에 집중되어 있다(Bagatell and Whitesell, 2004). 더욱 최근에 겔다나마이신이 17-위치에서 유도되어져 17-겔다나마이신 아미드, 카바메이트, 우레이 및 17-아릴겔다나마이신을 생성하였다(Le Brazidec *et al.*, 2003). 60개 이상의 17-알킬아미노-17-데메톡시겔다나마이신 유사체의 라이브러리가 보고되었고 Hsp90에 대한 친화도 및 수용해도가 시험되었다(Tian *et al.*, 2004). 겔다나마이신의 독성을 감소시키기 위한 다른 연구는 종양-표적성 단일클론 항체와 결합시킴으로써

활성 젤다나마이신 화합물을 악성 종양 세포로 선택적 표적화 및 전달하는 것이다(Mandler *et al.*, 2000).



<18>

<19> 이러한 유도체의 대부분이 감소된 간독성을 나타내지만 제한된 수용해도를 가진다. 예를 들면 17-AAG는 가용화 담체(solubilising carrier)(예를 들어 Cremophore®, DMSO-egg lecithin)의 사용을 필요로 하고, 그 자체로 일부 환자에게 부작용을 일으킬 수 있다(Hu *et al.*, 2004).

<20>

<20> Hsp90 억제제의 안사마이신 계 대부분은 일반적인 구조적 부위를 갖는다: 단백질, 글루타티온 등과 같은 친핵체와 공유결합을 빠르게 형성할 수 있는 미켈(Michael) 수용체인 벤조퀴논. 벤조퀴논 모이어티는 또한, 추가적인 비특이적 독성을 야기하는 산소 라디칼이 형성되는 동안, 디히드로퀴논과 산화환원 평형상태가 되도록 한다(Dikalov *et al.*, 2002). 예를 들어 젤다나마이신 처리는 과산화물 생성을 유도할 수 있다(Sreedhar *et al.*, 2004a).

<21>

그러므로, 암 및/또는 B-세포 악성종양 치료에 이용할 수 있고, 바람직하게는 향상된 수용해도, 개선된 약리학적 프로파일(profile) 및/또는 투여시 감소된 부작용 프로파일을 가지는 안사마이신과 같은, 신규한 안사마이신 유도체를 확인할 필요가 남아 있다. 본 발명은, 생물학적 물질 변화(biotransformation) 및 임의적인 모생산균주의 유전적 조작에 의해 생성되는, 신규한 안사마이신 유사체를 개시한다. 특히 본 발명은 현재 이용가능한 안사마이신과 비교할 때 전체적으로 개선된 약제학적 성질을 가지는 신규한 18,21-디데스옥시막베신 유사체에 관한 것이며, 이들은 특히 하기 특성 중 하나 또는 그 이상의 성질에 있어서의 개선을 나타낸다: 다른 암 하위-타입(sub-types)에 대한 활성, 독성, 수용해도, 대사안정성, 생체이용도 및 제형 가능성. 바람직하게 18,21-디데스옥시막베신 유사체는 개선된 생체이용도를 나타낸다.

발명의 상세한 설명

<22>

발명의 요약

<23>

본 발명에서, 인공적인 스타터 유닛의 통합에 의해 형성되는 신규한 막베신 유사체를 생산하기 위하여, 인공적인 스타터 유닛이 막베신 생산균주에 주입되어지며, 선택적으로 막베신의 post-PKS 변형에 관여하는 유전자들의 표적화된 불활성화 또는 결실이 수행될 수 있다. 특히, 본 발명은 17, 18 및 21 위치가 치환되지 않거나 또는 이들 위치 일부 또는 전부가 플루오르에 의해 치환되어진 벤젠 부위를 생기게 하는 스타터 유닛의 혼입에 의해 형성되는 신규한 막베신 유사체를 개시한다. 선택적으로, 스타터 유닛 생합성에 관여하는 유전자 또는 조절인자는 표적화된 비활성화 또는 결실에 의해 조작되거나, 또는 세포를 UV에 노출시키거나 스타터 유닛 생합성이 중단되어진 것을 나타내는 표현형을 선택하는 것과 같은 다른 수단에 의해 변형될 수 있다. post-PKS 유전자의 선택적인 표적화는

<24>

post-PKS 유전자들의 선택적 표적화는 다양한 종류의 메커니즘에 의해 일어날 수 있다. 예를 들면, 통합, post-PKS 유전자 전부 또는 일부를 포함하는 막베신 클러스터 부위의 표적화된 결실과 이에 따른 이후 선택적인 유전자 삽입에 의하거나, 또는 post-PKS 유전자 또는 이들이 코딩하는 효소를 비기능화시키는 다른 방법들, 예를 들면, 화학적인 억제, 위치특이돌연변이(site-directed mutagenesis) 또는 예를 들어 UV에 의한 세포의 돌연변이를 통해 일어날 수 있다. 그 결과, 본 발명은 18,21-디데스옥시막베신 유사체, 이러한 화합물의 제조방법, 및 이러한 화합물을 의약적으로 이용하거나 추가적인 화합물 생산에서 중간체로서 이용하는 방법을 제공한다.

<25>

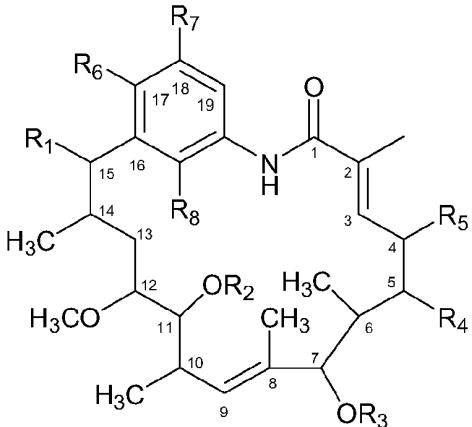
그러므로, 첫 번째 양태로서, 본 발명은 통상적인 스타터 유닛이 결실되고, 대신에 17, 18 및 21 위치가 치환되지 않거나 또는 이들 위치 일부 또는 전부가 플루오르에 의해 치환되어진 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 야기하는 스타터 유닛이 통합되어진 막베신 유사체를 제공한다.

<26>

더욱 구체적인 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1에 따른 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적

으로 허용가능한 염을 제공한다.

화학식 1



<27>

상기 식에서,

<29>

R₁은 H, OH, OMe^o이고;

<30>

R₂는 H 또는 Me이며;

<31>

R₃는 H 또는 CONH₂이고;

<32>

R₄ 및 R₅는 각각 모두가 H이거나 함께 하나의 결합(즉, C4 내지 C5는 이중 결합임)을 나타내며;

<33>

R₆는 H 또는 F이고;

<34>

R₇은 H 또는 F이며; 또한

<35>

R₈는 H 또는 F이다.

<36>

18,21-디데스옥시막베신 유사체는 또한 본원에서 “본 발명의 화합물”로 언급될 수 있으며, 상기 용어들은 본원에서 혼용될 수 있다.

<37>

상기 구조는 대표적인 호변체(tautomer)를 나타내며, 본 발명은 화학식 (1) 화합물의 모든 호변체, 예를 들어 에놀 화합물이 예시된 경우의 케토화합물과 그 반대의 경우를 포함한다.

<38>

본 발명은 상기에서 보인 화학식 (1)로 정의된 화합물의 모든 입체이성질체를 포함한다.

<39>

또 다른 양태로서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한, 화학식 1의 화합물과 같은 18,21-디데스옥시막베신 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

<40>

정의

<41>

관사 “하나의(a)”와 “하나의(an)”는 관사의 문법적 객체들 중 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하도록 본원 명세서에서 사용되었다. 예를 들면, “하나의 유사체”는 한 개의 유사체 또는 한 개 이상의 유사체를 의미한다.

<42>

본원에서 사용되는 용어 “유사체(들)”는 서로 구조적으로 유사하지만 구성상에서 조금 차이가 있는(한 원자가 또 다른 원자로 치환되거나 특정 기능기가 존재 또는 부재하는 경우) 화학적 화합물을 의미한다.

<43>

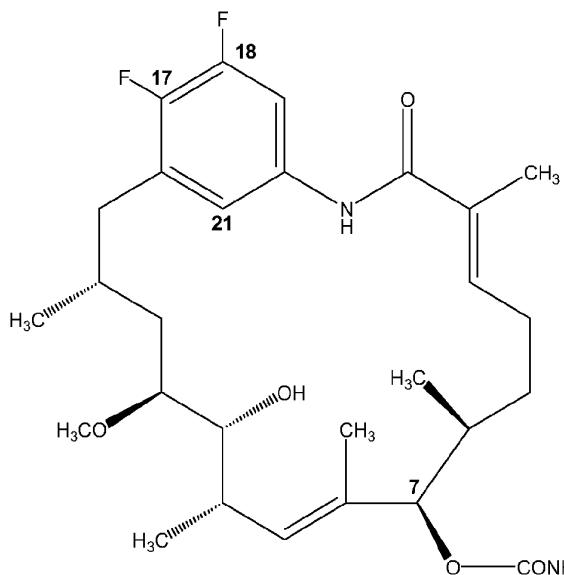
본원에서 사용되는 용어 “상동체(들)”은 다른 막베신 생산 균주로부터 유래한 대체가능한 막베신 생합성 클러스터로부터 유래하거나, 예를 들면, 젤다나마이신, 허비마이신 또는 레블라스타틴으로부터의 대체가능한 안사마이신 생합성 유전자 클러스터로부터 유래한 상동체로부터 유래하는 본원에 기술된 유전자 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 상동체를 의미한다. 이러한 상동체는 같은 기능을 수행하는 단백질을 코딩하거나, 막베신 또는 관련된 안사마이신 폴리케티드 생합성에서 이를 자체로 상기 유전자 또는 단백질과 같은 기능을 수행할 수 있다. 바람직하게는, 이러한 상동체는 본원에 기재된 구체적 유전자 서열(표 3, 서열번호 11은 클러스터 내의

모든 유전자 서열이며, 이로부터 구체적인 유전자가 추론될 수 있다)에 대해 적어도 40%의 서열 동일성, 바람직하게 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 상동성을 가진다. 페센트 상동성은 NCBI 웹사이트 상에서 이용이 가능한 BLASTn 또는 BLASTp 같은 당업계에 알려진 프로그램을 사용하여 계산할 수 있다.

- <44> 본원에서 사용된 용어 "암"은 피부나 신체 기관, 예를 들어 비체한적으로 유방, 전립선, 폐, 신장, 췌장, 뇌, 위 또는 장에서의 세포의 양성 또는 악성 신 생장을 의미한다. 암은 인접 조직으로 침윤되고 떨어져 있는 기관, 예를 들어 뼈, 간, 폐 또는 뇌로 퍼지는(전이) 경향이 있다. 본원에서 사용된 용어 암은 비체한적으로 흑색종, 임파종, 백혈병, 섬유육종, 횡문근육종 및 비만세포종과 같은 전이성 종양 세포 타입; 및 비체한적으로 직장암, 전립선암, 소세포폐암 및 비소세포폐암, 유방암, 췌장암, 방광암, 신장암, 위암, 교모세포암, 원발성 간암 및 난소암과 같은 조직암 타입을 모두 포함한다.
- <45> 본원에서 사용된 용어 "B-세포 악성 종양"은 만성 림프성 백혈병(CLL), 다발성 골수종 및 비호지킨 임파종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL)을 포함하는 질병 그룹을 포함한다. 이들은 혈액 및 혈액 형성 기관의 종양성 질환이다. 이들은 골수 및 면역계 기능 장애로 인해 발생하며, 환자를 감염 및 출혈에 매우 민감해지게 한다.
- <46> 본원에서 사용된 용어 "생체이용도"는 투여 후 약물 또는 다른 물질이 흡수되거나 생물학적 활성 자리에서 이용 가능하게 되는 정도 또는 속도를 의미한다. 이러한 성질은 화합물의 용해도, 위에서의 흡수율, 단백질 결합 정도 및 대사 등을 포함하는 수많은 요소에 의존한다. 당해 분야의 당업자에게 익숙한 다양한 생체이용도 테스트가 예를 들어 Egorin *et al.* (2002)에 기술되어 있다.
- <47> 본원에서 사용된 용어 "수용해도"는 수성 매질, 예를 들어, pH 7.3 인산 완충 식염수(PBS)에서의 용해도를 의미한다. 대표적인 수용해도 분석이 하기 실험예에 주어져 있다.
- <48> 본원에서 사용된 용어 "막베신 생산 균주"는 예를 들어 천연 스타터 주입물 3-아미노-5-히드록시벤조산을 주입했을 때와 같이 적합한 조건 하에서 배양했을 때 막베신을 생산하는, 예를 들어 *A. pretiosum*(*A. pretiosum*) 및 *A. mirum*(*A. mirum*)에 의해 예시되어지는 야생형 균주와 같은, 균주를 의미한다.
- <49> 본원에서 사용된 용어 "post-PKS 유전자(들)"은 폴리케티드의 post-폴리케티드 합성 효소의 변형에 요구되는 유전자를 의미한다. 예를 들어, 모노옥시게나제, O-메틸트랜스페라제 및 실시태양트랜스페라제가 있으며 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 막베신 계 내의 이러한 변형 유전자로는 *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* 및 *mbcP450*이 포함된다.
- <50> 본원에서 사용된 용어 "스타터 유닛 생합성 유전자(들)"은 자연적으로 통합된 스타터 유닛, 3-아미노-5-히드록시벤조산(AHBA)의 생산을 위해 요구되는 유전자를 의미한다. 구체적으로, 막베신 계 내의 이러한 스타터 유닛 생합성 유전자로는 *AHk* (AHBA 키나제), *Adh* (aDHQ 디히드로게나제), *Ahs* (AHBA 합성효소), *OX* (옥시도리덕타제), *PH* (포스파타제)가 포함된다. AHBA를 생산하는 다른 균주는 또한 AHBA 생합성 유전자를 함유한다.
- <51> 화학식(I)의 화합물과 같은 본원 발명 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염은 약제학적으로 허용가능한 무기산 또는 유기산 또는 염기로부터 형성되는 통상적인 염뿐만 아니라 4차 암모늄산 부가염도 포함한다. 적절한 산성염의 보다 구체적인 예로는 염산염, 브롬화수소산염, 황산염, 인산염, 질산염, 과염소산염, 푸마르산염, 아세트산염, 프로피온산염, 숙신산염, 글리콜산염, 포름산염, 젖산염, 말레산염, 타르타르산염, 시트르산염, 팔모이산(palmoic acid)염, 말론산염, 히드록시말레산염, 페닐아세트산염, 글루탐산염, 벤조산염, 살리실산염, 푸마르산염, 톨루엔솔폰산염, 메탄솔폰산염, 나프탈렌-2-솔폰산염, 벤젠솔폰산염, 히드록시나프토익산염, 요오드화수소산염, 말산염, 스테로이드(steroic acid)염, 타닌산염 및 그 등가물을 포함한다. 옥살산과 같은 다른 산들은 그 자체로는 약제학적으로 허용가능하지 않지만, 본원 발명의 화합물과 그들의 약제학적으로 허용가능한 염을 얻을 때 중간체로서 유용한 염의 제조에서 유용할 수 있다. 적절한 염기성염의 보다 구체적인 예로는 낙타륨염, 리튬염, 칼륨염, 마그네슘염, 알루미늄염, 칼슘염, 아연염, N,N'-디벤질에틸렌디아민염, 클로로프로카인염, 콜린염, 디에탄올아민염, 에틸렌디아민염, N-메틸글루카민염 및 프로카인염을 포함한다. 본 발명에 따른 화합물에 대한 하기의 언급에는 화학식(I)의 화합물과 이의 약제학적으로 허용가능한 염 모두를 포함한다.
- <52> 본원에서 사용된 용어 "18,21-디히드로막베신" 및 "막베신 II"(막베신의 디히드로퀴논 형태)는 혼용될 수 있다.
- <53> 상세한 설명
- <54> 본 발명은 상기에서 설명한 바와 같이 18,21-디데스옥시막베신 유사체, 이러한 화합물의 제조방법, 및 이러한

화합물을 의약적으로 이용하는 방법 및 추가적인 반합성 유도체 또는 생체내 변환 방법에 의한 유도체로를 위한 중간체 또는 주형(templates)으로서 이용하는 방법을 제공한다.

- <55> 바람직하게는 R₁은 H 또는 OH이다. 본 발명의 한 실시태양에서 R₁은 H이다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서 R₁은 OH이다.
- <56> 바람직하게는 R₂는 H이다.
- <57> 바람직하게는 R₃는 CONH₂이다.
- <58> 본 발명의 한 실시태양에서 바람직하기로 R₄ 및 R₅는 함께 하나의 결합이다.
- <59> 본 발명의 다른 실시태양에서 바람직하기로 R₄ 및 R₅는 각각 H이다.
- <60> 본 발명 화합물의 일 실시예에서 R₆, R₇ 및 R₈은 모두 수소이다.
- <61> 본 발명 화합물의 다른 일 실시예에서 R₆, R₇ 및 R₈은 모두 수소가 아니다.
- <62> 본 발명의 한 실시태양에서 R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂O⁻이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이다.
- <63> 본 발명의 다른 실시태양에서 R₁은 OH이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이다.
- <64> 본 발명의 하나의 적절한 실시태양에서 R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆, R₇ 및 R₈은 각각 H이다.
- <65> 본 발명의 하나의 적절한 실시태양에서 R₁은 OH이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆, R₇ 및 R₈은 각각 H이다.
- <66> 본 발명의 하나의 적절한 실시태양에서 R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 F이고 R₇ 및 R₈은 각각 H이다.
- <67> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 OH이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 F이고 R₇ 및 R₈은 각각 H이다.
- <68> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂O⁻이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 H이고 R₇은 F이며 R₈은 H이다.
- <69> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 OH이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆은 H이고 R₇은 F이며 R₈은 H이다.
- <70> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 본 발명의 화합물을 예를 들어 하기 구조로 나타낸 바와 같이, R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆ 및 R₇은 각각 F이고 R₈은 H이다.



<71>

본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 OH이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆ 및 R₇은 각각 F이고 R₈은 H이다.

<72>

본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆, R₇ 및 R₈은 각각 F이다.

<73>

안사 고리에 대한 비-수소 결사슬의 바람직한 입체화학은 하기 도 1 및 도 2(즉, 바람직한 입체화학은 막베신의 입체화학을 따름)에 나타낸 바와 같다.

<75>

본 발명은 또한 생체내 변환 또는 합성 화학에 의한 추가적인 변형을 위한 기질로서 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 용도를 제공한다.

<76>

하나의 양태로서, 본 발명은 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 의약 용도를 제공한다. 추가적인 실시태양에서 본 발명은 암, B-세포 악성종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리를 위한, 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 용도를 제공한다.

<77>

다른 하나의 양태로서, 본 발명은 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 의약품 제조를 위한 용도를 제공한다. 추가적인 실시태양에서 본 발명은 암, B-세포 악성종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리를 위한 의약품의 제조를 위한, 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 용도를 제공한다.

<78>

추가적인 실시태양에서, 본 발명은 치료학적으로 유효한 양의 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암, B-세포 악성종양, 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 방법 및/또는 암의 예방적 전처리 방법을 제공한다.

<79>

상기에서 기재한 바와 같이, 본 발명의 화합물은 암 및/또는 B-세포 악성종양 치료에 유용할 것으로 기대된다. 본 발명의 화합물은 예를 들면, 이에 제한되지는 않지만 말라리아, 진균성 감염, 중추신경계 질환, 퇴행성 신경질환, 혈관신생 의존성 질환, 류마티스성 관절염 같은 자가면역질환의 다른 징후들의 치료나 암의 예방적 전처리에도 효과적일 수 있다.

<80>

중추신경계 질환 및 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 프리온병, 척수인경 근위축증 (SBMA), 근위축성 측삭 경화증(ALS)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

<81>

혈관신생 의존성 질병은 노인성 황반변성, 당뇨병성 망막증 및 다양한 다른 안과질환, 동맥경화증 및 류마티스 성 관절염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

<82>

자가면역질환은 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 전신성 홍반성 류푸스, 건선을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- <83> "환자"는 인간 및 다른 동물(특별히 포유류) 대상을 포함하며, 바람직하게는 인간 대상이다. 따라서, 본 발명의 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 상기 방법 및 용도는 인간 의학 및 수의학 분야에서의 용도이며, 바람직하게는 인간 의학분야의 용도이다.
- <84> 상기에서 언급된 본 발명의 화합물 또는 이의 제형은 이에 제한되지는 않지만 예를 들면, 비경구 투여(정맥내 투여 포함), 경구 투여, 국부 투여(구강, 설하, 경피를 포함), 의료용 장치(예를 들어, 스텐트), 흡입에 의해, 또는 주사(피하 또는 근육내)를 통한 어떠한 통상적인 방법에 의해서라도 투여될 수 있다. 치료는 단일 투여 또는 일정 시간에 걸친 복수회의 투여로 이루어질 수 있다.
- <85> 본원 발명의 화합물은 단독으로 투여되는 것이 가능하지만, 하나 또는 그 이상의 허용 가능한 희석제 또는 담체와 함께 약제학적 제형으로서 제공되는 것이 바람직하다. 이에 본 발명의 화합물과 함께 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 상기 희석제 또는 담체는 본 발명의 화합물과 양립할 수 있다는 의미에서 "허용가능"해야만 하고 복용자에게 해롭지 않아야 한다. 적합한 담체의 예는 하기에 보다 상세하게 기술한다.
- <86> 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 다른 치료제와 복합적으로 투여될 수 있다. 두 가지(또는 그 이상) 제제의 복합투여는 각각을 사용할 때보다 훨씬 작은 양으로 투여 가능하게 하여 부작용을 줄일 수 있다. 또한, 이전의 치료에 의해 질병에 내성이 생긴 경우에도 암과 같은 질병의 재감작(resensitisation)을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 화합물 및 추가적인 치료제를 하나 또는 그 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- <87> 또 다른 양태로서, 본 발명은 세포독성제 또는 세포증식 억제제 같은 암 또는 B-세포 악성 종양 치료를 위한 제2의 제제와 함께 복합 치료를 하기 위한 본 발명 화합물의 용도를 제공한다.
- <88> 일 실시태양에서, 본 발명의 화합물은 암 또는 B-세포 악성 종양 치료를 위해 세포독성제 또는 세포증식 억제제와 같은 다른 치료제와 함께 복합 투여된다. 전형적인 추가적 제제로는 알킬화제제 및 유사분열 억제제(토포이 소머라제 II 억제제 및 튜불린 억제제 포함)와 같은 세포독성제가 포함된다. 또 다른 전형적인 추가적 제제로는 DNA 결합제; 항대사제; 및 단백질 키나아제 억제제 및 타이로신 키나아제 수용체 차단제와 같은 세포증식 억제제가 포함된다. 적합한 제제로는 메토트렉사이트, 류코보린, 프레니손, 블레오마이신, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 파클리타센, 도세택센, 빙크리스틴, 빙블라스틴, 비노렐빈, 독소루비신(아드리아마이신), 타목시펜, 토레미펜, 메게스트롤 아세테이트, 아나스트로졸, 고세렐린, 항-HER2 단일 클론 항체(예를 들어, 상표 Herceptin™으로 시판되는 트라스투주맙), 카페시타빈, 라록시펜 염화수소, EGFR 억제제(예를 들어, 상표 Iressa®로 시판되는 계피티닙, 상표 Tarceva™로 시판되는 엘로티닙, 상표 Erbitux™로 시판되는 세톡시맙), VEGF 억제제(예를 들어, 상표 Avastin™으로 시판되는 베바시주맙), 및 프로테아좀 억제제(예를 들어, 상표 Velcade™로 시판되는 보르테조맙)가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 또한, 적합한 제제로는 시스플라틴, 사이타라빈, 사이클로헥시클로로에틸니트로스우레이, 쟈시타빈, 이포스프아미드, 류코보린, 미토마이신, 미토잔톤, 옥살리플라틴, 및 탁솔과 빈데신을 포함하는 탁산과 같은 통상적인 화학치료제; 호르몬 치료제; 세톡시맙(항-EGFR)과 같은 단일클론항체 치료제; 다사티닙, 라파티닙과 같은 단백질 키나아제 억제제; 보리노스타트와 같은 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제; 수니티닙, 소파레닙, 레나리도미드와 같은 혈관신생 억제제; 템시로리무스와 같은 mTOR 억제제; 및 상표 Glivec®으로 시판되는 이마티닙이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 추가적으로, 본 발명의 화합물은 방사선 치료 또는 외과 수술을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 치료와 병용하여 투여될 수 있다.
- <89> 제형은 편리하게는 단위 투약 형태로 제공될 수 있고, 제약 업계에 잘 알려져 있는 어떠한 방법을 이용하여서도 제조될 수 있다. 이러한 방법은 활성 성분(본 발명의 화합물)을 하나 또는 그 이상의 부속 성분으로 구성되는 담체와 조합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로 상기 제형은 활성 성분을 액체 담체 또는 미세하게 분쇄된 고체 담체 또는 둘 모두와 조합시키고, 다음으로 필요에 따라 제품 모양을 만드는 과정에 의해 균일하고 밀접하게 결합되도록 제조된다.
- <90> 본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 투여 형태의 활성 성분, 선택적으로 무독성 유기 또는 무기, 산 또는 염기, 부가 염의 형태로 포함하는 약제학적 제형의 형태로 경구 또는 임의의 비경구 경로에 의해 정상적으로 투여될 것이다. 투여 경로뿐만 아니라, 치료될 질병 및 환자에 따라 상기 조성물은 다양한 투여량으로 투여될 수 있다.
- <91> 예를 들어, 본 발명의 화합물은 즉시-, 지연- 또는 조절-방출 적용을 위해 정제, 캡슐, 좌제, 엘리서, 용액 또

는 혼탁액의 형태로 경구, 구강 또는 설하 투여될 수 있으며, 이들은 향료 또는 색소를 포함할 수 있다.

<92> 이러한 정제는 미세결정 셀룰로즈, 락토오즈, 시트르산 나트륨, 탄산 칼슘, 제2인산 칼슘 및 글리신과 같은 부형제, 전분(바람직하게 옥수수, 감자 또는 타피오카 전분), 전분 글리콜산 나트륨(sodium starch glycolate), 크로스카멜로스 나트륨 및 특정 복합 규산염과 같은 붕해제, 및 폴리비닐파롤리돈, 히드록시프로필메틸셀룰로스(HPMC), 히드록시-프로필셀룰로스(HPC), 수크로스, 젤라틴 및 아카시아와 같은 과립화 결합제를 포함할 수 있다. 추가적으로, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산, 글리세릴 베헤네이트 및 탈크와 같은 윤활제를 포함할 수 있다.

<93> 유사한 형태의 고형 조성물은 또한 젤라틴 캡슐의 충진제로 사용될 수 있다. 이러한 측면에서 바람직한 부형제로는 락토오스, 전분, 셀룰로스, 유당 또는 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다. 수성 혼탁액 및/또는 엘릭서의 경우, 본 발명의 화합물은 다양한 감미제 또는 향료, 착색 물질 또는 염료와 함께, 유화제 및/또는 혼탁제와 함께, 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜 및 글리세린과 같은 희석제와 함께, 그리고 이들의 조합물과 함께 혼합될 수 있다.

<94> 정제는 선택적으로 하나 또는 그 이상의 부속 성분과 함께 압착 또는 주형하여 만들 수 있다. 압착된 정제는 선택적으로 결합제(예를 들어, 포비돈, 젤라틴, 히드록시프로필메틸 셀룰로스), 윤활제, 비활성 희석제, 보존제, 붕해제(예를 들어, 전분 글리콜산 나트륨, 교차-결합된 포비돈, 교차-결합된 카르복시메틸 셀룰로스 나트륨), 표면-활성제 또는 분산제와 함께 혼합된, 분말 또는 과립과 같은 자유 유동성 형태로, 활성성분을 적합한 기계 안에서 압착시켜 제조될 수 있다. 주형된 정제는 비활성 액체 희석제로 적신 분말 화합물의 혼합물을 적합한 기계 안에서 몰딩하여 만들어질 수 있다. 상기 정제는 선택적으로 코팅되거나 자국을 낼 수 있고, 예를 들어 정해진 방출 특성을 제공하도록 다양한 비율의 히드록시프로필메틸 셀룰로스를 이용하여, 활성 성분이 느리게 또는 조절되어 방출되도록 제형화될 수 있다.

<95> 경구 투여에 적합한 본원 발명에 따른 제형은 각각이 미리 정해진 함량의 활성 성분을 포함하는, 캡슐, 교갑(cachet) 또는 정제와 같은 분리된 단위로서; 분말 또는 과립으로서; 수성 액체 또는 비-수성 액체 상태의 액체 또는 혼탁제로서; 또는 수중유(oil-in-water) 액체형 에멀젼 또는 유중수(water-in-oil) 액체형 에멀젼으로서 제공될 수 있다. 상기 활성 성분은 또한 환약(bolus), 연약(electuary), 또는 페이스트(paste)로서 제공될 수 있다.

<96> 입 안의 국소 투여에 적합한 제형으로는 일반적으로 수크로스 및 아카시아 또는 트래거캔스의 향기나는 기재(basis)에 활성 성분을 포함하는 로젠지(lozenge); 젤라틴과 글리세린, 또는 수크로스와 아카시아와 같은 비활성 기재에 활성 성분을 포함하는 향정(pastille); 및 적절한 액체 담체 내에 활성 성분을 포함하는 구강-세척액이 포함된다.

<97> 상기에서 특별히 언급된 성분들뿐만 아니라, 본 발명의 제형은 문제가 되는 제제의 형태를 고려하여 당해 분야에서 통상적인 기타 물질을 포함할 수 있는데, 예를 들어, 경구 투여를 위해 적절한 제제로는 향미료를 포함할 수 있다.

<98> 국부 투여에 적합한 약제학적 조성물은 연고, 크림, 혼탁액, 로션, 분말, 용액, 페이스트, 젤, 약물이 함침된 드레싱(impregnated dressing), 스프레이, 에어졸 또는 오일, 경피 기구, 분진성 분말(dusting powder) 등으로 제형화될 수 있다. 이러한 조성물은 활성제를 포함하는 전형적인 방법을 통해 제조될 수 있다. 따라서, 이들은 또한 보존제, 약물 침투를 돋는 용매, 크림 또는 연고를 위한 연화제, 및 로션을 위한 에탄올 또는 올레일 알코올과 같은 양립할 수 있는 전형적인 담체 및 첨가제를 포함할 수 있다. 이러한 담체는 조성물의 약 1% 내지 약 98%까지 존재할 수 있다. 보다 일반적으로 이들은 조성물의 약 80%까지를 형성할 것이다. 예시하여 설명하면, 크림 또는 연고는 바람직한 농도를 갖는 크림 또는 연고를 제조하기에 충분한 양으로, 화합물을 약 5-10중량%로 포함하여, 충분한 양의 친수성 재료와 물을 혼합함으로써 제조된다.

<99> 경피 투여를 위한 약제학적 조성물은 오랜 시간 동안 환자의 표피와 밀접하게 접촉되어 있도록 분리 패치로 제공될 수 있다. 예를 들어 활성 성분은 전리 요법에 의해 패치로부터 전달될 수 있다.

<100> 외부 조직, 예를 들어, 입 및 피부에 적용하기 위해서, 조성물은 바람직하기로는 국부 연고 또는 크림으로 적용된다. 연고로 제형화된 경우, 활성 성분은 파라핀 또는 물과 섞일 수 있는(water-miscible) 연고 베이스와 함께 사용될 수 있다.

<101> 양자택일적으로, 활성제는 수중유 크림 베이스 또는 유중수 베이스를 가진 크림으로 제형화될 수 있다.

- <102> 비경구 투여의 경우, 유입 단위 투약 형태(fluid unit dosage forms)는 활성 성분 및 살균된 베히클(vehicle)을 이용하여 제조할 수 있는데, 예를 들어, 물, 알코올, 폴리올, 글리세린 및 식물성 오일 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 바람직하게는 물을 이용할 수 있다. 상기 베히클 및 사용된 농도에 따라, 상기 활성 성분은 베히클에 혼탁되거나 용해될 수 있다. 용액을 제조하는 데 있어서, 상기 활성 성분은 주입을 위해 물에 용해할 수 있고 여과 살균한 후 적합한 바이알(vial) 또는 앰플에 충진되고 봉입될 수 있다.
- <103> 유리하게, 국소 마취제, 보존제 및 완충제와 같은 제제는 베히클에 용해될 수 있다. 안정성을 증진시키기 위해, 조성물은 바이알에 충진하고 진공 상태에서 물을 제거한 후 냉동시킬 수 있다. 냉동 건조된 분말은 그 다음 바이알 내에 봉입되고, 주사(injection)용 물을 담은 동봉된 바이알을 사용 전 분말을 액상으로 되게 하기 위하여 공급할 수 있다.
- <104> 비경구 혼탁액은, 활성 성분이 용해되는 대신에 베히클에 혼탁되고 여과를 통해 살균될 수 없는 것을 제외하고, 실질적으로 용액과 동일한 방법으로 제조한다. 상기 활성 성분은 살균된 베히클에 혼탁시키기 전 산화 에틸렌에 노출시켜 살균할 수 있다. 유리하게, 계면활성제 또는 침윤제가 조성물에 포함되어 상기 활성 성분의 균일한 분포를 촉진한다.
- <105> 본 발명의 화합물은 또한 당업계에 알려진 의료 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 일 실시태양에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 미국특허 제5,399,163호, 미국특허 제5,383,851호, 미국특허 제5,312,335호, 미국 특허 제5,064,413호, 미국특허 제4,941,880호, 미국특허 제4,790,824호 또는 미국특허 제4,596,556호에서 공지한 장치와 같은 바늘없는 피하주사 주입 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에서 유용한 잘 알려진 이식체(implants) 및 모듈의 예는, 조절된 속도로 약물을 투약하기 위한 이식 가능한 미세-주입 펌프를 공지한 미국특허 제4,487,603호; 피부를 통해 약물을 투여하기 위한 치료용 장치를 공지한 미국특허 제4,486,194호; 정확한 주입속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 공지한 미국특허 제4,447,233호; 연속적인 약물 전달을 위한 다양한 유입 속도의 이식 가능한 주입 기구를 공지한 미국특허 제4,447,224호; 멀티-챔버 구획(multi-chamber compartments)을 갖는 삼투 약물 전달 시스템을 공지한 미국특허 제4,439,196호; 및 삼투 약물 전달 시스템을 공지한 미국특허 제4,475,196호를 포함한다. 많은 다른 이러한 이식체, 전달 시스템 및 모듈은 당업계에 알려져 있다.
- <106> 본 발명 화합물의 투여량은 특정 화합물, 관련 질환, 환자 및 질환의 성질 및 심각도, 환자의 신체적 조건, 선택된 투여 경로에 따라 변경될 것이다. 적절한 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- <107> 상기 조성물은 투여 방법에 따라 본 발명의 화합물을 0.1중량% 이상, 바람직하게 5 내지 60중량%, 보다 바람직하게 10 내지 30중량%로 포함할 수 있다.
- <108> 본 발명 화합물의 개별적인 투약의 최적량 및 투약 간격은 치료되고 있는 병의 성질 및 정도, 투여 제형, 경로 및 부위, 그리고 치료되고 있는 특정 환자의 나이와 건강상태에 의해 결정될 것이고, 의사가 궁극적으로 사용될 적절한 투약을 결정할 것이라는 것은 당해 분야의 당업자가 알 수 있을 것이다. 이러한 투약은 적절할 정도로 자주 반복될 수 있다. 부작용이 생긴다면, 보통의 임상 진료에 따라서 투여량 및/또는 빈도를 변경하거나 또는 감소시킬 수 있다.
- <109> 또 다른 양태로서, 본 발명은 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 제조방법을 제공한다.
- <110> 막베신은 두 단계로 생합성되는 것으로 간주될 수 있다. 첫 번째 단계에서는 코어-PKS 유전자가 단순한 카르복실산 전구체의 반복 어셈블리에 의해 마크롤리드 코어를 조립하는데, 이는 그 다음 도 1에서 보듯이, 첫 번째 효소-없는 중간체 "프리-막베신"을 형성하기 위해 환형화되는 폴리케티드 사슬을 제공한다. 두 번째 단계에서는 일련의 "post-PKS" 절단 효소들(예를 들면, P450 모노옥시게나제, 메틸트랜스퍼라제, FAD-의존성 옥시게나제 및 실시태양트랜스퍼라제)이 프리-막베신 주형에 다양한 부가기들(additional groups)을 부가하는 작용을 하고, 도 2와 같은 최종적인 모체 화합물 구조를 생성한다. 18,21-디데스옥시막베신 유사체는 비슷한 방법으로 생합성될 수 있다.
- <111> 이러한 생합성 생산은 선택적으로 신규한 화합물을 생산할 수 있는 적합한 생산 균주의 유전적 조작을 겸한 생체내 변환 방법에 의해 개발되어질 수 있다. 특별히, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 제조방법을 제공한다:
- <112> a) 적절한 조건에서 배양시 막베신 또는 이의 유사체를 생산하는 첫번째 숙주 균주의 제공하는 단계;
- <113> b) 상기 균주에 인공적인 스타터 산을 주입하는 단계;

- <114> c) 상기 균주를 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 제조를 위한 적절한 조건에서 배양하는 단계; 및
- <115> 선택적으로, d) 제조된 화합물을 분리하는 단계.
- <116> 상기 방법은 추가적으로 하기 단계를 포함할 수 있다:
- <117> e) 일반적으로 상기 단계 c) 이전에 수행되며, 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자 또는 이의 상동체인 유전자를 결실시키거나 불활성화시키는 단계, 및/또는
- <118> 상기 방법은 추가적으로 하기 단계를 포함할 수 있다:
- <119> f) 일반적으로 상기 단계 c) 이전에 수행되며, 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자를 결실시키거나 불활성화시키는 단계.
- <120> 단계 (a)에서 "막베신 및 이의 유사체를 생산하는 숙주 균주"는 적절한 조건 하에서 배양했을 때 R_1-R_8 의 정의에 의한 변형을 포함하는 막베신 또는 이들의 유사체, 특별히 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 생산하는 균주를 의미한다. 적절한 조건 (및 단계 c)에서의 적합한 조건으로는 적합한 스타터 주입물 및 적합한 조성물의 생장 배지(당업자에게 잘 알려져 있거나 공지의 방법으로 결정될 수 있음)를 준비하는 것이 포함된다.
- <121> 적합하기로는 인공적인 스타터 주입물은 치환된 벤조산(천연의 스타터 산인 3-아미노-5-히드록시-벤조산은 아님)이다. 가장 적합하기로는 인공적인 스타터 주입물은 벤젠 고리가 선택적으로 1개 내지 3개의 플루오르 원자에 의해 치환된 3-아미노-벤조산이다.
- <122> 적합한 실시태양에서 인공적인 스타터 산 주입물은 3-아미노벤조산이다.
- <123> 또 다른 적합한 실시태양에서 인공적인 스타터 산 주입물은 5-아미노-2-플루오르벤조산이다.
- <124> 또 다른 적합한 실시태양에서 인공적인 스타터 산 주입물은 5-아미노-3-플루오르벤조산이다.
- <125> 또 다른 적합한 실시태양에서 인공적인 스타터 산 주입물은 5-아미노-2,3-디플루오르벤조산이다.
- <126> 또 다른 적합한 실시태양에서 인공적인 스타터 산 주입물은 5-아미노-2,3,6-트리플루오르벤조산이다.
- <127> 당업자라면 동일한 화합물을 제조하기 위하여 숙주 균주에 주입될 수 있는 양자택일적인 인공적인 스타터 유닛으로 예를 들어 비제한적으로 치환된 벤조산의 메틸 에스테르, 에틸 에스테르, N-아세틸-시스테아민 티오에스테르; 및 예를 들어 N-아세틸-시스테아민 티오에스테르와 같은 통합을 위해 적절히 활성화된 생합성 중간체의 디케티드 유사체가 있다는 것을 알 수 있을 것이다.
- <128> 본 발명의 첫 번째 실시태양에서 숙주 균주는 막베신 생산 균주이다.
- <129> 또 다른 실시태양에서 숙주 균주는 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주이다.
- <130> 또 다른 실시태양에서 숙주 균주는 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주이다. 예를 들어, 숙주 균주는 $mbcM$ 및 선택적으로 추가적인 post-PKS 유전자가 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주일 수 있다. 구체적으로, 숙주 균주는 $mbcM$ 이 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주일 수 있다. 양자택일적으로 숙주 균주는 $mbcM$, $mbcMT1$, $mbcMT2$, $mbcP$ 및 $mbcP450$ 이 결실되거나 또는 비활성화된, 막베신 생산 균주의 조작된 균주일 수 있다.
- <131> 적합하기로는 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자 및/또는 post-PKS 유전자가 선택적으로 결실되거나 또는 비활성화될 것이다.
- <132> 또 다른 실시태양에서, 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자 또는 post-PKS 유전자는 DNA를 유전자내로 통합시킴으로써 기능적인 단백질이 생산되지 않도록 상기 조작된 균주 내에서 비활성화된다. 다른 실시태양에서, 하나 또는 그 이상의 상기 스타터 유닛 생합성 유전자 또는 post-PKS 유전자는 표적화된 결실 또는 결실들을 만듬으로써 상기 조작된 균주 내에서 결실된다. 또 다른 실시태양에서 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자 또는 post-PKS 유전자는 위치 특이 돌연변이(site-directed mutagenesis)에 의해 상기 조작된 균주 내에서 불활성화된다. 또 다른 실시태양에서 막베신 생산 숙주 균주는 화학적으로 또는 UV로 돌연변이되며, 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 효소 또는 post-PKS 효소가 작용하지 않는 변형된 균주가 선택된다. 본 발명은 또한 하나 또는 그 이상의 스타터 유닛 생합성 유전자 또는 post-PKS 유전자의 발현을 억제할 수 있는 조절자를 돌연변이 시키는 것을 포함하는데, 당업자라면 조절자의 결실 또는 불활성화가 유전자

의 결실 또는 불활성화와 같은 결과를 나타낼 수 있음을 알 것이다.

<133> 또 다른 실시태양에서 상기와 같이 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자가 결실되거나 불활성화되도록 조작된 균주 내로 대체가능한 막베신 생산 균주로부터 유래된 하나 또는 그 이상의 동일한 post PKS 유전자, 또는 이의 상동체가 재도입된다.

<134> 또 다른 실시태양에서 하나 또는 그 이상의 결실되거나 불활성화되도록 조작된 균주는 이에 제한되는 것은 아니나, 리파마이신, 안사미토신, 젤다나마이신 또는 허비마이신의 생합성에 관계된 클러스터를 포함하는 이종의 PKS 클러스터 유래의 하나 또는 그 이상의 post PKS 유전자에 의해 보완되어진다.

<135> post PKS 유전자를 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 방법은 하기의 단계를 포함한다:

<136> (i) 관심 유전자(예를 들어, 라파마이신, 젤다나마이신 또는 허비마이신 생합성 클러스터 및/또는 다른 이용가능한 서열)의 상동체에 기초한 축퇴성 올리고를 고안하고, PCR 반응에서 이러한 프라이머를 사용하여 적합한 막베신 생산 균주로부터 관심 유전자의 내부적 단편을 분리하는 단계;

<137> (ii) 상기 단편을 포함하는 플라스미드를 동일한 균주 또는 다른 막베신 생산 균주로 통합시켜, 상동재조합에 의해 표적화된 유전자를 파괴시키는 단계;

<138> (iii) 상기와 같이 생산된 균주를 막베신 유사체, 즉 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 생산에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계.

<139> 구체적 실시태양에서, 단계 (i)의 막베신-생산 균주는 악티노신네마 미럼(*Actinosynnema mirum*; *A. mirum*)이다. 또 다른 구체적 실시태양에서 단계 (ii)의 막베신-생산 균주는 악티노신네마 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum*; *A. pretiosum*)이다.

<140> 당업자는 상기에서 기술된 대체가능한 방법들을 사용하여 균등한 균주를 얻을 수 있음을 알 것이다. 예를 들어:

<141> · 축퇴성 올리고는 이에 제한되는 것은 아니나 예를 들면, *A. pretiosum* 또는 *A. mirum*과 같은 막베신 생산 균주 유래의 관심 유전자를 증폭하는 데 이용될 수 있다.

<142> · 다른 축퇴성 올리고는 막베신 생산업체 또는 이의 상동체를 생산하는 균주로부터, post-PKS 유전자 또는 그 상동체의 적절한 부분을 성공적으로 증폭시킬 수 있도록 고안될 수 있다.

<143> · *A. pretiosum* 균주의 유전자 서열은 *A. pretiosum*의 유전자에 특이적인 올리고를 합성하는데 사용될 수 있으며, 이때 내부적 단편은 막베신 생산 균주, 예를 들면 *A. pretiosum* 또는 *A. mirum*으로부터 증폭될 수 있다.

<144> · *A. pretiosum* 균주의 유전자 서열은 *A. pretiosum*의 유전자에 대한 축퇴성 올리고를 생성하기 위해 상동 유전자 서열과 함께 이용될 수 있으며, 이때 내부적 단편은 막베신 생산 균주, 예를 들면 *A. pretiosum* 또는 *A. mirum*으로부터 증폭될 수 있다.

<145> 도 2는 막베신 생합성 클러스터 내에서 post-PKS 유전자의 활성을 보여준다. 당업자라면 이에 따라 관심 화합물을 생산할 균주가 되도록 어떠한 추가적인 post-PKS 유전자가 결실되거나 비활성화될 필요가 있는지 확인할 수 있을 것이다.

<146> 이러한 시스템에서 불활성화 또는 결실을 포함하는 기술된 방법들 중 어느 하나의 방법에 의해 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자가 작용하지 않는 균주가 생성된 때, 하나 이상의 18,21-디데스옥시막베신 유사체가 제조될 수 있는 것으로 관찰되었다. 이에 대해 당업자들에 의해 이해될 수 있는 많은 가능한 이유들이 있다. 예를 들면, post-PKS 단계에 바람직한 순서가 있을 수 있는데, 하나의 활성을 제거하는 것이 이후의 모든 단계를 관련된 효소들에 맞지 않는 기질 상에서 이루어지도록 할 수 있다. 이는 post-PKS 효소에 제공되는 새로운 기질에 대한 낮은 효율성, 또는 단계의 순서가 바뀌어 더이상 남아있는 효소에 대한 기질이 아닌 단계 생성물들로 인하여, 배양액 내에 중간체를 생성하도록 할 수 있다.

<147> 당업자라면 혼합물 내에서 관찰되는 화합물의 비율은 성장 조건을 변화시킴으로써 조절될 수 있음을 알 것이다.

<148> 당업자라면 생합성 클러스터 내의 일부 유전자가 오페론 내에 구성되고 하나의 유전자 파괴는 종종 동일 오페론 내의 하위 유전자의 발현에 영향을 준다는 것을 알 것이다.

<149> 화합물의 혼합물이 관찰될 때, 이들은 하기의 실시예에 일부 기재된 바와 같은 전형적인 방법을 사용하여 쉽게 분리할 수 있다.

- <150> 18,21-디데스옥시막베신 유사체는 본원에서 기재된 바와 같이 많은 방법을 통해 선별될 수 있고, 하나의 화합물이 선호적인 특징을 보이는 환경 내에서 균주는 바람직하기로는 이러한 화합물을 만들도록 조작될 수 있다. 이것이 가능하지 않은 비정상적인 환경 내에서 중간체가 형성될 수 있는데, 이는 이후 원하는 화합물을 생산하기 위해 생체내 변환이 일어날 수 있다.
- <151> 본 발명은 막베신 PKS 유전자 클러스터 유래의 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자의 선택적인 결실 또는 불활성화에 의해 생성된 신규한 막베신 유사체를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 막베신 생산 균주에 인공적인 스타터 유닛을 주입하고, 선택적으로 막베신 PKS 유전자 클러스터로부터 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자를 선택적으로 결실 또는 불활성화시킴으로써, 생산되는 신규한 18,21-디데스옥시막베신 유사체에 관한 것이다.
- <152> 당업자라면 유전자가 기능하지 않도록 하기 위해 유전자를 완전하게 제거할 필요가 없다는 것을 알 수 있을 것이다며, 결과적으로 본원에서 사용된 용어 "결실되거나 불활성화된다"는 유전자가 기능하지 않게 되는 어떤 방법이라도 포함하며, 이에 제한되지는 않지만, 유전자가 발현하지 않거나 불활성화 단백질을 생산하도록 발현되도록 하는, 유전자 전체적인 결실, 유전자의 일부 결실, 표적 유전자로의 삽입에 의한 불활성화, 위치특이적 돌연변이; 유전자가 발현되지 않거나 불활성화 단백질을 생산하도록 발현되도록 하는, 숙주 균주의 돌연변이(예를 들면, 방사선 또는 돌연변이 유발 화학제, 원형질체 융합 또는 트랜스포존 돌연변이)를 포함한다. 대안적으로, 활성 유전자의 기능은 억제제에 의해 화학적으로 약화될 수 있는데, 예를 들면 메타파이론(다른 명칭: 2-메틸-1,2-디(3-페리딜-1-프로파논), EP 0 627 009) 및 안사이미돌은 산화제의 억제제이며, 이를 화합물을 생산 배지에 첨가되어 유사체를 생성시킬 수 있다. 또한, 시네핀진(sinefungin)은 메틸 트랜스퍼라제 억제제이고, 이는 생체 내에서의 메틸 트랜스퍼라제 활성 억제를 위한 것을 제외하고 유사하게 사용될 수 있다(McCammon and Parks 1981).
- <153> 또 다른 실시태양에서, 모든 post-PKS 유전자가 결실되거나 불활성화될 수 있고, 이때 하나 또는 그 이상의 유전자가 상보성(예를 들면, 자가-복제 플라스미드 상의 부착 부위(att site)에 또는 염색체의 상동부위 내로의 삽입에 의해)에 의해 재도입될 수 있다. 그러므로, 특별한 실시태양에서 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 생성방법에 관한 것이다:
- <154> a) 적합한 조건 하에서 배양했을 때 막베신을 생산하는 첫 번째 숙주 균주를 제공하는 단계;
 - <155> 선택적으로, b) 모든 post-PKS 유전자를 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 단계;
 - <156> c) 상기 균주에 인공적인 스타터 유닛을 주입하는 단계;
 - <157> d) 상기 변형된 숙주 균주를 18,21-디데스옥시막베신 유사체 생산에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계; 및
 - <158> 선택적으로 e) 상기 생산된 화합물을 분리하는 단계.
- <159> 다른 실시태양에서, 하나 또는 그 이상이 결실된 post-PKS 유전자가 재도입된다. 또 다른 실시태양에서, *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* 및 *mbcP450*으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 재도입된다. 또 다른 실시태양에서, *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* 및 *mbcP450*으로 구성된 군으로부터 선택되는 2개 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 재도입된다. 또 다른 실시태양에서, *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* 및 *mbcP450*으로 구성된 군으로부터 선택되는 3개 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 재도입된다. 또 다른 실시태양에서, *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* 및 *mbcP450*으로 구성된 군으로부터 선택되는 4개 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 재도입된다. 또 다른 실시태양에서, *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT1*, *mbcMT2* 및 *mbcP450*으로 구성된 군으로부터 선택되는 5개 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 재도입된다. 임의로, 이에 제한되지는 않지만 젤다나마이신 또는 허비마이신 경로와 같은 다른 PKS 생합성 클러스터 유래의 유전자가 적절히 도입될 수 있다.
- <160> 또한, 당업자에게 post-PKS 유전자들의 서브셋이 결실되거나 불활성화될 수 있고, 선택적으로 상기 post-PKS 유전자들의 더 작은 서브셋이, 인공적인 스타터 유닛이 주입되었을 때 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 생산하는 균주에 재도입될 수 있다는 사실은 명백할 것이다.
- <161> 그러므로, 바람직한 실시태양에서 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 생성방법에 관한 것이다:
- <162> a) 적합한 조건 하에서 배양했을 때 막베신을 생산하는 첫 번째 숙주 균주를 제공하는 단계;
 - <163> b) *mbcM*을 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 단계;

- <164> c) 상기 균주에 인공적인 스타터 유닛을 주입하는 단계;
- <165> d) 상기 변형된 숙주 균주를 18,21-디데스옥시막베신 유사체 생산에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계; 및
- <166> 선택적으로 e) 상기 생산된 화합물을 분리하는 단계.
- <167> 또 다른 바람직한 실시태양에서 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 생성방법에 관한 것이다:
- <168> a) 적합한 조건 하에서 배양했을 때 막베신을 생산하는 첫 번째 숙주 균주를 제공하는 단계;
- <169> b) *mbcM* 및 *mbcP450*을 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 단계;
- <170> 선택적으로 c) 추가적인 post-PKS 유전자를 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 단계;
- <171> d) 상기 균주에 인공적인 스타터 유닛을 주입하는 단계;
- <172> e) 상기 변형된 숙주 균주를 18,21-디데스옥시막베신 유사체 생산에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계; 및
- <173> 선택적으로 f) 상기 생산된 화합물을 분리하는 단계.
- <174> 또 다른 바람직한 실시태양에서 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 생성방법에 관한 것이다:
- <175> a) 적합한 조건 하에서 배양했을 때 막베신을 생산하는 첫 번째 숙주 균주를 제공하는 단계;
- <176> b) *mbcM*, *mbcMT1*, *mbcMT2*, *mbcP* 및 *mbcP450*을 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 단계;
- <177> 선택적으로 c) 추가적인 post-PKS 유전자 또는 스타터 유닛 생합성 유전자를 선택적으로 결실시키거나 불활성화시키는 단계;
- <178> d) 상기 균주에 인공적인 스타터 유닛을 주입하는 단계;
- <179> e) 상기 변형된 숙주 균주를 18,21-디데스옥시막베신 유사체 생산에 적합한 조건 하에서 배양하는 단계; 및
- <180> 선택적으로 f) 상기 생산된 화합물을 분리하는 단계.
- <181> 폴리케티드 유전자 클러스터가 이종 숙주 내에서 발현될 수 있다는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다(Pfeifer and Khosla, 2001). 따라서, 본 발명은 저항성 및 조절 유전자를 포함하거나 포함하지 않는, 완전하거나 결실을 포함하는, 막베신 생합성 유전자 클러스터의 이종 숙주 내로의 전이를 포함한다. 양자택일적으로, 완전한 막베신 생합성 클러스터는 저항성 및 조절 유전자를 포함하거나 포함하지 않은 상태로 이종 숙주내로 전이될 수 있으며, 이는 그 다음 본원에 기재된 방법들을 통해 하나 또는 그 이상의 post-PKS 유전자 또는 스타터 유닛 생합성 유전자를 결실시키거나 불활성화시키도록 조작될 수 있다. 상기에서 정의된 바와 같이 이러한 방대한 DNA 절편들의 전이를 위한 방법 및 벡터는 당업계에 잘 알려져 있거나(Rawlings, 2001; Staunton and Weissman, 2001), 본원에서 기술된 방법으로 제공된다. 이러한 배경에서, 바람직한 숙주세포 균주는 원핵생물이며, 더욱 바람직하게는 악티노마이세테 또는 대장균이고, 더욱더 바람직한 숙주 세포 균주는 악티노신네마 미럼 (*Actinosynnema mirum*; *A. mirum*), 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*; *A. pretiosum*), *S. 하이그로코피쿠스*(*S. hygroscopicus*), *S. 하이그로코피쿠스* 속(*S. hygroscopicus* sp.), *S. 하이그로코피쿠스* 바. 아스코마이세티쿠스(*S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*), 스트렙토마이세스 쭈쿠엔시스(*Streptomyces tsukubaensis*), 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*), 사카로폴리스포라 에리쓰래아(*Saccharopolyspora erythraea*), 스트렙토마이세스 프라디애(*Streptomyces fradiae*), 스트렙토마이세스 아버미티리스(*Streptomyces avermitilis*), 스트렙토마이세스 신나모넨시스(*Streptomyces cinnamonensis*), 스트렙토마이세스 리모수스(*Streptomyces rimosus*), 스트렙토마이세스 알버스(*Streptomyces albus*), 스트렙토마이세스 그리세오퍼스쿠스 (*Streptomyces griseofuscus*), 스트렙토마이세스 롬지스포로플라버스(*Streptomyces longisporoflavus*), 스트렙토마이세스 베네주에래(*Streptomyces venezuelae*), 스트렙토마이세스 알버스(*Streptomyces albus*), 마이크로모노스포라 종(*Micromonospora* sp.), 마이크로모노스포라 그리세오루비다(*Micromonospora griseorubida*), 아미코라톱시스 메디터라네이(*Amycolatopsis mediterranei*) 또는 악티노플라네스 종 (*Actinoplanes* sp.) N902-109를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 추가적인 예로는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 겔다너스(*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus*) 및 스트렙토마이세스

비오라세우스니거(*Streptomyces violaceusniger*)를 포함한다.

<182> 일 실시태양에서 전체적인 생합성 클러스터가 전이되었다. 또 다른 실시태양에서 전체 PKS가, 관련된 스타터 유닛 생합성 유전자 및/또는 post-PKS 유전자 없이, 전이되었다.

<183> 다른 실시태양에서 전체적인 막베신 생합성 클러스터는 전이된 다음, 본원에 기술된 바에 따라 조작된다.

<184> 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명의 18,21-디데스옥시막베신 유사체는 적합한 균주를 이용한 생체내 전환에 의해 더 처리될 수 있다. 적합한 균주는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들면 악티노신네마 미럼(*Actinosynnema mirum*), 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*), *S. 하이그로코피쿠스*(*S. hygroscopicus*), *S. 하이그로코피쿠스* 속(*S. hygroscopicus* sp.)과 같은 이용가능한 야생형 균주일 수 있다. 양자택일적으로, 적합한 균주는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들면, *mbcM*, *mbcN*, *mbcP*, *mbcMT2*, *mbcP450*(본원에서 정의된 바와 같이), *gdmN*, *gdmM*, *gdmL*, *gdmP*(Rascher et al., 2003), 젤다나마이신 0-메틸 트랜스퍼라제, *hbmN*, *hbmL*, *hbmP*, (Rascher et al., 2005), 허비마이신 0-메틸 트랜스퍼라제 및 추가적인 허비마이신 모노옥시게나제, *asm7*, *asm10*, *asm11*, *asm12*, *asm19* 및 *asm21* (Cassady et al., 2004, Spiteller et al., 2003)에 의해 코딩된 특별한 post-PKS 효소를 이용하여 생체내변환되도록 조작될 수 있다. 아직 규명되지 않은 유전자가 있거나, 공유 도메인 내의 서열이 존재하지 않더라도 당업자가 전형적인 방법을 통해 이러한 서열을 획득하는 것은 통상적인 것이다. 예를 들면 젤다나마이신 0-메틸 트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자 서열은 공유 도메인 내에 존재하지 않지만, 당업자는 프로브를 만들 수 있는데, 비슷한 0-메틸 트랜스퍼라제를 이용하여 이종의 프로브를 만들거나 이용가능한 상동의 유전자로부터 축퇴성 프라이머를 고안함으로써 상동의 프로브를 만들어 젤다나마이신 생산 균주 상에서 서던블롯(Southern blots)을 수행할 수 있으며, 이를 통해 생체내변환 시스템을 생성할 수 있는 이러한 유전자를 획득할 수 있다.

<185> 특별한 실시태양에서, 상기 균주는 본래의 폴리케티드 클러스터에 의해 생산되는 폴리케티드 생산을 막을 수 있도록, 전체적 또는 부분적으로 결실되거나, 아니면 불활성화된 하나 또는 그 이상의 본래의 폴리케티드 클러스터를 가질 수 있다. 상기 조작된 균주는 예를 들면, 악티노신네마 미럼(*Actinosynnema mirum*), 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*), *S. 하이그로코피쿠스*(*S. hygroscopicus*), *S. 하이그로코피쿠스* 속(*S. hygroscopicus* sp.), *S. 하이그로코피쿠스* 바. 아스코마이세티쿠스(*S. hygroscopicus* var. *ascomyceticus*), 스트렙토마이세스 쭈쿠밴시스(*Streptomyces tsukubaensis*), 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*), 사카로폴리스포라 에리쓰래아(*Saccharopolyspora erythraea*), 스트렙토마이세스 프라디애(*Streptomyces fradiae*), 스트렙토마이세스 아버미티리스(*Streptomyces avermitilis*), 스트렙토마이세스 신나모넨시스(*Streptomyces cinnamonensis*), 스트렙토마이세스 리모수스(*Streptomyces rimosus*), 스트렙토마이세스 알버스(*Streptomyces albus*), 스트렙토마이세스 그리세오페스쿠스(*Streptomyces griseofuscus*), 스트렙토마이세스 론지스포로플라버스(*Streptomyces longisporoflavus*), 스트렙토마이세스 베네주에래(*Streptomyces venezuelae*), 마이크로모노스포라 종(*Micromonospora* sp.), 마이크로모노스포라 그리세오루비다(*Micromonospora griseorubida*), 아미코라톱시스 메디터라네이(*Amycolatopsis mediterranei*) 또는 악티노플라네스 종 (*Actinoplanes* sp.) N902-109를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 추가적인 가능한 균주는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 젤다너스(*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *geldanus*) 및 스트렙토마이세스 비오라세우스니거(*Streptomyces violaceusniger*)를 포함한다.

<186> 상기에서 기재한 바와 같이 본 발명의 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 제조 과정이 실질적으로 또는 전적으로 생합성에 의한다고 하더라도, 전형적인 화학적 합성 방법을 포함하는 과정에 의한 본 발명의 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 생산하거나 상호전환하는 것을 배제하는 것은 아니다.

<187> 막베신 PKS 유전자 클러스터의 유전적 조작을 위해, 먼저 유전자 클러스터가 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*)으로부터 서열분석되었지만, 당업자라면 예를 들면, 이에 제한되는 것은 아니나 악티노신네마 미럼(*Actinosynnema mirum*)과 같은 막베신을 생산하는 대체가능한 균주가 있다는 것을 알 것이다. 이러한 균주 유래의 막베신 생합성 유전자 클러스터는 본원에서 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*)에 대해 기재한 바와 같이 서열분석될 수 있으며, 상기 정보는 동등한 균주를 생성하는데 사용될 수 있다.

<188> 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기를 포함한다:

<189> - *mbcM* 및 선택적으로 추가의 post-PKS 유전자가 결실되거나 불활성화된 막베신 생산 균주를 기초로 조작된 균

주로서, 구체적으로 *mbcM*이 결실 또는 불활성화되거나, *mbcM*, *mbcMT1*, *mbcMT2*, *mbcP* 및 *mbcP450* 이 결실되거나 불활성화되도록 제작된 균주. 적합하기로는 막베신 생산 균주는 *A. pretiosum* 또는 *A. mirum*)이다.

<190> - *mbcM* 및 선택적으로 추가의 post-PKS 유전자 및/또는 스타터 유닛 생합성 유전자가 결실되거나 불활성화된 막베신 생산 균주를 기초로 조작된 균주로서, 구체적으로 *mbcM*이 결실 또는 불활성화되거나, *mbcM*, *mbcMT1*, *mbcMT2*, *mbcP* 및 *mbcP450* 이 결실되거나 불활성화되도록 제작된 균주. 적합하기로는 막베신 생산 균주는 *A. pretiosum* 또는 *A. mirum*)이다.

<191> - 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 제조에 있어서 상기와 같이 제작된 균주의 용도.

<192> 본 발명의 화합물은 하나 또는 그 이상의 다음의 성질을 가지는 것으로 기대될 수 있다는 점에서 유리하다: Hsp90에 대한 높은 결합력, Hsp90에 대한 빠른 결합속도, 모 화합물과 비교했을 때 하나 또는 그 이상의 다른 암 서브-타입에 대한 우수한 활성; 우수한 간독성 프로파일, 우수한 신장독성, 우수한 심장 안전성과 같은 우수한 독성학적 프로파일; 우수한 수용해도; 우수한 대사 안정성; 우수한 제형 가능성; 우수한 생체이용도; Hsp90에 대한 높은 결합력, Hsp90에 대한 빠른 결합속도 및/또는 우수한 뇌 약물동력학과 같은 우수한 약물동력학적 또는 약력학적 특성; 우수한 세포 흡수성; 및 적혈구에 대한 낮은 결합력.

실시예

일반적인 방법

배양물 발효

<207> 세균 균주 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*) ATCC 31280(미국특허 제4,315,989호) 및 악티노신네마 미림(*Actinosynnema mirum*) DSM 43827 (KCC A-0225)(Watanabe et al., 1982)의 생장을 위한 조건은 미국특허 제4,315,989호 및 미국특허 제4,187,292호에 기술되어 있다.

<208> 본원에서 사용되는 방법은 이러한 특허들로부터 변형될 수 있고, 교반 배양기에서 튜브 또는 플라스크 내의 브로쓰(broths)의 배양을 위한 방법은 하기와 같을 수 있는데, 공개된 프로토콜에 대한 변형은 실시예에 나타냈다. 균주 모두는 ISP2 아가 배지 (배지 3, Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1966) 상에서 28°C 온도로 2-3일간 배양될 수 있고, 종자 배지(배지 1, 하기 참조 및 US 4,315,989와 US 4,187,292 참조)에 접종하는 데 사용될 수 있다. 접종된 종자 배지는 28°C에서 48시간 동안 5 또는 2.5 cm 작동반경으로 200 내지 300 rpm 사이로 교반하면서 배양되었다. 막베신, 18,21-디히드로막베신 및 18,21-디데스옥시막베신 유사체와 같은 막베신 유사체 생산을 위해 발효배지 (배지 2, 하기 참조 및 US 4,315,989와 US 4,187,292 참조)는 2.5% 내지 10%의 농도로 종자 배양물로 접종되었고, 실시예에서 달리 기재된 경우를 제외하고는 6일 동안 26°C에서 5 또는 2.5 cm 작동반경으로 200 내지 300 rpm 사이로 교반하면서 배양했다. 그 다음 상기 배양액은 추출을 위해 수집되었다.

배지

배지 1 - 종자 배지

증류수 1L 내의 조성임

글루코즈	20g
가용성 감자 전분 (Sigma)	30g
스프레이 건조된 옥수수 침지 농축액 (Roquette Freres)	10g
'누트리소이(Nutrisoy)'의 구운 콩 분말(Archer Daniels Midland)	10g
우유 고형분 유래의 웨튼 (Sigma)	5g
NaCl	3g
CaCO ₃	5g
NaOH로 pH 조정	7.0

<213> 121°C로 20분 동안 오토클래이브시켜 멸균하였다.

<214> 오토클래이브 후 아프라마이신을 최종농도가 50 mg/L가 되도록 첨가하였다.

배지 2 - 발효 배지

<216> 증류수 1L 내의 조성임

<217>

글리세롤	50g
스프레이 건조된 옥수수 침지 농축액 (Roquette Freres)	10g
'박토(Bacto)'의 효모 추출물 (Difco)	20g
KH ₂ PO ₄	20g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5g
CaCO ₃	1g
NaOH로 pH 조정	6.5

<218> 121℃로 20분 동안 오토클래이브시켜 멸균하였다.

<219>

배지 3 - ISP2 배지

<220>

증류수 1L 내의 조성임

<221>

맥아 추출물	10g
효모 추출물	4g
덱스트로즈	4g
한천	15g
NaOH로 pH 조정	7.3

<222> 121℃로 20분 동안 오토클래이브시켜 멸균하였다.

<223>

배지 4 - MAM

<224>

증류수 1L 내의 조성임

<225>

밀 전분	10g
옥수수 침지 고형분	2.5g
효모 추출물	3g
CaCO ₃	3g
황산화 철	0.3g
한천	20g

<226> 121℃로 20분 동안 오토클래이브시켜 멸균하였다.

<227>

LCMS 분석을 위한 배양 브로쓰의 추출

<228>

배양 브로쓰(1mL) 및 에틸 아세테이트 (1 mL)를 15-30분 동안 강하게 혼합한 후 10분 동안 원심분리하였다. 유기층 0.5 mL를 수집하였고 증발시켜 건조한 다음 메탄올 0.25 mL에 다시 용해하였다.

<229>

LCMS 분석 과정

<230>

LCMS 분석은 양성 및/또는 음성 이온 모드에서 작동하는 Bruker Daltonics Esquire 3000+ electrospray mass spectrometer가 결합된, Agilent HP1100 HPLC system 상에서 LCMS 방법 1을 이용하여 수행되었다. LCMS 방법 1: 크로마토그래피는 Phenomenex Hyperclone column (C₁₈ BDS, 3 micron 입자 크기, 150 × 4.6 mm) 상에서 하기의 농도구배적 용출 과정을 이용하여 1 mL/min의 유속으로 용출하여 수행하였다: T=0, 10%B; T=2, 10%B; T=20, 100%B; T=22, 100%B; T=22.05, 10%B; T=25, 10%B. 이동상 A = 물+0.1% 포름산; 이동상 B = 아세토니트릴 +0.1%포름산. UV 분광은 190 내지 400 nm 사이에서 기록하였고, 추출된 크로마토그램은 210, 254 및 276 nm에서 얻었다. 질량 분석은 100 내지 1500 amu 사이에서 기록하였다.

<231>

NMR 구조 해석 방법

<232>

NMR 스펙트럼은 각각 ¹H 및 ¹³C에 대하여 500 MHz 및 125 MHz에서 작동하는, 298 K에서의 Bruker Advance 500

spectrometer 상에서 기록되어졌다. 표준 Bruker 펄스 시퀀스가 ^1H - ^1H COSY, APT, HMBC 및 HMQC 스펙트럼들을 얻기 위하여 사용되었다. NMR 스펙트럼은 이들이 작동하는 용매의 잔기 프로톤 또는 표준 탄소 공명과 대조되었다.

<233> 화합물 순도 평가

<234> 정제된 화합물은 하기에서 기술된 LCMS 방법 2를 이용하여 분석되었다. LCMS 방법 2: 크로마토그래피는 Phenomenex Hyperclone C₁₈ BDS column (4.6 × 150 mm, 3 micron 입자 크기) 상에서 물+0.1%포름산:아세토니트릴+0.1% 포름산의 (90:10) 내지 (0:100)까지의 농도구배로 20 분 동안 1 mL/min의 유속으로 용출하여 수행하였다. 순도는 다수의 파장들(210, 254 및 276 nm)에서 MS에 의해 평가되었다. 모든 화합물은 모든 파장에서 > 95%로 순수하였다. 순도는 최종적으로 ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼의 정밀 검사를 통해 확인되었다.

<235> 수용해도 평가

<236> 수용해도는 하기와 같이 테스트될 수 있다: 실온에서 100% DMSO 내의 18,21-디데스옥시막베신 유사체 10 mM 스톡 용액을 준비한다. 앰버 바이알 내에서 3개의 0.01 mL 앤리퀴트에 0.1 M PBS, pH 7.3 용액, 또는 100% DMSO 중 어느 하나를 0.5 mL가 될 때까지 넣었다. 결과적으로 얻은 0.2 mM 용액을 어두운 곳, 실온에서 6 시간 동안 IKA® vibrax VXR 쉐이커 상에서 섞고, 이어서 얻은 용액 또는 혼탁액을 2 mL 에펜도르프튜브 안으로 옮긴 다음 13200 rpm에서 30 분 동안 원심분리한다. 상청액의 앤리퀴트를 상기에서 기술한 바와 같은 LCMS 방법 1에 의해 분석하였다.

<237> 항암 활성을 위한 시험관 내 생물검정

<238> 화합물의 시험관 내 항암활성 평가는 단일층 증식 방법에 의해 증식된 인간 종양 세포주의 패널을 대상으로 온코테스트 시험 기관(Oncotest Testing Facility), Institute for Experimental Oncology, Oncotest GmbH, Freiburg을 통해 수행했다. 선택된 세포주들의 특징을 표 1에 요약했다.

표 1

<239> 시험 세포주

#	세포주	특성
1	CNXF 498NL	CNS
2	CXF HT29	결장(Colon)
3	LXF 1121L	폐, 거대세포암종(large cell ca)
4	MCF-7	유방, NCI 표준
5	MEXF 394NL	흑색종
6	DU145	전립선 - PTEN 양성(positive)

<240> 온코테스트 세포주는 Roth *et al.*, (1999)에 기술된 바와 같이 인간 종양 이종이식체로부터 수립되었다. 공여체 이종이식의 기원은 Fiebig *et al.*, (1999)에 의해 기술되었다. 다른 세포주는 NCI(DU145, MCF-7)로부터 얻거나, DSMZ, Braunschweig, Germany로부터 구입하였다.

<241> 명시되지 않더라도, 모든 세포주는 RPMI 1640 배지, 10% 우태아 혈청(fetal calf serum) 및 0.1mg/mL 젠타마이신이 포함된 '조제 배지(ready-mix)' 배지(PAA, Clbe, Germany) 내에서 가습조건(95% air, 5% CO₂), 37°C에서 생장시켰다.

<242> 화합물이 인간 종양 세포주의 생장에 미치는 영향을 평가하기 위해 변형된 요오드화 프로피디엄 분석(propidium iodide assay)이 사용되었다(Dengler *et al.*, (1995)).

<243> 간단하게, 세포를 트립신 처리하여 증식기 상태에서 채취하고, 수를 세고, 편평한 바닥 96 웰 마이크로타이터 플레이트에 세포주에 따른 세포 밀도(5-10,000 생존 세포/웰)로 접종하였다. 세포가 다시 증식기에 접어들도록 하기 위해 24시간 회복 후에, 배양 배지(플레이트 당 6개의 대조군 웰) 또는 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 포함하는 배양 배지 0.010 mL를 웰에 첨가하였다. 각 농도는 3개씩 처리되었다. 화합물은 다섯 가지 농도로 적용하였다 (100; 10; 1; 0.1 및 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 연속적 노출 4일 후, 시험 화합물이 있거나 또는 없는 세포 배양 배지를 0.2 mL의 수성 요오드화 프로피디엄 (PI) 용액(7 mg/L)으로 교체하였다. 생존 세포의 비율을 측정하기

위해서, 플레이트를 냉동시켜 세포를 투과화(permeabilization)시켰다. 상기 플레이트를 해동한 후, 형광도를 Cytofluor 4000 microplate reader(여기 530 nm, 방사 620 nm)를 이용하여 측정하였고 생존 세포의 총 수와의 직접적인 관계를 도출하였다. 생장 억제 정도는 처리군/대조군×100(% T/C)로 나타내었다. 처리한 활성 화합물의 농도에 대한 % T/C의 그래프로서 플로팅한 후, 이를 70% 까지 세포 성장을 억제하기 위해 필요한 농도(IC_{70})를 계산하는데 사용할 수 있다.

<244> 실시예 1: 막베신 PKS 유전자 클러스터의 서열분석

<245> 악티노신네마 프레티오섬(ATCC 31280) 및 악티노신네마 미럼(DSM 43827, ATCC 29888)로부터 Kieser *et al.*, (2000)에 기술된 표준 프로토콜을 이용하여 게놈 DNA를 분리했다. DNA 시퀀싱(서열분석)은 표준 과정을 사용하여 Sequencing facility of the Biochemistry Department, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QW에서 분석했다.

<246> 프라이머 BIOSG104 5'-GGTCTAGAGGTCA GTGCCCGCGTACCGTCGT-3'(서열번호 1) 및 BIOSG105 5'-GGCATATGCTTGCTCGGGCTAAC-3'(서열번호 2)는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 NRRL 3602(서열 허가번호: AY179507)의 겔다나마이신 생합성 유전자 클러스터 유래의 실시태양트랜스페라제-코딩 유전자 *gdmN*를 표준 기술을 이용하여 증폭하기 위해 사용되었다. 서던 블럿 실험은 DIG 시약 및 비-방사성 핵산 표지 및 검출을 위한 키트를 사용하여 제조지침서(Roche)에 따라 수행했다. DIG-표지된 *gdmN* DNA 절편은 이종 프로브로 사용되었다. *gdmN*에서 생성된 프로브 및 A. 프레티오섬 2112에서 분리된 게놈 DNA를 사용하여 약 8kb의 EcoRI 단편을 서던 블롯 분석으로 확인했다. 절편은 표준 절차에 따라 리트머스 28 내로 클로닝하고, 형질전환체들을 콜로니 부합법(hybridization)으로 확인했다. 클론 p3을 분리하고, 약 7.7kb 삽입체를 서열분석했다. 클론 p3에서 분리한 DNA를 EcoRI 및 EcoRI/SacI으로 절단하고, 약 7.7kb 및 약 1.2kb 크기의 밴드를 각각 분리했다. 표지화 반응은 제조 프로토콜에 따라 수행했다. 상기에 명명된 두 균주의 코스미드 라이브러리는 벡터 SuperCos 1 및 Gigapack III XL packaging kit(Stratagene)를 사용하여 제조 지침서에 따라 만들었다. 이러한 두 라이브러리는 표준 프로토콜을 사용하여 선별되었고, 프로브로서 클론 p3로부터 유래한 7.7kb EcoRI 절편의 DIG-표지화 절편이 사용되었다. 코스미드 52는 A. 프레티오섬의 코스미드 라이브러리로부터 동정되었고, 서열분석을 위해 the sequencing facility of the Biochemistry Department of the University of Cambridge에 맡겨졌다. 유사하게 코스미드 43 및 코스미드 46은 A. 미럼의 코스미드 라이브러리로부터 동정되었다. 세 가지 코스미드는 모두 서던 블롯 분석에서 나타난 바와 같이 7.7kb EcoRI 절편을 포함한다.

<247> 코스미드 43의 PKS 부분의 약 0.7 kbp 절편은 프라이머 BIOSG124 5'-CCCGCCCGCGCAGCGCGCGTGGCCGCCAGGGC-3'(서열번호 3) 및 BIOSG125 5'-GCGTCCTCGCGCACGCCACCAGCAGCTCCAGC-3'(서열번호 4)을 사용하여 표준 프로토콜에 따라 증폭되고, 클로닝 되었으며, 중복되는 클론에 대한 A. 프레티오섬 코스미드 라이브러리를 선별하기 위한 프로브로서 사용되었다. A. 프레티오섬의 코스미드 라이브러리 선별을 위해 사용되었던 프라이머 BIOSG130 5'-CCAACCCCGCCGCGTCCCCGGCCGCACACG-3'(서열번호 5) 및 BIOSG131 5'-GTCGTCGGCTACGGCCGGTGCGCAGCTGCTGT-3'(서열번호 6)에 더해, BIOSG132 5'-GTCGGTGGACTGCCCTGCGCCTGATGCCCTGCGC-3'(서열번호 7) 및 BIOSG133 5'-GGCCGGTGGTGCTGCCGAGGACGGGAGCTGCGG-3'(서열번호 8)로 증폭된 DNA 절편 유래의 프로브를 생성하기 위해 코스미드 52의 서열 정보가 사용되었다. 코스미드 311 및 352가 분리되었고, 코스미드 352는 서열분석을 위해 제공되어졌다. 코스미드 352는 코스미드 52와 약 2.7kb의 중복부분을 가진다. 다른 코스미드의 선별을 위해 프라이머 BIOSG136 5'-CACCGCTCGCGGGGTGGCGCGCACGACGTGG CTGC-3'(서열번호 9) 및 BIOSG 137 5'-CCTCCTCGGACAGCGCGATCAGCGCCGCGC ACAGCGAG-3'(서열번호 10)을 사용하고, 코스미드 311을 주형으로 사용하여 표준 프로토콜에 따라 약 0.6kb PCR 절편을 증폭했다. A. 프레티오섬의 코스미드 라이브러리가 선별되었고, 코스미드 410이 분리되었다. 이는 코스미드 352와 약 17kb가 중복되며, 서열분석을 위해 제공되어졌다. 세 가지 중복성 코스미드(코스미드 52, 코스미드 352 및 코스미드 410)의 서열이 결집되었다. 서열분석된 부분은 약 100kbp의 크기였으며, 막베신 생합성 유전자 클러스터를 구성하는 23개의 오픈 리딩 프레임이 확인되었다. 서열 번호 11 내의 각 오픈 리딩 프레임의 위치는 표 3에 나타냈다.

표 2

<248>

코스미드의 요약

Cosmid	Strain
Cosmid 43	<i>Actinosynnema mirum</i> ATCC 29888
Cosmid 46	<i>Actinosynnema mirum</i> ATCC 29888
Cosmid 52	<i>Actinosynnema pretiosum</i> ATCC 31280
Cosmid 311	<i>Actinosynnema pretiosum</i> ATCC 31280
Cosmid 352	<i>Actinosynnema pretiosum</i> ATCC 31280
Cosmid 410	<i>Actinosynnema pretiosum</i> ATCC 31280

표 3

<249>

post-PKS 유전자 및 스타터 유닛 생합성 유전자를 위한 각각의 오픈 리딩 프레임의 위치

서열번호 11번 내 뉴클레오티드 위치(Nucleotide position in SEQ ID NO: 11)	유전자 이름(Gene Name)	인코딩된 단백질의 기능(Function of the encoded protein)
14925-17909*	<i>mbcRII</i>	전사 제어인자
18025-19074c	<i>mbcO</i>	아미노히드로퀴네이트 신타아제
19263-20066c*	<i>mbc?</i>	알려지지 않음(unknown), AHBA 생합성
20330-40657	<i>mbcAI</i>	PKS
40654-50859	<i>mbcAII</i>	PKS
50867-62491*	<i>mbcAIII</i>	PKS
62500-63276*	<i>mbcF</i>	아미드 신타아제
63281-64852*	<i>mbcM</i>	C21 모노옥시게나아제
64899-65696c*	<i>PH</i>	포스파타아제
65693-66853c*	<i>OX</i>	산화환원효소
66891-68057c*	<i>Ahs</i>	AHBA 신타아제
68301-68732*	<i>Adh</i>	ADHQ 탈수효소
68690-69661c*	<i>AHk</i>	AHBA 키나제
70185-72194c*	<i>mbcN</i>	실시태양 전이효소
72248-73339c	<i>mbcH</i>	메톡시말로닐 ACP 경로
73336-74493c	<i>mbcI</i>	메톡시말로닐 ACP 경로
74490-74765c	<i>mbcJ</i>	메톡시말로닐 ACP 경로
74762-75628c*	<i>mbcK</i>	메톡시말로닐 ACP 경로
75881-76537	<i>mbcG</i>	메톡시말로닐 ACP 경로
76534-77802*	<i>mbcP</i>	C4,5 모노옥시게나아제
77831-79054*	<i>mbcP450</i>	P450
79119-79934*	<i>mbcMT1</i>	O-메틸트랜스페라제
79931-80716*	<i>mbcMT2</i>	O-메틸트랜스페라제

<250> [주] 1 : c 는 완전한 DNA 가닥에 의해 코딩된 유전자를 말한다;

<251> 2 : 어떤 경우에는 하나 이상의 잠재성 개시 코돈이 확인될 수 있다. 당업자는 이를 인식할 수 있고 대체가능한 개시코돈을 확인할 수 있다. 하나 이상의 가능한 개시코돈을 가지는 그러한 유전자들에 (*) 표시를 했다. 개시코돈일 될 것으로 기대되는 것에 표시하였으나, 당업자는 대체가능한 개시코돈을 사용하여 활성 단백질을 생성할 수 있음을 알 수 있을 것이다.

<252> 실시예 2: BIOT-3806 균주의 생성 - *mbcM* 상동인 *gdmM*이 플라스미드 삽입에 의해 파괴된 악티노신네마 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum*) 균주

<253> pLSS308 구축의 요약은 도 3에 나타냈다.

<254> 2.1. 플라스미드 pLSS308의 구축

<255> 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) 균주 NRRL 3602 (AY179507)의 젤다나마이신 생합성 유전자 클러스터 유래의 *gdmM* 유전자 및 아미코라톱시스 메디테라네이(*Amycolatopsis mediterranei*, AF040570 AF040571)의 리파마이신 생합성 유전자 클러스터 유래의 *orf19*의 DNA 서열은 VectorNTI 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬되었다. 축퇴성 올리고를 고안하기에 적합한 상동성 부분이 확인된 이러한 정렬은 악티노신네마 미럼(BIOT-3134; DSM43827; ATCC29888) 유래의 상동 유전자 절편을 증폭하는데 사용되었다. 축퇴성 올리고는 하기와 같다:

<256> FPLS1: 5': ccscggcgncngsttcgacngyag 3'; (서열번호 12)

<257> FPLS3: 5': cgtcncggannccggagcacatgccctg 3'; (서열번호 13)

<258> 상기에서, N= G, A, T 또는 C; Y = C 또는 T; S = G 또는 C.

<259> PCR 증폭을 위한 주형은 악티노신네마 미럼 코스미드 43이었다. 코스미드 43 생성은 상기 실시예 1에 기재했다.

<260> 올리고 FPLS1 및 FPLS3은 코스미드 43을 주형으로 사용하고, Taq DNA 중합효소를 사용한 표준 PCR 반응 내에서, 악티노신네마 미럼 유래의 *gdmM* 상동체의 내부적 단편을 증폭하기 위해 사용되었다. 결과적인 793bp의 PCR 생산물을 *SmaI*으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여, 플라스미드 pLSS301을 생성시켰다. 증폭된 서열이 A. 미럼의 막베신 클러스터의 *mbcM* 유전자 유래인 것으로 분명하였다. 플라스미드 pLSS301은 *EcoRI/HindIII*로 절단하고, 그 절편을 *EcoRI/HindIII*로 절단된 pKC1132(Bierman et al., 1992) 내로 클로닝했다. 결과적인 플라스미드로서, 제작된 pLSS308은 아프라마이신 내성이고, A. 미럼 *mbcM* 유전자의 내부적 단편을 포함한다.

<261> 2.2 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*)의 형질전환

<262> 플라스미드 pUZ8002가 내재되어 있는 대장균 ET12567은 접합(conjugation)을 위한 대장균 공여균주를 생성시키기 위해 전기친공을 통해 pLSS308로 형질전환시켰다. 이 균주는 무성 접합에 의한 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬의 형질전환에 이용되었다(Matsushima et al., 1994). 세균접합체(exconjugants)를 배지 4 상에 도말하고, 28°C로 배양했다. 24시간 후, 50mg/L 아프라마이신 및 25mg/L 날리딕스산을 배양용기상에 발랐다.

<263> pLSS308은 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬 내에서 증폭될 수 없지만, 어떠한 아프라마이신 저항성 콜로니는 플라스미드에 포함된 *mbcM* 내부적 단편을 통한 상동재조합에 의해 염색체의 *mbcM* 유전자 내로 통합된 플라스미드를 포함하는 형질전환체가 될 수 있을 것으로 기대된다(도 3). 이는 염색체 상의 *mbcM* 유전자가 잘린 두 복사체를 생성시킨다. 형질전환체들은 PCR 분석을 통해 확인했고, 증폭된 단편을 서열분석했다.

<264> 콜로니들은 배지 4(50mg/L 아프라마이신 및 25mg/L 날리딕스 산 함유) 상에 부착되어 있다. 각각의 부착물로부터 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스텝고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트) 및 50mg/L 아프라마이신을 포함한 각각의 50ml 팔콘튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 5cm 작동반경으로 2일 동안 배양했다. 이들을 이후 (5% v/v) 발효배지(배지 2)에 접종하고, 28°C에서 24시간동안 생장시키고, 이후 26°C에서 추가로 5일 동안 생장시켰다. 이들로부터 대사체를 상기에 기재된 표준 프로토콜에 따라 추출하였다. 상기에 기재된 표준 프로토콜을 이용하여 HPLC를 통해 샘플의 막베신 유사체 생산성이 평가되었다.

<265> 생산력을 가지는 분리된 선택체는 BIOT-3806으로 지정했다.

<266> 2.3 BIOT-3806 유래의 화합물 확인

<267> 샘플은 LCMS 방법 1을 이용한 상기 일반적 방법에 기재된 바와 같이 분석되었다.

표 4

<268> LCMS에 의해 확인된 화합물

화합물	머무름 시간 (min)	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	질량
14	11.4	525.2	501.2	502
15	9.7	541.1	517.1	518
A	8.6	506.1	482.1	483

B	9.3	539.2	515.1	516
C	10.9	543.1	519.2	520

<269> 실시예 3: BIOT-3870의 생성 - *gdmM* 상동체 *mbcM*이 프레임내 결실(in-frame deletion)을 갖는 악티노신네마 프레티오섬 균주

<270> 3.1 *mbcM*의 하위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

<271> 올리고 BV145(서열번호 14) 및 BV146(서열번호 15)는 주형으로 코스미드 52(실시예 1로부터 생성된) 및 Pfu DNA 합성효소를 사용한 표준 PCR 반응 내에서 악티노신네마 프레티오섬(ATCC 31280) 유래 DNA의 1421bp 부분을 증폭하는 데 사용하였다. 5' 연장부는 증폭된 단편을 클로닝하기 쉽게 하기 위한 제한효소 자리가 도입되도록 각각의 올리고 내에 고안했다(도 4). 증폭된 PCR 생산물(PCRwv308, 서열번호 16, 도 5A)은 *mbcM*의 3' 말단의 33bp 및 추가적으로 하위 상동부분의 1368bp를 코딩한다. 이 1461bp 단편을 *Sma*I으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여 플라스미드 pWV308을 얻었다.

<272> BV145 ATATAACTAGTCACGTCACCGGCGCGGTGTCCGGACTTCGTCAACG

<273> *Spe*I

<274> (서열번호 14)

<275> BV146 ATATCCTAGGCTGGTGGCGGACCTGCGCGCGCGGTTGGGTG

<276> *Avr*II

<277> (서열번호 15)

<278> 3.2 *mbcM*의 상위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

<279> 올리고 BV147(서열번호 17) 및 BV148(서열번호 18)은 주형으로 코스미드 52(실시예 1로부터 생성된) 및 Pfu DNA 합성효소를 사용한 표준 PCR 반응 내에서 악티노신네마 프레티오섬(ATCC 31280) 유래 DNA의 1423bp 부분을 증폭하는 데 사용하였다. 5' 연장부는 증폭된 단편을 클로닝하기 쉽게 하기 위한 제한효소 자리가 도입되도록 각각의 올리고 내에 고안했다(도 4). 증폭된 PCR 생산물(PCRwv309, 서열번호 19, 도 5B)은 *mbcM*의 5' 말단의 30bp 및 추가적으로 상위 상동부분의 1373bp를 코딩한다. 이 1423bp 단편을 *Sma*I으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여 pWV309을 얻었다.

<280> BV147 ATATCCTAGGCACCACGTCGTGCTCGACCTGCCGCCACGC

<281> *Avr*II

<282> (서열번호 17)

<283> BV148 ATATTCCTAGACGCTGTCGACGCGGGCGCGGTACCACGGGC

<284> *Xba*I

<285> (서열번호 18)

<286> 생산물 PCRwv308 및 PCRwv309는 같은 방향성으로 pUC19 내로 클로닝되어 다음 클로닝 과정을 위해 pUC19 폴리링 커 내에 *Pst*I 자리를 형성했다.

<287> 상기 1443 bp의 pWV309 유래의 1443bp *Avr*II/*Pst*I 단편은 pWV308의 4073bp *Avr*II/*Pst*I 단편 내로 클로닝되어 pWV310을 생성했다. pWV310은 그러므로 *Avr*II 자리에 결합된 *mbcM*의 플랭킹 부분과 상동적인 DNA를 코딩하는 *Spe*I/*Xba*I 단편을 포함했다. 이 2816 bp의 *Spe*I/*Xba*I 단편은 *Spe*I로 선형화된, pKC1132(Bierman et al., 1992) 내로 클로닝되어 pWV320을 생성했다.

<288> 3.3 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬의 형질전환

<289> 플라스미드 pUZ8002가 내재되어 있는 대장균 ET12567은 접합(conjugation)을 위한 대장균 공여균주를 생성시키기 위해 전기친공을 통해 pWV320으로 형질전환시켰다. 이 균주는 무성 접합에 의한 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬의 형질전환에 이용되었다(Matsushima et al., 1994). 세균접합체(exconjugants)를 배지 4 상에 도말하고, 28°C로 배양했다. 24시간 후, 50 mg/L 아프라마이신 및 25 mg/L 날리딕스산을 배양용기 상에 발랐다.

pWV320은 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬 내에서 증폭될 수 없지만, 아프라마이신 저항성 콜로니는 플라스미드에 포함된 상동체의 *mbcM* 플랭킹 부분을 통한 상동재조합에 의해 염색체 내로 통합된 플라스미드 pWV320를 포함하는 형질전환체가 될 수 있을 것으로 기대된다.

<290> 6개 세균접합체로부터 계놈 DNA를 분리하고, 제한효소처리하고, 서던블롯으로 분석했다. 블롯은 6개 분리체 중 4개에서 상동체의 상위 부분에서 통합이 발생된 것으로 나타났고, 6개 분리체 중 두 개에서 하위 부분에서 통합이 발생된 것으로 나타났다. 상위 부분(BIOT-3831에서 고안된)에서 상동적 통합되어 얻은 균주를 2차 교차에 대한 스크리닝을 위해 선택했다. 하위 부분(BIOT-3832에서 고안된)에서 상동적 통합되어 얻은 균주를 2차 교차에 대한 스크리닝을 위해 또한 선택했다.

3.4 2차 교차에 대한 스크리닝

<292> 균주들은 배지 4(50 mg/L 아프라마이신으로 보충된) 상에 부착되고, 28°C에서 4일간 생장시켰다. 각각 부착물의 1 cm² 부분을 50mL 팔콘 투브에 담긴 항생제가 함유되지 않은 7 mL의 변형된 ISP2(1L 증류수 내에 0.4% 효모 추출물, 1% 맥아 추출물, 0.4% 텍스트로스 함유)에 접종하는 데 이용했다. 배양물은 2-3일간 생장시켜 이후 50mL 팔콘 투브에 담긴 다른 7 mL의 변형된 ISP2(상기 참고) 내로 계대배양(5% 접종)했다. 4-5회 계대배양 후 배지에 초음파를 처리하고, 연속적으로 회석한 후, 배지 4로 옮겨 28°C에서 4일동안 배양하였다. 이후 단일콜로니를 아프라마이신을 포함하는 배지 4 및 항생제를 포함하지 않는 배지 4 위에 부착한 후 플레이트를 28°C에서 4일 동안 배양하였다. 아프라마이신 플레이트에서 자라지 못하는 것을 제외하고 항생제가 없는 플레이트 상에서 자란 부착물은 이들이 항생제 마커를 잃었는지를 확인하기 위해 +/- 아프로마이신 플레이트 상에 재부착시켰다. 상기 돌연변이 균주는 502 아미노산의 프레임내 결실을 가지는 *mbcM* 단백질을 코딩한다(도 6A, 서열번호 20 및 21; 도 6B는 코딩된 단백질 서열을 보여준다, 서열번호 22).

<293> *mbcM*이 결실된 변이체는 배지 4 상에 부착되고, 28°C에서 4일간 생장시켰다. 각각의 부착물로부터 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10 mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스팀고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 투브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200 rpm조건에서 2 inch 작동반경으로 2일 동안 배양했다. 이들을 이후 생산배지(배지 2- 5% 글리세롤, 1% 콘스팀고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 1% 칼슘 카르보네이트)에 접종하고(0.5 mL 내지 10 mL), 28°C에서 24 시간 동안 생장시키고, 이후 26°C에서 추가로 5일 동안 생장시켰다. 2차 대사체를 추출하고, 막베신 유사체의 생산성을 상기 일반적 방법에서 기재한 바와 같이 LCMS를 통해 분석하였다.

3.5 BIOT-3872로부터 화합물 14 및 15 확인

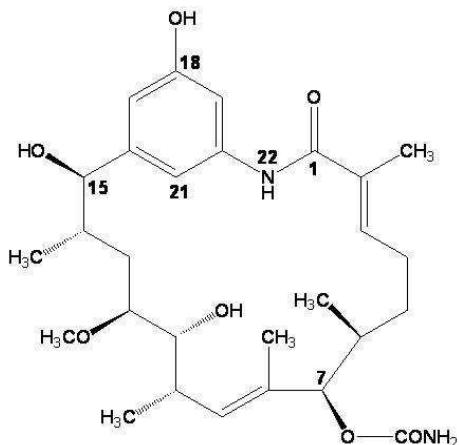
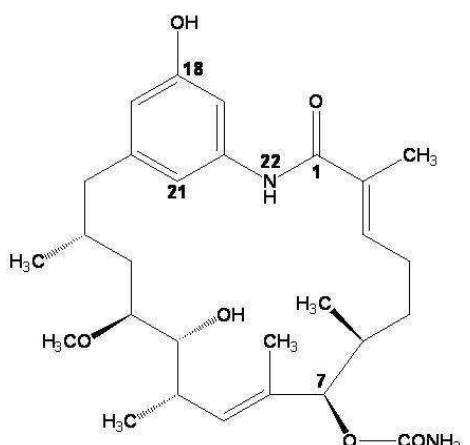
<295> 실시예 3.4에 기재된 발효 추출물을 얻은 다음, 이를 LCMS 방법 1을 이용한 상기 일반적 방법에 개시된 바와 같은 LCMS를 통해 분석하였다. 막베신은 관찰되지 않았으며, 두 개의 신규 화합물이 관찰되었다. 이 화합물의 물리화학적 특성을 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

<296> LCMS에 의해 확인된 화합물

화합물	며무름 시간 (min)	[M+Na] ⁺	[M-H] ⁻	질량
14	11.5	525.2	501.2	502
15	9.9	541.1	517.1	518

<297> 화합물 14 및 15는 이전에 보고된 바 있는 막베신 유사체인 7-O-카바모일프리-막베신 및 7-O-카바모일-15-히드록시프리-막베신과 동일한 것으로 나타났다.



<298>

mcm 내로의 통합(실시예 2) 또는 *mcm* 유전자의 결실 중 어느 하나에 의한 *Mcm*의 기능 제거는 동일한 화합물; 14 및 15를 생산한다는 점을 주목하라. 관찰된 구조와 생합성 경로 간의 관계 분석은 *Mcm* 이외에도 많은 수의 효소들이 기능하지 않는 것을 나타내었다. 화합물 15의 경우에 이들은 *Mcp*, *McmT1* 및 *McmT2*이고, 화합물 14의 경우에 *Mcp450*의 기능이 또한 관찰되지 않았다. 상기에서 기재한 바와 같이 이들 단백질들이 이러한 시스템 내에서 기능적이지 않을 수 있는 많은 이유들이 있을 수 있다. 예를 들어 화합물 14 및 15는 이러한 효소들에 대하여 새로운 구조를 나타내어, 이들이 양호하지 않은 기질이 되거나 전혀 기질이 될 수 없을 수 있다.

<300>

3.6 BIOT-3872 원생생물 생성을 통한 각각의 콜로니 선별

<301>

하기의 배지 변형을 이용하는 Weber 및 Losick 1988로부터 개작된 방법을 이용하여 BIOT-3872로부터 원생생물을 생성시켰다; 악티노신네마 프레티오섬 배양물은 ISP2 플레이트(배지 3) 상에서 28°C에서 3일간 생장시키고, 5 mM를 긁어내어 물 내에 멸균된 10%(w.v) 글리신 2 mL가 보충된 ISP2 브로쓰 40mL에 접종했다. 원생생물은 Weber 및 Losick 1988에 기재된 바와 같이 생성되었고, R2 플레이트(R2 제조법- 수크로스 103g, K₂SO₄ 0.25g, MgCl₂ · 6H₂O 10.12 g, 글루코스 10 g, 디프코 카사미노산 0.1g, 디프코 박토 아가 22g, 증류수를 최종 800mL가 되도록 첨가하고, 혼합물을 121°C에서 20분간 오토클레이브시켜 멸균) 상에서 재생되었다. 오토클레이브한 후, 하기의 오토클레이브된 용액을 첨가했다; 0.5% KH₂PO₄ 10mL, 3.68% CaCl₂ · 2H₂O 80mL, 20% L-프롤린 15mL, 5.73% TES 버퍼(pH7.2) 100mL, 미량 원소 용액(ZnCl₂ 40mg, FeCl₃ · 6H₂O 200mg, CuCl₂ · 2H₂O 10mg, MnCl₂ · 4H₂O 10mg, Na₂B₄O₇ · 10H₂O 10mg, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O 10mg, 증류수를 최종 1L가 되도록 첨가) 2mL, NaOH(1N) (비멸균된) 5 mL.

<302>

80개의 각각의 콜로니들을 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착시키고, 상기에 기재된 바와 같이 막베신 유사체의 생산성을 분석했다. 원생생물 대부분은 모균주와 비슷한 수준으로 생산되는 부착물을 생성시켰다. 80개 샘플 중 15개는 모균주보다 현저히 더 많이 14 및 15를 생산했다. 가장 최고의 생산균주, BIOT-3870(또한 WV4a-33으로 명명된)은 모균주보다 훨씬 높은 수준으로 14 및 15를 생산시키는 것으로 관찰되었으며, 이후 실험에 이용하기 위해 선택되었다.

<303>

실시예 4: 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시막베신을 생성하기 위한 WV4a-33으로의 주입

<304>

4.1 WV4a-33 (BIOT-3870)을 이용한 3-아미노-벤조산의 생체내 변환

<305>

WV4a-33은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스팀고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 2 인치 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스팀고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상층을 취함)에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톡 용액 (메탄을 내에 용해된 3-아미노벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었

다. 동시에, 종자배지 배양액은 배지 2를 접종하는 데 이용했다. 이들 배양액의 분석(이하 참고)은 두 타입의 생산배지 모두에서 동일한 화합물이 제조되나 변형된 배지를 사용했을 때 더 높은 역가가 관찰되는 것으로 나타났다.

<306> 4.2 3-아미노벤조산을 이용한 WV4a-33 주입물의 배양액으로부터 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시막베신의 확인

<307> 실시예 2.7에 기재된 밸효 추출물을 얻은 다음, 이를 상기 일반적 방법에 개시된 바와 같이 LCMS를 통해 분석하였다. 화합물 14 및 15가 예측된 바와 같이 생산되었다. 더 나아가, 3-아미노벤조산을 주입하지 않은 어떠한 밸효물의 추출물에서도 관찰될 수 없었던 새로운 화합물 16이 명백히 관찰되었다. 16은 14 또는 15 보다 더 늦게 용출되었으며 하기 표 6에 기재된 물리화학적 특성을 가졌다.

표 6

LCMS에 의해 확인된 화합물

화합물	머무름 시간 (min)	$[M+Na]^+$	$[M-H]^-$	질량
14	11.5	525.2	501.2	502
15	9.9	541.1	517.1	518
16	12.9	509.3	485.2	486

<309> 실시예 5: 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시막베신의 생산 및 분리 (다른 방법)

<310> 5.1 3-아미노벤조산을 이용한 WV4a-33 주입물의 배양액으로부터 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시막베신의 밸효

<311> WV4a-33은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 두 개의 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 30mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스팀고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 250 mL 코니칼 쉐이크 플라스크에 접종하는 데 이용했다. 6개의 플라스크가 접종되었다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 1 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지 10mL(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스팀고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상층을 취함)을 포함하는 170 팔콘 투브 각각에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간동안 생장시켰다. 200 mL 주입물 스톡 용액 (메탄올 내에 용해된 3-아미노벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 투브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 투브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었다. 배양액을 따라내고(대략 1.4 L), 팔콘 투브를 세척하였다(각각 7 mL의 물로). 세척액을 따라내었다(대략 1.4 L). 따라내어진 배양액 및 세척액을 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시막베신의 분리를 위하여 사용하였다(대략 적으로 총 3 L). 동시에, 종자배지 배양액을 변형된 생산 배지 30mL에 접종하고(3 mL) 이어서 상기에서 기술한 바와 같이 동일한 배양과 주입 방식을 수행하였다(2mM의 최종 주입 농도). 상기 플라스크들은 2 인치 작동반경 쉐이커에서 배양되었다. 생산성 수준은 팔콘 투브 생산 배양액을 위하여 측정된 것의 대략 50% 내지 90%인 것으로, LCMS에 의하여 평가되었다.

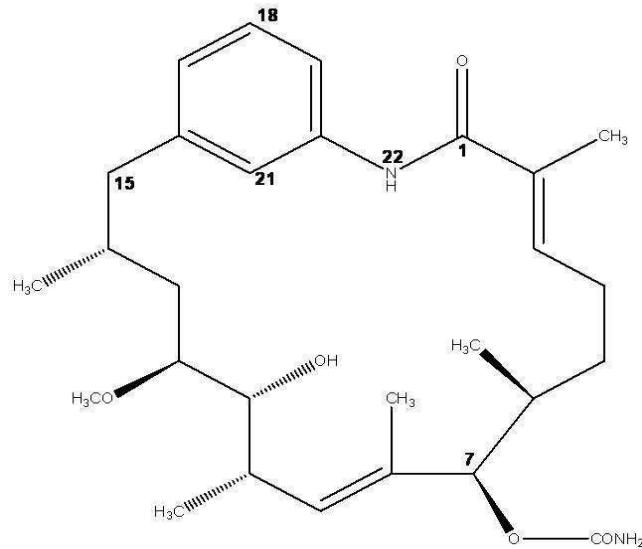
<312> 5.2 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시막베신의 분리 및 특성 확인

<313> 밸효 브로쓰(3 L)는 동부피의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 2 번 추출했다. 유기 추출물을 모으고, 용매를 40°C, 진공 하에서 제거하여 유성의 잔류물 1.2 g을 수득하였다. 그 다음 상기 잔류물을 실리카겔 60 컬럼(30 x 2.5 cm) 상에서 100% CHCl₃로부터 CHCl₃:MeOH (97:3)까지의 단계적인 농도구배적 용매를 이용하여 크로마토그래피하고, 대략 250 mL의 분획들을 수집하였다. 상기 분획들은 분석용 HPLC에 의해 모니터링되었다. 16을 포함하는 분획들을 모으고, 용매를 40°C, 진공 하에서 제거하여 435 mg의 반-순수(semi-pure) 16을 수득하였다. 상기 반-순수 물질을 Phenomenex-Luna C₁₈-BDS 컬럼 (21.2 x 250 mm, 5 micron 입자 크기) 상에서 물:아세토니트릴의 (77:23) 내지 (20:80)까지의 농도구배로 25 분 동안 21 mL/min의 유속으로 용출하여 역상 HPLC를 통해 추가로 정제하였다. 17 분에 용출된 16과 관련 분획을 모으고, 용매를 감압 제거함으로써 흰색 분말의 16 (125 mg)을 수득하였다.

<314> 16의 순도는 상기 일반적 방법에서 기술한 바와 같이 방법 1을 이용하여 LCMS에 의해 확인되었다. LCMS: 16, RT

= 12.9 min ($[M+Na]^+$, m/z = 509.4; $[M-H]^-$, m/z = 485.5).

<315> 400 MHz에서 수집된 양성자 NMR 데이터가 하기 나타낸 구조와 일치하였다.



화합물 16

<316> 실시예 6: BIOT-3870에 5-아미노-2-플루오로벤조산을 주입함에 따른 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신의 생성

6.1 BIOT-3870을 이용한 5-아미노-2-플루오로벤조산의 생체내 변화

<317> BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스립고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 2 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스립고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상충을 취함)에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간 동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톡 용액(메탄올 내에 용해된 5-아미노-2-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었다.

6.2 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 17의 확인

<318> LCMS 방법 1을 이용하여 상기 일반적 방법에 개시된 바와 같이 분석을 수행하였다. 화합물 14 및 15 이외에, 새로운 화합물이 표 7에 기재된 LCMS 특징에서 관찰되었다. 이러한 데이터들은 표제의 화합물과 일치하였다.

표 7

화합물	머무름 시간 (min)	$[M+Na]^+$, m/z	$[M-H]^-$, m/z	질량
14	11.5	525.2	501.2	502
15	9.9	541.1	517.1	518
17	13.3	527.3	503.3	504

6.3 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 17의 생산 및 추출

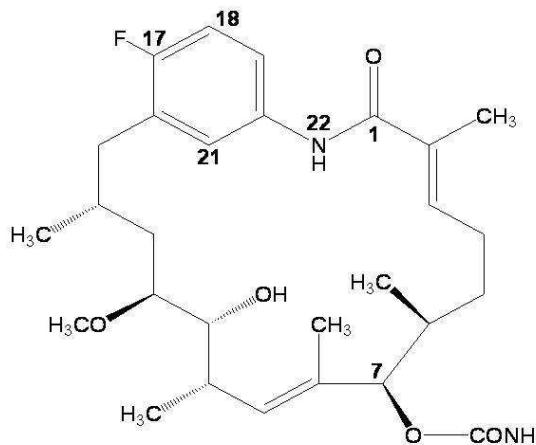
<324> BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 2개의 6 mm 원형 플러그를 종자배지 30mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스립고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 250 mL 코니칼 쉐이크 플라스크에 접종하는 데 이용했다. 6개의 플라스크가 접종되었다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 1 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양

했다. 이들을 이후 변형된 생산배지 10mL(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스팁고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상층을 취함)을 포함하는 170 팔콘 투브 각각에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간 동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톡 용액 (메탄올 내에 용해된 5-아미노-2-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 투브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 투브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었다. 배양액을 따라내고(대략 1.4 1), 팔콘 투브를 세척하였다(각각 7 mL의 물로). 세척액을 따라내었다(대략 1.4 1). 따라내어진 배양액 및 세척액을 하기와 같이 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신을 분리하기 위하여 사용하였다.

<325> 6.4 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 17의 정제 및 특성 확인

<326> 발효 브로쓰(~3 L)는 동부피의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 2 번 추출했다. 유기 추출물을 모으고, 용매를 40°C, 진공 하에서 제거하여 유성의 잔류물 3.0 g을 수득하였다. 그 다음 상기 잔류물을 실리카겔 60 컬럼 상에서 CHCl₃ 내의 2% 메탄올 용액으로 용출시켜 크로마토그래피하여, 대략 250 mL의 분획들을 수집하였다. 상기 분획들은 분석용 HPLC에 의해 모니터링되었다. 17을 포함하는 분획들을 모으고, 용매를 40°C, 진공 하에서 제거하였다. 상기 반-순수 물질을 Phenomenex-Luna C₁₈-BDS 컬럼 (21.2 x 250 mm, 5 micron 입자 크기) 상에서 물:아세토니트릴의 (77:23) 내지 (20:80)까지의 농도구배로 25 분 동안 21 mL/min의 유속으로 용출하여 역상 HPLC를 통해 추가로 정제하였다. 18 분에 용출된 17과 관련 분획을 모으고, 용매를 감압 제거함으로써 흰색 분말(54 mg)을 수득하였다. d₆-아세톤 내에서 얻어진 NMR 데이터는 보고된 구조와 완전히 일치하였다.

<327> 17의 순도는 상기 일반적 방법에서 기술한 바와 같이 LCMS 방법 2를 이용하여 확인되었다. 측정은 다수의 과장들에서 수행하였으며 양성 및 음성 모드 둘 다에서 MS 분석을 이용하여 수행하였다. LCMS: 17, RT = 11.3 min ([M-H]⁻, m/z = 503.3; [M+Na]⁺, m/z = 527.3; [2M+Na]⁺, m/z = 1032.0).



화합물 17

<328> 실시예 7: BIOT-3870에 5-아미노-3-플루오로벤조산을 주입함에 따른 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디데스옥시막베신의 생성

<330> 7.1 BIOT-3870을 이용한 5-아미노-3-플루오로벤조산의 생체내 변환

<331> BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스팁고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 투브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 2 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스팁고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상층을 취함)에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간 동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톡 용액 (메탄올 내에 용해된 5-아미노-3-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 투브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 투브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었다.

<332> 7.2 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 18의 확인

<333> LCMS 방법 1을 이용하여 상기 일반적 방법에 개시된 바와 같이 분석을 수행하였다. 화합물 14 및 15 이외에, 새로운 화합물이 표 8에 기재된 LCMS 특징에서 관찰되었다. 이러한 데이터들은 표제의 화합물, 18 및 이의 C15-히드록실화 유사체, 19와 일치하였다.

표 8

화합물	머무름 시간 (min)	$[M+Na]^+$, m/z	$[M-H]^-$, m/z	질량
14	11.5	525.2	501.2	502
15	9.9	541.1	517.1	518
18	14.1	527.2	503.1	504
19	11.5	543.3	519.3	520

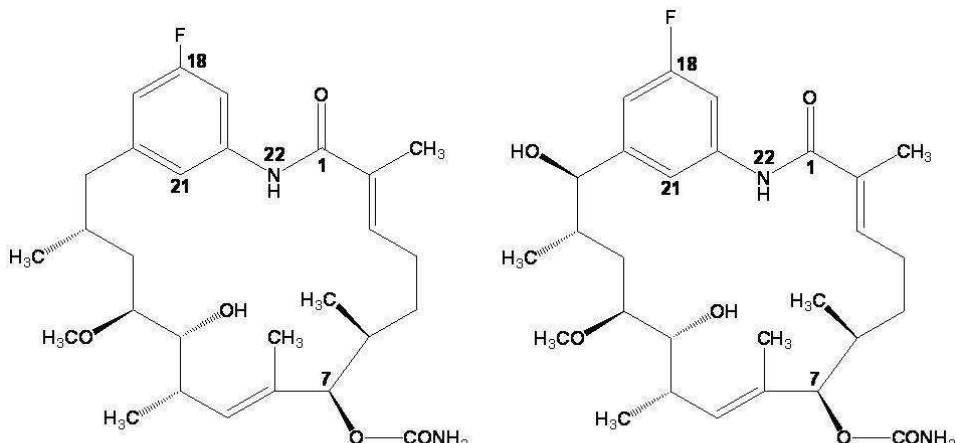
<335> 7.3 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 18의 생산 및 추출

<336> BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 2개의 6 mm 원형 플러그를 종자배지 30mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스팀고형, 1% 콩가루, 0.5% 웨튼, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 250 mL 코니칼 쉐이크 플라스크에 접종하는 데 이용했다. 6개의 플라스크가 접종되었다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 1 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지 10mL(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스팀고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상충을 취함)을 포함하는 170 팔콘 투브 각각에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간 동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톡 용액 (메탄올 내에 용해된 5-아미노-3-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 투브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 투브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었다. 배양액을 따라내고(대략 1.4 1), 팔콘 투브를 세척하였다(각각 7 mL의 물로). 세척액을 따라내었다(대략 1.4 1). 따라내어진 배양액 및 세척액을 하기와 같이 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디데스옥시막베신을 분리하기 위하여 사용하였다.

<337> 7.4 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 18의 분리 및 특성 확인

<338> 발효 브로쓰(~3 L)는 동부피의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 2 번 추출했다. 유기 추출물을 모으고, 용매를 40°C, 진공 하에서 제거하여 유성의 잔류물 3.4 g을 수득하였다. 그 다음 상기 잔류물을 실리카겔 60 컬럼 (30×2.5 cm 컬럼) 상에서 100% CHCl₃ 내지 CHCl₃:MeOH (96:4)의 단계적 농도구배를 이용하여 크로마토그래피하고, 대략 250 mL의 분획들을 수집하였다. 상기 분획들은 분석용 HPLC에 의해 모니터링되었다. 18을 포함하는 분획들을 모으고, 용매를 40°C, 진공 하에서 제거하여 528 mg의 반-순수 18을 수득하였다. 상기 반-순수 물질을 Phenomenex-Luna C₁₈-BDS 컬럼 (21.2 x 250 mm, 5 micron 입자 크기) 상에서 물:아세토니트릴의 (77:23) 내지 (20:80)까지의 농도구배로 25 분 동안 21 mL/min의 유속으로 용출하여 역상 HPLC를 통해 추가로 정제하였다. 20 분에 용출된 18과 관련 분획을 모으고, 용매를 감압 제거함으로써 흰색 분말(224 mg)으로서 18을 수득하였다. d₆-아세톤 내에서 얻어진 NMR 데이터는 보고된 구조와 완전히 일치하였다.

<339> 18의 순도는 상기 일반적 방법에서 기술한 바와 같이 LCMS 방법 2를 이용하여 확인되었다. 측정은 다수의 파장들에서 수행하였으며 양성 및 음성 모드 둘 다에서 MS 분석을 이용하여 수행하였다. LCMS: 18, RT = 11.9 min ($[M-H]^-$, m/z = 503.1; $[M+Na]^+$, m/z = 527.2; $[2M+Na]^+$, m/z = 1031.5).



340

화합물 18

화합물 19

341

실시예 8: BIOT-3870에 5-아미노-2,3,6-트리-플루오로벤조산을 주입함에 따른 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시-17,18,21-트리플루오로막베신의 생성

342

8.1 BIOT-3870을 이용한 5-아미노-2,3,6-트리플루오로벤조산의 생체내 변화

343

BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 생장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스ტ고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 2 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스ტ고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상층을 취함)에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26°C에서 24시간 동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톡 용액(메탄올 내에 용해된 5-아미노-2,3,6-트리-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26°C에서 6일 동안 추가로 배양되었다.

<344>

8, 2, 4, 5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톨시-18, 21-디데스올시-17, 18, 21-트리플루오로말베신 20의 화이

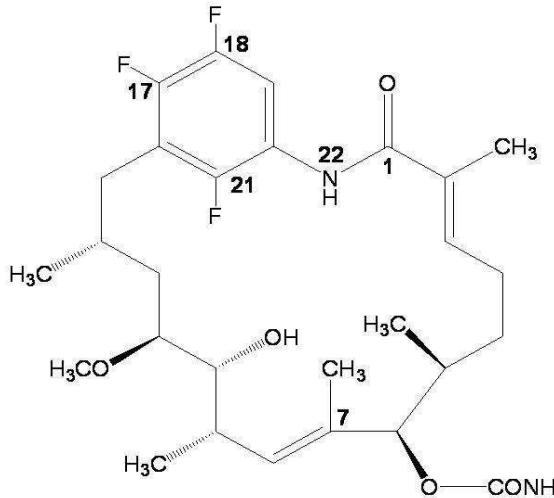
<345>

LCMS 방법 1을 이용하여 상기 일반적 방법에 개시된 바와 같이 분석을 수행하였다. 화합물 14 및 15 이외에, 새로운 화합물이 표 9에 기재된 LCMS 틀정에서 관찰되었다. 이러한 데이터들은 표 3의 화합물과 일치하였다.

开 9

246

화합물	머무름 시간 (min)	$[M+Na]^+$, m/z	$[M-H]^-$, m/z	질량
14	11.5	525.2	501.2	502
15	9.9	541.1	517.1	518
20	13.2	관찰되지 않음 (Not observed)	539.2	540



화합물 20

<347>

실시예 9: *mbcM*이 프레임내 결실(in-frame deletion)을 가지며, *mbcMT1*, *mbcMT2*, *mbcP* 및 *mbcP450o* 추가적으로 결실된 악티노신네마 프레티오섬 균주의 생성

<349>

9.1 *mbcMT2*의 하위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

<350>

올리고 1s4del1(서열번호 23) 및 1s4del2a(서열번호 24)는 주형으로 코스미드 52(실시예 1로부터 생성된) 및 Pfu DNA 합성효소를 사용한 표준 PCR 반응 내에서 악티노신네마 프레티오섬(ATCC 31280) 유래 DNA의 1595bp 부분을 증폭하는 데 사용하였다. 5' 연장부는 증폭된 단편을 클로닝하기 쉽게 하기 위한 AvrII 자리가 도입되도록 올리고 1s4del2a 내에 고안했다(도 7). 증폭된 PCR 생산물(1+2a, 도 8, 서열번호 25)은 *mbcMT2*의 3 ' 말단의 196bp 및 추가적으로 하위 상동부분의 1393bp를 코딩한다. 이 1595bp 단편을 *SmaI*으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여 플라스미드 pLSS1+2a를 얻었다.

<351>

1s4del1 (서열번호 23)

<352>

5'-GGTCACTGGCCGAAGCGCACGGTGTATGG-3'

<353>

1s4del2a (서열번호 24)

<354>

5'-CCTAGGCGACTACCCCGCACTACTACACCGAGCAGG-3'

<355>

9.2 *mbcM*의 상위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

<356>

올리고 1s4del3b(서열번호 26) 및 1s4del14(서열번호 27)은 주형으로 코스미드 52(실시예 1로부터 생성된) 및 Pfu DNA 합성효소를 사용한 표준 PCR 반응 내에서 악티노신네마 프레티오섬(ATCC 31280) 유래 DNA의 1541bp 부분을 증폭하는 데 사용하였다. 5' 연장부는 증폭된 단편을 클로닝하기 쉽게 하기 위한 AvrII 자리가 도입되도록 올리고 1s4del3b 내에 고안했다(도 7). 증폭된 PCR 생산물(3b+4, 도 9, 서열번호 28)은 *mbcP*의 5 ' 말단의 ~100bp 및 추가적으로 상위 상동부분의 ~1450bp를 코딩한다. 이 ~1550bp 단편을 *SmaI*으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여 pLSS3b+4를 얻었다.

<357>

1s4del3b (서열번호 26)

<358>

5'-CCTAGGAACGGGTAGGCAGGTCGGTG-3'

<359>

1s4del14 (서열번호 27)

<360>

5'-GTGTGGGCCAGCTGCCAGCACGCCAC-3'

<361>

생산물 1+2a 및 3b+4는 pUC19 내로 클로닝되어 다음 클로닝 과정을 위해 pUC19 폴리링커 내에 *HindIII* 및 *BamHI* 자리를 형성했다.

<362>

상기 pLSS1+2a 유래의 1621bp *AvrII/HindIII* 단편 및 pLSS3b+4 유래의 1543 bp *AvrII/BamHI* 단편은 pKC1132의 3556 bp *HindIII/BamHI* 단편 내로 클로닝되어 pLSS315를 생성했다. pLSS315는 그러므로 *AvrII* 자리에 결합된

고안된 4개 ORF 결실 부분의 플랭킹 부분과 상동적인 DNA를 코딩하는 *HindIII/BamHI* 단편을 포함했다(도 7).

9.3 BIOT-3870의 pLSS315에 의한 형질전환

플라스미드 pUZ8002가 내재되어 있는 대장균 ET12567은 접합(conjugation)을 위한 대장균 공여균주를 생성시키기 위해 전기천공을 통해 pLSS315로 형질전환시켰다. 이 균주는 무성 접합에 의한 BIOT-3870의 형질전환에 이용되었다(Matsushima *et al.*, 1994). 세균접합체(exconjugants)를 MAM 배지(1% 밀 전분, 0.25% 콘스팅고형, 0.3% 효모추출물, 0.3% 칼슘 카르보네이트, 0.03% 황산철, 2% 아가) 상에 도말하고, 28°C로 배양했다. 24시간 후, 50mg/L 아프라마이신 및 25mg/L 날리딕스산을 배양용기 상에 발랐다. pLSS315는 BIOT-3870 내에서 증폭될 수 없지만, 아프라마이신 저항성 콜로니는 플라스미드에 원래 포함된 상동 부분을 통한 상동재조합에 의해 염색체 내로 통합된 플라스미드를 포함하는 형질전환체가 될 수 있을 것으로 기대되었다.

9.4 2차 교차에 대한 스크리닝

3개의 BIOT-3870의 주요한 형질전환체:pLSS315가 2차 교차에 대한 스크리닝을 위한 계대배양을 위해 선택되었다.

균주들은 MAM 배지(50mg/L 아프라마이신으로 보충된) 상에 부착시켜, 28°C에서 4일간 생장시켰다. 2개의 6mm 원형 풀러그를 250ml 코니칼 플라스크에 담긴 ISP2 30mL(0.4% 효모 추출물, 1% 맥아 추출물, 0.4% 텍스트로스 함유, 항생제는 함유하지 않음)에 접종하는 데 이용했다. 배양물은 2-3일간 생장시켜 이후 250ml 코니칼 플라스크에 담긴 30mL의 ISP2 내로 계대 배양(5% 접종)했다. 배양물을 실시예 3.6에 기재된 바와 같이 4-5번 계대배양하여 원생생물화한 후, 상기 원생생물을 연속적으로 희석하고, 재생 배지 상에 도말하고(실시예 3.6), 28°C에서 4일간 배양시켰다. 하나의 클로니를 아프라마이신을 함유하는 MAM 배지, 및 항생제를 포함하지 않는 NAM 배지 두 개 모두에 부착시키고, 28°C에서 4일간 배양시켰다. 아프라마이신 플레이트에서 자라지 못하는 것을 제외하고 항생제가 없는 플레이트 상에서 자란 클론 no 1(no 32-37) 유래의 7개 부착물 및 클론 no 3(no 38-41)유래의 4개 부착물은 이들이 항생제 마커를 잃었는지를 확인하기 위해 +/- 아프로마이신 플레이트 상에 재부착시켰다.

막베신 유사체 생산은 일반적 방법에 기술된 바와 같이 수행했다. 분석은 LCMS 방법 1을 이용하여 일반적 방법에 기술된 바와 같이 수행했다. 화합물 14는 모균주 BIOT-3870과 비슷한 정도의 산출량으로 생산되었고, 부착물 33, 34, 35, 37, 39 및 41에서는 화합물 15의 생산이 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 원하는 돌연변이 균주가 원래의 *mbcM* 결실에 더하여 *mbcP*, *mbcP450*, *mbcMT1* 및 *mbcMT2* 유전자를 포함하는 막베신 클러스터의 3892bp 결실을 가짐을 보여주는 것이다.

실시예 10: Hsp90 결합

등온적정열량계 및 K_d 값 결정

효모 Hsp90은 1 mM EDTA 및 5 mM NaCl을 함유하는 pH7.5의 20 mM Tris에 투석되고, 동일한 완충액이지만 2% DMSO를 함유하지 않은 완충액으로 0.008 mM로 희석되었다. 시험 화합물은 50 mM 농도로 100% DMSO 내에 용해시키고, 이어서 2% DMSO를 포함하는 Hsp90를 위해 동일 완충액 내에서 0.1 mM로 희석했다. 작용열은 MSC 시스템(Microcal) 상에서 1.485mL의 세포 부피로 30°C에서 측정했다. 각각의 0.100 mM 시험화합물을 0.027 mL의 10개 앤리퀴드들을 0.008 mM 효모 Hsp90 내로 주입했다. 희석열은 시험화합물을 2% DMSO가 함유된 버퍼 내로 주입시켜 각각의 실험에서 결정하였고, 세 플로팅 변수; 화학양론, 결합상수 및 작용 엔탈피 변화에 따른 비선형 최소제곱 커브-피팅 알고리즘(Microcal Origin)을 이용하여 교정된 데이터를 얻었다. 상기 결과는 하기 표 10에 나타냈다.

표 10

Hsp90 결합에 대한 K_d 값

	K_d (nM)
막베신	240
16	20
17	19
18	23.5
겔다나마이신	1200

<373> 실시예 11: 생물학적 데이터 - 18,21-디데스옥시막베신 유사체의 시험관내 항암 활성 평가

<374> 시험 화합물의 시험관 내 항암활성 평가는 단일층 증식 방법에 의해 증식된 인간 종양 세포주의 패널을 대상으로 변형된 요오드화 프로피디엄 분석(propidium iodide assay)을 사용하는 일반적인 방법에 기재된 바와 같이 수행되었다.

<375> 결과를 하기 표 11에 나타내었으며, 모든 처리구/대조구 (% T/C) 값은 적어도 3개의 독립적인 실험의 평균을 나타낸 것이다. 표 12는 평가기준(reference)으로서 막베신을 이용하여, 세포주 패널 시험을 통해 얻은 화합물에 대한 평균 IC₇₀을 보여준다(이때, 평균은 모든 반복값의 기하평균으로서 계산됨).

표 11

<376> 시험관 내에서의 세포주 데이터

	각 약제 농도($\mu\text{g/mL}$)에서 시험구(Test)/대조구(Control) (%)														
	화합물 16					화합물 17					화합물 18				
세포주	0.01	0.1	1	10	100	0.01	0.1	1	10	100	0.01	0.1	1	10	100
CNXF 498NL	100	19	8	8	6	97	22	7	8	7	64	9	9	11	9
CXF HT29	106	52	8	7	6	102	49	7	7	8	98	14	11	13	11
LXF 1121L	106	48	10	7	5	100	41	10	11	11	94	43	13	13	12
MCF-7	83	21	10	11	10	86	20	10	10	8	77	27	12	12	8
MEXF 394NL	100	64	7	5	3	101	21	4	3	3	91	24	7	5	4
DU145	96	47	8	8	8	93	7	8	10	9	66	9	8	9	6

표 12

<377> 세포주 패널 시험을 통한 평균 IC₇₀ 값

	IC ₇₀ ($\mu\text{g/mL}$)
막베신	0.21
16	0.193
17	0.106
18	0.077

<378> 본원에서 언급되는 특허 및 특허출원을 포함하는 모든 참고문헌은 가능한한 전체적인 범위로 본원에 참고문헌으로서 포함된다.

<379> 명세서 및 하기 청구항까지 전체적으로, 만일 문맥상 달리 요구되지 않는다면, 단어 '포함하다', 및 '포함하다'와 '포함하는'과 같은 어미 변화 단어는, 어떠한 다른 전체적인 것, 또는 전체 또는 단계들을 이루는 단계 또는 그룹도 배제하지 않는 경우를 제외하고, 제시된 전체적인 것, 또는 전체를 이루는 단계 또는 그룹을 포함하는 것을 나타내는 것으로 이해되어질 것이다.

참고문헌

<381> Allen, I. W. and Ritchie, D.A. (1994) Cloning and analysis of DNA sequences from *Streptomyces hygroscopicus* encoding geldanamycin biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 243: 593-599.

<382> Bagatell, R. and Whitesell, L. (2004) Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1021-1030.

<383> Beliakoff, J. and Whitesell, L. (2004) Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. Anti-Cancer Drugs 15:651-662.

<384> Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, ET., Nagaraja Rao, R. and Schoner, BE. (1992) "Plasmid

cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp." Gene 116: 43-49.

- <385> Blagosklonny, M.V. (2002) Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogues. Leukemia 16:455-462.
- <386> Blagosklonny, M.V., Toretsky, J., Bohen, S. and Neckers, L. (1996) Mutant conformation of p53 translated *in vitro* or *in vivo* requires functional HSP90. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8379-8383.
- <387> Bohen, S.P. (1998) Genetic and biochemical analysis of p23 and ansamycin antibiotics in the function of Hsp90-dependent signaling proteins. Mol Cell Biol 18:3330-3339.
- <388> Carreras, C.W., Schirmer, A., Zhong, Z. and Santi D.V. (2003) Filter binding assay for the geldanamycin-heat shock protein 90 interaction. Analytical Biochemistry 317:40-46.
- <389> Cassady, J.M., Chan, K.K., Floss, H.G. and Leistner E. (2004) Recent developments in the maytansinoid antitumour agents. Chem. Pharm. Bull. 52(1) 1-26.
- <390> Chiosis, G., Huezo, H., Rosen, N., Mimnaugh, E., Whitesell, J. and Neckers, L. (2003) 17AAG: Low target binding affinity and potent cell activity - finding an explanation. Molecular Cancer Therapeutics 2:123-129.
- <391> Chiosis, G., Vilenchik, M., Kim, J. and Solit, D. (2004) Hsp90: the vulnerable chaperone. Drug Discovery Today 9:881-888.
- <392> Csermely, P. and Soti, C. (2003) Inhibition of Hsp90 as a special way to inhibit protein kinases. Cell.Mol.Biol.Lett. 8:514-515.
- <393> DeBoer, C and Dietz, A. (1976) The description and antibiotic production of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. J. Antibiot. 29:1182-1188.
- <394> DeBoer, C., Meulman, P.A., Wnuk, R.J., and Peterson, D.H. (1970) Geldanamycin, a new antibiotic. J. Antibiot. 23:442-447.
- <395> Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelmann R. and Fiebig HH. (1995) Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assay. Anti-Cancer Drugs, 6:522-532.
- <396> Dikalov, s., Landmesser, U., Harrison, DG., 2002, Geldanamycin Leads to Superoxide Formation by Enzymatic and Non-enzymatic Redox Cycling, The Journal of Biological Chemistry, 277(28), pp25480-25485
- <397> Donze O. and Picard, D. (1999) Hsp90 binds and regulates the ligand-inducible α subunit of eukaryotic translation initiation factor kinase Gcn2. Mol Cell Biol 19:8422-8432.
- <398> Egorin MJ, Lagattuta TF, Hamburger DR, Covey JM, White KD, Musser SM, Eiseman JL. (2002) "Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats." Cancer Chemother Pharmacol, 49(1), pp7-19.
- <399> Eustace, B.K., Sakurai, T., Stewart, J.K., et al. (2004) Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness. Nature Cell Biology 6:507-514.
- <400> Fang, Y., Fliss, A.E., Rao, J. and Caplan A.J. (1998) *SBA1* encodes a yeast Hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. Mol Cell Biol 18:3727-3734.
- <401> Fiebig H.H., Dengler W.A. and Roth T. Human tumor xenografts: Predictivity, characterization, and discovery of new anticancer agents. In: Fiebig HH, Burger AM (eds). Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development. Contrib. Oncol. 1999, 54: 29 - 50.
- <402> Goetz, M.P., Toft, D.O., Ames, M.M. and Ehrlich, C. (2003) The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. Annals of Oncology 14:1169-1176.
- <403> Harris, S.F., Shiau A.K. and Agard D.A. (2004) The crystal structure of the carboxy-terminal

dimerization domain of *htpG*, the *Escherichia coli* Hsp90, reveals a potential substrate binding site. Structure 12: 1087-1097.

- <404> Hong, Y.-S., Lee, D., Kim, W., Jeong, J.-K. et al. (2004) Inactivation of the carbamoyltransferase gene refines post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent geldanamycin. *J. Am. Chem. Soc.* 126:11142-11143.
- <405> Hostein, I., Robertson, D., DiStefano, F., Workman, P. and Clarke, P.A. (2001) Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Research* 61:4003-4009.
- <406> Hu, Z., Liu, Y., Tian, Z.-Q., Ma, W., Starks, C.M. et al. (2004) Isolation and characterization of novel geldanamycin analogues. *J. Antibiot.* 57:421-428.
- <407> Hur, E., Kim, H.-H., Choi, S.M., et al. (2002) Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 α /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol. *Molecular Pharmacology* 62:975-982.
- <408> Iwai Y, Nakagawa, A., Sadakane, N., Omura, S., Oiwa, H., Matsumoto, S., Takahashi, M., Ikai, T., Ochiai, Y. (1980) Herbimycin B, a new benzoquinoid ansamycin with anti-TMV and herbicidal activities. *The Journal of Antibiotics*, 33(10), pp1114-1119.
- <409> Jez, J.M., Chen, J. C.-H., Rastelli, G., Stroud, R.M. and Santi, D.V. (2003) Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90. *Chemistry and Biology* 10:361-368.
- <410> Kaur, G., Belotti, D., Burger, A.M., Fisher-Nielson, K., Borsotti, P. et al. (2004) Antiangiogenic properties of 17-(Dimethylaminoethylamino)-17-Demethoxygeldanamycin: an orally bioavailable heat shock protein 90 modulator. *Clinical Cancer Research* 10:4813-4821.
- <411> Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000) Practical Streptomyces Genetics, John Innes Foundation, Norwich Kumar, R., Musiyenko, A. and Barik S. (2003) The heat shock protein 90 of *Plasmodium falciparum* and antimalarial activity of its inhibitor, geldanamycin. *J Malar* 2:30.
- <412> Kurebayashi, J., Otsuke, T., Kurosumi, M., Soga, S., Akinaga, S. and Sonoo, H. (2001) A radicicol derivative, KF58333, inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor, angiogenesis and growth of human breast cancer xenografts. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:1342-1351.
- <413> Le Brazidec, J.-Y., Kamal, A., Busch, D., Thao, L., Zhang, L. et al. (2003) Synthesis and biological evaluation of a new class of geldanamycin derivatives as potent inhibitors of Hsp90. *J. Med. Chem.* 47: 3865-3873.
- <414> Lee, Y.-S., Marcu, M.G. and Neckers, L. (2004) Quantum chemical calculations and mutational analysis suggest heat shock protein 90 catalyzes trans-cis isomerization of geldanamycin. *Chem. Biol.* 11:991-998.
- <415> Liu, X.-D., Morano, K.A. and Thiele D.J. (1999); The yeast Hsp110 family member, Sse1, is an Hsp90 cochaperone. *J Biol Chem* 274:26654-26660.
- <416> Mandler, R., Wu, C., Sausville, E.A., Roettinger, A.J., Newman, D.J., Ho, D.K., King, R., Yang, D., Lippman, M.E., Landolfi, N.F., Dadachova, E., Brechbiel, M.W. and Waldman, T.A. (2000) Immunoconjugates of geldanamycin and anti-HER2 monoclonal antibodies: antiproliferative activity on human breast carcinoma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 92:1573-1581.
- <417> Matsushima, P., M. C. Broughton, et al. (1994). Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene* 146(1): 39-45.
- <418> McLaughlin S. H., Smith, H.W. and Jackson S.E. (2002) Stimulation of the weak ATPase activity of human

Hsp90 by a client protein. *J. Mol. Biol.* 315: 787-798.

<419> McCammon, M. T. and L. W. Parks (1981). Inhibition of sterol transmethylation by S-adenosylhomocysteine analogs. *J Bacteriol* 145(1): 106-12.

<420> Muroi M, Izawa M, Kosai Y, Asai M. (1981) "The structures of macbecin I and II" *Tetrahedron*, 37, pp1123-1130.

<421> Muroi, M., Izawa M., Kosai, Y., and Asai, M. (1980) Macbecins I and II, New Antitumor antibiotics. II. Isolation and characterization. *J Antibiotics* 33:205-212.

<422> Neckers, L (2003) Development of small molecule Hsp90 inhibitors: utilizing both forward and reverse chemical genomics for drug identification. *Current Medicinal Chemistry* 9:733-739.

<423> Neckers, L. (2002) Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* 8:S55-S61.

<424> Nimmanapalli, R., O'Bryan, E., Kuhn, D., Yamaguchi, H., Wang, H.-G. and Bhalla, K.N. (2003) Regulation of 17-AAG-induced apoptosis: role of Bcl-2, Bcl-x_L, and Bax downstream of 17-AAG-mediated down-regulation of Akt, Raf-1, and Src kinases. *Neoplasia* 102:269-275.

<425> Omura, S., Iwai, Y., Takahashi, Y., Sadakane, N., Nakagawa, A., Oiwa, H., Hasegawa, Y., Ikai, T., (1979), Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*, 32(4), pp255-261.

<426> Omura, S., Miyano, K., Nakagawa, A., Sano, H., Komiyama, K., Umezawa, I., Shibata, K, Satsumabayashi, S., (1984), "Chemical modification and antitumor activity of Herbimycin A. 8,9-epoxide, 7,9-carbamate, and 17 or 19-amino derivatives". *The Journal of Antibiotics*, 37(10), pp1264-1267.

<427> Ono, Y., Kozai, Y. and Ootsu, K. (1982) Antitumor and cytoidal activities of a newly isolated benzenoid ansamycin, Macbecin I. *Gann*. 73:938-44.

<428> Patel, K., M. Piagentini, Rascher, A., Tian, Z. Q., Buchanan, G. O., Regentin, R., Hu, Z., Hutchinson, C. R. And McDaniel, R. (2004). "Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for hsp90 inhibition." *Chem Biol* 11(12): 1625-33.

<429> Pfeifer, B. A. and C. Khosla (2001). "Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(1): 106-118.

<430> Rascher, A., Hu, Z., Viswanathan, N., Schirmer, A. et al. (2003) Cloning and characterization of a gene cluster for geldanamycin production in *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3602. *FEMS Microbiology Letters* 218:223-230.

<431> Rascher, A., Z. Hu, Buchanan, G. O., Reid, R. and Hutchinson, C. R. (2005). Insights into the biosynthesis of the benzoquinone ansamycins geldanamycin and herbimycin, obtained by gene sequencing and disruption. *Appl Environ Microbiol* 71(8): 4862-71.

<432> Rawlings, B. J. (2001). "Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part B)." *Natural Product Reports* 18(3): 231-281.

<433> Roth T., Burger A.M., Dengler W., Willmann H. and Fiebig H.H. Human tumor cell lines demonstrating the characteristics of patient tumors as useful models for anticancer drug screening. In: Fiebig HH, Burger AM (eds). Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development. *Contrib. Oncol.* 1999, 54: 145 - 156.

<434> Rowlands, M.G., Newbatt, Y.M., Prodromou, C., Pearl, L.H., Workman, P. and Aherne, W. (2004) High-throughput screening assay for inhibitors of heat-shock protein 90 ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 327:176-183

<435> Schulte, T.W., Akinaga, S., Murakata, T., Agatsuma, T. et al. (1999) Interaction of radicicol with

members of the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Molecular Endocrinology* 13:1435-1488.

<436> Shibata, K., Satsumabayashi, S., Nakagawa, A., Omura, S. (1986a) The structure and cytoidal activity of herbimycin C. *The Journal of Antibiotics*, 39(11), pp1630-1633.

<437> Shibata, K., Satsumabayashi, S., Sano, H., Komiyama, K., Nakagawa, A., Omura, S. (1986b) Chemical modification of Herbimycin A: synthesis and *in vivo* antitumor activities of halogenated and other related derivatives of herbimycin A. *The Journal of Antibiotics*, 39(3), pp415-423.

<438> Shirling, E.B. and Gottlieb, D. (1966) *International Journal of Systematic Bacteriology* 16:313-340

<439> Smith-Jones, P.M., Solit, D.B., Akhurst, T., Afroze, F., Rosen, N. and Larson, S.M. (2004) Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors. *Nature Biotechnology* 22:701-706.

<440> Spiteller, P., Bai, L., Shang, G., Carroll, B.J., Yu, T.-W. and Floss, H. G. (2003). The post-polyketide synthase modification steps in the biosynthesis of the antitumor agent ansamitocin by *Actinosynnema pretiosum*. *J Am Chem Soc* 125(47): 14236-7

<441> Sreedhar A.S., Nardai, G. and Csermely, P. (2004) Enhancement of complement-induced cell lysis: a novel mechanism for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors. *Immunology letters* 92:157-161.

<442> Sreedhar, A.S., Soti, C. and Csermely, P. (2004a) Inhibition of Hsp90: a new strategy for inhibiting protein kinases. *Biochimica Biophysica Acta* 1697:233-242.

<443> Staunton, J. and K. J. Weissman (2001). "Polyketide biosynthesis: a millennium review." *Natural Product Reports* 18(4): 380-416.

<444> Stead, P., Latif, S., Blackaby, A.P. et al. (2000) Discovery of novel ansamycins possessing potent inhibitory activity in a cell-based oncostatin M signalling assay. *J Antibiotics* 53:657-663.

<445> Supko, J.G., Hickman, R.L., Grever, M.R. and Malspeis, L (1995) Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36:305-315.

<446> Takahashi, A., Casais, C., Ichimura K. and Shirasu, K. (2003) HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20:11777-11782.

<447> Tanida, S., Hasegawa, T. and Higashide E. (1980) Macbecins I and II, New Antitumor antibiotics. I. Producing organism, fermentation and antimicrobial activities. *J Antibiotics* 33:199-204.

<448> Tian, Z.-Q., Liu, Y., Zhang, D., Wang, Z. et al. (2004) Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12:5317-5329.

<449> Uehara, Y. (2003) Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Current Cancer Drug Targets* 3:325-330.

<450> Vasilevskaya, I.A., Rakitina, T.V. and O'Dwyer, P.J. (2003) Geldanamycin and its 17-Allylamino-17-Demethoxy analogue antagonize the action of cisplatin in human colon adenocarcinoma cells: differential caspase activation as a basis of interaction. *Cancer Research* 63: 3241-3246.

<451> Watanabe, K., Okuda, T., Yokose, K., Furumai, T. and Maruyama, H.H. (1982) *Actinosynnema mirum*, a new producer of nocardicin antibiotics. *J. Antibiot.* 3:321-324.

<452> Weber, J.M., Losick, R. (1988) The use of a chromosome integration vector to map erythromycin resistance and production genes in *Sacharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythraeus*) *Gene* 68(2), 173-180

<453> Wegele, H., Muller, L. and Buchner, J. (2004) Hsp70 and Hsp90-a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 151:1-44.

<454> Wenzel, S.C., Gross, F., Zhang, Y., Fu, J., Stewart, A.F. and Muller, R (2005) Heterologous expression of a myxobacterial natural products assembly line in Pseudomonads via Red/ET recombineering.

Chemistry & Biology 12: 249-356.

<455> Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60^{v-src} heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8324-8328.

<456> Winklhofer, K.F., Heller, U., Reintjes, A. and Tatzelt J. (2003) Inhibition of complex glycosylation increases the formation of PrP^{sc}. Traffic 4:313-322.

<457> Workman P. (2003) Auditing the pharmacological accounts for Hsp90 molecular chaperone inhibitors: unfolding the relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics. Molecular Cancer Therapeutics 2:131-138.

<458> Workman, P. and Kaye, S.B. (2002) Translating basic cancer research into new cancer therapeutics. Trends in Molecular Medicine 8:S1-S9.

<459> Young, J.C.; Moarefi, I. and Hartl, U. (2001) Hsp90: a specialized but essential protein folding tool. J. Cell. Biol. 154:267-273.

<460> 본 명세서 및 청구범위로 이루어진 본원은 후속출원의 우선권 기초로서 이용될 수 있다. 이러한 후속출원의 청 구범위는 본원에서 기술하고 있는 어떠한 특징 또는 특징들의 조합에 관한 것일 수 있다. 이들은 생성물, 조성 물, 공정, 또는 용도 청구항의 형태를 취할 수 있으며, 한 예로서 제한 없이 하기 청구항을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<193> 도 1: 첫 번째 잡재 효소가 유리된 중간체, 프리(pre)-막베신, 및 막베신에 대한 post-PKS 프로세싱을 보여주는 막베신 생합성을 나타낸 것이다. 도면 내의 PKS 프로세싱 단계의 리스트는 사건의 순서를 대표하는 것은 아니다. 다음 약어는 클러스터 내의 구체적 유전자를 위해 사용된다: ALO - AHBA 부하영역; ACP - 아실 캐리어 단백질; KS - β -케토아실신타제; AT - 아실 트랜스퍼라제; DH - 탈수소효소; ER - 에노일 환원효소; KR - β -케토환원효소.

<194> 도 2: 막베신을 얻기 위한 프리-막베신의 post-PKS 프로세싱 부위를 묘사한 것이다.

<195> 도 3: 플라스미드 pLSS308이 상동 재조합에 의해 염색체 내로 통합되어 *mbcM* 유전자 파괴를 일으키도록 제작된 균주 BIOT-3806의 생성을 도시화한 것이다.

<196> 도 4: 실시예 2에 기재된 *mbcM*의 프레임내 결실의 구축을 나타낸 것이다.

<197> 도 5: A는 PCR 생산물 PCRwv308의 서열, 서열번호 16을 보여준다. B는 PCR 생산물 PCRwv309의 서열, 서열번호 19를 보여준다.

<198> 도 6: A는 실시예 3에 기재된 바와 같이 *mbcM* 내에 502 아미노산의 프레임내 결실된 DNA 서열을 나타낸 것이다 (서열번호 20 및 21).

<199> [주]: 1-21 bp는 3-아미노-5-히드록시벤조산 생합성의 포스파타제의 3' 말단을 코딩하며, 136-68 bp는 *mbcM* 결 실 단백질을 코딩하고, 161-141bp는 *mbcF*의 3' 말단을 코딩한다.

<200> B는 단백질의 아미노산 서열을 보여주는 것이다(서열번호 22). 단백질 서열은 도 6A에 나타낸 바와 같이 완전한 가닥으로부터 생성된 것이다.

<201> 도 7: *mbcP*, *mbcP450*, *mbcMT1* 및 *mbcMT2* 유전자가 프레임 내에 결실된, 악티노신네마 프레티오섬 균주의 생성을 묘사한 것이다.

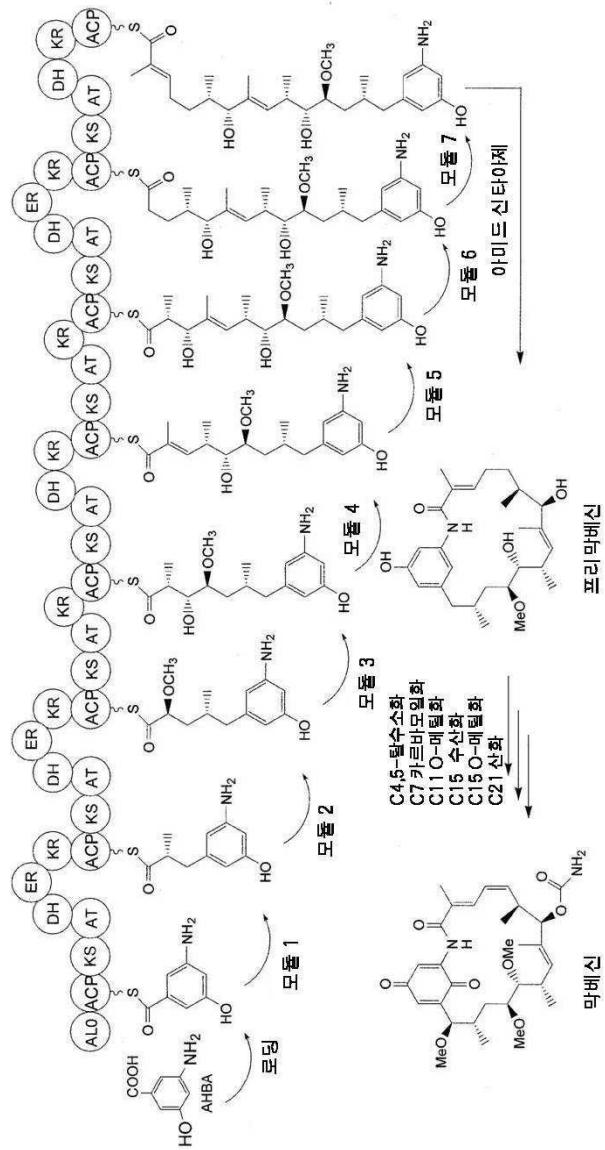
<202> 도 8: 증폭된 PCR 생산물 1+2a의 서열을 나타낸 것이다(서열번호 25).

<203> 도 9: 증폭된 PCR 생산물 3b+4의 서열을 나타낸 것이다(서열번호 28).

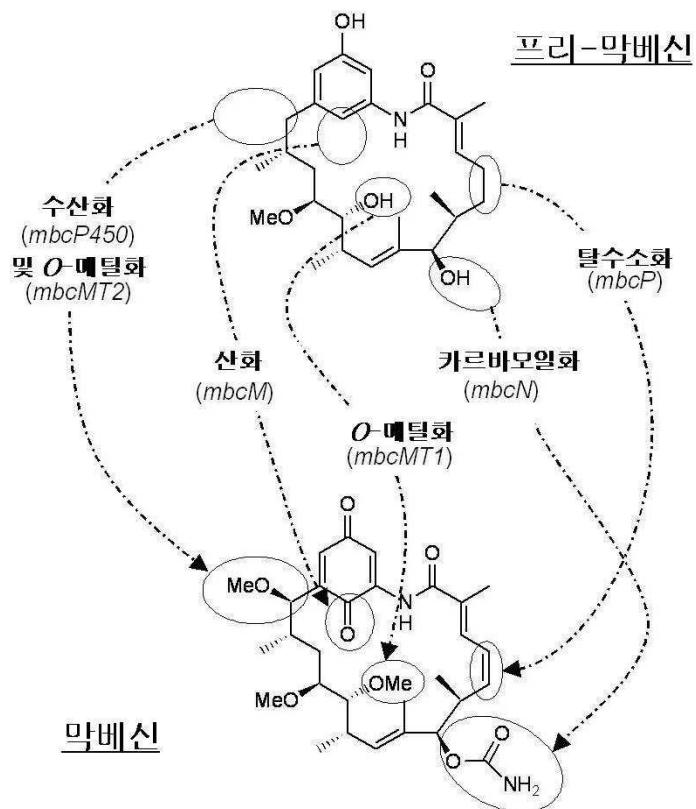
<204> 도 10: 실시예에서 제조된 화합물들(14-20)의 구조를 나타낸 것이다.

도면

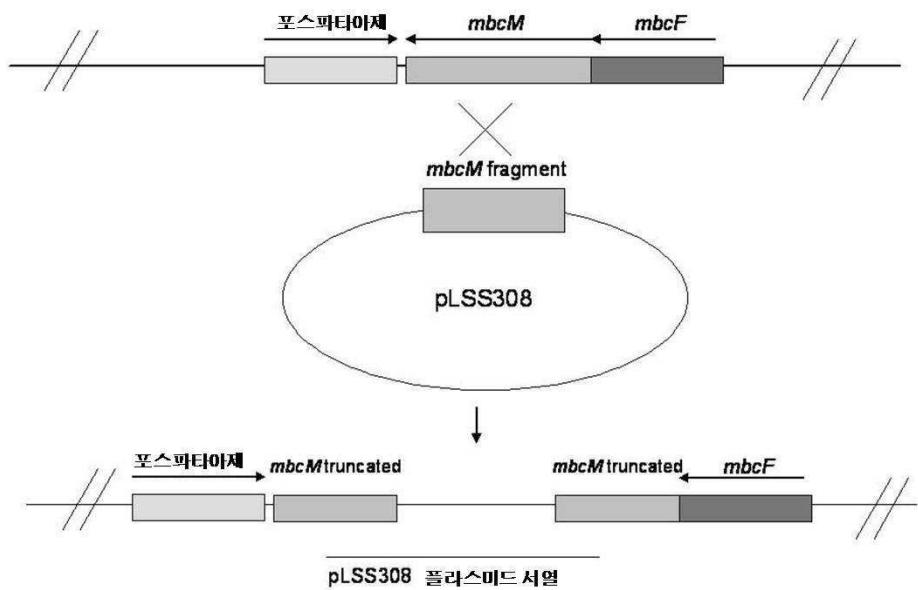
도면1



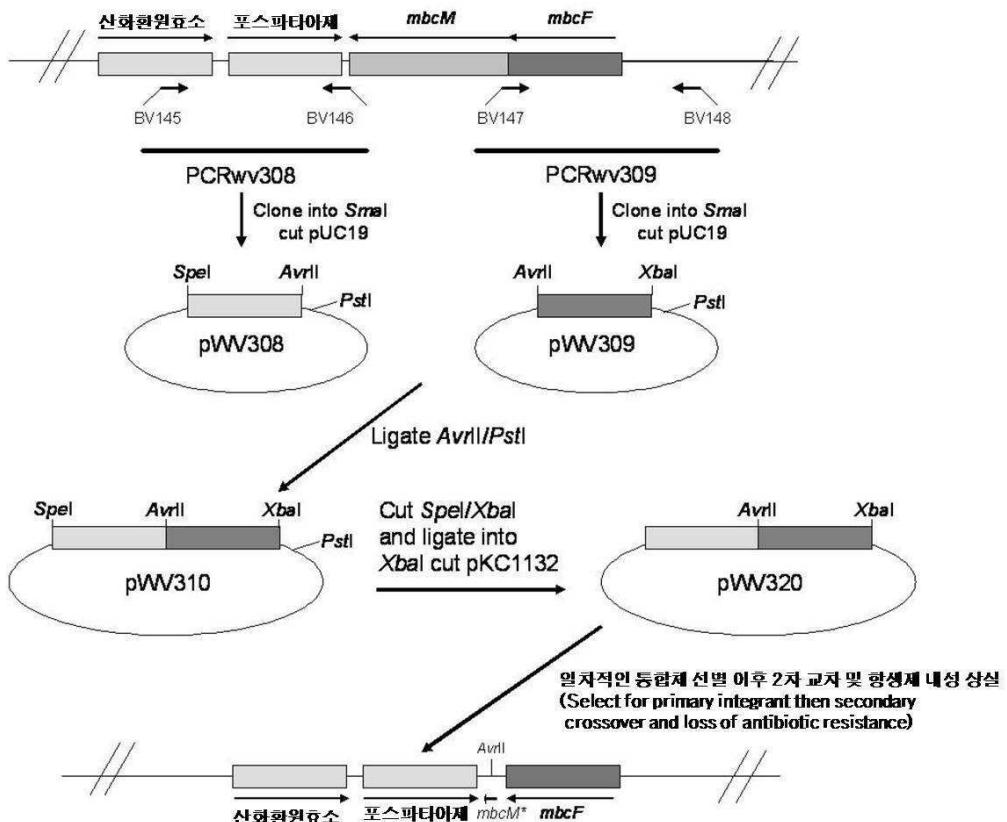
도면2



도면3



도면4



도면5A

1 ATATACTAGT CACGTCACCG GCGCGGTGTC CGCGGACTTC GTCAACGACC ACGCGTTCCG
 61 GGCCGCCTGG CGCGCGACG GGGCGCCGGT GGACCGGTG GTCGGCACG TGGAGGACAC
 121 CGCCAGGGGG TTCCCTCGTCA CCCGGTCGGG GATCTCGATC GGGGTGCGCG CGGCCTGGC
 181 CTCGCACCAAG GCGCTGGACA CCACGGTCGT ECGCGTGGAG GGCAGCGGGC GCACGGCGGA
 241 GCTGCGCTGC ACCTTCGGCT TCAGCCGAA CCGCGAGGGC CCGTCGCGGC TCCTGCTCAC
 301 CACCGACGGC CGCACCAACCC CGGTGAGCT GCCCCCGGAG CCGGTGGGCG CCGAGTACGA
 361 CGCCCAGCTC GCGAGCCTGC CCACCCGCT GGCCGACCCC GCCACGCGCG GCGAGGCGGC
 421 GTCCGGGGCG CGCTGGATCG CGGGCGCGAT CGAACGGGTC TACCGCGCCG CCGACACCGT
 481 GCGGTGCGCC GAACGACGAC ACACGGCGGT CGACCTCGTC CCGACGGGAG CCCCCTGATG
 541 ACCACCGGAC AGACCAACCC CGAGTCGTG CGGGCCGAG CCGGGGACGA CGGGGCCGCG
 601 ACCGCGGTTC CGCGGCCGC GGCCCCGCGC CCCCTCGCCC CGCCGACCCC CGCAGCCAC
 661 CGGCACGTCC CGGGCGCGAC CTACGACGG GCGTGTGTG TCGACCTCGA CGGGGTGCTG
 721 GTCAACAGCT TCGCCGTAT CGCGCAGCGC TTCGAGATCG CCTACGCCGA GGTGCGTCCG
 781 GACGGGGCCG CGCGCTCGA GGAGTACAAC CGGCACCTGG GCGGGTACTT CCCGGACATC
 841 ATGCGGATCA TGGAACCTGCC GCTGGAGAT GAGGGTCCGT TCGTCCGCGA GAGCTACCGG
 901 CTGGCGGGTG AGGTGGAGGT GTTCGAGGGC GCGCCGGAGC TGCTGGCGGA CCTGCGGCAG
 961 CACGGCTTCG GCACCGCGT GGTCACCGGC AAGACGGGG CGCGCGCCCG GTCGCTGCTG
 1021 ACCACCCCTCG GCATGGCGGG GCTGTTCGAC CATATCATCG GCTCCGACGA GGTGCGGAAC
 1081 CCCAACCG CGCCGGACAT GCTCCTCGTGC GCCACCGGCC TGCTCGACGT CCCGGCCGAC
 1141 CGGGTGGTGA TGGTGGCGA CGCCCTGAC GACCTGGCCA GCGCCCGCGC CGCGGGCTAC
 1201 CGGGCGCTGG CGCGCCTGTG GGGCGAGAC GACGAGGCGG AGCTGCTGGC GCGAACCCG
 1261 GACGCGGTGG TCCGCAAGCC CTCGCAGGT CTCGACTGGT GCCTGGCCCA CCTCGCCGAC
 1321 GACCGGACGT GACGCGCGAG CAGGCCCGG CGCGGCACGT GCCGGGGCCT GCGGGGCGTC
 1381 **ACCCCAACCG CGCGCGCAGG TCCGCCACCA CCCTAGGATA T**

도면5B

1 **ATATCCTAGG CACCACGTG TGCTCGACCT CGCCCGCCAC GCGCTCACCC CCCGATCATG**
 61 ATCGACTCG TGACGGGGC GAACTCGTCC TTCTTCACGA GCACCCGCGT CGTCTCCACC
 121 CCGTCCAGCA CGGTGAAGTA GCGGCGGGCG ATCAGCACGT GCTGCCGTT CTCCGCGGCC
 181 CGACCCCGGA AC GTGGTGCC CGCCAGCACC GAGTCCCGCG CGTAGTCGTC CAGCCCCTCC
 241 AACCGCACCG CCTCCCAGCC GTCCCGGTCC GCCGCCCCCG GCCGGAACCG GTACACCGCC
 301 TGCCACGCC CGTCCCTGGG CCTGCGCTCC ACCACGTGCG CGTCCCCGCG CTCCACGACC
 361 CGGTAGGCGC AGCCGTACTG CTCTGCTCG ACCCCGACA GCTCCAGCGG CTCCAGGTAG
 421 GACGGGCCGA CGAACCCAC GTCCACCGC CAGGTCGCC CGTCCAGCG CACCAGGTG
 481 AACGAGTGC CCTCGTCCCG CCCGAACCG TC GTGGGCCA CGCGGATCGC CGCGCGGACC
 541 ATCAGCACCT CGTAGCCCAG CGCGGTGAGC AGGGGTGGA AGAGCCGGTT GAGTCGTAG
 601 CAGACCCCGC CGTTGCGGCC GGTCACCACG TGCGGAACA CACGGGGAG CGGGATCTCC
 661 GCGAGCCCCC GGTTCGGCGG CAACCGGTG GCCGCGCCGC CGTTGTCGTA GGGCACGGAC
 721 ATCAGGTGCG CCTTGTCAG CGCCCGAAC GACTCCAGCG TCGGGCTCGG CACGCCGCC
 781 TCCACGCCGA TGCGCCGAG GTACTCGGCC ACGTCGATCA TGCTGGTGCT CACCTCTCGT
 841 CGGTGGGTGTC GGTGGACTGC CCTGCGCTG ATCGCCCTGC GCTCGACTGC CCTGCGCTG
 901 AATGCCCTGC GCCCGGCTGC CCTGCGCCCG ATTGCCCTGA GCCCATTGC TCGGCGGCCA
 961 GTCGCTCGCG CAGCGCCTCG GCGCGATCG CGGGCGTCGG CTGGTGAAC AGCAGCGGG
 1021 CGGGCAGGCG CAGCCCGGTG GCGGTGTTCA GCCGGTTCCG CAGCTGCACG GCGTCATGG
 1081 AGTCGAAGCC GATCTCGAAG AACGCGTCGT CGGGGCCAC CGCGCCCTTC TCGCGTGCC
 1141 CGAGCACGGC GGGGGCCAGG TCGCGGACCA GCTCGGTGAG CACGGCCTCC TGCTCGTCG
 1201 CCGACAGCCC GGGCAGGGCG GCGCCGAACC CGGGGGGGGG CGCGGCCTGC CGGGTGGCGG
 1261 GGGAGAGCGA GCGCCGCGCG CGGGGGACGA GCGCGCGAG CAGCGCGGGC ACCGCCTCGT
 1321 CGCGCGCGGA GCGCGCGAGC GCGCCAGGT CCAGGGCAG CGGCACGACC AGCGCCGGGC
 1381 **GCCCCGTGGT GACCGCGCCC GCGTCGAACA GCGTCAGAA TAT**

도면6A

1 ctcggccacgaccggacgtgacgcgcgagcaggccccggcgccgacgtg
 gagcggctgctggcctgcactgcgcgtccggggccgcgtgcac

51 ccggggcctgcggggcgtcacccaaaccgcgcgcgcaggtccgccaccag
 ggcccccggaccccccgcagtgggttggcgccgcgtccaggcggtggc
 stop

AvrII

101 cctaggcaccacgtcgtgctcgacctcgccgcacgcgtcaccccccgg
 ggatccgtggtgcagcacgagctggagcgggcgtgcgcgagtgggggc
 start

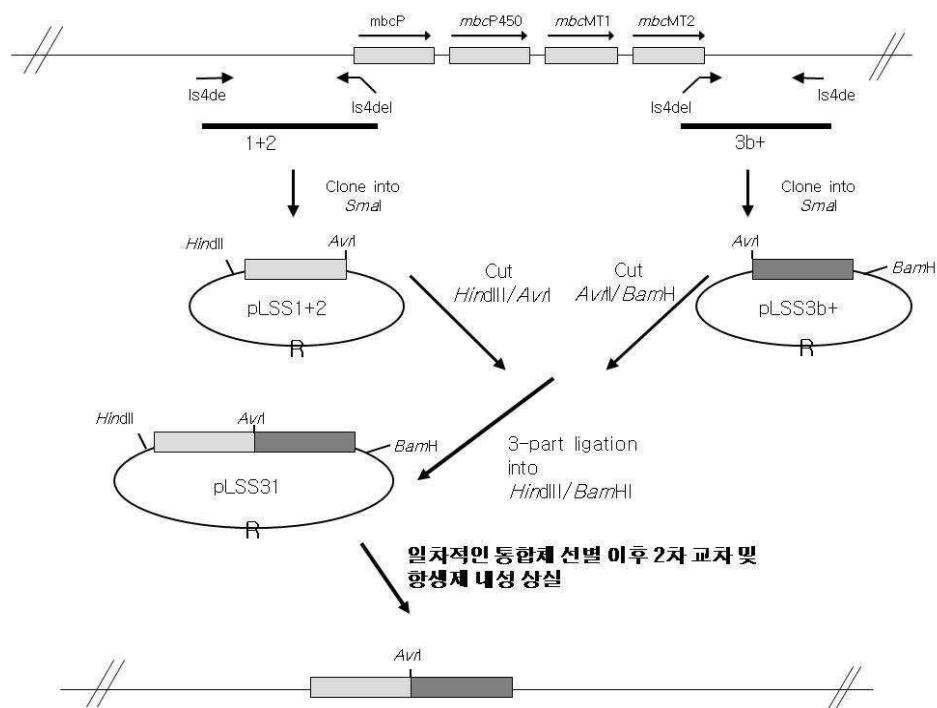
151 atcatgatcga
 tagtactagct

도면6B

1 VAGEVEHDVV PRLVADLRAR LG *

22

도면7



도면8

```

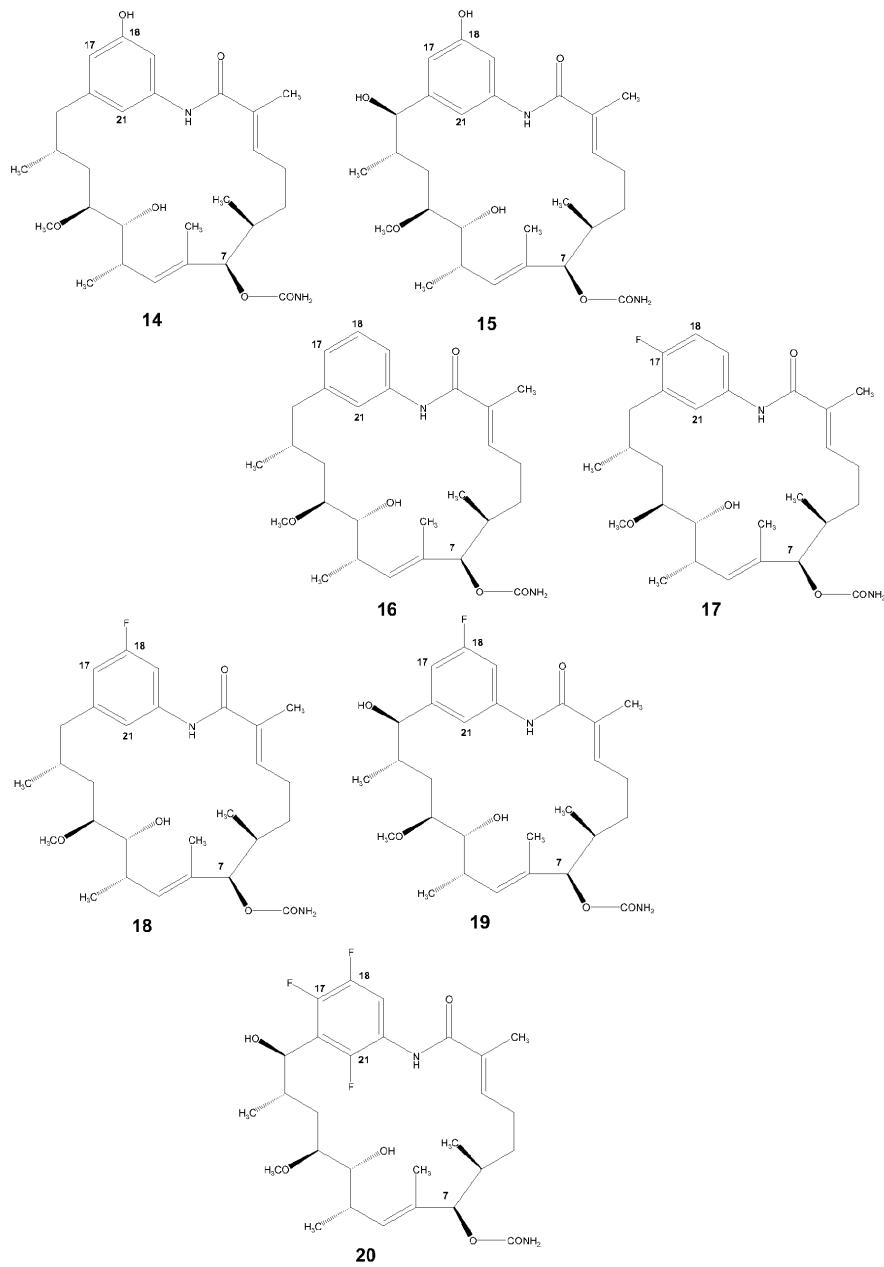
1 CCTAGGCGAC TACCCCGCAC TACTACACCG ACCAGGCCA CGCCTACGGG AACTCCTGGA
61 CATACCGAC CACACCGTCC AACGCAACTT CCGCGAACTG GCCGATCTGG TAGGCGACGC
121 GAAGGGCCTG CTGTTCCACC CACCGCACCT GGTGGCGTC CCAGAATTG GCTGCTTCCT
181 AGCAGTAGCC GAACACCCGT AACCACGCG TGGCGTCCC CACGGACGCC ACCGCCTCGC
241 GGGCTGCGGG GCGAGCGCAG CGAGCCCGCG CAGCCCCACT CCCCGTCCC TCTTCTCCGT
301 GTGGCTGGC GCATGTCAA TTCCCACGTA CTGCCAACAG ATCATGTGCC GTTGAGCAG
361 GTCAGCGACT TGTGCGCTT CGGTGCCCTTA AGGCGAGCT GGGATGGGGG CACTGTTCC
421 GGACTGAGCG GGGCAGCTTG GAAGGTGGAG TTCGGTGAGC AGAGGCAGCA CGTCCCCTCG
481 CACGTAGAGG TGTTGTACA CGCGTGGCG GGACCTGCGC AGTAGGCCCG TATCCGAAG
541 CTGCTCCAAG ATCAGGAGTG CGGCGCGGT CGTATAAGCCG AGTTCGGCG TCAGCATGGT
601 GCTGTGAGC AGTGGGGCGA CGAGCAGCGG GGCAGGAAGC GCTTGACCT TCCTCCGCC
661 GGTGCGCATE GCCCAGGTGG GCGATCGCG GAGCCTCACG GATCGCGTC ACCTCATGCA
721 GGCTGGCGCT CAACCTGGAA CGCGCAGCTG TTTCGTCCAG ACGTGCCAGG GCGGTGTAGG
781 CGTCAACAA GGTCTTGCTG GTTTCGGAGC CGAGTCTGAG CCGGGACCAG GACGACAAC
841 CGCGGATCCT CGCGGACGGG GGCAGGCTCG TGTCTTCACC GGTGGTAGTT GACCTGCGCG
901 GGGCGGAGGT GCCCTATTGC TGCCGGACG AGGTATCCC CCGGAGCAGT TTCTCAGCAC
961 GCGTGAATC GAGATCCGGG GCGCTGAGCG CGGTGAACGC CTCGTCAGC GAGTCGCACG
1021 CGCACGTCGT CCTGACATCG GGCGCGCAT GGCGCGAGGT GGTCAGCGGT GAGCGGGAAAG
1081 GCGCGGCAGG GTGTGTGCGA GACACTCCGG GACTCCGTG AGAAGGTCGA TCAGGCAGAA
1141 GGGTTGAAC GCGAATCGCA AAGCGGGCCG GCGCAAAGG GTGCGGGCCG CCTGCGACGA
1201 TTGGTCACGC TGCTGCGCG CGGTCCCCCG GGAACCTGCTT GCGGAGCAGG TCGATCCGCC
1261 CCTTGTGATC TTCTGCCAGC GCCTCCAGAA CCGAGAGCAG TCGTCGGGGCG TGCAGTGCAT
1321 GGCCATACCC ATCGTCGCGT ACCCCAGAGG GTGTCGCTCC CGTTCAAGGGG CGACCATTT
1381 CCACGCCCGC TTGGCCTCCT TGGCGGCCG GCGAAGATCG CCGAGCATCA GGTAGGTGCC
1441 CGACAACCCG ACAACCCCTGC CTGCGAACGC GGCTTCCGGC ACCCCGGCGC CCTCGTCGGC
1501 TTCCAACGCC CGAACACCGT GCCACAGCAC GGCGCGCGC TTGCGCTCGC TCGTCTCAG
1561 CCATCCCATG ACACCGTGCG CTTCGGCCAG TGACC

```

도면9

1 **GTGTGCGGGC CAGCTCGCCC ACCACGCCA CGAGGGTCTC CAGCGCGTCC GCGCCGGTGC**
 61 GCGCGCCCCG GACGACCTCG ACCGTGGGA TCAGGTACGG CGGGTTCATG AAGTGCCTGC
 121 CGATCAGCCG CGCCGGGTGCG GGGACGTGCC CGGCCAGCTC GTCGATCGGG ATCGAGGAGG
 181 TGTTGACAC CAGCGGCACG CGCGGCCCG TGAGCGCGC GGCCCCGGCC AGCACCTCGG
 241 CCTTGACCGG CAGCTCCTCG GTGACCGCT CCACCACAG CGAGACGTCC GCGACGTCGG
 301 CGAGCGAGGT GGTGGTGAGC AGCTCGCCCC GCTCGCGTC CTGCGGCAGC GCGCGCATCA
 361 GCCTGCCAT GCGCAGCTGG CGGCCACCG CCTCCCGCGC CGGCCCGACC TTGGCCCGGT
 421 CGGTCTCGAC CAGCACCACCG GCGACCCCGT GCGCACGGC CAGGGAGGTG ATCCCCAGGC
 481 CCATCGTGC CGCGCCGAGA ACGGCGAGCA CGCTCCTGCG GTCTGCTCT CCCATCGCGC
 541 TCCCCCGCCG CGGCCACCGC GGCGCCGTC CGGTCCGCG CACGCGCATT
 601 CCACCTCTGA TCGTGTGCGG GGAAAGGCGC GCGCGACCCC CTGACCTGCC CCCCTGAACC
 661 CCCCTCAACG GAACCGGAAA TCGAATGTCC CGAACCGCGC GTCAAATCGT CGATTGACAG
 721 CCGCAGAACT GTTCATAGAC TGTGGCGCA GTACCGATCT CGAATTCCA CGGAAGAGTC
 781 CTCCCCCATG GCTCAGCAGA TCAGCGCCAC CTCGAAATC CTCGACTACG TCCGCGCGAC
 841 CTCGTTGCGC GACGACGACG TGCTCGCCGG TCTGCGGGAG CGGACCGCGG TTCTCCGGC
 901 CGCGTCCGCG CTGCAGGTGG CGCCGGAGGA GGGCAGCTG CTGCGCTGC TGGTGCGCCT
 961 GGTGCGCGCG CGCTCGGTGC TGGAGGTGG CACCTACACC GGGTACAGCA CGCTGTGCAT
 1021 GGCCCGCGCC CTCCCGCCCG GCGGACGTGT CGTGACCTGC GACGTCGTGCG CGAAGTGGCC
 1081 GGACATGGGC AGGCCGTTCT GGGAGCGGGC GGGCGTCGCG GACCGCATCG ACGTCCGCGT
 1141 CGCGGACGCC CGCGCCACCC TGGCCGGCCT GCACGCCGAG CACGCCGTGT TCGACCTGGT
 1201 GTTCATCGAC CGGAACAAGT CGGATTACGT CCACTACTAC GAGCGCGCCG TGACGCTGCT
 1261 GCGCACCGGC GGCGTGGTCG TCGTGGACAA CACGCTCTT TTCGGGGGG TCGCCGATCC
 1321 GTCCGCGACC GATCCGGACA CCACCGCCGT CGCGGAGCTG AACCGCCTGC TGCACGCCGA
 1381 CGAGCGGGTC GACATGTGCC TGCTGCCGAT CGCGGACCGGA ATCACGCTCG CCGTGAAGCG
 1441 GTGAACCCGC CGGAATCGCG CGGAATTCCC CGGGAGAGAA AGGCCGCCGC AGTGTTCACC
 1501 GAGGACGTGG **CCACCGACCT GCGCGCTAC CCGTTCTAG G**

도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Biotica Technology Limited

<120> 18,21-DIDESOXYSACBECIN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF CANCER

<130> IP0042-GB01

<160> 28

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 1
 ggtctagagg tcagtcccc cgcgtaaccgt cgt 33

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 2
 ggcatatgct tgtgctcggg ctcaac 26

<210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 3
 cccggccgcg cgagcggcgc gtggccgccc gagggc 36

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 4
gcgtcctcg c gcagccacgc caccagcagc tccagc 36

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 5
ccaacccgc c cggtccccg gcccgcggca acacg 35

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 6
gtcgtcggct acggccgggt gggcagctg ctgt 34

<210> 7
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 7
gtcggtgac tgccctgcgc ctgatcgccc tgcgc 35

<210> 8
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 8

gcgcgggtggt gctgcccgag gacggggagc tgcgg 35

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 9

cacccgctcgc ggggggtggcg cggcgcacga cgtggctgc 39

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 10

cctcctcgga cagcgcgatc agcgccgcgc acagcgag 38

<210> 11

<211> 100588

<212> DNA

<213> Actinosynnema pretiosum

<400> 11

gatctggggc gacgagccgc ccgcgggccc ggggcggcgc ttgcaggcgc tcgtctcccg 60

gctgcggcgc ggcgcgtggc gcgcgggcgc ggtcgctg ggggtggcgc ggtaccggct 120

cgtggcggac gtggacgcgc cgccgttcga ggagctggcc gcgcggggcgc gggaggacgc 180

gctgcgggag gcgcggcgc tggggcggc gcggtcgccc ggcgagccgc cggtggtcgc 240

ggccgtcgcc cgccgggtgg cgacccggct ggccggcgtc tcggtgagg tggtgctgga 300

cctggcggag gtgcgagctgg cgctcgccgc caccggggcg gccatcggtg gggcgagcgg 360

ggtgtcgccc gagcacccgg cgacacgagcg ggccgcgggg tgctgtgg

acgcgtcgcc 420

gggcgcggga cggcaggccg aggcgctggc ggcctacgag cgggtccgcg cggcgctggc 480

cgacgagctg ggccgcgacc ccggcacggc cctgcgcgag cgccacctgc ggctgtcg	540
cgccaccccg ccaccgctcc cccggccgaa cgcgctccc ggcgcgttga cgggttct	600
cggccggac gcccacctcg cccgcgtcg cgaccgtcg gccgcgggc ggctgttac	660
cgtcgctggg cccgggggg tggcaagac ccggctggcc gtggaggcgc tgccggga	720
ccgggacgct ctgttgttgg acctcgccg ggtcgccgag ccctcgagg tcgtcgccg	780
cgtcgctcc gggatcgggc tgcgcggca ccgcgacccg	
ccggccgggg acgcgacggc 840	
gctgctggcc gccgagctgg cggcgccgac gtcgtgtcg ctgtggaca actgcgac	900
cctgtcgac gccgtggccc acctggtcg gtcgtgtc cccgtgtcc ccgagctcg	960
cgtcgcc accagccggg aaccctgtgc ggtcgacggg gaggcgctgg tcccgctgg	1020
gccgcgtcgct ctggggggaa tccccggacgg gcttgacccc ggggtcgca cggcgtcggt	1080
gccccgttcc gccaacggg cgtcgccgtt gccccgtt tcccgctcg acgcacac	1140
gctggccgac gtggtgccg tggtgccggc gctggacggg ctggcgttg cgctggagct	1200
ggcccccggcc cggtcgccg ccctgcccgt	
gccccacactg gtggccgggt tgcgcgcg 1260	
gttccgcctg ctggcgccg gaaaccgggc cgcgcgcgccc cggcacccga cgctgcgc	1320
ggtgatcgctg tggagctggg acctgtggc cggggccgag cggccgtgg ccgagcgat	1380
ctccgtgtcg cccggccggg tccccggg gtcggccccc gccgtctcg cggccgtgt	1440
gccccgcac gagggtccccg aactgtggc cgcgtggc gaccgtgc tgctgagct	1500
ggtcgccgggt cggccggcga tgctggagac ggtcgccgcg tacgggtcg agccctgg	1560
cgccgcgggg gacttgagcg cgtccgcga cctggccccc ggcacgtgg cgggggtgt	1620
ggcggggcag gacgcgtgc	
tgcgcggcc gggcagcgc gcggcggtgg cggcgatcg 1680	
cgcggagcac gacaacgcgg tggccgcgt gcaccacccg tgcgcacccg gggacgcgg	1740
cggggcgctc ggcgtggcgc tgcgtgttgc ctggtaactgg cagggtttcg gccggcagtc	1800
cggggcgccg cactggctcg ggccggcgtt ggcgggtccc ggcggccgtt cccggagcg	1860
ggactgcgcg cggccgcgcc acctgtcg cctggccgac ggcggccacg ggggtggta	1920
tgcggggag gtggggcgc tgcggaccg ggtgtggcg caccggggc tcccccgtca	1980
cctgcgggtg ctggggcgg tctgtgtt cctgtgggg cgcggcagg ggggtgttccg	2040
ggagctggc	
gcggcgccg ggtgttgtc cgggctggcg caccgttcc tggccgagct 2100	
ggcgagaac gccggcgacg tggaccgggc ggcggccac gcgagggtgt ccctggacc	2160
gttccggcg gccggggacg ggtggggcgt ggcgggggtg ctggcggtgc gggcgccggc	2220
gcggcggtac gacgacactgg acgggacgtg ggcggaccc tggaggcgc gggcgctgg	2280
ggggagttc gggcgctga gccccgttga cccgggtcgg ggcgacactgc ggtgggtcg	2340
cctgcacag cggcgccgtg acagcgccgc ggcgtggag gtgtggccg cggccgtgc	2400
tcggggggag caggtcgccg tggtgacgc gccggaggcc ggcgtcgccg tgcgtcg	2460
ggcggagcgg gacgtggcgg cggcggtgt gctctgagcg ccggatcg gccggcgcccc	
2520	
ggaccctgggg cggcggtgt agctgcgtcc cgggggtggg gggcggtgg ggcacccggc	
gcggcccgat tatcggttg cctggggga cctggcggtt gggagccggg cgttgcggcg	2580
ggcgcgggtg ttggcggtcg cgagcgggga gtcggcccg cttggcccg tggcggtgg	2640
ggcgcggccg ctggaggcagg cggcggtggcgtt gtcggccgg tgggggtgc tgctcg	2700
ggccgcgcgg gtggggggcg cgcacgaccg caccgacccc ctggcgccg agctggtcga	2760
ccggggccgg gccggcggtgg gccggagccg gttcgccggc ggcgtacgcg ggggtggga	2820
ggcggagcgg gacgtggcgg cggcggtgt gctctgagcg ccggatcg gccggcgcccc	
2880	
tcaggcgccg ggggtcatgt gggcggtgc aggccggcca ggtcacacgt ccaggaccc	2940
cgcgcgtcc ggcgtcgcc ggacttcggc ctgcgtcggtt aagacccctt cgggtgac	3000
cgccgtgcacc tcgggtcgcc cgtccaggca ggcgtcgcc aggacgggtga gctggaa	3060
caggctcgcc gctcgccgaa ggtggacag gaccaccccg ctggcgccg tggcggtgg	3120
caccagggtt tcgacgcctt gggcgccgac gacgagggtcc aggtcgctgc cgcgcac	3180
gctgacgcgg cgttgcgtca ccaccaccc tgcgtcgac ggcgtcggtt cgggtggaa	3240
gtcggtggcg ccggagccccc tggggccgc ggcaggccgg ccgaacatct	
tgttgcgcgg 3300	
gtggatctcc gctgtgtcg ggcggaaagcc gacgcgcacg tggatcaccg gcacggac	3360
ggcgcggccg gctcgccgacg cgttggcgag cctggggagg tagggccgggt cgggttag	3420
ggcgcaccacg gccggctgga cgtccatcac cagcaggccg ggggtgggg tctcgcc	3480

cgtttcggtg	gtggcggcgc	ggggccgccc	ggtgggggtc	aggggtgcgg	gggtgccggg	3540
gtgagcaggc	tgtgacggt	gagcaggcgg	tcggcgagt	cctcgccggc	cagcgggtcc	3600
tcggcgccca	cgaccaggc	gtggacgatc	gcgcgggtc	cgtggagat	cagcacggcc	3660
aggtcgccgg	cggccgctc	gtccacctcg	cccaggccgg			
cgcgcaggc	ctcggtggtg	3720				
atgaggggtc	ggaagagactc	ggccaggccc	tccgcagacc	gccacgcgc	cggccgggt	3780
agcacggcgc	ggtagaaagg	cggtgttgtc	gcgaagtggc	ggccacggc	caggaggcgg	3840
gcgtggcg	gggccccgg	gtcgccagg	tgcggcagga	gctcgcccg	caccaggcc	3900
gccgcaggc	cgacgaggag	cgtgtcgcc	tcgccaagt	gttgttagag	cagetgcct	3960
ctgacgtcg	cggctcgcc	caggtcggtc	accgggaccg	ccgcggccg	ctcgccgacc	4020
aggtcgacgg	cggccggcat	gagggcggcc	ctggagcggg	cgaccggcgc	gtcgccggcg	4080
gtgttacgg	gggtgaaact	agacagtgt				
caataaatga	gcaagtgtcg	tcgaacgcgc	4140			
gcgcggaaat	ctccggtgcc	cggggccgt	ccctggcagc	atgatcacgc	gatgaccgag	4200
gtgaggacgc	gcccgtacgc	cggggcccg	gacctgcgc	cgatgcagg	gttggcgcgg	4260
cggatctgga	cggcgctcgag	ccgggtggcac	gtcgccgacc	tggcctggca	gcgcacccag	4320
cacaccgggc	gcgaggccga	gtggccgacc	gcgcgtgtgg	aggcggccgg	cgaggtgg	4380
gcgtgggggt	gggcccggact	gcccggtag	ctggcgctgc	tggcgtaccc	cgccggccgg	4440
gagcttgccgg	gggggggtct	cgactgggtc	gcggcgctgg	ccaccgcgc	cgggcgctcg	4500
gtcaccgtgc	tggacgcgcga					
accgcacctg	gtcgccgcgc	tggaggctcg	cgggtacgag	4560		
cggctggcg	ggccgcactt	ccggcactcg	gtcgccgcgc	tggacgaccc	gccgacgccc	4620
gaactgccc	cgggttaccg	ggtccgcgc	gtcgccggcg	aggaggacgt	ggcggcgcgg	4680
gtcgccggcgc	accggggcgc	ctggtgccgc	tcgccccgtca	ccgaggagag	ctaccggcgc	4740
gtgatgggg	cgtggccgt	ccggccgggg	ctggactggg	tggtgaggg	gccggacggg	4800
cggctcgccgg	ccacctgcct	gatctgggtc	gacgagcgc	acggcggtgg	cgagctggaa	4860
ccggctgggg	tcgaccccg	tctcgccgg	cgccggctgg	ggccggccgt	gtgcctggcg	4920
gcgcgtggcg						
cgctcgcga	ggcggggcg	cgggcggcg	tggtgtaccc	gtgcacgg	4980	
caccccgacc	accccgcc	cgcgcgc	taccggggc	tgggttccg	cgagcacgc	5040
cgcacgatca	cattcacgc	gtcgaggcgc	cgccggtagc	agccgcgg	cggggcgac	5100
ggacccggc	gacgagcgc	tccgcgtcg	gagcgtctgt	ccagcgcgt	ggacaccagt	5160
gccacgacca	gaccgcgc	cgatcgctg	ggtcggtcg	gggtcgacc	gcggtgaggc	5220
tctcgccgg	gtgggtgaac	cacgtcctgg	cgatggctc	cacgcgcgac	accgggtgcc	5280
ccggctggcg	ctggacgtca	ccgacgcgc	cgccgtcgac	cgccggggc	cgccgcgtt	5340
ccggccgttgc	gccgcgcgc	ccgagtcga	cgccagggtgg	ccgggtccgc		
ctggaactga	ccccggcgc	ctccggccc	gcccgtccgg	ccggccggcc	aaccgcctc	5400
aggcgigc	gaccgcgc	accatcccc	ccaccaccac	cgccatcg	acgtggtgca	5460
cggtcgctgg	gctcggtcg	cgccggggc	gggacaggag	gagttccac	gccatcgcc	5520
ccagggcg	gtcgccgagg	gcgacgggtgg	tcaggcgcgg	gcgcaccc	cgccggccacgg	5580
ggtgtcg	gaagccgacc	acggagacgt	cgtcggcac	ggacaggccc	gcctccgcga	5640
gcgcctggca	cgccgcgaac	gccaggcg	cggtgaagca	cagcagcgc	cgaggcggt	5700
5760						
gttggacag	gagggtccagg	gtggcgccgt	agccgttctc	cgccatccac	tccacgcacg	5820
ggcgcacgt	ctccacactc	accccgccg	ccgcgaaggt	ctccagcgc	ccggagaggc	5880
ggccacggc	ggcgatgtgg	cgccgggtcg	tgcctcgcc	cgtggggcc	gtgcgtatca	5940
ggtgcacgc	ctcgccgtgc	ccggcggtcg	gcagcacgc	cgccgcggaa	cgccgcgc	6000
cgcgtcg	ggggagc	cggtgcgcgg	ggaagtctgtt	ggccggc	acgttcagca	6060
gcacggacgg	cccgctcgcc	agccgtcccg	ggacccgtccag	cagccgggg	aacctggcc	6120
cgaagaccac	gccctccacc	tggggcgc	cgagcgag	caccagcg		
gcctccac	6180					
cgcgtcgcc	gccgtctca	ccggcgaaca	gggtgaaccc	gtggcggtgg	cgccgcgcga	6240
ccgcgcctc	gatcgatca	ccggacagct	tggcgaggc	cacggcg	gagacgaaac	6300
cgagggtctt	gtgtcggtgg	cgccgacagca	cggtgtcg	cgccgtagcc	agctgtcg	6360
ccgtcgcccg	cacccgtcg	tccaccgc	ccgagatgc	cagtc	ccgacgcgc	6420
agagcaccag	ggaggcggtg	ggcaccgc	cgccgcaggc	ggacgcgac	tcggccagcg	6480

tggcggtcag gctcgccgcc 9480
 acgaggccga gcacggccag ggcgatggc gccccatggc gttgacgggg catcggttg 9540
 cctctctgg tggctctgg ggcgcccggc gggtggacttg tcggcgcgg 9600
 cgggtgttgtt ggggtcagc agggggagtt ggtctgggtc agcaggccca gcccagggg 9660
 caggcggttg tagtcggccgg acgcgttggg gtccaggccc tggtacaggt agctcagtt 9720
 gcagggggtt atccatgg tctgtcggtt cccgtcgcc accagctcgc cgtgcgtat 9780
 gtcgcgcgtc cactggccac cggggaaacgt ggtgttgtt gcccgtcga acgggttcga 9840
 ctcgtgtcg gccagcgcgg tccacggtcc
 ggcgatcgcc gggcggtcc aggagcggaa 9900
 ccagcgccgg ccgtccgagc cgatcgccctc gtggagcatc agccactgg tcttgcggc 9960
 gacctttag atgttggacg cctcgaacaa cgggttgcgg ttgtgtcct gcatggcgat 10020
 cacgggttg gtaaagccgt tggggactg ggcgaggctg gtctccgagc ggtacagggt 10080
 gccgttgtcg tccgaggaga acaggtggca ctggccgtg tcgcagacgg tccagaagtc 10140
 gaccaggtag ccgttgcga tggatctgc gatcatccc ggcattccgt tggctagaa 10200
 gttcctcgcc gggaccagg acgcgggtt ctgcgtcgt ggcgtcgtc agtacgaggc 10260
 gttggaccgc gtcgttaca
 ccaggtacca caggcgttgc gggcgaagt agaacacctg 10320
 cggcgccggc cggtagcccg tgccgatccc ggagcggtt aggtgttgcg gggggcgg 10380
 cgcgcctgg gaccagtgg tgaagctgtt gtgcacggg ttgttagccgt tggtagac 10440
 cgaggcgaac acgtggtagc ggccgttgcg ggcacccacg ctgggtcct tgacggagac 10500
 cgtggcgtc gaggagtgg tggatctgc gatcagcgcg ccgtggagg accaccggaa 10560
 gctgtcgcc agcgacccgc ccgttgcgtg cgggtcgtg tgggtggcg ggcgttgcg 10620
 gggcgtgtg tgcgtggcc cgactctcc cgtgcacgt gtcgcgttga ggctgaacga 10680
 ggtcggtcg
 gggtgtggacc cggtgtggatc cgccgtgaac ccgaactcga cggcccccc 10740
 ggtggggatg gggcggtgtt aggaggcggtt gcccgtc acctggccgc cggactggg 10800
 cacctcgccg ttccaggctt ggcgcacccg ctggcccgag ccgttagtcc aggtgagcgt 10860
 ccagccgtcg acggcgtcac cgagggtgtt gatggcgcacg ctgcgttga aaccggcc 10920
 ccactggag gtcggcggtt aggcgttgcg gcacccggc ggcgcggcgg ctgggtgg 10980
 gagggcggcg agcgcggcca ccatggcgag cgagggtgtt ggcacccggc cgatccggc 11040
 ccggcgcggg tgcgtggcc ttgcgaggag catggcgtcc ctgcgtcgtc gtcgcacggg 11100

 ggtcggtcg gccgaccggg agcggcggtt gcccgtgtt actccccac ttccgtcaat 11160
 ctagccaggt ggcacagggt ggtcaaaggt aaaaaggcg gacgcgttt agctccagc 11220
 gcaaagggtt cgcgcgttct ttccggccgg gggcagggtt atccggccgg gctcggtcg 11280
 aggacggggc tggatggg ggggggtat gggcggtc ggggggggg tcggccgg 11340
 cccggccacgg gtcagaggcg cacgcggacg acggtaacg ggagggttcg ctcggcgtac 11400
 tggtaacttgg aatggaccac cagcagggtcg tcggcgtca aggtcggtt ggacgggacg 11460
 tccatggccc tggcggttgc cccggcgcg accgtggcgc gggagtggc ctcgtcagc
 11520
 cgcaggacgc tgcgtcgcc ctccgggtgg aacaggctgg tgacgtgtt ggggtgttgc 11580
 cgcgcagga gcacccgtc cgaggcgatc tcggccacgc cggccagggtc gatcggttgc 11640
 acggcgccgg tgggtgtgtt gatggcgtgg aacgcgtgg agttgggttc ggcgagcgc 11700
 acgtggcgcc cgtccgggtt gaccacgagg ccgttgcgtt tgcgtccctc ctcgtacgc 11760
 accggggagt cggcgagggtc cacgaacgtc ctcaagggtt ggcacccctc ggggtcgcc 11820
 agctggcgcc cgggtatccg gtagaggacg gggcgaaacg agtcgttgc gtagggcgtcg 11880
 ccgttgcggg cgtatggcgac gtcgttgcacc accgtggcgc gggagtggc ctcgtcagc
 gtcgaacacg 11940
 tgcaggacgc cggccgtcg ggtgtgttgc acgaaggactt gcccgtggc gcccggccgc 12000
 atgaccaggcc tgcgtcggtt gatccatgc cgcacgggg tggcgccggc gtcgttgc 12060
 gggcgccagg acggctccag ggcggggcg tcgcgttgc cgcgcaggat cgtggcgtcg 12120
 gtcgtcgccg cgcgttagaa tggcggtcg cccggcgtc ggcacgttgc ctccgggttag 12180
 ggcgggtcg cggggaccac gtaggggtgtt acgggggtgtt ggcggccggc ggcgggtggc 12240
 acggcgccgg cgggtggcgc ggcggccggc ggtggcgccg cggcgccggag ggctggggcg 12300
 acgcgggtga ggacggagggt cgcgttgcgagg accgttgcgg
 tgggtgttgc ggaagggttc 12360
 cgggggtcg aagggtgttgc ggcgcacac aaggcgttgc tggcgccggg tggcgttgc 12420

cgcttgtcgg gggtagttct tcacccccc tccgggggg gggccgact agggtgagcg 12480
 gtgtggcga tcttggcg caccgggtgg cgaaccgctc cgacgtgcgg gacttcctgg 12540
 tcagcaggcg cggagggtgt agtccggggc gggccggct gcccgtctc gggccggggc 12600
 gggtgcggg gtgcggcgg gaggaggctg cgctgctcgc cgggtcagc gtggactgg 12660
 acacccgctt ggagaagggg cacatcgccg gtgtctcgcc ggaggtgctc gacccgtgg 12720
 ccgggtgct gggctcgac gccgaggaggc
 gggctcacct gttcgacctg gcgcgcgcgg 12780
 cccgcgtcc cccgcgcgc gagggtggcg cggaggccgc gctgcccgcg acggcgcagt 12840
 ggctgtgca cagcatgacg ctgtcgctgg cgatggtgc cggccggcg caggacgtgc 12900
 tggcgtcaa cccgcgtggcc cgcgcgtct acgcgcgcgt gttcgcgcagc gccaccacgc 12960
 gggacggcgg cccggcgaac ctgcggcgtt accacttcct cgacgcgggc gcccgcgagt 13020
 tctacgggaa ctggggggc accgcgcgacg tgctcgctc cgcgcgtcgc gccgaggccg 13080
 ggcgcgaccc ggcgcgacggg gccaccgcg agctggtgg cgagctgacg gccgcgagca 13140
 ccgagttccg ggccgcgtgg
 agcgcgcacg acgtgtctgc gcacccgcgc ggcgcacaaga 13200
 cttccggca ccccgaggcg ggtgagctga gcctgagcta ccactcggtg gacctgcga 13260
 tctccgcac cggagcccg cacgtgtcg cgtgcaccgc cgaaccgcg tcgaccgacg 13320
 aggcgaggct ggcgcgcgtc gtccggtag cccgggggtgg cggccaccc cgcgcgtct 13380
 cgcgcggcg gggggggcc cccggtcaga gcgtgagcgc catcccgatc gagccggcg 13440
 cggctcggtt gaagccgtgc ttgaggtaca gccggcggcc gggcgcgtcg gccaggagg 13500
 tcacgaacgc gccggcggg gccgcgtcgc ggatgcgcgc gaggcgcgc tccatgatcg 13560
 cgcgcgcac
 gcccctcccc tgggttcgg gcagcacggc catgtcgacg acgtggaaat 13620
 accagccgcc gtcgcgcagg acccgccca tgccgacggt cccgcgtcc gcgtgcgtga 13680
 cgtgaaagga gcccaggcg cgggcaggg cggcggcgcc ctgcgtggcg gtcttggcg 13740
 acaggccgga ctgcgcgcg aggccggagg agtcggcgc ggcgcgggg gtcgggtgg 13800
 gctctcgatc cccgtgcacg cggtcaggct cccacggcg cggccggcc cccgcgcac 13860
 ctgacgattt ccccgctcgc gggatgcgg gcggccgcgc gggatttt gacatcccc 13920
 ggccggcga gacggcgccg cggcgtgaa aagagcgcgc tcgcggccct tcgcgcgc 13980

 cccgacatcc cccgcgcggc gaccggtaa tgccgtccac gcctgggggt tccctccca 14040
 cgtcgaacac cggccaccacg cggccacgcg cccgcgtcgc caccggacg ccgaggaaca 14100
 cctttcacg ggcacggaa gccgcagcg aggaaaaacc gggaatggcc gcaggcgatc 14160
 gccgcacgac gtccgcacat caccgcgago agaatcgca ggcgttccacc gggccggcg 14220
 aggaagattt ctcgaagaac ctgcgggaag cccgtggaaaga aaacccggac 14280
 ccgaaacgcg acaaatttc ggcacccac ccgtgaaaca cccggccccc ccaccaggatc 14340
 acccgctgac atcacgctca gtcagtatcg gcacgtccc cccgcgaggc ggagcgcgc
 14400
 accccgcaca accgggcacc gacgggcac ctccactcg cccagcaccg ccccaagatc 14460
 gcacgtagca cgggtgaaa cccgtcaagc gcatctcaac ccgttcggag cagagtggcg 14520
 cccgtcacgt cccgaccgtt caccgttggc aacgggtcca gtccacgcg ggtgcgtca 14580
 agccacttg ccccgatcac acccgccgt gcaaccgaat gcagcaggaa tatcttccc 14640
 gagaactcg cccgttaaccg ggagtggagc caggccacc cctaagacgc ttgcacat 14700
 gcccaacaat ggtgaagatg gaacggcgga ccgcaccgcg aacgcgaacc gaactccgcg 14760
 agagggcaccg gtgaaacgatc ctggaaacgac tactgcgcg tagctcaagg
 gtggaaacgcc 14820
 cggctcgcc gggcgagg gaataacggc ttttacccc tcgacaacag cttgtcaacg 14880
 aaaccctgtc acccgagcg tccccgcgcg caccgtcgc ggggtggcg cggcgcacga 14940
 cgtggctgcc cggcgctcgac gacgcacgcg gtcccccgcg cccgcgcgaa ggcgtcg 15000
 gatcgccacg acggggcacc cggaccacgc ctcccccggc acagcgcgc caccgcgcgt 15060
 tccggcgcc gccgggaccg cccgcaccgcg cggagcgcgcg ccaccggccg gggccgtcc 15120
 ccgcccggaccg ggtcgccctc cggaccacca ctccacggac cacggaaagg accactcccc 15180
 cagtggagct tctgcgcgc cccgagatcc agtcggccgt
 cgagcacctc ggggtggacc 15240
 tgccggaccg gggggacgg cggttcctgg tggacggacc gcccgcctgc ggcaagacga 15300
 cggccctgcg gggctcgac gaccggatcg cccacggaga ccacctcgatc tccaccgc 15360
 cctgcacccccc gccggagacg gagctgccc tgggggtgct caagcagctc tcgcctccc 15420

ccggcatggc cagggtcgac ccgcgcctgg tcgcccacct cggcgagctg ctcgccccgg 15480
 ccccgccgcc cccgcgacac tcggcgctcc tgcaactgtta ccactcgctg tgccggcg 15540
 tgcgcgcgt gtccgaggag gtccgcgtgg tcatcgctt ggacgacgctc cgccacggcg 15600
 acaccgcctc gctgcacgtc ctgctgcagc
 tggtgcaccc gctggacacg ggcgggtgc 15660
 ggctgtgtc caccgcgac ctgctgtgc cggtgagctt cccggcgtc cgctacgagc 15720
 tgctgcgcgt cgcggggtc ggcctgtcc gggtcgcgc gtcgcgtcg gccagggtgc 15780
 gggaggaggc ggtgcggggtc gtccgcggc acgtcgccaa ggggtcgac ttccgcgc 15840
 tgaccggcg caacccgtc ctgctgcacg cgtggcggt ggacgtgtcg gaggcggcg 15900
 agccgcgca gatcgctac ggcaactctt tcctgtccctg cctgcaccgc aacgaacccc 15960
 tggttcttggc caccgtgcgg ggcgtggcgg tgctggcgg cggctcgcc tcggacctgg 16020
 gcagcgctgc cggcaccgag
 ccggagcagg tcgcccagggt gctgaacgcctc ctgcgggagt 16080
 cggggctgtc ggcggaggac ggggtccggc acgacgcggc ggcggcgcg gtcgtcg 16140
 acaccgggtc cccgcgacac gaggtgtgtc accgcgcgc cgcgcgcgtc ctgcgcgacc 16200
 agggcggcgc ggtcacccgc atgcgcgacc acctgtcg ggcggggcgc atcaccgacc 16260
 cgtggcggtc ggacgtgtcg gtggacgcgg cggagctgtt ggtgcagcgc ggcgagccga 16320
 cggccgggtt ggcgtgtc cagcgcgcgc tcgactgcag cccggaccgg gagcgcagga 16380
 cggccgtgca ggcgcggctg gccacggcgg agtggctgtt gaacccgtcg acctcgca 16440
 ggcaccacac
 cgcgcgtgtc ggcgggttcc acgcgggcag gttgtcggtc cgcgcacagcg 16500
 cgacgcgtat gaagcacccgt cgtggggccg ggaacacccgc cgaactcgac ggggtgtcg 16560
 cccggctgcg gaccgaccggc cgcgcgcgc aggacgtgcc ggtgctggag cactggctga 16620
 ccagcaccta ccccgccgcg gcccggccca ggaccgtgtt ggggcgggac gtggactcg 16680
 cgcgcagcag ggcggacccgt gttccgcggg cgaacgcgtt gtcgtgttgc gtgtgttgg 16740
 cgggggacag cgcacgcgtg gccgaccggg cggaggcggt gtcgtggag ctgcggctgg 16800
 cgcggagtc cgggtgtac ggcgtgcgg cctgtgttgc gtcgtccgcg ctgtctact 16860

 cggaccgcgc ggacgtggcc gcctcggtt gcgacgcgt gtcgtggcg cggggcggtc 16920
 cgctgtgcc gatggcgccgc ggcgcagggtc tggcgctggc ggcggagtc ggcgtgcgc 16980
 ggggcgacca cccgagcgcgc gacgagctgg cgcggggaggc gtcgaccgtg gtgtccccgg 17040
 cccgcgtgggg ggtgtcggtt gggctgcgc tgacccgtt ggtgctggcg ctgaccaggaa 17100
 tggggcgcta cgcacggcgc gcgccgtgg tggcgccaggc ggtgccaac gggatgttcg 17160
 ggcaccgcac cagcgtggac tacctgtacg cgcgcgggca ctcttcctg ggcggggaaac 17220
 ggcgcgcgc ggcgtggcgc gacttcctgc tgcgtgggaa gcaactgttcc cgggtggggcc
 17280
 tggcgcggcgtt gtcgcgcgc ggaccgcggc ggcggaggcg tggctggcg 17340
 agggcaacccg ggaccaggcg cgggtgtca tccacgacca gtcggcagg cgggcacgg 17400
 acacccgcgc ggcgcgcggc caggcgtgc ggcgtgtcg ggcgcacccgc tcggtaac 17460
 ggcacccgcac gtcgtgcgg gaggcgggtt cgggtgtca ggcgtcgac gacaactacg 17520
 agctggcgccg gaccctgcgc gacctgggg gggcgcagcg ggcgtgggc gagaacaacg 17580
 tggcgcgcgc ggtgtatccgg cgggggtggc acgtcgcccg gatgtgcgc ggcggccgc 17640
 tgtgcgagga gtcgtatgcac accgcgcacg ggctgggttgc cgcgcacccc
 cgcgtcgccgg 17700
 cccgcagggtc ggacactggac cgggtgtac gtcggagca cgggtggcc ggcgtcgcc 17760
 cgtcgccggcgt gacgacccgg gacgtcgccg tgaactgtt cgtcacgc acgcacgggtt 17820
 agcagcaccc gacgcgggtt tccgcacac tcggatcaa gacgcgggag cagtcgcgc 17880
 cggagcttag cgtcgaccgg tcgaactgtac gcgacgggg cggtccctgt gatctggggc 17940
 cggccgcgtcc ggtcccggtc cgtccgtcc cgcctgtcc ggtccgcgc tgcgtggcc 18000
 cggccgcgtcc ggtcccggtc cgcctcggac tcggggatc gggccaggg tgggtggcgc 18060
 gacgtgtcg cgcacgtcgc gacccagtc ggcgcgcgc
 gggccgtcga gcaacgcgc 18120
 caggccgcgc gtggacttct tgcgtcgccg catgaacccgc acgacgtcg cgtccggac 18180
 gcccggcgc acgcgcacgg gacgcgcgtt gcccgcacc acggagggtt gtcggccac 18240
 cgggtccggc cgcacccgcgc cgcgcgcgc cgcgcgggg cggcgaaga cggcgcgc 18300
 cgcgcacccgc tgcgtcgcc gacccgcgc accgggtggc acgtccagg gtcgtggcc 18360
 ggtgtggccg tagttgggg tgcgtcgcc ggcggagtc cgtcgccg cggccacac 18420

gcgggccttg agggcgacgc tcgcccac ctggtccagc agcggcagcc ggtccaggcc 18480
 cggcgcggcc atgaagtggc agcggggcat
 ctcggcaggc cggttgcga gctcgctc 18540
 gggcagggtg gcgagcaggt cgaggtcga cagcacggcg ggggctgcc agtaggcgc 18600
 gacgagggttcc tggccctcg ggaggttgc acgcgtctc ccggcgtac tcgcgtc 18660
 ctggccagc acgcagggtcg acgcgtc ac caccgggtg cccgggtgt agagcgaggc 18720
 ggcgaggccg acccgctcg tgggtgtcc gccgcccag gagacgacga cgtccgc 18780
 ggtcaggccg aactcggcga accggctca cagggtggcg acgggtgcga gggttgc 18840
 gtgtcgccg tggggccg ggaggacgag ggaggggacg cggggctgg cggtctggc 18900
 cggccggccg ggggtacca
 cgacggcgcg ggcgcgcgc agggccgcga cgacgtccgg 18960
 gagggcgccg cgacgcgcgt tccgatgtg gacggtagt ggcgcgtc ccagctcgac 19020
 cggacactcg cgggtgtgg cggcggtgg ggcgggtgg gtggagctgg gcaactgttc 19080
 ctccctgggt gggcgccgac gggggcgatc gggggacgcg ggggggtgac gggaaagcaa 19140
 tcgggcaggta atggAACCGG tccgggggc gaacggcag gaattcaat gggggcaagc 19200
 gacggggagc gatcccagtgt gttggggcga agtgcggcgc gggaaaggc ggtcgctg 19260
 cctcagccgc cggccgcgc gcccgtc acg acgtggtgc gcagggtgag cggcccccgc 19320
 gcccacgg
 cccgcgcgac gcccggccg ttgtgggtca gggtcgcctg ctgcacacgc 19380
 accggcaggc cggggccgcg cgggtccgcg cggcgccgc gtcgtccag gtgcgcgc 19440
 cacgcgcgcg cggagccgac cacgcgcgcg cggggcgccg cccctgcgc ggcgacggc 19500
 gcctcggtc gtcgtacccgg cggagccgcg ctgcgtccagc tctgcacca gtggaaacagg 19560
 aacgcggcc tggcggttc cggggccagc ggcgaccgtt cggccagggt gtgcagcacc 19620
 gtggctgcg cggccgactc gccagggtcc tggccccaca cgggctcac accgacgcgc 19680
 acgtccaggc ccatgtcgct ggacgcggc ggcgaccacgc gtcgaccgg cccggccgc 19740

 aggccccac cggcaggcc ctgcggcc gggtcgacgc gcagggtcgcc ggcgcgc 19800
 tcggcgcaca gacggcgag caccggccc cgcgcggcc eggtcggtcc cagccacacgc 19860
 gccaccaccc cggcccccgcg caggaacgc cagtgcgcg cccggccgcg cgcgcgc 19920
 tcccgacga cggggggcag cacctcgcc accgagccgg ctccacccgc tgccagcgc 19980
 cagcccgacc aggacggggc gcccgcgc ggggtccgc cggggccgc tctcgccgaa 20040
 cgggtccgcg tcatgtccac caccactcc gccttggca gacgggtcc tgccggatca 20100
 cccgcgtgtt cggacgcgcg cggacatagc gacgcgcaat acggcaatt caccgc 20160
 20160
 tcaggtcagg ggggttggg gggatgcctt agggggcgag tgccgc 1999aaa gggaaagaag 20220
 aatcgaaagc acatgcgaga ggcacttcca agtcaggcc gcaaggccgg gtccgcgtc 20280
 tcggggacac cccgggtctg cgcgtgcgc caccgaagga cgtgggtaca tgctcgac 20340
 cgacctgtatc cggccgggttc cggactgtc cggggccaaac gggatcgct tcggcgc 20400
 gaccgcctac tggacggcgc cccgttcgtt cggcacgc gggctgaac ggcgcacgc 20460
 cccctcgcc ggtcacctcg ggcagttgcg gctgcaccc cggcaccgcg cgtatgtctg 20520
 cctggaaat cggcgtgaaa tgcgtggag ctattcgcc tgctccgc
 cggacgcgt 20580
 ggcggccgcgttccgc gttccaccga cggaggactg acccactgc tcggcgc 20640
 cggggccccc cgggtgtatca cggacgcgcg cgcgcgcgag cgggtcgacc ggttgcgc 20700
 cggcgggttc cggcgcgcgtga cgggtatgc caccaggac gggccgcgc cggacggc 20760
 catcgcttc gggccgtgg cggccgagga gggccgtcg cccgcgcgc acgggtcg 20820
 gctcgacgc gttggctggta tgctctacac ctccggc 20880 acggggccca ccaaggcg 20880
 gctgtccacg cggcgcgtc gctgtggc ggtggccgc tgctacgtgc cgggtccgg 20940
 cctcgccgc gggaccgcg tggcgtggcc gctggccgc
 ttccacagcc tgcgtccat 21000
 caccgtcgctt cggccgcac cggccgtgg cggcaccacgc cgcacgtgg acggcacgtc 21060
 cggcgcaggac gtgtcgccg cgtggagca gggccgtcg acgttctgg cggccgtcc 21120
 gacgtgtac cggtaacctgg tcgacgcgc cggcgcgcg gggccaccc cccggac 21180
 ggggtggcc cgggtggcc gggccgtgc gacggccggag ctgcgtgcgc cgttcgagg 21240
 cacgttcggc cggccgcgtga tcgacgccta cggcgcacc gggccgtcg gggccatcg 21300
 ggtgaactgg cggaccgggg cggcgcgtgc gggccgtgc gggccgcgg tgccgggct 21360
 gacggcgtccgg cgggtggacc cggagacgt

gctggacgtg cccgcgggc gggagggcga 21420
 gtctgggtg tcggggccga gcgtgatgt gggctaccac aaccagccc aggacggc 21480
 cgagggtctg cgggacggct ggtaccgcac gggcgcacctg gggcgccgc acgaggccgg 21540
 gtttcgcacg gtcaacgggc ggtcaaggaa gatgatcatc cgggttgggg agaacgtgca 21600
 cccggcgag gtcgaggccg tggcgccgc ggtgcgggg gtggcgacg tcgcgtcgt 21660
 gggcaagccg cacgacgtgc tggcgaggt gccggttggg ttcgtgtgc cggcgccgg 21720
 cgggttgcac cggcgccgg tgcgtggcgc gtgcgggag gagctgtcgt acttcaaggt 21780
 gcccggaggag gtctacgaga
 tcgagcgggt gcccgcacg cgctcgccg agaccacccg 21840
 gcacgtctg ctggaccctgc cccgcgggt gcggcgccg tcgagcggc agttccagtc 21900
 gctgtcgccg ctggactggg tgccgaggac ggcgcgtccg ggtgaggagg tcccgccgag 21960
 ctgggtctg gtggacggcg acccgctggg gtcgcggac ggggtcgccg ccacggccgc 22020
 gcgggtcgccg gtggcgccg cggcgccga tgcgcgtccg gacggcgat cggacgcccga 22080
 cgagccggcc gcgagcagcg cggcgaaacc gggctcggtt ggctcggtg agccggcgtc 22140
 gggtggtcg ggcgaaccgg gtcgggtga accggcgccg agcagcgcgg gtgagccggg 22200
 tgcgggttag
 cggcgccgg cggaaaccccc gcaggtcgta ctggtcgccc cggtcccccgg 22260
 tgagcgttgtt gaggtcgccg gggacgtgga ggcgcgtccg gacgggctcg cgcggcgct 22320
 cgtcggtgg ctggccgacg acgggttcgc gggcgccggg ttctgtgtgg ccacccgtgg 22380
 cgcgggtcg acctcccccg gcgaggaccc gcccgtccg gcccgtccg cgcgtgtggg 22440
 tgtgtgtcgcc tcgggtcgagg cccgcgtccg cggcgccgg tggcgccgg acctggacgc 22500
 gtccggcgc gggcgccgg cggcgctggc tcgcgtcgc gggcgccgg acgaccaggt 22560
 gcccgtcgcc ggcgacgtgc cgctggcgcc cggcgctggc aggggttccg tgccgtccga 22620

 cccggccccc gccccggc tggacccggc cggcgccgtc gtggtacccg gtggcgactc 22680
 ggcgcggcc gggccctcg cgggcaccc ggtggcccg cacggcgcc ggcgcctgt 22740
 gctgtctcc cccgacgggc tgcccggaca ggcgcgcgc gacctggagg cgggttcgc 22800
 ggcggccggc ggcggccggc agtcgggtt gtgcacccg gccgacccgg tgcgcgtcg 22860
 cgcctgtcc gacgcccggg acggccggg cacggcggtg gtgcacgtgc agggcgccg 22920
 ggcgtgtcg gactcgccg cgcctctgt cgcctgcac gagctgaccc gccaggccgc 22980
 accggcgctg ttctgtgtt caccctcggt ggcggccgt cggcgctcg accggcgaccc
 23040
 ggcgcggccg gggccggacc agttcgccga ggcgcgtggc cgacggcgcc cggacccggg 23100
 cctggccggg ctggccgtgg cctgggtcc gctgcggcc gggccggcc aggccggccg 23160
 gggcgccgtc ccatggccg aggccgtac cctggcgac ggcgcgtcc cgcggccacca 23220
 gggcccgctg gtgggtctcg ggctcgacgc ggtcggtcg cggcgccgg tggcgccgt 23280
 gccggccgtg ctgcacgacc tggcgacgg cggcgccgc ggcgggtcg cgcggccgc 23340
 ggtggccgag ttacgcgcga ggctcgccga ggcgggtgg cagcggccgc gacgcgtcg 23400
 gctggacccgt gtgcgcgagc acgtcgccg ggcgcgtcg ctggccggg
 acaccccggt 23460
 ggcgcggccac cggcgcttcc ggcacttcgg cgtcaccccg ctgaccggcc tggcgctcg 23520
 cgaccggatc aacgcgcgca cggcgccgtc cctggcccg acggcggtgt tcgaccaccc 23580
 gacccggcc ggcgcgtccg accacctgtt ggcgcggcc accggccacc ggcgcacgt 23640
 cgagccggcc cgggacgacg gggcgccgg gacccgtccg gggacgacg cgggtggcgat 23700
 cgtcgccatg ggtgcagac tggccggcc cgtggctcg cggaggacc tggcgccgt 23760
 ggtggacgag ggcgtcgacg cgtacggccc gttccggacc gacccgggtt gggacccgt 23820
 caccctgtcc gacggctcg acccgccggg gaggttccct
 gtggaccggc gtggtttct 23880
 ggcggccgc ggcgacttcg acggccgggtt cttcgccatc tcccgccgc aggccctggc 23940
 catggacccg cagcagcggt tgcgtgttgg ggtgggtgg gagaccgtgg aacgcgcgg 24000
 gatcgacccg cgtcgctgc acggcgaaga cgtcgccgt ttcagccgc tgcgtatcca 24060
 cgactacggg accgaacccg gttccggcc gggccggcc gggccggcc tgcgtcccg 24120
 cagcgccggc agcgtgttcc cggccgcgt cgcctacccg ctcggccctga cggccggcc 24180
 gctgaccgtg gacacggcg tgcgtcgac gtcgtgtggc atccacccgtt cggcgccaggc 24240
 gctgcgtcg ggcgagtgct cgtatggcg
 cgcggccgg gtcgcgtga tggggcagcc 24300
 gacgtcggttcc cccggcagcg cggcgccgc ggcgacccggc gctgcaagtc 24360

gttctccgac gacgccgacg gcacgaactg ggccgagggc gtggcggtgc tgctgctgga 24420
 gcggctctcg gacgcgcgccc gcacggca cccgggtctg gcggtgtgc gcggcagcgc 24480
 ggttaaccag gacggggcca gcaacgggt gaccgcgccc ageggcccg cgccagcagcg 24540
 ggtcatcagg caggcgtgg cgaacgcgg gctgcgaccg tccgaagtgg acgcgtgga 24600
 ggcgcacggc accggcacca ccctggcga cccgatcgag ggcgcaggcgc tgctgcac
 ctacggcag gaccgcgagc
 agccgcgtg gctggcgtc ctcaagtcca acctcgcc 24720
 cgcgcaggcg gggcgccg tgcggcgat gatcaagatg gtatggcgc tgccgcacgg 24780
 cgtctgcgc cgcacccgtc acgtcgccac gcccgttcc aagggtcact ggtcgccgg 24840
 cgcgtcgag ctgcgtaccg aggccaggcc gtggcgccg aacggccggc cacggccggc 24900
 gggcggttcc tgcgtcgccg tccgcgcac caacgcgcac gtcgtgtgg aggagcaccg 24960
 gaaaccggcc gccgcgcgg tgcaccggc ctccccggc ctggcggtca gccgcggcg 25020
 cgcggcgctg gtgcgtccg ggcgcacccg ctccgcgtc gccgcgcagg ccgcggccct 25080
 gctggggcac
 ctggccgacg ggaccgaccc ggcggcgctg ggccgcgc tcgcaccac 25140
 cgcaccccg ttcgagcacc gggccgcgtt cctcgccg gacgtcgacg ccgcgcgc 25200
 cgggtcgcc ggcgtcgcc aggaccggcc cgccgcgaac ctggtcaccg ggcaggccg 25260
 cgtggacggc cgggtcggt tgcgttccc cggccaggcc ggcgttgaa ccggcatgg 25320
 cgggagctg ctggagaccc cgcgggtt ccgcgcggg ctgcgcgagt gtcggaggc 25380
 gctggagcgg tggaccggct ggtccctgtc cgacgtgc tcgcacggg cggagctgga 25440
 cgggtcgac gtgtccacg cgcctcggt ggcgttgatg gtggcgctgg ccgcgtgt 25500

 ggagtctgc ggggtgcgc cggacgcgt ggtcgccac tcgcaggcc aggtggcc 25560
 cgcgtcgcc gccgggtggc tgcgttggc cgacgcggc agggtgtgg cgctgcgc 25620
 cgcgcgatc gccgagcacc tggccggccg cggccgcatt atgtccgtc ccgcggggc 25680
 gagcgggtg gccgggtga tgcgcgaccg gcagggccgg gtgcgttg ccgcgtgaa 25740
 cggccgtcc ggcgtcgcc tggccggggc cgccgcgcg ctgcgcgac tggccgcgc 25800
 ctgcgcgcgg gagggcgtgc gggccggat catccgtg gactaccca gccacaccga 25860
 gacgtggac ggcgtcgac gggtgtca ggaggtgtcc gccggcgta ccgcgcaggc
 25920
 cggcacgtg cctggcgtt ccaccgttga cggcgagtgg gtcgcacggc cgggctgg 25980
 cgcgactac tggttccggc acctgcgcgg gaccgtcggtt tgcgcacg cgggtcgcc 26040
 gctggcgcc tccggcacc ggggttgcgtt ggaggtgtcc agccacccgg tgctaccgc 26100
 cgcgacccgcg gaggtgttgg aggccgcgg ggtgcgcgc ggcgtgtgg tggctcgct 26160
 cggcgcgcac gacgggtggcc cgcgcgggtt cctcaccggg ctgcgcgac tgcacgcgc 26220
 cggcgtcccg tggggcgtgg aggccgtt ccgcggcgac gacggccggg tggagctgcc 26280
 gacgtacgcg ttccacgcacg acgggtactg gtcgcgcgc ggcccggtgg
 ccggggacgt 26340
 gtcgggtcg ggggtggtgg acgcggcga cccgtcgcc gggcggtcg tgccgcgtcc 26400
 gggcacggcc ggggtgtcc tgcgtcgcc gctctcgac cggccgcgc cgtggctggc 26460
 cgcgcgcgcg gtggccggga cgggtctgtt gcccggccg ggcgtgtgg agctggccgt 26520
 ggcgcgcgcg gacgagaccc ggtcgccgg gtcgtgtgg cttgtatcg ggcagccgc 26580
 ggtgtgcgc cggacgcgcg aggtggaccc gacgtgtcc gtcgcgcgc cggacgcgg 26640
 gggcggtcgcc gacctcgccg tgcgttggc gaccggggc gccgcggagt ggtcgagca 26700
 cgcgcgcaggc ggcgtcgccc cggccggccg gtcggccgg
 gcgcgcaccc cggggccgc 26760
 gacggccgg ggcgcactgg acggggccgc actggacga cagtggccac ccgcggccgc 26820
 ggaacccgtt ggcgttggaa gtttctacga gaacctggc gagctgggtt acgagtaacgg 26880
 gcccgttgc cggggcgtc cggccggccgt gacgcgcgc ggcgagggtt tgccgcggc 26940
 cgtgtcgccc gaggaggccgt tgcgtcgcc ggcgtgtcc gggcaggccg ggtccggca 27000
 ggcgggtcc gggaaacggg cggggacgg gttcgccatc caccggccc tgcgtggacgg 27060
 ggcgcgtcgcac gccggcaacc tgcgtcgcc gcccggccg gccggacgc tgctgcgtt 27120
 cgcgttggaaac gagggtcgccg tgcacgcac
 cggggccgcg ggggtcgccg tgcgtcgcc 27180
 ggcgcacccg gaggactccc tggagctgg gtcgttgcac gccgacggc cgccgtggc 27240
 gagcgtcgcc gggctgaccc tgcgcacccg ggtcacggc ggcgcgcgg ccgagtcgt 27300
 gcacgagggtt gagggtggaccg aggtcgccg gggcggttgc tggccggagg tgccgcac 27360

ccgcgactgg gaggccgccc cgacactgcc gaccggctcg cgcgagctgg ccgcccgcgc 27420
 gctgaactg gtgcaggacc ggctggcggg cgtggacgc gcaccgctgc tggatcac 27480
 cacggcgcgc gtggcgtgg ccgacgacgc cgaggtcacc gaccggccg ccgcccgcgt 27540
 ctggggctg ctgcgctcg
 cgcagtccga gcacccggc cggttcgcgc tggtcgacgt 27600
 cgacggcggc gggcggccg aggtcgccgc gctcgccc ggcgacgagc cgacggccgc 27660
 gctgcgcggc gggctcgctc gggctccgc ctcgcgcgc ctgcgcgcgc gtctcggtcc 27720
 gcccgcggg ggcactggc acctggacgc agtacccacc ggcacgcctc acggcgtcgc 27780
 gctcggtggc tcggAACGGG tccgctcg ggcggggag gtggatcg aggtcaggc 27840
 ggcggggcag aacttccggg acgtgtgtt ggctcgccg ggcgtcgccg gccaggagg 27900
 catggcggc gagggtccg ggatcgac cgaggtcgcc cccgaggtga ccggattcgc 27960
 cgcggcgcac
 cgggtgatgg ggctgttccc gcgcgttcc gggccgtgg ccgtggccga 28020
 cgcggcgcacg gtggtgccgg tgccgcggg ctggctgtc accgacgcgg cggccgtgcc 28080
 ggtcgcttc ctgacccgcgc tgcacggact ccaggacgc gccggctgc gggccgggaa 28140
 gacgggtctg gtgcacgcgg cggcggccgg cgtcgccggag gccggctgc agctcgcca 28200
 ccacttcggc ggcgcgtgc tggccaccgc gcacccggcc aagcacagcg tgctgaccgc 28260
 gctggcggt cccggcggc gcgcgttcc cagccgcac ctggctacg cgcggcggtt 28320
 cggcgcgtc gacgtggtgc tgaactccct ggtcgccgag cacgtcgacg cctcgctcg 28380

 gctgctgcgc gccccggcc ggttcggtt gatcgcaag aacgacgtcc gggacgcgcga 28440
 ctcgtcggtt gacgtccgtt accgggtttt cgacctggc gggacgcgc gggccggaccg 28500
 gatcgccgag ctgctggagc agtgggtggg cctgttcgag tcggccgc tgcggccact 28560
 gccgggtgcgc acgtggacgc tcacccgcgc ggcctcgccg ttccgccgaga tgagccggg 28620
 cgggcacacc gcaagatcg tcctgacat cccgcgcgc ctgcaccccg agggcacgg 28680
 gctgatacc ggcggcgccg gcacgtcg ggcacccccc gcccgcacc tggtcaccgc 28740
 gcacggcgcgc cggacacctgc tgctggcgg caggcggggc cccgacgcgc cggcgcgcag
 28800
 cgagctggcg gaggagctgc cgccgtggg cgccgtggc cgtgcgacgt 28860
 cgcggacccgg gcccgcgtcg acgcctgtc cgcctcgcc cggccggcc gcccgcgtac 28920
 ggcgtcggt cacggccgg ggcgcgtcgac cgacggacag gtacccgc tcacccgg 28980
 gcggttcgac ggggttcc gccccaaatggt ggacgcgtac ggcacactgg acgaggcgc 29040
 cgcgcaccc gacctggccg cggtcgctgt ctactctcg gggcggccg tgctcgca 29100
 cgcggggcag gcaactacg cggcggcgaa cgccgtcg gacgcgtgg cccgcaccccg 29160
 gcacccgcgc gcccctccgg cgcctcgctt ggcctgggg ttgtggagcg
 acacgagcgc 29220
 gctgaccgcg acatggacg ggcgcgcggt ggacgcacg cggcgcgcgg gcgtgtggg 29280
 catggcaac gacgaggcgc tggcgccgtt ggacgcggc ctggcgccg ggctgcccgc 29340
 gctggggccg gcccggatcg accccggccgc gctgcgcac cccgcgtcg ggtcgccgt 29400
 gctgcgcggg ctggcgccg ccacccggcc cacggccgg acccgccgacc gggacgcgcgt 29460
 gggccggcgt gccggacggt tggccgggtt gtcggccgc gaggcggacg agtgcgtgt 29520
 gggccgtgt cgacgcgagg cggccggcgt gtcggccac ggcacgcgc acgggtcg 29580
 gcccgagggt ggcgtccggg acatgggtt cgactcgctc
 accggcggtt agtgcgcac 29640
 cggcgtcgcc gggcgcaccc ggctcggtt gcccgcacg gcacgttcg accacccac 29700
 gccggcgccg ttccgcgcgc tgctgggg cggatgtcg ggcgcgtcg tggctccgg 29760
 agccgtgacc gcccgcgcg ctcccgatcg cgccgcgcg cccgcgcacg agccgatcg 29820
 gatcggtcg atggcggtcc ggctggccgg cgggtggc gacccggccg ggctgtggg 29880
 gctgcacc gggagcggg acggatgtt ggacttcccc gacgaccggg gctggaccc 29940
 ggagtcgtc taccaccccg acggcactc cccgcaccc tccatcgac tgcgcggccg 30000
 gttctggac gacgcggccg ggttcgacgc
 cgggttcttc ggcacatcccc cgcgcgaggc 30060
 cctggcgatg gacccgcgcg acgggtgtt cctggagacc tgctggagg cggtcgacgc 30120
 cgcgggatc gacccggatcg cggatcgccg cagcgcaccc ggggtgttcg cggatcat 30180
 cgaccaggac tacgggtgc ggcgcggccac ggcggccgag gagctggagg gctacctgt 30240
 cacggcacc gccacgtcg tggcgccgg ggggtggcc tacctgtcg ggctggagg 30300
 cccggcggtc accgtggaca cggcgtcgac gtcgtcgctg gtggccacgc actggcggt 30360

gcaggcgctg cgccggggcg agtgctcgat ggctggcg ggcggcga ccgtatggg 30420
 gcggcgctg cgttcgtgg
 agttctccg gcagcgccgg ctggcgccgg acggaaactg 30480
 caaggcgltc ggccggacg cggacggac cgcgttcagc gagggcgccg gcgtgtgt 30540
 gctggagccg ctctcgacg cgccggccgg cgggcacccg gtgtcgccg tgatccgggg 30600
 gtcggcgctg aaccaggacg gggctcgaa cgggctgacc ggcggccagcg gaccggcga 30660
 gcagcggtg atccggccg cgctggccga cgccggctg cggccgtcgg acgtggacgc 30720
 ggtggaggcg cacggcacccg gcaccgcgt cggcgcacccg atcgaggcgg ggcgcgtgt 30780
 ggcacactac ggccggacc gggaggcgc ggaaccggg tggctgggt cgctcaagt 30840
 caacaccggg
 cacacgttgg cggccggccgg cgtgtcgacgt gtgtcaaga tgggtgtggc 30900
 gctgaaccac ggccgtgtgc cccggctgtc gcacgtggg gagccgagcg cggcggtgga 30960
 ctgggagtgc ggccgggtgc gcctgtgtc gagcgcggg cctggccgg agagcggcag 31020
 gccccggccg ggggggtgt cgtcggtgg gatcagcggc acgaacgc acctgggtgt 31080
 ggaagccgcg cctcgccagg agggcgccgg ggcgcggagt gggccggccg cggccggacc 31140
 ggacaccggg tcggcccca cccggacgc cccagcggc cccgtccaga cctccggcgt 31200
 gatcccctgg cgctgtcg cccgtccgc cgacgactg cccgcgcagg cgcgaagct 31260

 ggccgcccac gtggggccgc acgacgacct ctgcggcgtc gacgtcggt ggtccctcg 31320
 gaccaccgc accgcgcacc cgcaccgcgc cgtgtcgac ggcggcacc cgcggcgct 31380
 gctgtcgcc gccgcgcgc tcggggccgg cgagggcagc caggccgtgc tcaccggcgt 31440
 cggccgtggg tcgggttcgg cgaagaccgt gttcggtgtc cccggccagg ggcgcgactg 31500
 ggcggcatg ggccgtgagc tgctgggtc ctgcgggtg ttgcggccgc ggctgcgcga 31560
 gtgcggccac gcgcgtggcc cgcacaccga ctggacacct ctggacgtgg tgccggccgc 31620
 ggaggccgcg cccgggttcg agcgggtcga cgtgtccag cccacctcg gggccgtat 31680

 ggtggcgctg gccgcgtgt ggctcggtc cgggggtggag cgcgtccggc tcgtcggtca 31740
 ctgcaggcgc gaggtggccg cgcggcttgt cggcgggtac ctggcgctgg gcgcacgcgc 31800
 ggcgcgtatc ggcggccgcgc cagggccat cgcgcaggag ctgaccggc gcggcggat 31860
 gctgtccgtc tcacactcg ccgagccgg cgcgcgtact cttggccgtt gggccggaa 31920
 gctgtggatc gggccgtca acagccccgc gtccgtctcg gtgtccggc acgcgcggc 31980
 gctggcgatc ttctgtcg tgcgtggccaa ggccggatc aaccgtggc ggctgcccgg 32040
 cgtggacttc gccggcact cgggcacgt cgcggcatc gaggcgcggc
 tgccgcgagga 32100
 gctggccgac gtacccgcgc cggccggcga agtgcctgg ctgtccaccg tggacggccg 32160
 gtgggtggag cgcaccaggc tggacgcgcga ctactggta cgcacactgc gcgcacgtgt 32220
 cccgttcgac gaggccgtcc gcgcgttgt ggacgcggg caccggcgt tcgtggaggt 32280
 ctccacgcac cgggtgtgtcgc caccgcgtat cggcgcggcgc ggcgcacgc ggcaggacgt 32340
 ggcggccgcgtt gttggggca cgcgtccggc cgcgcacgcgc ggcgcggacc ggttcgtgg 32400
 cgcgtccggc gaggtggccg cctcgccgtt ggcgggtggac tggccggccg tggtcgccg 32460
 gaccggggccg cgggtgtgg agctgcgcac gtacgcgttc
 cggcacgagc ggttctggct 32520
 caccgggtcc ggcggccgcgt tgcgcgcgtt gggcgtccgg caggccggc acccgctgt 32580
 gggcgccgtg gtacgcgtcc cggacaccgg cggcgtgtc ctgaccggc ggctgtcgct 32640
 gtccgcgcac cgggtgttgtt cgcaccacgc gctgtccggc gtccgcgtgc tgccggggac 32700
 ggcgcgttgtt gagctggccg tgcgcgcggc tgacgagacc ggcacgcggc tggtggccga 32760
 gctgtgtgtc ggcaggccgc tcgtgtgtc gcgcacccgg cgcgcacgc gtcaggtgt 32820
 ggtggcgag gaggccggcgc acggccggcgc gccggcgcgc gtgtactcgc gggccggcga 32880
 cgaccggccg tggaccgcgc acgcctcggt
 ctcgcgtcgcc cgggcacgagg acgcgcgcgc 32940
 gggagccggag ggcgcacgcgt ggcgcgcgc cggccggcgc ggcgtggacc tcggcggtt 33000
 ctacgcgcgc ctcgcgcgcac ggggtacga ctacggccgc gccttcggc gcctgggtcg 33060
 cggctgggtc agggccgcacg aggacgttcgc cggacgtccgg cgcgcgttgtc accagcacgg 33120
 cgcggccgcgc cgggtcgccgc tgcacccggc gctgtgtgcgc ggcgcgttgtc acgcgcgcgc 33180
 gctgtgtgcgc gggccacggc gggccacgcgc gctgcgttgtc acctggacccg gcgtgcggct 33240
 gcacgcgcgc gggccacgcgc cgcgttgtcgc ggcgtggag ggcacgcggc cggagccgtt 33300
 gtcgcgtcgcc ggcgcacgcgt

cggcgggcac gcccgtggc accgtcggt cgctgctgct 33360
 gcgcgcgcgc gacgcggacc ggctgcgggc gacagcggcg ggcacggcgg cagcggcggc 33420
 ggacgacggg ctgcacgcgc tggagtggac cccgcacccg ctgcggcagg agacgaccgg 33480
 ttccccccgc gtcctggaca ccaggcgctg ggagctcccc gagggcgctg ggcggccga 33540
 ggcgatcacc acgccccgtgc tcgcccagct ccaggccgag ctgcacggga cggcggaccct 33600
 ggtcggtgt acgcggggcg cggtggccgt gcatgacgac gccgaggta ccgaccggc 33660
 cggccggcgc gtgtgggggc tggtgcgcgc cgccgaggcc gaggaaaccgg aacgcgtcgc 33720
 cgtggtcgac
 gtcgacgacg ctcgcggacc cgcgtggc gccgcggcgc acgcggcgg 33780
 cgcagaaccg cagctcgccc tgcgcggcgg ggcggcgttc ggcggcggc tggtcgaggc 33840
 gtccggggcg ctggccgtgc cggacggccg gtggcgctc gacagcaccg gccggggcac 33900
 cctggagaac ctggcgtcg tgcccaaccc cgccggccgg ggcggcgtcg cgccggcgtca 33960
 ggtcggtatc gtgtcgccgg cggccggct gaacttccgg gacgtgtga tcgcgtcg 34020
 cgcctacgag tcggagatcg gcaccggagg cgcggccgtg gtgtggagg tcgcggcga 34080
 cgtcaccgcg gtggccgtgg ggcaccggcgt gatggcatg atccccggct cggtcgcc 34140

 gctggccgtg gccgacgccc gcacgggtt gcggtgccg cgccggctgg cggtcaccga 34200
 cgcggccggc gtggccgtcg ctggccgtac cgccctgtac gggctcgccg acctcgccg 34260
 cctggccggag ggcggacccg tgctggtgca cgcggccggc ggcggcgctg gcatggccg 34320
 cgtcagtcgc gcccggact tcggcgtcg cgtgtggc accgcgcacc cggccaagca 34380
 cggccgcgtg gacccggccg cggaccacct ggcctccagc cggaccctcg cttacgcgca 34440
 cgggttcggc gacgtcgacg tggtgtgaa ctccctggc ggcgagcacc tcgacgcctc 34500
 gctgcggctg ctgcgcgcgg cggccgggtt cgtggagatg ggccggccgg acctgcgcga
 34560
 cgccgacgag gtggcgccgc agcaccggc cgcgcctac ctccctggc acctcgccg 34620
 cgacgcggg cggaccggc tcggcgtact gctgggtggag ctgggtggcc tggtcgagtc 34680
 gggcgcgtc cggccgtcg cggaccggc caccggactg tgccgcgcg cggaggcg 34740
 cgggccatg agccaggccc gccacgtcg caagctcg ctaccggc cccgcgcgt 34800
 cgacgcgac ggcacggtcc tgatcaccgg cggcacggga accctcgccg cggctctggc 34860
 cggccacctg gtggacgcgc acggcgtccg gaacctgctg ctggtcagcc gcacggccc 34920
 caacgcgcg ggtgcggccg acctggtcgc ggagctggc gagcggggcg
 cgagggcc 34980
 ggtggccgcg tgacgttgg ccgagaaggc cgcgtcacc ggcgtctcg cctcgatccc 35040
 cacccggcgc cgcgtcaccg ggcgtcgca cgcggccggc ggcgtggacg acgggtgt 35100
 caccccccgt gacccggacc ggtcgccgc ggtgtcgcc cccaaaggccg acggccccc 35160
 gctgtcgac gggccaccg aggacgcgcg cctcgctcg ttccctgt gctgtcggt 35220
 ggcggccgtg ctggcaacg cggccggcggc gaactacgca gccgccaaca cttacctgg 35280
 cgcgtcgcc cggccgggtt cttccctggc ctgtcgctgg cctggggccg 35340
 gtggcgccg accacggccc taccggcaga cctggccgc
 cccggccgtc gccgcgaccc 35400
 ggtgcgcgcg atggacaccg cttccgcgt ggcgtcgctc gacgcgcgc tccgcaccgg 35460
 acgctcgacg gtcgtcgccg cggactcgta cgtcacggcg gccaccggc cgaacccgg 35520
 gctgcgcgcg ctggccggc cggccggccg cgcgtggcc acgtccgcg gggacgagcg 35580
 cggcgccgtg gggccgtgg cggggctggc cgaggccgac cggccgggt tctgtgtgg 35640
 cttccgtcgcc tgcacgcgc cggactcgat gggccgtggc ggcaggagg cggccgtcg 35700
 cgacgcgcgc ttccctggc cggccgtccg cttccctggc ggcgtggagc tgcccaaccc 35760
 gctgcgcgcg cggccggcc ttcggctcgcc
 ctccacgtcg gtgttcgacc acggccacccc 35820
 gaccgcgtg gccgcgcacc tgcgcgcgc gctgaccggc gacgactcg cgcaggccgc 35880
 ggcgtcgcc gccacggccg gggccggca cgcacggcc gttggatcg tgcgtcgcc 35940
 ctgcgcgtc cccggccggc cggactcgcc ggaggccgt tggtcgatcg tggagccgg 36000
 caggacgcgc ataccggcgtt cccggccgcg cggggctgg gacccggagg cgcgtcgcc 36060
 cggccggccg gaccggccgg gcaagagcta cgtgcgcgc ggcgggttcc tgccgcacgc 36120
 ggcggccgtt gacccggact tttccctggc gaggccgtgg ccaccggacc 36180
 gcacgcgcgc ctgtcgcc
 agacccctcg ggagctgttc gacgcgcggc gcatgcaccc 36240
 gacccctcg cggccgcgtc acgtcgccgt gttcgccggc gtgtcaacc aggactacgg 36300

cgtgcacagc ggcacgaccc cggccgagct ggaggggtac gtatgaccg gtcgaccac 36360
 cagcatcgcc tccggccggg tggcttacct gtcgggtctg accggggccg ccgtcaccgt 36420
 ggacaccgcg tgctctcg tgcgttgcgatccctg gcccgcagg cgctgcgtc 36480
 gggcagtgc tcgatggcga tcgccccggc cgccgacggta tcgagggc 36540
 cgttcgttc tccggcage cgccgcggc cccgacggg cgctgcaagg cggtcgccga 36600
 cggcggac
 ggcattggcg tgcggaggg cgtcgccctg gtgtcgctgg agcggcttc 36660
 ggacgcgcg cacaacggc acccggtct ggcggctgt cgccgcacgg ccctgaacca 36720
 ggacggcg tccaacggc tggccgcga acggggccg gcccgcagg ggggtatcg 36780
 gcaggcgctg gccaacgcgg ggctgtcccc cgacgaggta gacgcggctg acgcgcacgg 36840
 caccggcacc gcactcgccg acccgatcgaa ggcgcaggcg ctgtcgccca cctacggcg 36900
 ggaccggac ccggccggc cgctgtggct ggggtcggtg aagtcaaca tcgggcacac 36960
 ccaggcggcg ggggcatacg cgacgtgtca agatgtg ctggcgatgc agcggggcgt 37020

 gctgcccg accctgcacg ccgacacccc gacgacgaag gtgcacttgtt cctcgccgc 37080
 ggtggcgctg ctgtcgccgg cgccggctgt ggcggagacc gggaggccgc gccgggggg 37140
 cgttcctcg ttggatct ccggcacca cgccgcacgtc ctgtggagc aggccccca 37200
 ggacgcgcg cccacgcgg tggcccgccg gggccgggg ctgtcgccgg cggtggctg 37260
 gccgggttcc gggcgcacgc ccggcgctg gcccgcagg gcccgcagg tcggacgca 37320
 cctggcgccg ggcaggccg gaccgcggc cgtggctgg tcgttgccg gcacgcggac 37380
 ggcgttcgca cagggccgg tctgtggcgcg ccggacggcg gaggccgcgt gtgacggct
 37440
 ggcggcgctg gccaaggcc gctgtccgc gctgtgcacg accgggtgagg ccgggtcg 37500
 cggcgctg gtgttcgtgt tcccgccca agggcgccag tggatcgca tggcgccga 37560
 gctgatcgac gctgtcgccg tattcgccga cggttgcgc gagtgcgcgg aggccgtgg 37620
 accgttcgtg gacttcgacc tgatcgaggta gtcgcggc cgcgggtcgc tggagcggt 37680
 cgacgtgtt cagcccgct cgtggcggt gatgggtcgc ctggcagcgc tctggcggtc 37740
 gctggcgctg gaaccggac ccgttgcgg gcactcgac ggcgagatcg ccggccggc 37800
 gtcagccgg ggcgtcagcc tggccgacgc cgccgcgt gtcgcgttgc
 gcagcaaggc 37860
 gatgcggccag gacctggccg ggctcgccgg catgtgtcc gtgccttcgc ccggccgacga 37920
 cgtcgacccg agcgggtatc ccggacgcgt gtgggtcgcc gcccacaacg gcccaccc 37980
 gaccgtggc gccgggtacg tggacgcgt gcccgcgc tccgcgcact acgaggccgc 38040
 cgagggtccgg gcccggatca tcccgctca ctacgcgcac cacaccggc acgtcgacac 38100
 catccgcgac cggtcgccg aggactggc gcacgtcgcc ccggaggccg gcacgtccc 38160
 gtggctgtcg accgcgaccc gcgagtggac caccggtag gacgcggacg ccgactactg 38220
 gttccgcaac ctgcggccg cgggtggctt ccacaccgc
 atcaccaccc tgcggagca 38280
 gggccacccg gtgttcgtgg aagtctcccg ccacccgtc ctaccacccg ccatcgaggc 38340
 cacgtcgaa ggaacccggac ccacccgtt caccggaaacc ctccgcgcg acgacggccg 38400
 ccccgaccgc ctcttcacca ctgcgcaccc cctgcacgtc cgccgcgtcc acgtcgactg 38460
 ggacgcggc tacggggca gcccgcgcac ccgcacgcgt ctccgcact acggttcca 38520
 gcacgacgcg tactggctca ccggccggc cgcgcgcgcg gcccgcgg acgcggctt 38580
 ctggacgcgc gtggacagcg ggcacgtggc cgccgtcgcc gggccctgg ggcgtcgagcc 38640
 ccggccctg gageccgtc tgccgggctt
 gacgagctgg cggccgcacccgacgg 38700
 cgcggccgtg gacgactgtt cttaccggat cggctggag cgggtggacg tgccggccgc 38760
 cccgctgtcc gggacgtggc tggctgtggt gcccggaggca ctgcgcacg acacccgtt 38820
 ccccgagggtc gcccggccgc tggccgcgcg cggccgcacgc cggaggatcg tggccgggg 38880
 cccggacccgt gcccggacc tgggtgacga gcccggagggt gtcgtgtcgc tgcgtggctg 38940
 ggacgacgcg cccggccggg gcccgcacgt ctgcgcgcgc gtcgtggacg cggccggct 39000
 ggtgcgggg gcccggccgc gcccgcgtc gggccctgg tggccgcacca cgctcgccgc 39060
 ggtcgccgtc gcccggccgc
 gcgaggtgac gcccggatcc gggccgcaccc 39120
 gggcgctgtc ctggccctgg acctgcggca caccgtgggtt ggcctggctg acctgcggcc 39180
 gcccggccgc ggggtcgccgc tggacccgt gtcgtggccg gcccgcacgc 39240
 ggaccagctg gcccggccgc cggccgggtt gttcgcgcgg cgcacgtaccc gacccgggt 39300

cgcgtcgccg cccgcgtggc gaccgcggg gacggtgctg gtcacccggc gcaccggcg 39360
 cctcgccggc tacgtcgccc ggtggccggc ggagcggggc gcgccggacg tggtgctgct 39420
 ctcgcggcc gccccggacg cgccggccgc ggacgccctg gtgcggacca tcacggccgc 39480
 gggcgcccc
 tgccgtgc tggctgcga cgtcaccgac cgggacgcgc tggccgagg 39540
 ggtcgcaac ctgcggacg ggccgctgc ggtggtcac gccgcccggc tggccgacc 39600
 gggacggccg ctggggaga ccacgcggc ggagttcgcc gccatcgcc gggcaaggt 39660
 cgcggccgc cgcctgctgg acgagctgt gggcggccgg gagctgacg cttcgtgt 39720
 gttctctcc ggccggccgg cctggggcag cggccggcag gcccggtaag cggccggcaa 39780
 cgcctctg gacgggctcg cgcagcgcag ggcgcggccga gggctcgccg ccacctcggt 39840
 ggcctggggc gcgtggggcgc gcgtcgac ggtcgacgag gtgtggcgc agcagtggcg 39900

 ggcgcgggg ctgtcacca tggacccgcg ctcggccacc ctcgcctcg cgcacgcgt 39960
 gggctgggc gaggcgcacc tgctcgccg ggacgtcgac tggcccgct tcgccccgc 40020
 ctacgcgtc gccaggccgcg cccgcgtct ggcggcgtc cccgaggtcg cgcacgcgt 40080
 ggcgtcggt gacgcggcccg cgcacgcggg gggatcgcc gccggctgg cggccgtgcc 40140
 gcccggcag caggagcggc tgctcacca gctgggtcag gccggaggcgg cggccgtgt 40200
 gggctgggc ggcatacccg ggcacgggc gttccggag gtccggtaactcgctac 40260
 ggcgtggag ctgcgaacc ggctcgccgc ggccacgggt ctacccctgc cgcgacgt
 40320
 ggtttcgac cacccgcgcg cagacgcctt ggccgcac ctcgggtccg cgctggggcc 40380
 ggccgcgcg cgggtggact cgggtggccg cgtgtggcc gagctggacc ggctggaggc 40440
 ggcacatcccg ggcgtcgctg cggccggat cggccggctt cggctggacc tgccgtcg 40500
 gcggttgagc gcccgcgtcg gcgagctgtt cgcgcgaac ggcgaggcgg cgaacggcg 40560
 ggcgcgaac ggccggccgcg cggccggccga ctagctggac gacgcggggg cggaggacgt 40620
 gctcggttc atcgaccggg agttcgggga cgcgtgacg gccacacgag ccccgacccc 40680
 ggcggccacc gggcccccaca caacgacgac ctcggcgagg aacagatggc
 gaacgacgag 40740
 aggctctca gctaccctaa gcggtcacc ggcacacgc accgcacgcg ggacggcgt 40800
 cgcgaggcgg atccggggc ggacgagccg atcgcatcg tcggcatggc ctgcgcgttc 40860
 cccggccgcg tgcgcaccccg ggacgagctg tggagctgg tggcgtccgg cgcgacggc 40920
 atcgccctt tccggacga cggggctgg gacctggccg cgtgttcga cccggacccc 40980
 gaccccaccc gccgctcta cgtcaccag ggcgggttcc tggacgacgc ggcctgttc 41040
 gacgcccgt tttcggtat ctccggcgcg gaggcgctgg ccacccgaccc gcagcagcgg 41100
 gtgtcgctgg agacccgtg ggacacccg gacgaggccg
 gcatcgaccc gacccgcgt 41160
 tccggcagg acgtggcgt ttccacccgg gtcgcacacg gggactacgc gtcgaccgt 41220
 gaccgggtgc cgagggtctt cgagggtac ctggcatcg gggggccgg cagcatcgcc 41280
 tccggcgcg tctcgactc ctcgggtctg gagggtccgg cgtcacgtt ggacacccgc 41340
 tgctcgctg cgtgtcgccg atgcactgg gccggccacg cgtcgccggc gccggagtgc 41400
 tcgtcgccg tccggccgg cgtgtatggt atggcgcacgc cgggtgggtt ctcgggttc 41460
 tccggcgcg gccggctggc cgcgcacgg cgggtcaagt cttcgccga cggccggac 41520
 ggcacgtcg ggtcgaggg cgtgggtctg
 ctgtcgctgg acggcgtgc ggacgcgcgg 41580
 gccaacgggc acgggtctt tgccgtggc cgcgggtccg cgtcaacca ggacggggcg 41640
 tccaacgggc tcaccgcgc caacggccgc tcgcacgcg ggtgtatccg cgcggcgtc 41700
 gacgcggccg ggtcgccgc cgcggacgc gacgcggctgg aggcgcacgg caccgcacg 41760
 gtgtcgccg acccgatcg ggcgcaggcg ctgtgaaca ctcacggccg gcacccggac 41820
 ggggcgcacgc cgcgttaccc ggggtcggtc aagtccaaac tccggcacac ccaggccgc 41880
 gccggcgtgg cccgggtat caaggcggtg caggcgatgc gccacggcgt gtcggccccc 41940
 accctcaacg tcggcaccgc
 caccaccaag gtgcactgtt ctcggccgc ggtggagg 42000
 ctggcggagg cccggccgtg cgcggagacc gggcgtccgc gccgggtgg cgtgtcg 42060
 ttccggcgtga gggccacca cgcgcacgtt atccgtggac aggcacccga gcacgacca 42120
 ggcgcggagg acgggggtgg cgcggccgcg gtggccggc gccggccgc gccgtggacg 42180
 ctgtccggc gcacccgcgc cgcgcgtcc gaccaggccg ggcggctggc cggccacgt 42240
 acggccgacc tcggccggc ggcgtcggtt ccacccaccc ggcgcacgt 42300

gagcaccggg cggtggtggt cggctcgac gggctggcgg cgctggccga aggccgctcg 42360
 tccgcgtcg
 tgacgaccgg tgaggccggg gtcgacgggc gcgtggtgtt cgtgttcccc 42420
 gccaagggg cgcaatggat cggcatggc gcggagctga tcgacgcgtc gccgtattc 42480
 gcccggctgtc tgccgactgt cgccggaggcg ctggaaacct tcgtggactt cgacctgatc 42540
 gaggtgtgc gggacgcgg gtcgctggag cgggtcgacg tggtcgaccc cgcgtcgagg 42600
 gcggtatgg ttcgctggc acgcctctgg cggtcgtgg cggtggaaacc ggacggcgtt 42660
 gtcgggact cgcaggcgca gatcgccgcg gcggcggtca gcggggcgct cagctgccc 42720
 gaccccgag ccgtggtcgc gttgcgcage aaggcgatcg cccaggaccc ggccggcgtc 42780

 ggcgcatga tgcgtcgcc cctgcccgc gacgacgtcg acctgagcgg gtatccgg 42840
 cgcgtgtgg tcgcgcgcgca aacggcccc acctcgacg tggtgccgg tgacgtggac 42900
 ggcgtgcgc agctccacgc ccactacgag ggcgcgagg tccggcccg gatcatcccc 42960
 gtcgactacg ccagccacac cgggcacgtc gacaccatcc gcgagcggct cgccgaggca 43020
 ctggcgacg tgcggccgag ggcggccacg atccgtggc tgcgaccgc gacggcggag 43080
 tggaccaccg gtgaggacgc cgacgcccac tactggttcc gcaacctgct cggcgccgt 43140
 ggctccaca ccgcacatcac caccctcgcc gacgaggccc accgggtgtt cgtggaaagt 43200
 43200
 tccagccacc ccgtgctcac caccgcatac gaggccacgc tcgaaggaaac cggacccacc 43260
 ggcgtcaccg gaaccctccg ccgcgcacgc ggcggcccg accgcctcct caccgcctc 43320
 gccaccctgc acgtgcgcgg cgtccacgtc gactggaaagg cgtgttcgc cggcacggc 43380
 ggcgcgcgg tccgcgtcc gacctacgct ttccagcacg agcgctactg gctggaccgg 43440
 ggcgcggcg ccgggtacgt cacggcgccg ggcctggccg acgcggcgca cccgctgctg 43500
 gccgcgcgtc cccagctgcc cggcacccggc ggggtgtgc tgagcggcgg gttgtcgccg 43560
 ggcacgcacc cgtggctggc cgagcacgtg gtgaacggga cgcgcgtgtt
 gcccggcacc 43620
 gccctggtg agctggcgct ggcgcggcgg gacgagggtgg acgcgcggcgt gctgcgcgag 43680
 ctggtgatca cccggccgat gccgggtccgg gacgggggtt tccgtcacgt gcaggtggac 43740
 gtcgcgggtg cggcgacga cgggtcgccg gccgtgcgga tctggtcgcg cggcaggac 43800
 ggcgcgcggc agacggcccg ctggaccgag cacggccaccc gtcgcgtcc cccgcacgc 43860
 ggcgcgcgcg cccgcgcgcg gacggcgccg tggccgcggc agggcgccgc ggcgtggac 43920
 gtggacgact tctacgaccg ctcgcggcc ggcggctacg agtacggcc gctttccag 43980
 ggcctaccc cgcgtggcc cggggacggg caggcgtgg
 ccgaggtgtt gtcgcggcgt 44040
 gaggcggccg gtttcggcgc gcacccggcctc gtcgtggacg cggcgctgca cgtggccacg 44100
 ttctgcgtc cccggggcc ggggtcgccg acgtgcgtc cgttcgcgtg gacggcggt 44160
 cggctgcacg ccacccggcgc gacggcggtg cgggtgcacg cccgcgcac cggcgcacgc 44220
 ggcctcgcc tggagctgcg cgcgcggac gggaaacccg tcgtgacggc cgcgcgtcc 44280
 gtgcgtgcgc acgcgcaccc cggccacgcg caggccccc acgtcacggc ggacgcgtt 44340
 tggccgggtgc ggtgggtcga gcagccgccc ggcgcgcgg cgcggcgtc ggtgtcgctg 44400
 ggcggccgtc cggggacgcg cgggttcgc
 gcccgcgg ttttcggcgc ccctgcggcc 44460
 gtggcggcgc tggccggagg cgcggccccc gcggtggcgt tcgtggacac caccgcgtgt 44520
 cgggagccgg ggcgggacgt gcccggccg ggcggccgt tcgtggcgc ggcgtggag 44580
 ctgtgggtgg cttggctgcg cggacgcgcg ctggccggaa cccgacttgt gcttagtcacc 44640
 acgcgcgcgg tggcggtgcg cgcggacgcg gaggtcacccg acccgcgtc cgcggcggt 44700
 tgggtctgc cgcgtcgcc gcagtcggag caccggacc ggggtgtggc gctggacgtc 44760
 gacgagccgg ggcggccgcg ggcgcgcgtc gcctgcgcgg agccgcacgt ggcgtccgg 44820
 ggcggccgg gtttcgcgc
 ccggctcgcc agggccgagg cgcgcgcgg cgcgcgtccg 44880
 gtcgacggcc cgggtgtgtt caccggccgc accggcacgc tcggcgccgt cgtggccgg 44940
 cacctgtca cgcgcacgg cgcgcggaaac ctgcacccgg tgagcaggcg cggccggac 45000
 gcgtccggcg ctgcagaact ctcggacgcg ctgcgcggc tgggtggcga ggtcgagctg 45060
 tcggcgtgcg acgtggccga cgggtggcgc ctgcgcgcgg tgcgtggccg cgtgcgcggcc 45120
 gcccggcgttgc tgcacgcgcg ggcgcgcgtg gacgacggcc tgctcaccga cctgaccgc 45180
 gacgggttcg acgcgtgtt gcgcccaag gtcgacgcgg tcgcccaccc ggacgaccta 45240
 ctggggacgc

tgccgctgg t ggtttctcc tccgcgaccg gcacctcg caccggc 45300
 caggcgaact acgcccggc caacgcggtc gccgacggc tcgtgcagcg ccggccgcg 45360
 cggggctgc cggcgtgc gctggctgg ggccgtgtt cgacaccag cgagctgacc 45420
 ggcacatgg acgcggcga cgtggccgc acccgccgg ggggggtgtt cgccctggac 45480
 gccccggcgcg gcttggcgct gtcgacgcc ggcctggc cggacgacgc gctgtcg 45540
 ccgatccacc tggacaccgc cggcgtgc cggggggccg acccgctcc gccgtcg 45600
 cggccctgg tccggcgcgc cggcgcgcg cggccaggc cgccgtcg 45660

 ctggtggcgc gactggccgg ggtggacgcg gcccggcgc ggtggagctg 45720
 gtgcgcgcg aggccggcgc cgtcctcggg cacggcggc cggacggcat cggcaggac 45780
 cagccgttcc gggaggctgg gttcgactcg ctcacggccg tggagctgcg caaccggctc 45840
 ggcgcggcca cgggtctcgc gctggccgcg acgggtggt tcgaccaccc gacgtccgcg 45900
 cgggtcgccg agcacctgcg ggagctgtg ttggcgcgg agacggctca ggcccccgcg 45960
 cggccggagg tggtgccga cgacgacccg atgcggctgg tggcatggc ctggcggttc 46020
 cccggcgggg tcgcccacgc ggacggctgg tcgcccggagga ggcgcacggc
 46080
 atcgcccggt tccggacga cggggctgg gacctggcgg cgctgttcga cccggacccc 46140
 gaccacgcgg gacacgtcgta cgtcgccgaa ggcgggttcc tcgacggggc gacgggttc 46200
 gacgcgcgt tttcgccat ctccccggc gaggcgtgg ccatggaccc gcagcagcgg 46260
 ctgctgtgg aggtggcggt ggagacgttc gagcaggcgg gcatcaaccc ggcgtcg 46320
 cacggcaccg acaccgggtt gttcgccggc gtgatctacc acgactacgg cgaggcggc 46380
 ggcgagctgc cggaggcgcg gtagacctac cgcagcaccc gacgtccgg cagcgtgg 46440
 tccggcggcg tgcgtacgc gctggcgtt accggccgg cgctgaccat
 cgacacggcc 46500
 tgctcgctg cgtcggtggc gatccacccg ggcgcggcgg cgctgcggc gggcgagtgc 46560
 tcgatggcgc tggcgccgg ggtgacgggt atgtcgacgc cggcggtt cgtgagcttc 46620
 tcgcccgcgc gccggctggc cccggacggg cgggtcaagt cgttctcgga gggcgcggac 46680
 ggcacccgggt tcagcgaggg cgtcggtgt gggtcgctgg agcggctgtc ggacgcgcgg 46740
 gccaacgggc acgggtgtc tgggtgtt cgggtgtgg cggtaacca ggacggggcg 46800
 tccaacgggc tcacccgcgc caacggccgc tcgcagcagc gggtgatccg cgcggcgtc 46860
 gacgcggcgg gtttgggca cggcggacgtg gacgcgggtgg
 aggccgcacgg cacgggcacc 46920
 accctcggtt acccgatcgaa ggcgcaggcc gtgcgcgcac cctacggca ggaccgcgag 46980
 cagccgtgt ggctggcac getcaagtcc aacctcgcc acacccaggc ggcgcgggc 47040
 atcgccacgc tgatcaagat gatccaggcg atgcggcacg gctgtcgcc ggcacccctg 47100
 cacgtcaccg acccgaccac ggccgtggac tggggcggc ggcgggttga gctgtcgacg 47160
 cggcgcgggg agtggccgg aaccgggggtt cccgcgggg cgggggtgtc gtcgttccgg 47220
 gtgagcgca cgaacgcgc cgtatcccg gacgcggccc cggtaaccgg ggcgggttgg 47280
 ggcgcgggg aggccgggtt gtcgtcggtt
 gtgcgtcgcc cccgcacgcg cggaggcgtt 47340
 cgggagcagg cggaccgggtt cgtggcgcac ctggcggtt agtcgttccgc ggcggccgtt 47400
 gccccgtcg tgggtcggtt tcggcgccgc ctggaggagc gggccgtgtt cgtggcgac 47460
 cggcgcgcg cggggggaggc gttcgccggc ctggccagg ggcggccctc ccccgccctc 47520
 gtcacccgggc ggacccgggtt cggggggcgc gtgggtttcg tgggtccgg tcaggcg 47580
 cagtgggtcg gcatggggcg tgcgtcgac gacgcgtcgcc cgggttgcgc gaaacgcgtt 47640
 cgcgagtcg cggggccctt ggcggccgtac accgactggg acctggtcga ggtgatcacc 47700
 tgggtggcg cgtggacgt
 cgtggacgtc gtgcagcccg cgtcggtggc ggtgatgggt 47760
 tccctcgccg cgtcggtggc ctcgcgtggc gtgcacccgg acgcgggtat cgggcactcg 47820
 cagggcgaga tcgcgcgcgc gaccgtcgac ggctggctca gcctccaggc cggcgcgaag 47880
 atcgctcgcc tgcgcacca gctgatcgac gaggagctga cggggttgg cggcatgatg 47940
 tccgtcgccc tggccgcgc gacatcgac ctggcggtt acggggccg gttgtgggtc 48000
 ggcacggta acggggcgcg cggcggccgtac gtgcggggg acaccggggc actggaggag 48060
 ctggcgccgc gctgcccgcgc ggcgggttgc acgcgggtga tcccggttgc ctacgcacgc 48120
 cacaccgggc
 acgtcgacgc catccgcac cagctcgccc ggatgtcgcc cgacgtcacc 48180
 cccggcccg cggagatccc gtggctgtcc acggtgaccg gcgagtggat caccggcgc 48240

gacgacgacg ccgactactg gttccacaac ctccgccca cgtccactt cgccgacggg 48300
 atcaccaccc tgcgtcgacgc cgggcacccgg gtgttcgtgg aggtctctc gcaccccgtg 48360
 ctggcggcgg cgtgcagga gagcgcgcag gcggccgggg acgcgcgggt cgccgtgacc 48420
 ggcacgcgtc gccgcgcacga cggcggctgg gaccgggtcc tgaccggcct ggccgagctg 48480
 cacgtgcgcg gctggacgt ggactggacg cgggtgctgc cggaggcggg gccccggcc 48540

 ctgcccacgt acgcgttcca gcacgagcgc tactggccgg aaccgcgcg cccggccccc 48600
 ggcgcggcgt gtggtgacga cgcgcgtgg gcgggtatcg aggtgtgtga cgcgcggac 48660
 ctggccgggg agctggccgt ggacgaggac gagctggcgc ggtgtctgacc cgcctgacc 48720
 tcctggcgc ggcgcagcgc ggcaaggagc ggcgcgtacgc gctggcgtta cgggtcgac 48780
 tgggtccccc tccccacagc cgggtctggg ctgcccggc ggcaaggcgt gtccggcggg 48840
 caggcgtgt cggcggggcc gaggtctgtcc ggccggggcag ggctctccgg cggtcagggg 48900
 acgcgcaggcg ggtccggcgt gcccggcggaa gcggcactgc caggcggggcc aggtcgcccc
 48960
 ggcggagcgg cgctgcccgg cgggtggcc gtgggtgtc cgcgaacga cgagcggggc 49020
 cggcgggtcg cggcgggtcg ggtcgccgg ggtgtggacg tgaccgtcgt ggcggcggtc 49080
 gacgccaccc ggcacgggtc ggcgaaggcgc ctgcgcgacc gccccgacgc cgtgtgtcg 49140
 ctgcgtctt gggacgcggg ggcgcacagc cgggcgcgc cgggttcggc cacggccgc 49200
 ctggtgacgg cctggccga cccgggtgc accggggccgc tgggtgcgc gaccggggc 49260
 gcggtgacgc tcgcggcga ggacgcgcac cccgaccagg cccgcgtgt ggggttggc 49320
 ggggtgtgg cctggaccc gccggaggcg ttccggcggac tggtcgacct
 gcccggcgc 49380
 cccacccgacg cgcacccgtcg cgcgttcgcg gccgcgtga cccgcggcgg cggcggaggac 49440
 cagctcgccg tgcgcgcacgg cgcgcgtcg gcccgcgcg tggtccgcga cggggccgac 49500
 ggcgcggagt ggacgcgcgc cggcgcgggtc ctggtcaccg gcggcaccgg cggcctcgcc 49560
 acgcacgtgg cccgcgtcg cgcgcgtcc ggggcgggc acgtcgctgc cgcgcgcgc 49620
 tccggccccc cgcgcgcgcgg ctcggcgcgcg aggtggaggc gctggcgcgc 49680
 cggtcagcg tggtgccct ggacgtggcc gaccgggacg cggcgtccgc cgtgtcgcc 49740
 gacgtcgacg gggacggggc gtcgaccgc gttggcgtac
 cggcggcgc gggactggcc 49800
 cgcacgcgg tggtgagct gaccgcggg cggtaacgcgg acgtcgccgc cggcaaggc 49860
 gagggcgcgc ggtgtctggc gaggtgtcg cgcgcacgg cgcgtggacgc gttcgctcg 49920
 ttctccctcg ggcgcggcgt gtggggcagc ggcggcagg cccgtacgc ggcggccaac 49980
 gcgttcctgg acggcgtccgc cgcgcgcagg cggcgcgcgc ggctcggtc cacctcggt 50040
 gcgtggggcgc gctggggcgg cggcctcgac atgatcgacg acgggacgc ggagcgggt 50100
 gccggctgg gcatccgcac gatggacccg gaggcggcgc tgccggcat ggcgtggc 50160
 gtcgctccg ggcggccgc gacgtgtgt
 gccgacgtcg actggccccc gttcgccccc 50220
 ggctacccc tggcgggaa ggcgcgcgtc ctgcgcggc tgccggaggt ggtggcgtc 50280
 ctggccgaac cggacgcgc cgcgcggcgt gtggacgcgc gggcgcgcgt ggcggccgg 50340
 ctgaccgggc tggacgcgcgc cggcaggac gagctgcgtcg cggacccgtt ggcggcgcac 50400
 ggcgcggcgg tgcgtgggtt cgcgcaccc ggcgcgtcg cggcggaccg ggcgttcaag 50460
 gacggcgggt tgcactcggt gaccgcgtg gagctcgacg accggctggg cgcgcacc 50520
 gggctcgccg tggccgcac cgtgtgttc gaccacccga aaccctggc tctggcgcgc 50580
 gtgcgtcgac cggagctgtt
 ccccccacggc gggacggggg tgacggcggc gcagggtggc 50640
 caccgggagg acgcgtccg cgggtgtcg gcgtcggtc cgcgtggccgg gttcgaggag 50700
 ctggcgtgc tggcgcgcgt cgtggaccc tcgtggccgc cgcacccgc gggcggcgc 50760
 gcgcacgcgg acggggacga cctggcggac ctggcggagc tgacccgtt cgcgtcggtc 50820
 cgcaggcgc tgcgcgcac caccgcggg aacgacttag gcttgcgtgc ggagcggaga 50880
 gagcatgagc gggggcacct cgcggagag cgtcgccag cccctgcgcg ccacgcgtt 50940
 ggacaacgac cggcgtcgcc gggagaacga cggcgtggc cccggaggccg gtggccgg 51000
 ggcgtcgac
 tcgatggcgt gccggctgcc cggcggcgtc accgacccgg agtcgtgt 51060
 ggagctgggt cgcgaggggcc gggacgcac cggcgcgtc cgcacccggc ggggtggaa 51120
 cctggggcgtc ctgttcgacg acgacccggc cgcggcggc tcctcgatcg tgcggggagg 51180
 cgggttccgt ggcggccgg ggggttcga cgcgcgtc ttcggcatct cccgcgcga 51240

ggccctggcc atggacccgc agcagcggct gctgctggag gtggcgtgg aggccgtgga	51300
gcggccggg ctcgacccgc gtcgctgga gggccggac gtcgcggtgt tcgcggccgg	51360
caaccgcag ggctacggcg cgccgaccgg tgacgccccg gagggcctgg aggggttccct	51420
ggcgtaaac gcctcgctgt cggtgatctc cggcgccgtc tcc tacaccc tggcctgac	51480
cggcccgcc gtcaccgtgg acacggcgtg ctcgtcgctg ctggcgtga tccacctggc	51540
ggtgcgtcg ctgcgtcg gggagtgtc gatggcgtc gccggccggg tgaccgtgat	51600
ggggcagccg accgcgttcg tggagttctc gccgcagccg gggctccccc cggacggcg	51660
gtcaagtcg ttggcgacg gccgcggacgg cacgtcggtt gccgaggccg tcggcgtgt	51720
gctgtggag cggtctcg accgcgcggcg cgacggcac gaggtgtgg cggtgatccc	51780
cggctcgccg gtgaaccagg acggggcgctc caatggcctg accgcgccga acggcccg	
51840	
ccaggagcgg gtatcgccg cggccctggc cgacggcgtt ctggcctgg ccgacgtgga	51900
cctgtggag ggcacggca cggcaccagg gctggcgac ccgatcgagg cgcggcgct	51960
gctcaacacc tacggccggg gcaggccgca ggaccggccg ctgtggctgg ggtcggtgaa	52020
gtcaacacc gggcacgccc agtcggcgtc ggggtggcg ggcgtatca aggtgggtca	52080
ggcgtatccgg cacggcctga tgccgcgcac gtcgcaccc gacgagccga gctcgaaact	52140
ggactggcg gccccccgg tggagctgtt ggccgcgag cggagatggc cggagaccgg	52200
gccccccgg cggggccgg tgcgtcggtt cgggggtggc ggcacgaac	
cgcacgtgat 52260	
cgtggagcgg gcccggagg aggccgccc cggggtcgag gcccggggc ggcccgcc	52320
caggctcgccg gccggccagg acggccggat cgcggcggtt accggccagg cgcggcc	52380
cgcggccccc gccaccggccg aaccggccgc gtcggccgtc gaggacggga cggcgtcg	52440
ccccggcccg gtccgcaccc gccccggcgtt gccgtggcg ctgtccggc ggaccggcc	52500
cgcgtggcc gccaggccgg cccgggtcg cgcgcaccc cgcgcgcacc cggccggcc	52560
cccggtggac gtggcctgtt cgctggccac gaccgcgtt gtcgtggagc accggccgt	52620
cgtccccggc gcctcgctcg acgaggccct ggcgggggtt	
gacgcgtcg cctcgccgg 52680	
cgcggacccg tcgggtgtcg tcggcgaggc ggcgcggc cgggtggcgg tgctgtcac	52740
cggcaggggc agtcagcgcc cgggtcgccg ggcgcggctg cggagccgtt tcccggttt	52800
cgcgcggccg ttgcacgcgc cgtgcgcgc cgtggcgag ctgcaccgc ggcacggccg	52860
cgcgatcggtt ctcgcgcagg tggcgctggc cgacccggc acgcccggc cgcgcgtct	52920
cgaccggacc ggttcaccc agccgcctt gttcgctgtc gaggtcgccg tggccggct	52980
gttcacgtcg tggggcggtc gccccggcc gctggccggg cactcggtcg gcgagatcg	53040
cgcgcgcac gtggccgggg tgctctccct	
cgccgacgcc gccgcgtgg tgccgcggc 53100	
ggggggctg atcgaggac tgcccggagg cggcgcgtat gtcggcgtgg aggccggca	53160
ggacgaggcc gtcgcgttc tcggggacgg ggtgtcgctg gccgcgtca acggccgcac	53220
ctcggttgtt ctcccgccg acgaggaggc cgtcaccggc gtcgcgcga ggctggcgca	53280
ggggggcagg cgcaccaaga ggctcgccgt ctgcacccccc ttcactcgcc accgcgtgaa	53340
cccgccgtcg gccgcctcc gccgcgtggc cgaggacgtc gectaccccg cccccacgat	53400
cccgatcgcc tccaccctca cggccgcacc cgtcaccccc gacgagctgc gtcgcgcga	53460
ctactgggtg cggcacgcgc	
cgccgcgcgtt ccgggttcgt gacgcgtgc gggcgtgg 53520	
ggacgcgggc ggcgcacgt tcctggagct gggccggag ggcgtgtca cggccggccgg	53580
cgcgcactgc ctgcggacg cgggttcgtc ggcgcacgt cgcgcgcacg tgcccgaggc	53640
ggggccgtg ctgcggggcc gCACGTGCAGC ggcgcacag tcgactgggg	53700
ttcgctgttc acgggcggc acgcgcggc cgtcccgctg cccacccatcg cggtccagca	53760
cgaggaccac tgggtgtgc gccgcgtccac cggccgcac gtcggcgtgg tcggcctgc	53820
cgaggccggg caccgcgtc tggcgccgtt cgtcgctg cggagagcg gccccggcgtca	53880
gctgagccgt	
cgggtgtcg tggggcgca gccgtggctg ggcgcgttgc acgttcctccgg 53940	
cacggcgctg gtgcggccg cggcgctgtt ggagctggcg gtgcggccgg ggcacgcac	54000
cggcgcacccg gtcgtggagg agtcgtgtat cggccgcacc atgcgcgtc cggacggccg	54060
cgcgcgtgc gtcgcggcc ggcgcgttgc ggcgcgttgc gggccgggtt cgggtgcgt	54120
gtactccgc gggacgggg cgggtggactg ggtcgaccc gccgcggggg cgctgaccgc	54180
gccggaggcc ggcgcgcaccg cggacgcggg cccgtggccg cggagacgc cggagaac	54240

ggacacgcgg ggttctacg acaccctcgccggc taccctacg gcccgtgtt 54300
 cggggcctg acctcggtcg ggcgcggcga gggcgaggcg tggcgagg tggcgctgcc 54360
 cggtgacgcg accgggtcg gatccaccc gcccgtc gacgcgcgc tgacacccgc 54420
 gcacttcgc ctggccaccc ggaccgagcg cgccgcggg ctgtgtccgt tcgcctggac 54480
 cggcggtcg gtcacgcgg cgccgcgcac gaccgcggg gtgcacgcgc ggcgcacccgg 54540
 cgacgcgcgt gcgtgtcg cgggtccgt cagccgtcg cggacgtggc 54600
 cgcctgacc ttccgcggc cagccgacac cccgtccgg gagggtccgg acgcgtgtg 54660
 ggcgtggag tggaccgagc acccgctgca cgcggacggg accacccccc cggcgaccc 54720
 caccacggcc gtgggtgtcg tggacacccg gagcgtcgac gccccgacg acggccccgc 54780
 ccgcgcgcgc gcgtgaccc cccacgtct cgccgagctg cagccgcacg ccgacgacga 54840
 ccggccggcgtc gtcgtgtca ctcaggcgc ggtcgccgt cgcgtcgacg gcgaggtcac 54900
 cgaccgcgcg tccaccgcgg tgggggtgt ggtgcggcc ggcgaggtcg agcagccgaa 54960
 ccgggtccgg ctggtcgacg tcgagccggg ggccgacccg gtgtcaccc cgcggcggc 55020
 gcagggtggcg ctgcggcgca cgtgcggcagg ctggtcgcgc cccggcgcgc 55080
 cctccggcg cgcacccgcga cgtcggtcg gctggctcc gaccggcc 55140
 gcacgttgc 55140
 ctccctcgcc ctgtcccg acgactccgg cacggcccg ctgcggcccg gcgagggtcg 55200
 gatcgccgtc cgcgcggcg gcctgaactt ccgcgacgtg ctggcgccg tggggatgt 55260
 cccggcgtc gcgggtatcg ggcggaggg cgccgggtgt gtcgtggagg tcggcccccgg 55320
 cccgcacac accgacgcgc ggcacacccg cccggcgcac accggctcgg gcggcctggc 55380
 cgtggcgac cgggtatgg gcctgttccc cggcgcgttc ggcggcttgg ccgtggccga 55440
 ccaccgaatg gtgacccggta tggcggacgg ctggcggttc accacccggc cggcgtgcc 55500
 catcggttc ctgaccggcc tctacggct ggcgcaccc
 ggcggcgtca cgcggccgca 55560
 gaccgtgtcg gtgcacgcgg cggcggcg ggtcgcatg gcccgtgc agctcgccg 55620
 ggcgttccgc gtcgggtgc tggcaccgc gcacccggc aagcacgcgg ccgtgacccg 55680
 cctggcgcc cccgagttcc acctgttcc cagccgcac accgcctacg ccgaccttt 55740
 cggccgggtg gacgtgtgc tgaactcgct caccggcgacg cactgtggagg cctcgctgg 55800
 gtcgtcgcc gcggccggcc gtttcttggatggcaag accgacttcg cgcacgcgc 55860
 cgaggcgca aaggcgacc cggcgtcgc ctaccggcc ttcgacactgg cggcggaggc 55920
 gcccggcag cgcgtcgcc agctgtggc
 cgagctggcgcgctg aggccggccg 55980
 catccacccg ctggccaccc cggcctggatgcacccgc ggcggagg cggtcgctg 56040
 gatgagccgg cccggcgcacg tggcaagat cgtgtcgatcc ctcccccggc gccccgaccc 56100
 gacggcgcacg gtgtgtca cggcggcgc cggcgtcgc ggcgtcgcc cggccggca 56160
 cctggtacc cgcacggag cccgcaccc gtcgtcgcc tccgcacgcg cgcacggc 56220
 cccggcgcgc gggagctga cgcacggctg ggcggcgcacg tgcgggtcg 56280
 ggcgtcgac gtcggcgacc gggacgcgc cggcgtcgc ctgcacca tcccccggc 56340
 gcaccggcgtc accggcgtcg
 tgcacacggc gggcggtctc gacgcacggc tgctcgccgc 56400
 gcagaccccg gaggcctgg acgcgggtt ccgcggccaa gtcgacgcgc tcgcgaacct 56460
 gcacgagctg accggcgacc cggccgtt cgcgggttac tcctcgccct cggcgtgt 56520
 cggccggcgc gggcagacca actacgcgc cgcacgcgc tggctcgacg gcctcgccca 56580
 cgtccggcgc gggcgccgc tggccgcac ctgcgtggcc tggccgtgt gggcgagg 56640
 cggccggcatg acggccggcc tggccggcg accggccggg cggccggcc gggccggcc 56700
 gggagccgtc ggcgcgtgtt ccaccacca gggcatggc ctgtcgacg cggcgtcg 56760
 gtcggccgc
 cccgatcg gtcgaccc cgcgcgtca cgcggacgg 56820
 cgcgcaccc cccgcgtc tgcggccctt gggccccc accgcgcac cgcgcgtcg 56880
 ggcacccacc gacgcggcc tgcggccag gtcgcgcgc ctgcacggcc cggcaggca 56940
 cggcgtcgtc gtggagctgg tgcgggagca ggcgcgcgc gtgtgggt tcgcaccc 57000
 gacgcgcgtc tgcggccggcc gggcggttccg ggacctggc ttcgacttcg tgacggccgt 57060
 gagctcgcc aaccgcctt cggccgcac cggcgtccca ctggcccca ccaccgttt 57120
 gacccacccg accccgtgg acgcggcgcc caccgtcgc gacgcgtgg cggtcgcccc 57180

cgcgcccgcc ccggccaccc cggtcgtac ggcgcgcgg gacgacgacc cgatcgccgt 57240
 cgtcgccatg ggctgcccgc tgccccggc cgtgtctcc cggaggacc tgtgcggct 57300
 gctcgacggc ggcgtcgacg ccatcgccc gttccggac gaccgggct gggacctgg 57360
 gtcgtgttc gacgacgacc cgaacgcgtt cggcaagtcc tacgtgcgcg agggcgggt 57420
 cctggcgggc gccccgggt tcgacgcgc gttctcgcc atctcccccc gcgaggcgct 57480
 cggcatggac ccgacgcgc ggctgttgtt ggaggtggcc tggagaccg tcgagcggc 57540
 cggatcgac ccgacctcg tgcgcggcgc ggacgtcgcc gtgtcgccg gggcggcgc
 57600
 gcagaactac ggcacggcc ccggccgggt gcccggggc ctggagggtt acctggcg 57660
 gggccggcgc acgacgtgg tgtccggcc cgtctctac acgctcgcc tcaccggcc 57720
 cgcgtcgacg atcgacaccc cgtgtccctc gtcgctggc gcatccacc tggcggtgc 57780
 gtcgtcgcc tcggcgagt gtcgtatggc cctggcggtt ggggtgcgc tgcgtggcg 57840
 gcccggcgc ttctggagt tctccggca ggcgggcgc gccccggacg ggcggtgcaa 57900
 gtcgttcggc gccccggcgg acggcacgac gtggccgag ggccgggac tgggtgtct 57960
 ggacgggtt tcggcgccg gggcgccgg gcacgagggt ctggcggtgc
 tgcgcgggtc 58020
 ggcgtcaac caggacgggg cgtccaaacgg cctgaccgcg cgaacggcc cgtcgagg 58080
 cgcgggtatc cggccggccc tggccgacgc gggatcacc cggacgcgg tggacgcgt 58140
 ggaggcgac ggcacccggca ccacccctgg tgacccgatc gaggcgccagg ccgtgtggc 58200
 gacccacggg caggacccgcg agcagccgtt gtggctgggg tgcgtgaagt cgaacatcg 58260
 gcacgcgcac gccccggcgc gctgtcgccg cgtgtatcaag tccgtgtctt cgctggccg 58320
 gggcggtctt ccccgctcc tgcacgcac caccggcacc ccgcaggatcg actgtctc 58380
 gggggcggtt gagctgtgg cgcggcgccg ggagtggccg
 gagacccggc gtccggcgc 58440
 gatcggtgttcc tccgttccg ggggtgagccg caccaacgcg cacgtggtcc tggagcagg 58500
 ccccgagccg gaacccggcgc gggaggccga accccgcggg gagtccgc caggccgg 58560
 gtccgttccg ccgtgtatcc gggccacccgc gtggctgtt tccggccgtt ccccgaggc 58620
 gctggcgac caggccggcc ggcgtggta cggccgtcccc gccgagtggc gggctccga 58680
 cgtggctgg tgcgtggcca ccacgcggc cccgtggag cagcgccgg tggctgtgg 58740
 gcgacacc ggcgcgggc tgcgcggcc gtcgcgttgc gccgcggac gccccgaccc 58800
 gcacgtgttc accggaccc cgcacgtgg
 cggcaggacc gccttcgtt tcccgccca 58860
 gggcgccag tggcgccga tggggcgga actccgttgc gcctcgccg tggtcgccga 58920
 acgcctgcgc gagtgcgcgg cggccctgcg cccgtatacc gactggacc tggtcgagg 58980
 gatcaccccg ggtggcgccg tggaggacgt ggacgtgtt cagccacca gctggcgat 59040
 catgggtcg ctggcgccg tgcgtggcc tgcgtggcc caccggacg cggtgtatcg 59100
 gcacttcgcg ggcgagatcg ccgcgcac cgtcgccggc tggtcagcc tccaggacgg 59160
 cgcgaagatc gtcgcgttc gcagccagatc gatcgacgag cacgtaccc ggctcgccg 59220
 catgtatgtcc gtcgccttc
 ccggccgagga catcgacccg acggctacc agggccgg 59280
 gtgggtggcc gcccacaacg gcccacccgc gaccgtggc gccggggacg ccgacgcct 59340
 ggcggagctg cggacgcgc tggaggccga ggcggccacc cgcgtatcc cgcgtcgacta 59400
 cgcgcacccac accggccacg tcgacgcac cgcgcaccag ctgcggccga tgctcgccg 59460
 cgtcaccccg cggcccgccg agatccctgt gctgtccacg gtgaccggcg agtggatcac 59520
 ccccgccgac gacgacccgcg actactggtt ccacaaccc cgcgcaccc tccacttcgc 59580
 cgacggatc accacccttc tgcacgcggc gcacccggcc ttcgtcgagg tctccacgca 59640
 ccccggtctt
 accccggccg tgcaggaggc cggcggaggc aaccggccgc tgccacccgt 59700
 cggcggtggc accctgcgc cgcggacgg cggcggagg cgggtggtgg cggccctggc 59760
 cgagctgtgt ggcgcgggg tggccgttgc cccggccggc gtgtcccccg tggtcgagg 59820
 ggtcgccgtg ccgtgtatcc cgttccggca cggacgttgc tggtcttcgc gggcgctggc 59880
 cgcgcgcgg cgggtggccg agggccggca cccgtggcc cgggtggtgg tgagcgatcc 59940
 gggcacggc ggggtgtatcc tgcgtggccg gatctcccgcc gccacccacc cgtgtgtct 60000
 cgaccacgccc gtgcggccg cgggtgtatcc gcccggccgc gcgtggccg agtggcggt 60060

 gcggccggc gacgagaccc ggacgcccac cttggaggag ctgtgtatcc gcaggccgg 60120
 ggtgtcgccc gaggacgggg agtgcggctt ccaggtggc gtggccggc aggacgggg 60180

gcgcgcgag gtgcgcgcct actcccgccg cgacgacgcc ggcgcgtgga ccgagcacgc 60240
 gagcggcacg ctgtcgccga agtctcgct gccccccgac gtcccggccg cccctggcc 60300
 gcccgggc gcgaggccga tcgcgctgga cgggttctac gaggccatgg cagggccgg 60360
 ttacgggtac gggcccgct tccggggct gcgcgccgc tggcgacg gggacgacgt 60420
 gtcgcccag gtggccgtgc cgccggccga ggacgaggta gccccggct tcggcatcca
 60480
 cccgcgcctg ctggacgccc ccctgcacgc cggaaacttc tgttccccg cgcaggacgg 60540
 cgagcgggcc acgatgctgc ctgtcagctg ggacgacgtg cggttgcacg ccaccggcgc 60600
 gacgtcggtg cgggtcgccc cccgcggctt gggcgccct ggcgcggccg cgctgaccgt 60660
 ggcgatcacc gaccgcgagc ggggtcgccgt ggccgggggt ggcgcgctc ggtatgcgcgc 60720
 gtcagcccc gaggcagctgg gcgcgcccgg cgtcgccgtt gacgcgctc ggggtcggt 60780
 gtggccgag gtggccgtcg aggccggccga cccgtggcc gtgtggctt ccgagcggca 60840
 cccgacgtg acgcctacg cggccgaccc ggacggccg ggggcgctgc
 tggtgacgt 60900
 gggccctgg ctggccggcg acgacgcccgt ggcgcgcg cacgcgtga ccagcgcggc 60960
 gctggagctg gtgcggact gggcgacccg cggggacctg ggcgtgagc ggctgggtct 61020
 ggtcactacc gggcccgagg acgtcgccga caccgcgc cgcgacccgg cgcaggccgc 61080
 cgtgtgggc ctggcgcct cggccgcctc ggagcaccgg gaccggctcg cgctggctga 61140
 cgcgacgac cggccccgg cgacgctcgc cctggccggc ggtcgccgt tccggaggt 61200
 gtcctgcgc ggcgagcggg cgcacgcgc gaggctggc cggccgtcc cggcaggcc 61260
 gtcggcgtc gaccggacg acgcggccct gatcaccggc
 ggcacccggc ccttggcgc 61320
 gtcgcgcgc cggcacctgg tgacccgcga cggcgtcgcc cgcctgctc tcaccggcc 61380
 cggggggccg gacgcgcgcg ggcggccga gctggccgag gagctgcgcg ggctggccgc 61440
 ggacgtcggt gttggggcgt ggcacgtcgc cgaccggac ggcgtcgcc cgctgctcgc 61500
 gtcgatcccc gccggccgc cgtcaccgc cgtcgac ggcggccgc cgctcgacga 61560
 cgcggccgt accgcaccta cccggagcg gctgtccgcgt gtcgtggcc cgaaggtcga 61620
 cgcgtgcgc aacctggacg acgtggctgg ggacggccccc gggttgcgtc cggtctactc 61680
 ctcggcgtcc ggggtgtcg gacggccgg
 gcagggccg tacggccgg ccaacacatt 61740
 cgcgacgacg cttggcgcgc gacgcggccg cggggccgg ggcggccgtg cgctggcgt 61800
 gggcctgtgg gcaaggccca gcgagctac cggcacctg gccgtgacc ggctgcggc 61860
 caccggccgg ggcggctgg tgccgtac cgcgcgcg ggcgtgcgc tggtcgacgc 61920
 gggcgggtc accacggccg gcccggccgt gtcgtgcgc cgcgcgcgtt acctggccgc 61980
 gtcgcgcgc tccgcgcgc acgaggccgt gcccggccgt ctcgcgcgc tcgtccccgc 62040
 cgcgcggccgc tcgtctccc cgcgcgcgcg gcaggccgcg cccggccgc gttgcggcc 62100
 ggcctggcc gggctgtcg
 gcgacgagca ggaggccgtg ctcaccgc tggtcgcga 62160
 cctggccgc cgcgtctcg ggcacggcga aagggccgcg gtggcccg acgacgctt 62220
 cttcgagatc ggcgtcgact ccatgacggc cgtcgacgt cggacccgc tgaacaccgc 62280
 caccggcgt cgcctgcgc cgcgtctgt gttcgaccag cgcacccgc cgatcgcgc 62340
 cgaggcgtc cgcgacgcac tggccgcga gcaatggcc tcaggcaat cggccgcagg 62400
 gcagccggcc gcaaggcatt caggcgcagg gcagtcgcgc gcagggccat caggcgcagg 62460
 gcagtccacc gaccgcaccc acgagaggta agcaccacca tgcgtac ggcgcgtac 62520
 ctggccgc
 tcggcgtgga gggccggcgtg ccgagccgcg cgctggagtc gttgcggcc 62580
 ctgcacaagc ggcacctgtat gtccgtgcgc tacgacaacg gggcgcggc cgaccggtt 62640
 cgcgcgaacc gggggctcgc ggagatcccg ctgcggctgt tggtcgccca cgtgggtacc 62700
 ggcgcgaac ggggggtctg ctacgacgtc aaccggctt tccacgcct gctcaccgc 62760
 ctggcgtacg aggtcgat ggtcgccgc gcaatccgc tggccgacga cgggttccgg 62820
 cggacgagg agcactcgat caacctggta cgcctggacg ggcggacccg gtcgtggac 62880
 gtgggttgc tcggccgtc tcacctggag cgcgtggacg tgcgtggct cgacgaggag 62940

 cagtagggct ggcctaccg gtcgtggag cgcggggacg cgcacgttgt ggacgcagg 63000
 cccaggacg gggcgccgca ggcgtgtac cgggtccggc cggggccggc ggaccggac 63060
 ggctggagg cggcgccgtt ggacggccgt gacgactacg cgcggactc ggtgtggcc 63120
 ggcaccacgt tccgggtcg ggcggccgag aacggccacg acgtgtat cggccgcgc 63180

tacttcaccc tgctggacgg ggtggagacg acgcgggtgc tcgtgaagaa ggacgagttc 63240
 gcccgcgtca ccgagtcatgatcggtt gggtaggcgc gtggcggcgc aggtcgagca 63300
 cgacgtgtg tcgtcggtc acggccgtt gggcagctg ctgtcggtc tgctggcga
 63360
 gcgcggctgg cgggtgtgg tgctggagcg ctggccacg ccgttccggc tgccgcgc 63420
 gtcgggttc gacagcgagg cgaccgcgt gctggctcg gcccgcgc 63480
 gcccgcgttc ggggagcccg cgggcacta cgagtggcgc accgcgtccg gggagacgc 63540
 gatcgcttc accgtgcggg aggagggca ctgcggctgg cccgaggcga cctcggtta 63600
 ccagccccggc ctggaggacg cgctgatcgc ggcggcggag ggcgtccgg gggtaagg 63660
 gcggcgcggc tggaggtga cccggctacg cggccgggc gaccacgtc gggtggtggc 63720
 caccgacccc ggcggggcgc gcgtgaggct gacggcgcgg ttgcgggtc
 gctgcgacgg 63780
 ggcgaacacgc gtgggtcgccc cccgcacccg caccgcacgt accgacactgg acttctcgca 63840
 cgactggctg tggtgcgcac tgccgctgca cgaccggcgc cgggtgacgc cgaacaacct 63900
 ccagggtgtc gaccggccca ggccacgcac cgggtgtcg gggggccag ggcaccggc 63960
 gtacgagttc atgcgggtgc cccggcgcacg cccggagccg ttccggcacgc cggagagg 64020
 gtggagactg ctggcgtgt tcggcgtcg ggcggcgcac ggggtgtgg accggctggc 64080
 cgttacacg ttccaggcgc ggtggcgcg ggggtgggg gggggccgga tgctgctggc 64140
 cgggacgcc ggcacactga tgccgctt cgccggcag
 ggcacgttccg 64200
 ggacgcggcg aaccctggctt ggaagctgga cctgggtctg cggcggcagg cgggtcgcc 64260
 gctgtggac agtacacacgc tggagcgcgc cggacacgt cggcacccg tgacgatctc 64320
 ggtggcctg ggggggtgg tggtgcgtgc cgaccggcgc gggctgcgg accggacgc 64380
 ggcgtatgtc gggcgcgcgc agcgcgcacg gacacccggc ggcgtggccc ggtcggtct 64440
 caagccccgt gggacgggg tgctgcaccc ggcggcgcac ggcggccctcg cggccacgc 64500
 gggggccgtg gggccgcagt ggcgggtggg ggcggcggg cgggtcggtc tggtcgacga 64560
 cgtgtgtggg accgggttcg cgctgctcac
 cagggcggg ctggtggcgg ggcggaggt 64620
 cggggcggc ctggacgggc tggcgcgcg ctacgcac cttggccccg cggggcggc 64680
 ggcggacggg cggacgcacg tgggtgcgt gggcgggaa tacctgacgt ggctggagga 64740
 gctggacgcg cggcgggtgc tgctgcgacc ggacttctac gtgttggcgc cggccgggg 64800
 cggcggggg ttggccggc ttgtggcggc cttggcgcgc cgggtgggt gacccccggc 64860
 agggccccggc acgtgcgcgc cggggcctg ctgcgcgc acgtccggc gtcggcgg 64920
 tggcccgaggc accagtgcgag cacctgcgag ggctgcggc ccacgcgc cgggtcgcc 64980
 ggcacgcacg cggccctcg
 cgttcgcgcc cacagcgcgg ccacgcgcgc gtagccgcgc 65040
 ggcggggcgc tgccaggc cgtcaggcgc tcgcccacca tcaccacccg gtcggccgg 65100
 acgtcgagca ggcgggtggc cagcaggagc atgtccggc cggcttggg gttcgcgacc 65160
 tcgtcgaggc cgtatgatag tgcaacacgc cccgcacatgc cgggggttgt cagcagcgc 65220
 cggcgcgcgc gcccgcctt gccgggtgacc acggcggcgc cgaagccgcg ctgcgcagg 65280
 tccgcagca gtcggcgcgc gccctcgaa acctccacact caccgcgc cggtagctc 65340
 tcgcccggacgca acggaccctc catctccagc ggcaggctca tgatccgc gatgtccggg 65400
 aagtaccgcc
 ccaggtgcgc gtttactcc tcgaacggcg cggggccgtc ggcacgcacc 65460
 tcggcgtagg cgtatcgaa cccctgcgc atgacggcga agtgcgtgac cggcaccgg 65520
 tcgaggtcga acacgcacgc cgggtcgtag tgccgcgcgg ggcgtgcgc gtcggcggc 65580
 ggggtcgccg gggcgggggg ggcggggcc gcccgcgc gaaaccgcgt cggcccccgc 65640
 tcgtccccgg ctggggcccg cacgactcg gggttggct gtcgggtgt catcacggg 65700
 ctccctcg gacgaggctg accggcgcgt gtcgtcgatc ggcgcacccg acgggtcg 65760
 cggcgcgtt gaccggctcg atcgccccc cggatccacgc cggccctcg 65820

 cgcgcgtggc ggggtcgcc aggccgggtgg gcaggctgcg gagctggcgc tcgtactcg 65880
 cgcgcgtggc ctcggcggc agctcgaccc ggggtgtgcg ggcgtcggt gtcggcgg 65940
 gcccgcacgg gcccgcgc ttcggcgtga agccgaagg gcaacgcgc tccggcgtc 66000
 cggcgcgtcc ctccacgcgc acggaccgtgg tgcggcgcgc cggccaggccg 66060
 cgcgcacccc gatcgagatc cccgaccggg tgacgaggaa cccctggcgc gtcgtctcca 66120
 cgtcgccgac accgggttcc accggcgc cgtcgccgcg ccaggccgc cggacgcgt 66180

acgggcaggg cgccccgtcg aggccacca cgacgtcccc cagctcgag gaccgcgt 69180
 cgggtccggg gaacggcagg ccacccgaca cgacgcccc gcccgcgtcgtcc 69240
 ccgcgttagac caggtcgccg cacccgtggg cacgggcctc ggccgcgtcg gcgaggctcg 69300
 cgtcgccgc gacgaccc gggccggcca gcccgcgtcg gaacccgcg aggtcgacgc 69360
 cgacccaccc cggacggctg ggccaggccg tgacgaccc gcccgcgtcg gtgcgggga 69420
 acgcgatccc gacccgtcg agccgcgtcc cggccgcgtcc ggccaggccg gcgacggcgt 69480
 gcccgcgtcg gtcgaggctcg gcccgcgtcc accgcgtcccc aggccacccgg
 aagccctccc 69540
 gcagcaccag cgccccgtcg tcgagccgca gcccgcgtt ggtccgcgtcgtcc 69600
 cgagcagcgc cccgcgtcaca cccgcgtcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 69660
 cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg ataccgcgtcgtcc 69720
 cacgcacccg cccacccacc accgcacccgg cccgcgtccg cccgcgtccg acaccgtcc 69780
 ccagcgcacc accacccgcg cggccgcgtcc cccgcgtccg cccgcgtccg gacccgcgtcc 69840
 cccgcgtccg cccgcgtccg tccgcgtccg gggcgtccg gttccacc accgcgtcc 69900
 gatcgcccg cgtggccgtt tcgcccgtt gcagcgcgtt
 gtgcgcgtcc ggtcgccgtt 69960
 cgctgcgtcc ggtcgccacc tcgggtatgc tcggtcgccg ctccaggcac gccaggcagg 70020
 cccgcgtccgta cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70080
 cgtcgccgtt cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70140
 gatgggggtt cccgcgtccg tccgcgtccg tgacgcgtccg cccgcgtccg gggccggg 70200
 atgagttcga cgaaccgcacc ctgcacaac cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70260
 ggcgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70320
 tccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70380
 accggctcgcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70440
 accggcgca cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70500
 aagccctcca cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70560
 aggctctgcg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70620
 cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70680
 acgacctgca cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70740
 cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70800
 tcgaaccagt cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70860
 cgctcttca cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70920
 atgctcggtt cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 70980
 acctcgccgtt cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71040
 tccaccaccgc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71100
 gggccgagcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71160
 gctcgccgtt
 acggcgcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71220
 acctcgatcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71280
 cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71340
 agcgcgtatcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71400
 aacggctcgatcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71460
 tccaccaccgc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71520
 cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71580
 tactcgatcc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71640
 gacttctcca cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71700
 gtgcggagt tccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71760
 gagtcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71820
 tcggcgccgtt cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71880
 cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 71940
 tcggggaaat cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 72000
 cactcgatcc tccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 72060
 tcctccaccc cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtccg cccgcgtcc 72120

aacagctcg acatcgacgg gacgaggctg gtctggccg gcgagaagtt cccgttgc 72180
ccgagcacga gcatgtggca tcaccttgat ccggggaggcg agggctgggg cgccgggggg 72240
gtcggcgta ggcgggggc ggcacggcg cgaggtcgaa cgaggtcagc cgccggcg 72300
tggcgccgg ctgcgggtc ggcacgagggt ggaagcgctc cacgcctcc tcggtggcg 72360
cgccgagctc ggccggcgag ggcacgtcg cgggggcgaa cccggcgaac
cgtaggcga 72420
tctccatcat ccgggtcgcc tcggtgccc ggaagtggc gaccagggtgc gcgcggcg 72480
gcgcgcctg gtccgtgagc caggtcagca gcgtcgaccc ggccggcgac gagacgacg 72540
ggcacgagggt ggccggcgac ttgagggtcc acacccggcg gcgcgcctcc agcagca 72600
tgcgcggcc ggcgtcgcc cccggcggtt cggacatggc cacgaccaggc acctcggtcg 72660
cggggtcgcc gaggcggccg cgcggccccc ggtcgctgt atgcacggcg gtggcgta 72720
tctgcttgt ggcacgggtc agctcctcgac cccgggtcag tcggcctcg cccggcg 72780
cgacgaccac ctccagggtc agggtgcga ggaactcc 72840
gtcggcccg gtgaaggcc 72840
cgccgcgtgc gtcgcgtcg aacgcgtcg ggtacatcg ccggcgctgc cgccggcg 72900
cggtgaccac ggccggcgctg aactcggggc gtcggggcag ggaggcgac tcggcctcg 72960
tgtacaggcg caccctggc agggcgccgg ccacctcgcc gcgtcgacg gggctgtcg 73020
cgacgaacgc gatcggtcg tggcgaaagc cgagccggc ggcgtggcg cgcaccgacg 73080
ccgacttggc gcggccggcgtc atcgccga gacgaaatgt tcggcaagg cccaggcg 73140
cgagcacggg ccaggcggtt tcgtggcg tgcggctggc cacggactgc aggacggcg 73200
gcccgctcgac cccggcg 73260
ccaggagggtt ggcgcggcc acgggtgtgt ccagggtcca gaccaggcac ttgaccgtcg 73320
gtcgccccgtt ctgggtcagc gtcgtgtc cctgagcgta gttcggtgc gtcgtcaag 73380
tccgcgggg gcccggctgc gcacgtgtcg ggcgacgac agtggcaga tctggagggt 73440
gccctcgatg attcggatg gtcggcgcc cccggcgcc cgcggccacca cgtggccgtc 73500
gctggccccc gcccggccgaa gacgactgcac cgcggccccc gacccggcg cggccctcg 73560
cgaggccagg tacttggctt gacccggcc cccggccagg tccggcgagt tcggcgtcca 73620
cagcgctg cgtgtcg 73680
tcggcgccggc ggcgacgtcg tcggcgacgt gcaactcg 73680
caggtgcggc ggcgacgacgt ggtggcgcc cggcacggcg ccggccgtcg cgggggtcg 73740
gggtgtcg acggcgccgg ccaggcgacg ggcgaggatg cggacgcac cccacgcac 73800
cgacaccggc cctgtggatc ggcggcggtt gaccaggac ggcggccacca gcccggcg 73860
gcccgaggacg tcggcgccgg gacccggc cccgtccagg gtatcccgg agtggccggc 73920
ggccggccac ccgtgggtt tcggcacctt ctccacccgc acggccggcg cgtggcg 73980
cacgacgacc ggcgtcgccc cggccggta gtggccgaag accaccagca ggtccgta 74040
gtggcgccg 74100
gtgatccacg acttggcc ggtcaccacc acctcgccgt ccgggtgtc 74160
ggtaatggtc tggttcatcg cggacaggatc gtcggcccg cccggctcg tgaacccgac 74220
cgccgcgc cccggcgagg tgagccgtcg cagggatcg tgcgtgtcg cgggggtccc 74280
gagccgtcgcc ggggtccacg cccatggc ctgggggtt atgacgtcg gcagcgac 74340
gcacagetcc cccaccggacg cgggtcgatc gccgttctcc cggctggccca gcccggagg 74400
ccgtgggg ggcggccacctt gggcgacag caccggccac cccggccagct ccaccaggac 74460
ctcgccggc agctcgcccg ccagggtcca cccggcgccg cggtcggcc cgcgtcg 74520
gaccagcccg gccaggcgca cggcgccgtt caccggcccg cccggcccg cccggcc 74580
agcggtgtca tgggttgc ggtggcgaaat cttccaggatc ccagggtccgg cccgtcgatc 74640
acgacgtcgaa aggtcgactc cagggtcgacc acgagctca tcggaaatcg cgggtgacg 74700
gtgcggacg cggacaggatc ggtgtccggc tccaggatc gttgggtcg ctcggcgagg 74760
aacggctcgca cccgtcgcc caccggcgatc ggggtgacgg cgcggccgtt ggaggaggatc 74820
gtcacagatcg tgcctcccg tagtctgtatc agccggccccc ggacttgcgc cccggatcg 74880
cgtcgccggc ctggcgccg acgacgtcgcc agggcgccgaa ggggggtcg cccggatcg 74940
cgcccgccgtt ggggtggccg aggaggatc gcatggggcc tcggccggcc cgcacggagg 75000
ccgtggccctc ctggcgccgac cggatcgatc cgggtggacg atccggctgg 75060
tcacgaagcc gggggcgatc cccggatcg cccggatcg gggccggccg cccggatcg 75120

ccacgagggt ctccagcgcg tccgcgccgg tgcgccgccc cggacgacc tcgaccgtgg 75180
 ggatcaggta cgccgggttc atgaagtgcg tgccgatcag cccgcgccgg tcggggacgt 75240
 gccccggccag ctctcgatc gggatcgagg aggtgttgg aaccagcgcc
 acgcgcggcc 75300
 cggtagcgc ggcggccccc gccagcacct cggccttgc acggcagctcc tcggtgaccg 75360
 cctccaccac cagcagacg tccgcgacgt cggcagcga ggtgggtgt agcagctcg 75420
 cccgcctcgcc gtccctggcc agcgcggca tcagcctggc catgcgcagc tggcggcca 75480
 cccgcctcccg cggccggcccg accttggccc ggtcggttc gaccagcacc accggcacgc 75540
 cgtggccgac ggcaggag gtatccca ggcccatcgt gcccgcggc agaacggcga 75600
 gcaccgtctt gccgtctgc tctccatcg cgctccccc cccgcggccac cgcggccccc 75660
 gtccgtccg cgcgcgtcc cggcacgcgc attccacct
 cgatcgtgtc cgggaaagg 75720
 cgcgcgcac cccctgaccc gccccctga accccctca acggaaaccgg aaatcgaatg 75780
 tccgaacgc gccgtcaat cgtcgattga cagccgcaga actgttcatc gactgtggcg 75840
 gcagttaccga tctccgaatt ccacggaga gtcctccccc atggctcagc agatcagcgc 75900
 cacctcgaa atcctcgact acgtccgcgc gacccgttg cgcgacgacg acgtgtcgc 75960
 cggctcgccg gageggaccc cggttctccc ggccgcgtcc ggcgtcggg tggcccccgg 76020
 ggaggggcag ctgtcgccg tgcgtgtcg cctggtcggc ggcgcgtcgg tgctggaggt 76080
 cggcacctac accgggtaca gacgcgtgt 76140
 tgtcgtgacc tgcgcgtcg tcgcgaagtgcg gccggacatg ggcaggccgt tctggagcg 76200
 ggcggcgcc gccgacgcgca tcgacgtccg cgtcgccgac gcccgcgcc ccctggccgg 76260
 cctgcacgccc gagcacgcgc tggtcgaccc ggtgttcatc gacgcgaaca agtggatta 76320
 cgtccactac tacgagcgcg cgcgtacgt gtcgcgcacc ggcggcctgg tcgtcggtgg 76380
 caacacgc ttttcggcc gggtcggcc tccgtccgcg accgatccgg acaccaccgc 76440
 cgtgcgcgag ctgaaacgcg tgcgtcacgc cgacgagcgg gtcgacatgt gcctgctgcc 76500
 gatcgcggc ggaatcacgc
 tcgcccgtaa gcggtaacc cggccgaatt 76560
 ccccccggaga gaaaggccgc cgcagtgtc accgaggacg tggccaccga cctggccccc 76620
 taccgggtcc tgcgggaccc gggcgactgc cgcgtcgcc caccccccgc ctacggccaa 76680
 ttacgggagg agcagcccg taccagggtc cgcctgtgg acggcagcac cccgttctg 76740
 ctcaccggcc acgagggtgt cgcaccgcg ctcgaccgacc cgcgcgtcgc ctccgacggc 76800
 gccaaccgcg cccagccgcg ttgcgtgaag ttgcacatcc cggacgacgt gttcaacttc 76860
 ggcaagatgg acgaccgcgac gacgcgcgagg ctgcgcgcg tggtcggccg gcacttcgcg 76920
 agccgcggcc
 tggaggcgat ggcgcgcg atcaccacga tctgcacgc ccagctgcgc 76980
 cagctcggtc aggccggctc cccggccgac ctggggcccc actacgcgtt cccgatcccg 77040
 tccctggta tcggcgccgt gtcggcggt gccggccccc gcctggacga gttcgccgc 77100
 gactcgcacgc ggcgcgtgg cccgtcccg tccgcgagg agatggcgc cgcgcataac 77160
 tcgatggtcg gttcggtgg cgcacgtgc gccggcaagc gggccccc cggcgcacgc 77220
 ctgatcagcc gcctgggtgt ggacttcgag cgcaccggcgc agctgacccgc gaaggacgc 77280
 gtcgcgcaccg tgaatggcgt gtcgtggcg ggctacgaga ccaccgcgaa catgatcgcc 77340

 ctgggcacga cccgcgtccct gcgcgacccc gagcagctgg cttcctgcg cggcggcc 77400
 gccggttcg ccaacgcgt cgaggagctg ctgcgtgc acaccatcg ccaggacggc 77460
 accggccgcg tggccctggc gacgtcgag ctggacggcg tgcgttcc cgcgggtcc 77520
 ggcgtgatecg tcaacctgcg cgcggccaa cgcgaccccg acgttctccc egatccgc 77580
 cgcctcgacg tgaccaggca caacgcggc cggcacttcg cttcggtcta cggcgtccac 77640
 cagtgcgtgg gcaatgcgtt ggcgcgcgtc gagctgcaga tcgcgtgg aaccctgtg 77700
 tgcgcgcaccg cggccgtccgc gcctgcacgc ccgttgcagg acctggactt cgcctggag
 77760
 tccatgaacc tggcgtccgc ctgcgtgcgc gtcacgtgtt gggcaccgcg cgtccaccag 77820
 gggagggccg atgacccgcg ccaccccccac cccgcacccgt gcccggagg tcccgatgcc 77880
 caggcgcgcg gaggcccg tgcacccgc cccgcgtcc cgcgaggcgc aggaggccgg 77940
 cggccgtccgc cgggtgcgc tggggacgg cagcaccggc tggctgtatca ccaagcgc 78000
 ccaccagcgcg gagctgcgtc ggcaccccg ctcagcgcgc gacttccgc gccctggcta 78060
 ccccaaggccg attgcacgtc aggacaagtc gacgttcatc agcagcttcc cgctcatgg 78120

cgaccccgag cacaaccggc agcgccggat ggtcctggc ccgttacccg
 tccgcgaagg 78180
 ggaacgctg cggccgttcg tgcagcggat cgtcgacgag aagatcgacg aactcctcg 78240
 gggccccaaac cgggtcgacc tggtcaccgc gttcgegctg cccatcccg tccctcgcat 78300
 cagcgccgtc ctgggcctgc cctactccga ccacgaggc ttcgagcgca acagcggcg 78360
 gctgatecgcc caggacgtgc ccccgccagg a cggccggag gccagcgagg agctccagca 78420
 ccacccgcac cgcgtcctgg gcgacaagat gaccgacccc gccgacgacc tcctctcg 78480
 cctggcgca cgggtgctgg caggcgat cagcaggccg gaggcggtcg acatgaccgt 78540
 cctggtgctg gccccgggc acgagaccac cgcgaacatg
 atcgcgtcg gcaccctcg 78600
 gctgctccgg caccccgacc agctggcgt gtcaggccg ggcgacgacc ccgcctcg 78660
 cgagaccgcc gtcgaggagc tgcgtcgta cctgacgatc tgcacacccg ggcgtcgcc 78720
 cgtggcgacc gaggacgtgg agatcgacgg ccaggtgate cgcgcggcg agggcggtgg 78780
 gctggcgacc tgcgtcgca acccgaccc cgcgtctac gacggcgacc cgcacgtgt 78840
 ggacctcgcc aggccgtga agcagcaatt cgcgtcagc ttccggcaccc accagtgcct 78900
 gggccagtcg ctggccgca tggagctca ggtcgtcg aacaccctt accggcggt 78960
 cccgacccgt cgcgtcgca cgcgtcgga
 ggcgcaccc ttcaagcagc acgggatcg 79020
 ctacggcgtc tacgagctgc cggcacccgt gtgaccctt cccaccagac ctccgtccac 79080
 gcagaccctcc cgaagccga ccccgaaagg cgggtccat gagcgcacacc acgtgtccg 79140
 tgcccgctcc cgaggaggtc ggcaagctt acgaccagat cctgaaggac gagcacaccc 79200
 acgagcgtt cggaaagtt aaccaccagg tgcacatcg ctactggac gaccgcaccc 79260
 cggacgtgcc catgcgcgag gccgtggcgc gcctgaccga gctgatggc ggcgcctgc 79320
 gggggacgc cggaggaccgc gtgctggacc tggctgccc catcgccggc cggcgaccc 79380
 agatcggtcg caccaccggc
 gcacgcgtcg tcggcgttag catcagcgag gaggcggatcg 79440
 agctcgccac caggctggcc accgaggccg gcgtggccg ccgcgcacc ttccagcg 79500
 cggacgcata cgggtcgccg ttccggacg agtcctcg cgggtgtat gcccgtgg 79560
 cgatcctgca catgcgtcc agggaggcagg tcctgtccg ggcgcggccg gtcctgcgc 79620
 cggaggccg cctggctcc accgactt tcgaacgcgc accccgcacg cggggatgc 79680
 accccgcata cggggcttc tgccgaaccc cgtgacgac gatggccgac gtggacgact 79740
 acgtgcgtat gtcgtaccgg gtggccgtcg gcgtgcgggat gtcgtggac atcaccgac 79800
 agaccatgg
 acgcacttgg cgggagaccc tggagatcg cagccagaac gaccgcgg 79860
 tcgacttcga cctggcgag ctgttcggcg tggacgat cggctgcctg ctggcgcc 79920
 cagaccgc cgtggcccg tcccgaggc cgtggccgc ctgtacgacg acctgtgg 79980
 ggcgcgactg gaggggggcg cagccgaccc gaacctgcac atcgctact gggacgcgc 80040
 ggactcgcca acgcacgcg cggaggccgt agtgcgttcc accgacgac acgtccgcgc 80100
 cctgcacgtg accacggccg accgactgtggc ggacgtggc tgccgttag gcccggcc 80160
 cctgcgcgcg gtggacccatcga cggcgccca cgtgaccggc atcagcatca ggcgcgcca 80220

 gatcacccac ggcacccacc tggccaagtc cgcggccac gggacaaca ccaagttct 80280
 ccacgcacac ggcgtggccccc tccgttccc ggactctcg ttgcacgcgg tcatggcgat 80340
 cgagtcctg atccacatgc cgcaccgcga cgggttcctg aacgaggcaa gacgcgtact 80400
 ggcgcgcaggc gggcactgg tcctcaccga actgttcga cgcgcggcc gaccacccg 80460
 cagacacccca ggcataaccg atgttcgcgc agcatcgatg gtccctgc ccaacgcaga 80520
 cgactaccc cgcactactac accgaggcagg cctacgccta cggaaactcc tggacatcac 80580
 cgaccacacc gtccaaacgcgacttccgcg actggccgat ctggtaggcg acgcgaagg
 80640
 cctgcgttcc caccacgcg acctgggtgg cgtcccaggaa ttccgtgt tcctacgt 80700
 agccgaacac cggtaaccac cgggtggcg tcccccacgcg cggccacccgc tcggggcg 80760
 cggggcgacg cgcgcgaccc cgcgcgaccc cactccgcg tccttcctt ccgtgtggcc 80820
 tggcgcatgt caaatccca ctgactgcga acagatcatg tgcgtttga gcaggtcagc 80880
 gacttgtcg ctttcgtgc cttaaaggcc agctggatg gggcactgt ttccggactg 80940
 agcggggcag ctggaaaggat gggatccgcgat ggcgcaccc gtcgcacgt 81000
 gaggtggttg tacacgcgtt ggcggaccc ggcgcgttcc ggcgcgttcc
 caagctgttc 81060

caagatcagg agtgcggcgc ggtgcgtata gccgagttcg gcggtcagca tgggtctgtt 81120
 gagcagtggg gcgacgagca gcggggcggg aagcgcttg accttcctcc gcccgggtcg 81180
 catgcccgat gtggcgatc gcgcgacgtt cacggatcgc ggtcaccta tgcaggctgg 81240
 cgctcaacct ggaacgcgcg actgtttcg ccagacgtgc cagggcgggt taggcgtaca 81300
 acaaggctt gctgggttcg gagcgcagtc tgagccggga ccaggacgac aactccgcga 81360
 tcctcgccga cggggcggc ctcggtctt caccgggtt agttacccgt cgcgggggg 81420
 aggtgcccta ttgtccggg gacgaggta tccccggag
 cagtttctca gcacccgtg 81480
 aatcgagatc cggggcgctg aecgcgttga acgcctcgac cagcgagtc cacgcgcacg 81540
 tcgtccctgac atcggggccgc gcatggcccg aggtggtcag cggtgagcgg gaaggcgcgg 81600
 caggggtgt gcgagacact cggggactcc gtgcagaagg tgcgtcaggc gaaagggttg 81660
 aactgcgaat cgcggccgg cccggccgca aagggttgg gccgcctcgac acgattggtc 81720
 acgctgtgc ggcgcgggtcc cgccggactt gcttgcgag caggtcgatc cgccttgc 81780
 gatttctgc cagcgcctcc agaaccgaga gcagtcgtcg ggcgtcagt gcatggccaa 81840
 taccatcgta gcgtacccca gagggtgtcg
 ctcccggttca ggggcacca ttccacacgc 81900
 ccgcgtggcc tcctggcg cccggccaag atcgccgagc atcaggtagg tgcccgacaa 81960
 cccgacaacc ctgcgtccca acgcggcttc cggcaccccg cgcgcctcgat cggcttcaa 82020
 cgcgcgaaca cctgtccaca gcacggcccg cgcgttgc cgcgtcgatcc ccagccatcc 82080
 catgacaccg tgcgttgc cagtgacca cgateggctg tggatcgatcgg tggatcgacaa 82140
 cgccagctcc acgcgtcgat cagcgcgtt accgaccaca ggcggccgc gatgtccagc 82200
 acttttgtcc ggtacccggc cagcgtcgatc ggggtgcgt gcacggccac gacttccgc 82260
 cgcgtcacttca gtcggccactt
 gtacgcggcc aaggcgttgc cgaacagcgg ctgcggcccg 82320
 acctcgaagc cgtcgacgaa cacccgcgc aaatcaccga gcagtttccc tgcggccaa 82380
 gtgcgcgat gcaggatctt gccaacttgc tccacttgc gggactc ctgcgtcaca 82440
 gcccattcgca gcagtgcctg ggcttggctt gtctctcg cgcgttgc cgcgttgc 82500
 cggtaacgcgc aggagggtaa ctcgggtgc gtgtatcgatcgg tggatcgacaa 82560
 ggctcggtca gcaccagcac gcccgggtt acccacttgc ggcgttgc ggcgttcc 82620
 tcgacggatgttca ttcccgat cgcggccaaac gacgaggatcg agaccacggg gtcggccagc 82680
 aggtccagca
 atctcagctc ttgcggatg ggcacaagag tggatcgatcat cgtatccct 82740
 cccggaggac ggcgtatgatt ggagtggcgac acagaaggaa aacgcgcgt tcgcgggtt 82800
 cggcggtcc acgcgccttc ggcggccac ttggacttgc acggccagaa gttcaccggc 82860
 aaggactctg tgacggatgttgg agcggtgcac gcccattcgat tggatcgatcgg cgtatcgat 82920
 gtggtaacca gcaacttgc ctagcttgc catcttgc cgcgttgc cgcgttgc 82980
 cttgatctt tcggatcgatc tggatcgatc gtcgacatgtt cgcgttgc ggcgttgc 83040
 cgttctctt gagatcgatc ggcgttgc cgtatcgatgg ggcgttgc gacgttgc 83100

 cgcaacaggt caggcggcgt cagatctccc cattaccgag gtttcgttgc atcgccgacg 83160
 gggccgcct cgaagaagtc caatcgatc ggcattccct tcgattgtat aatagcgca 83220
 cgggtgtcgat tcgacatcgat cccaccgtt cgttgcgtat tgcacggatc agggaggagc 83280
 gaccccttc gggacttgcac cgcgttgc tccctgttgc cgcgttgc cgcgttgc 83340
 cacgttaggtt gccggatgcg ggcggatggg acaacgaagg gacaatcgatc acggccagg 83400
 tgcggatgtt ctgtttttttt cccgttgc gacgttgc cgcgttgc cgcgttgc 83460
 acgaacatcgatc cgggggttgc ggcgttgc cgcgttgc acgttgc cgcgttgc 83520
 ctcagcaagc tctggcgaaat cgcgcacacg tcagatcgat cctcatcaaa ggggtggaa 83580
 agggaaaggat tcccgcttc ccccgatcgat tggatcgat ctcggatcgat ctcggatcgat 83640
 agggcgacat cttgttgc ccccgatcgat tggatcgat ctcggatcgat ctcggatcgat 83700
 actccgtcat ccccgatcgat ccccgatcgat tggatcgat ctcggatcgat ctcggatcgat 83760
 gcatcgtatcgat ccccgatcgat ccccgatcgat tggatcgat ctcggatcgat ctcggatcgat 83820
 ggcacgcgc gacgttgc gtcgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc 83880
 gtcggccat ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc 83940
 aggcatacgatc agccgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc 84000
 tggcgacgatc ggcgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc ctcgttgc 84060

cagcgactt ctacatcgcc ggtgagctga tcgcagcgc ggagtggcgc ggcgccctct 84120
 cttacctcgaa cgctcccgta cgccgcctgg agcacgttgt gcgcaggac gacgaggccc 84180
 ctttgctcat ctacggatc ctgcaccta agtcgggct cgccgcggca cggccggaa 84240
 aagccgacga atccgacgcg cacctcgta aagccgtgg catcgccgaa agggtgcgc 84300
 tggcagtga caactaccgg ctgcgttgc accggactc
 ggtcaacatc tgaccgtgg 84360
 ggctggcagt ggagcgcattg gacggcacgg aagccgtcaa acgagccac gggatgcgc 84420
 tcagcaagac caccggcgta gaacgcgtgg gccaccacta catcgatctg gcgcgcggct 84480
 accagctgca cgagaccgt gaccgcgcct tgacacacct tcagatgcgc aggcaacct 84540
 caccgcgca ggtgcgtac cacccgcagg tcagggaaac cttctcaacg ctgcggaaac 84600
 aggaccgcgac gcgcctggat tccctggcag ggctgcgcg ctggatcggt atgcgggt 84660
 gacaggacgg cgagctgacg tcgctgttgc gggcagcccc cccatcgcc gcccctcaac 84720
 agcagggtgcc ggtacgtccc tcacagcgcg
 acgctgacga tcaggctggc gaacatggcc 84780
 acggccagcg cgatcatctg ctggcgccg ccggcaaga agagggaccc caccacccgc 84840
 agtggtaaac cgccaccgg caccaacggc caccggccgg cagagccgt cccctcttt 84900
 tttggaggctc tgcccgccg gcgaggcgat cccttagct tcacagctt ccactctcg 84960
 tcttggttc cgaacaccccc ccgcacccccc actacgatcc cccatgggg gctgtatca 85020
 tcgcggtagt gctgtgtc gtcttcctcg tgcaactcaa gcgggaaccc agacgactgg 85080
 gcaacggcgct ctacctgctg atgagcctgg cgttttcgc cctctggctg ctcaccctcg 85140
 ccacccccc gaccaggacg
 ctggtggtag gcgcggtagt cctgatgcgc ccggatttcg 85200
 tcaccgtat cccctgttc ctcatgcaca acggcgtaac cctgctgcgc cgccggggcg 85260
 tcaaaaccagg caacgccttc tcctcgccg caggcaccgc catcctgtgc gtcgtaggcg 85320
 gcctgctctt ggtctgctc tcggccctgc gcgaaggctc cccgaccccc tgggtgtgg 85380
 cagcagccgg ttccctggtc ctccctggccg gctacctggg ctgccttc accctttcc 85440
 tgctctactc cgtgtctac ggccgagtc gcaagcgcac eggcacaccc ggcgcacatcg 85500
 tcctggcgcc gggcgtcccc ggcggccgag tgaccccgct cctggcaggc cgccgtggacc 85560
 gcgcctgaa
 gctctaccgc cgccggcag ccaagggcgc ttcccccgtg gtagtgcgc 85620
 ctggcgcca agggccagac gaaccgcct ccgaagccga ggtcatggcc aactaccc 85680
 gcgaacgcgg catccggac gaggccctcc tggaagagcg cgagtcacc tcgaccgtgg 85740
 agaacctccg cctctctcc gcctgcctcg ccgaacgcgg cgtgacccgc agactcctgg 85800
 tcgtcaccag cagtcaccac gtcccccggag ccgcgcattt ctcggccgc gcaggcctga 85860
 aggcaacgt ccgcggccgc cgaaccgcct ggtacttcgt ccgaacgcgc ttccctggcc 85920
 agttcgccgc cctctggtc cagtaccgc ccctcaacgc cctggcaggc tgacccgcac 85980

 tctccgtt cccgtctcg gcctacggcg tctgaaaagc acgacccggc cgacggaca 86040
 ccgcgtcaca gatccagcg ccgcgcaccc aaggccacgt tgaaccggtc gcaccacacc 86100
 acgacgtgc gcagccccga caggtccacg tcctccggaa tcaggttagt ctgggtgcgc 86160
 tcgggtgcct tcatggacc gagccggcagg tagcgcctt cgtgtactt gccccactcc 86220
 ccacccggcgg tcgcgtcgga gagccagatg tgcaaggctgg gcccgtccga ggtggagaac 86280
 ccatccagcc gcagcacgcg cgccggcccg ctgcgcagca cggccgggt gccccgcgc 86340
 tcgtgtctt gggtgacgaa cccacccgtt ccgcgcaccc tcggctggc ggcggcgtcc
 86400
 gacgacgtcc caccggcgat cgtggcacgg ctggccggc ccggccgggt gtcgcaccc 86460
 ccagcccccgg tgcctacccccc cgcaccggc gagaacgtga actcgccggc cagccctcg 86520
 tccgcctcgcc tgcgcgtcca caaccgcac ggctggaaaca cccacagccc gacgaccgc 86580
 gcccacccca caaccccccga caccgcaccc accgcctcc tgcgcacccga accgcgcacc 86640
 acgtccctcc ccttcctccg cagacgcactt gccaccatgc cacgggtcgc gcccgtatgc 86700
 cacgaccacc gcgcacacc cggccacccgc agcgcactagg ctgcaccccg gggtcgcgc 86760
 ccgcgtccga ggggttgtag caggcagccc accgcgttc ggcgtatgtgg
 gatggaggga 86820
 gcggccgggt gtccgagctg gatgcagccg cgggtgtcac ggtgggttcc gacgtggc 86880
 gcgggggtgcc cgtgtgcgc gtgcggggg agatcgacac caacgtcgcc gacgaggatcc 86940
 gcccggcgct gctgcctgg ctggacgggt tgccggccg agggtgtcgc gacgtgcgc 87000
 gggtgagtt catggctcc accgggttgt cgctgtat cgaggccgc cggccgcaggc 87060

cggcgaagct ggtgctggcc accgcccaga gcggcggtgc cggcccgctg cagctgaccg 87120
 gatatgacgcg cgtgtcccg acgcacccca ccgtggacct ggccgtggac gcccagctcg 87180
 gggccgcctt ggcgggatg cccagcacgg cctgaccacc
 ctcgtccac gggcgccctg 87240
 ccccgccgacc accccgcacgg cgccctgggg ggacgagatc acagctggtg gaagacgcga 87300
 tcctgtccg cgcgcgcga cgccgggtgg cgcggcgct cccgcacgg cggccgaccc 87360
 gccccggtc cccaccacgg ctccggcacc ggccccgaca cgcacaccga ccccgcccc 87420
 gccccgggc acgaccacac caccacccggc gtcctggc gcaggtgtcg ccaccggcac 87480
 cgcctgacg ctggcactcg cggggccgc agccccagcc gacaacagcg cggaaaggc 87540
 ggcacatcatg gacgaggtgg acgccccaaac cacccccaccc accccggccg cgctggacct 87600
 cacccccgcg ccacccctgg cggaggtgcg
 cgcgtggacc ggccgcgtgc tgatcgacgc 87660
 cgacgaggaa gcagcgacg acgtgtgcgt cgtggtaaac gagctggcgc 87720
 cgaccacacc acctccccac tcgcctgcgt ctcaccacc acccccgagc acgtgcgcgt 87780
 ggaggtcgag gacggctccc cgcacccacc acgccccggac ctacccgcgg gcctgcgc 87840
 gatccgcacg cgcggacgcg gcctgtgcgt gatccgcacg ctgaccgatc gctggggcag 87900
 cacccccac cccggcggca agaccgtgtg ggccggactg cgcacgtcc cggcgcac 87960
 agccgcacgc cccaccaacg agccacggc ggatctacg ggaagagcgc ggcggggcac 88020
 tccggcgcg ttggacgccc
 ggcacactcc cggtgagggg tcggcgccg gagttggatga 88080
 gcgtggccgc gaggcaggcc ggtccggcg acgagacggc catcagcagc cggccgaccg 88140
 gggccgcgag gcgtggccg cggcgccga gcctgcggg caccggccg accacggagc 88200
 tgacccgcgag gacggcgggtg caggcgccga gcgcgcgcct gcggccgcgc ccctcgaagc 88260
 gcacccgtggac ggcgggtcagc gccccggaga ccatgagcgc cgcgcgcgc ccctggacca 88320
 cccgcgcggc caccagcgcc gggccgggtgg gggtggggcc gcaggccggg gaggcggcgg 88380
 tgaaggtggc gggccgcacg aggtggggcc acggccggcc cggatctcg cggaggtggg 88440
 ccccggtgat
 cagcaggacg gcgagctgcg gcaggacacc gacacggca cgaccgcgtc 88500
 gatgtgcgtc gggccgcgc agggcgccga acggggcgcg ggcgagcgct gaggggccgc 88560
 cccgcgcac tccccgtca caccccccgc cgcagcacat ctcctccgt ctcccgccgc 88620
 accagcaccc gcgcactcc gtgcgcacg cccaccacag gggccgtcc cacggcggttgc 88680
 tagttcgcacg ccagcgcgtg gtggtaggc cccgtcacgc gacccgcacg caggcccc 88740
 ggcgcacgt cgcggccgcg cggcacgtcc tcggcgacca cgtcacccgc ctcgcagtgc 88800
 ctgccccca cctgtcacccgg cgcgcgcgc cccggccgcg caccaggcgc caccgcgtac 88860

 cggctcccgta acagcgccgg cctgggttg tcgctatgc cccgtccac ggcacgaa 88920
 accccgcctca ccccgccgtt gacggcagcc acccggtaca gcgtcacacc agcgcgcgcg 88980
 acgaccgacc gccccggctc gatcagcgc ctcggcaccc gcacgcgcgc cagcgcgcac 89040
 tcgtggctca ggcaccccg caccgggtgc gcaacccgcg caaggtcgaa ctccccctcc 89100
 cccggcaggta agggcaccgcg gaaaaaccggc cggagggtcca gctgctcgat cgcaccccg 89160
 cacgaggcga tcagccgcac catccgcgc ggcgcctct cgtacaccgc gacgtgtcg 89220
 acctgcgacc cgcgtggca gtgcagcccc accagcctca ggcacggcgtc ctcgaccacc
 89280
 cgcagcaccg ctcgcgcgc gtcggccaccc gccaggagaa agccgaactt ctggctcc 89340
 accccggctcg ccacccggccg gtgggtgcgc gggtcgacgc cgggggtgac cggaccaggc 89400
 acgttcgtcg gccccctggc cagcgcgcgc agctgtcgat tctcgtcgaa cgatccacc 89460
 accacccgcgc cgcacccgtta cccggaggccg gccttgggtt ctcggccgtt tttgcacgttgc 89520
 cctgtgcagca gatccgcgtc cgcggggaaac cgcacccgc ggcgcgtcgc cagtcggcc 89580
 ggcgaggacaca cgtccagcga cagccctcg tcggccaccc accggtaacac ctcgcggac 89640
 ggcagcgcct tggccgcgaa caccaccta gcctccggca gcacccccc
 gaacccgcgc 89700
 gccccggccc ggacggtgcc ctgcgtgcgc acctggcagg ggcgtgcgc gggccggccg 89760
 agctcggtcg cgggcacccccc ggcgcgcgc agctcccccc gtcgcgcgc ggtccccagg 89820
 ggcacacgcg cgcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc 89880
 ggcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc ggcgcgcgc 89940
 gtcctgtacg cgtgtccggg cggatttgc ggcgcgcgc cccgacccgc ccagccgc 90000
 ctcgaaccccg ggcgcgcgc cccggaaac cgcgcgcgc attccccga 90060

acgcctacct cacggcgatt ttgatgctt ttttacgcg
 ggacgcccgg atattactc 90120
 ctccgagccg cggggggacg ttgacttctc atgcccacg acgtgatcga ggagagaccc 90180
 cgaatgtccg aaacaccgg tttcgccgt ccacccagg tgaaagccc ggtaccccg 90240
 gccgcggccg ccaaccgggt gggcgctgg ctgctggagc accgggtgca accggcggga 90300
 ccccgccgca cggaccagca cagcacgccc cagggctgtt ggaaggcat gtgcctgacc 90360
 ggcgtcgact acttctcgac cctgtctac ctgcgggca tcgcggcg 90420
 gcggtctcgc cgctggcgc gtcgtgatc gtcgtcgatc ccgttgcgg gatgtcgccg 90480
 atgtaccgcc gggtggcgca cgagtgcgc
 cacgggcagg gctcggtggc gatgtcgag 90540
 gacctgtgc cttctggcg cggcaagctg ttctgtgtt tgctgtggg tttcggtggcc 90600
 acctcggttgc tcatcacat caccctgtcg gggccgacg cgtcggtcg cgcgtggag 90660
 aaccgcacg cggccgcgtt cctgcacggg cacgagggtc tggtcaccgt ggtgtcgctg 90720
 ctctgtgttgc ggggggtttt cctgtgtggc ttccaccggg cggtcagcg 90780
 ctgggtcgccg tttccgtgt gtcacacgcg gtgggtcggt tgccggcg 90840
 atcgcgaacc cggacgtgtt gacggctgg ttgcggcg 90900
 ggggtgttgc ggttgtcg
 cccggccctg ctggcggtcc cgctgtcg 90960
 tccgggttcg agacccgggtt gggcatgtt cccgtggcg aggccaagggg cgccgacgac 91020
 gcccgaacgccc tggcgaaaccg cgtccgcaac accccgaacg tgctaccac cccgcgcgt 91080
 atcatgtcggtt gttacctgtt ggccaccaggc ttctgtgtt ccgtgtcg 91140
 cagttccccc cccggccgcg gccaacggg cggcgctgg cttacccggc gcacgagctg 91200
 ctgcggcgtt ggttccgtgt gtcacacgcg atcagcagcg tgctgttgc 91260
 ggcgcgtccg ccatggccgg gtcgtatcaac atcgtgcgcg 91320
 atggccccgg
 actggacgcg cccgtccgcg cgggtcg 91380
 gtcgcacatca cgggtatctt ccaggccgac gtggacgccc aggccggcgt 91440
 ggcacatctgg cgtatgtgtt gtccggcg 91500
 gggccgggg ggcggccctc ggcgttcgcg gtgtgaccc 91560
 gtggagaacg tgatcgagaa gccggacggc atcagcatc cttcggtt catcgccg 91620
 atcatcgccg ttcgtgttgc tcgcggatc tcgcgcacca cccggcg 91680
 atcgagttcg acgagaccgc ggcggcgtt 91740
 ctgaccgtga tcgcgaaccc caggcaggcc ggtgacgtgg ccggatcgc ggacaaggag 91800
 gcccggcgcg cgggggtgaa cccggcgccg gggcaggccg acgtgtgtt cctggatc 91860
 gacgtgtgg accccgtcgat cttcagcgac gtgtgggg tgccggcg 91920
 ggcacccggg tgctcgccg 91980
 ctggcgctgc ggcactgcac cgggtgcgc 92040
 agccgcgtgg ggcacccgtt ccgttacccg ctgggtggc ggcggacac ggcggcg 92100
 gtgcgggaga tcatccgggc gcacgatcc 92160
 cggccgttgcg cggccacgc ggcgggtgg tccaggcagg cccgtggc 92220
 ggggtgtccccc gcccacgttccg cccgtgggg cccaggccg 92280
 cgtatcgccg ggcgtgtcg cgcacccgt cccgtgtc 92340
 cggccggcgtc ctaacgcgcg cgcacccgcg 92400
 gaagagccac accaactggg cttcgccgtg ggaggccgg tgccgggtt 92460
 cgcgtccgcg cggccgggg gactgggtcg cgcacccgcg 92520
 cgcggccgcg cagggtcgac acggccgcac ggtccggc 92580
 cgcggcgtc 92640
 ggaacacgtc ggcacatcgcc cttccctcg gaggatcgga tcggaaaggcc 92700
 cccggccgcg accccggcga caagccctca cccggccgac 92760
 gaccccccgcg cgttacaaac cccgttaccc cccgttaccc 92820
 aacactgttgcg tgcgtgtc 92880
 aacgtaaaac cccgtgtca cccgttaccc gacccgttaccc 92940
 cccgttgcg tgcgtgtc 93000

ctcgtcctcg gcattcgccg actggggcgg ctctgatggg cggcacggga gtcgtggcca 93060
 acgcgcgtcg tggcgatcg cccctgctgc tcacggta cctgtcgatc gcgtatca 93120
 ggccggagaa gtctgtatgt cctcgaccac ggccggctg ctccaggatcg ccgtatcat 93180
 cgccgcgtg gccggccct accggccgtt cggcactac atggcccgct tctacaccga 93240
 cgccaaagcac accaaggatcg agcgctgtct acaccgcga gcccgcgtcg accccgactc 93300
 gcagcagcgc tggggcacct acgcgcaggg cgtgctcgcc ttctccctcg tcggcgtggc 93360
 cctgtgtac ctgtatgcagc gagtgac 93420
 ctggctgccg ttcgaccacg accggggcgc 93420
 ggtctcgccc ggcgtggcg tcaacaccgc cgcctcgatc gtggccaaaca cgaactggca 93480
 gtcctacgtc cggagaccc tcctcgccca caccgtcgatc atggccggc tgaccgtca 93540
 gaacttcgtc tccggcgccg tccggatggc cgtccggatc gcgtgtgtc gggcttac 93600
 cccggaggcc tccggccgc tccggatggc tccggatggc ctgggtcgatc tccaccaggc gcaccctcg 93660
 cgtctctgtc cccgtgtcg tctgttcgc catcgatcg tgcgcgaccg gcgtgtgtat 93720
 gagtctgaag gccccgtgg acgtggacgg ccagcaggatc gccatgcggc cggccgcctc 93780
 gcaggaggcc atcaaggagc
 tcggcaccaa cggccggccg atcttcaacg ccaactccgc 93840
 ccaccgttc gagaacccca acggctggtc gaacctggtc gagatcttc tgatccgtct 93900
 gatcccggtc tcgatccatcc gcacccatcg caccctggtc ggcaaccgcgca agcagggtca 93960
 cgtctgttc agcgatcgatgg cgtgtgtcg gaccggatc ctcggatcgatc tctggccgc 94020
 cgaggcgcac ggcctgcgc ccctggaggg caaggagatcg cggatcgccg tccggccag 94080
 cgcctgttc gccaacacca ccaccgcac ctccaccggc gggatcgaccc ccatgcacga 94140
 cagccatacc ggcctggcgcc gggccgcac gctgtgtac atgtttcg gcgagatgac 94200
 gccggggccg
 gtcggcaccc gcctgtacag catctggatc tgcgcgtgtt 94260
 cctggccgtt ctgtatcg ggcgcaccc ggatcgatcc ggcaagaagc tggggccgc 94320
 cgagggtacc tgcgcgcgc tgcgtatcc ggcgtatcc ggcgtgtgc tggcgccgc 94380
 cggatctcg cggatcgatcc cgtcgaccc cggatcgatcc aacaaccccg gcgagacccg 94440
 cctgtcccgat atccatcgatcc ctcacgcgc tgcgtatcc aacaaccccg ggcgttgc 94500
 gggatccacc gtgaccatcg actggatccatcg tgcgtatcc ggcgtatcc tggcgccgc 94560
 cggatctcgatc cggatcgatcc cggatcgatcc tgcgtatcc ggcgtatcc ggcgtatcc 94620
 95040
 cgcccccggg accgcggccgc cgtgtccac ggacagcccg ctgttcgcct cgtgtgtgt 94680
 cggcgcgtatc gtgtgtcg cccctcgatcc ctccgtcccg cccctcgatcc tggggccat 94740
 cgcggaggccat cgtgtgtatcc caccaccgc accccgcgc ccccccggc ggacacgggc 94800
 ggcggccccc cggccaaagcc cgtccgtcg ggcgtgtatcc ccccgccat cgtgtatcc 94860
 tccctggccg acgcgtcgatcc ccccgccatcc agcgatccatcc ccccggtatcc 94920
 ttcgtgtgtt gggccggccat cggatcgatcc acggatcgatcc cggatcgatcc cccggatcc 94980
 ttcacgtatcg cggatcgatcc tggatcgatcc ttcacggccat cctcgccat
 gggccatcc
 gtcacgtatcg cggatcgatcc tggatcgatcc ttcacggccat cctcgccat
 gggccatcc
 gtcacgtatcg 95460
 atcttcgttc tgcgtatcc cgcgtccatcc cggatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc 95520
 tcggatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc 95580
 ctgttcgtatcc tggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc 95640
 tccctggccg cggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc 95700
 accatccatcc gggccatcc cggatcgatcc cggatcgatcc cggatcgatcc 95760
 gacgatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc 95820
 agcgatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc
 ccgagccac cgcgcggag 95880
 aagaccggcg atgtcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc 95940
 ggcggccatcc tggatcgatcc cggatcgatcc tggatcgatcc cggatcgatcc 96000

acggtgacg agatcagcgg cgacggcgg accccgctgg tggtcggcg cggcgaggcgg 96060
 gtgtcgccg tcatccggct gtccgacgtg gtcaagcccc gcatgaagga gcggttgcgg 96120
 gagctgcgcg ccatggccat ccgcacggtc atggcacccg ggcacaaccc gctgaccggc 96180
 agggcgatecg cggccgaggc gggggtcgac gactacctcg ccgaggccaa gcccggaggac 96240
 aagatggccc tcatccgcaa ggagcaggag
 ggcggcaagc tggtcgcgt gaccggcgcac 96300
 ggcaccaacg acgcggcggc gctggccag tccgacgtgg gcgtggccat gaacaccggc 96360
 acctcgccg ccaaggaggc cgggaacatg gtggacctgg actccgaccc caccaggctc 96420
 atcgagatcg tggagatcg caagcagctg ctgatcacgc ggggcgcgc gacgacgttc 96480
 tcggtcgcca acgacctggc gaagtacttc ggcatactgc ccgcattgtt cgccgcgatc 96540
 caccggcage tggacaagct caacgtcatg ggcctggca cggcgcagtc ggcgatctg 96600
 tcggcgtca ttctcaacgc gctgatcatc gtggtctga tccgcgtgc gctgcgcggc 96660
 gtgcgtaca agccctccag
 cgcgagctcg ctgcgtcgcc gcaacctgct ggtgtacggc 96720
 gtcggcggca tcatacggcc gttcgtcgcc atctggctca tcgacccgtc cgtccgcctc 96780
 atccccggaa tcgggtgaac tccgtgaac cggtcgaa gcaggccctg gccggcttc 96840
 gcgtcctgtc ggtgtgacc gtcataccg gcgtgtcta cccgcgcgc gtctggctcg 96900
 tctcgccgtt gcccggcctg cagccaaacg cggaggccac cggcaccggag ctggcgtgg 96960
 cggcgcgca ggggacggc tggtccagc cgcgcggcgtc gatggcgcacg ctgcccgggt 97020
 cggcgggtc caacaaggc gaggcgaacg ccgactacga cgcgtgatc gccgagcggc 97080
 gcaccggat
 cgcggcgcg gaggcggtt cggaggacgc cgtggcgcag gacgcgggt 97140
 cgcctcgcc ctccggcgt gaccgcgtga tcagcggca gtacggcgc atccagggtgc 97200
 cgcgcgtggc gggggagcgc ggggtgtcg aggacgcgt gcgggcgtc gtcggcggagg 97260
 cgtcggtggg ccgtcgctc gggtcggtt gcgagcggg cgtcaacgtc accgcctca 97320
 accggccgt cgcgcggcgc gagttagacc gaccggggc cgtcctcgcc gcggccccgg 97380
 gtctcccca ttctctgtat ctggggacgc ggcgggaccc tgacaagcg caagcgcggc 97440
 gaactgcga tctacctggg cgcggcggc ggcgtcgca agacccgtc gatgtcgcc 97500

 gagggcgcacc gccgcgggg ggcggcgcg gacgtcgctg tcgccttgtt cgagacgcac 97560
 gcccgcgacg gacccgcac catggtcac ggcctggagg tgctgcccc caaggagggtc 97620
 cagcacccggg ggaccacgt caccgagatg gacgtggacg cgggtcgcc cccgcgcgcc 97680
 gagatcgccg tggggacga gtcggcgcac accaacgcac ccggctcccg caacgcgaag 97740
 cgcgtggcagg acgtcgagga gtcgtggac gccggcatcg acgtgtgtc cacgtcaac 97800
 atccagcacc tggagtgcgt caacgacgtg gtgcgcgcac tcacccgtt cgagcagcgc 97860
 gagaccatcc ccgacgaggt ggtgcgcgc gccgagcagg tggagcttgtt cgacccgtacc
 97920
 cggaggcgcg tgcggccgcg cctggcgcac ggcaacgtct acgcgcgcac caagatcgac 97980
 gcccgcgtgg gcaactactt cgggtcggtt aacctgaccg cgtcgccgtc gctggcgttg 98040
 ctgtgggtgg ccgaccagggt ggacgtggcg ctccagcggtt accgcaccgtc gcagcgcac 98100
 accgacacccct gggaggcccg cggcgggtc gtggcgcgg tgaccggcgg cgcggagagc 98160
 gagaccctiga tcccgaggcgc cccgcgcac ggcgcgcgc cggggcggg gctgttgtt 98220
 gtgcacacca tgcggcgcga cggcctcgcc ggttccgcgc cggagtcgtt ccggaccgc 98280
 gtcggcgtca ggtgtcgac ggtgtcttc aacgtggtct cctcgtaac
 ggacgtcgcc 98340
 aacacccgcg agcgcggcagg gtcggggcgc tgacggatt cgcctgagtc tagggcggc 98400
 cgcggccgcg cgggggtggca cccgcgcacc ggggtggttca cgtcgccgtc cgcgcgcgg 98460
 ggcggcgcg cgcgggtgcga gaggtggcc gtcggcgcgc ggcgggtttt ccgacatggc 98520
 ggcgcacga aatagtttc ggcgggtcg ggcgcgtcga atcgactcg ggtgggttt 98580
 tccgcgcac cccggaaacgc gacgaacccg gccggcgaac cggcggggc gtcgcgcgc 98640
 aacggcgcg accgcgcgg tgcgcgcgtt tggcagcctt ccaggtcacc 98700
 cattccgcgc ttgcggggaa catccgcgtt ccagtggcc
 cggcggaca cggggcccg 98760
 caccgcgtac ggcgtcgca ggacgtcggt gtcgcacccgg agcgtgaaac cgaacgtaac 98820
 cggacagcgg cgggtcgat tgggttaaca ctggcgcgcg agcgcactt taccacagc 98880
 gacgaacgcg gccggaaacgc acccttaca ggtgaagtga ggcattcg gacccgggt 98940
 cgcagaaaac ttacgcgc cggatgact ccactcgcc tagtccatta gtgtggatt 99000

ccggtaaccgt tgccgcag gcccgaagaa ggccgcagg aaagacgatt aactcatccg 99060
 ggcgcggccgc cgtcgac gtgaacgcga cggcgcacg ggaacgaaac gagcagaca 99120
 tgtcatcgat ctcttacca cttaccagaa
 aagggtgccgat tgaccccgat gaagaccatt 99180
 ccggccgatc ccccgaaac acgcggcgatcc gcccgtccgc cgctcggca accgcacgac 99240
 gggcttgcgc gccacccggc accccaggc cggcgcgcga ggcgatgtt acccgacccc 99300
 cggccaccag cgggacagg cgcaccacgg ccacgcgcgg aacccacggc gaaccgcctc 99360
 tcgcgtat ccaccacggc cgggtggga gttccatgga gaccgcgtt caaccgttcc 99420
 tcaccacagt ggtcagacc ggcagcttc cgaaggccgc cgccacgcgt aactgcgttc 99480
 agcccacat caccaccagg atcaaggcgc tggaggagac cctcggcgatcc 99540
 gcaggttgcg gcgccgcata
 cagatgacct ccgcgggtt cgagctgcgt ccgttcgcgc 99600
 gcaacatcat cacgctcacc gacaaggccc gcaaggcgat caccatgaaac ggggagccgc 99660
 acgggcacct cgtataggc agcgcggcaga gcctaccgcg ctaccggctc ttaccctga 99720
 tcgagtgatc gtgcgtgcgc taccggcgatc tccagatctc gtcgcactcg cgaacaaccc 99780
 ggtcaacct gggccgcgtt cgcggggca ggttggactg cgcgttccgc atcggccgg 99840
 tcgagcagcg ggcacggctg gagacgacgg tgctgtcccc cgaaccgcgt ggtatggtcg 99900
 cggcccccgg ccacgcgtt cgcggcgatcc cggcggcgttcc 99960
 gcacgcttgt
 caggccgag aacggggcga gctaccacga gcagttcgag cggcgctcg 100020
 ggctgcacga gggcgagtcg cgatcgccgg tgctggccct ggactcggtc gacgcggcca 100080
 agcggcggtt cgcctcggg ctggcatc cgctgggtcc ggaggtcactg gtcggccgg 100140
 agctggcgga cggcaggctc agccgcattc gctggacccc ggcgttccgg gtgttacccc 100200
 agttcgcgtt ggcgcaggac aactcgccga acccgctgtt gacgcgttcc gtcggccgg 100260
 cggcgcagggtt ggtgagcggag caggtggccgc gacacccgcgtt gtagggcgatcc 100320
 gtcgtggatg cggagcggcc ccctcgatc ggcgcggagg ggcgcggatcc gtcggggcga 100380

caggatttga acctgcgacc ccccgctccc aaagcggtt cgctaccaa ctgcgccacg 100440
 ccccggtcac caggagctt ggcgcacgcg ctaagcttt ttcagcaccc acccggtggg 100500
 cgctgcgcgg gtgtagctca atggtagacg cccagcttc caagctggtc atgcgggttc 100560
 gattcccgatc acccgcttca ccagatcc 100588

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> s is g or c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n is g, a, t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> y is c or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> n is g, a, t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(15)
<223> s is g or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n is g, a, t or c

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> y is c or t

<400> 12
ccscggcgn ycngsttcga cngyag

27

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> n is a, c, g or t

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> n is a, c, g or t

<400> 13
cgtcncggan nccggagcac atgccctg 28

<210> 14
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 14
atatactagt cacgtcaccg gcgcgggtgtc cgccggacttc gtcaacgc 47
47

<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 15
atatcctagg ctggtggcgg acctgcgcgc gcggttgccc tg 42
42

<210> 16
<211> 1421
<212> DNA
<213> Actinosynnema pretiosum

<400> 16	
atatactagt cacgtcaccg gcgcgggtgtc cgccggacttc gtcaacgcacc acgcgttccg	60
ggccgcctgg cgcggcgacg gggcgccggt ggacccgggt gtccggcgacg tggaggacac	120
cgcaggggg ttccctcgta cccggctggg gatctcgatc ggggtgcgcg cggcctggc	180
ctcgaccag ggcgtggaca ccacggctgt ggcgtggag ggcagggcg gcacggcgga	240
gctgcgtgc accttcggct tcagcccgaa ccgcggggc ccgtcgccgc tcctgctcac	300
caccgacggc cgaccacccc cggctcgagct gcccggcag cgggtggcgcc cgagtgacga	360
cggccagctc ggcggcctgc ccacccgcct ggccgacccc ggcacgcgcg	
gcggggggc 420	
gtccggggcg cgctggatcg cggcgcgat cgaacgggtc taccgcgcgc cggacaccgt	480
cgccgtgcgc gaacgacgac acgcgcgggt cgacctcgatc ccgacggag ccccggtatg	540
accacccggac agaccaaccc cggatcgatc cggggccggag cggggacgaa cggggccgcg	600
accgcgggttc cggcgccccgc gggccggcgc cccctcgccc cggccggacccc cggccccac	660
cggcacgtcc cggcgcgac ctacgaccgg ggcgtgtgt tcgacctcgaa cgggggtgt	720

gtcaacagct tcggcgtcat gcggcaggcg ttcgagatcg cctacgccga ggtcgctggc	780
gacggcccg cgccgttcga ggagtacaac cggcacctgg	
ggcggtactt cccggacate	840
atgcggatca tggacctgcc gctggagatg gagggtccgt tcgtccgcga gagctaccgg	900
ctggcgggtg aggtggaggt gttcgagggc gcgcggagc tgctggcgga cctgcggcag	960
cacggcttcg gcaccccggt ggtcaccggc aagagcgggc cgccgcggc gtcgtcgctg	1020
accaccctcg gcatggcggg gcttgcac catatcatcg gtcggacga ggtcgcaac	1080
cccaagcccg cgccggacat gtcctgtct gccaccggcc tgctcgacgt cccggccgac	1140
cgggtggta tggggcgaa cgccctgacg gacctggcca gcgcggcgc cgccggctac	
ccggcgttgg ccgcgtgtt gggcgagacg	1200
gacgaggcgg agctgctggc ggcaaccgg	1260
gacgcgttg tcccaagcc ctgcaggtg ctgcacttgt gcctggccca cctgcggac	1320
gaccggacgt gacgcgcgag cagccccgg cgccggacgt gccggggcct gcggggcgtc	1380
accccaaccg cgccgcgagg tcggccacca gcctaggata t	1421

<210> 17
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 17	
atatcctagg caccacgtcg tgctcgacct cgccgcacac gc	42

<210> 18
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Primer

<400> 18	
atattctaga cgctgttcga cgccggcgcg gtcaccacgg gc	42

<210> 19
<211> 1423
<212> DNA
<213> Actinosynnema pretiosum

<400> 19	
atatcctagg caccacgtcg tgctcgacct cgccgcacac ggcgtcaccc cccgatcatg	60
atcgactcg tgacgcggc gaactcgtcc ttctcacga gcaccgcgt cgtctccacc	120

ccgtccagca	cggtaagta	gccccggccg	atcagcacgt	gctgccgtt	ctccggcc	180
cgaccccgga	acgtggtgc	cgccagcacc	gagtcccg	cgtatcg	cagcccg	240
aaccgcacc	cctccagcc	gtcccggtcc	gcccgecccg	gcccgaacc	gtacacc	300
tgccacgccc	cgtccctgg	cctgcgtcc	accacgtcg	cgtcccc	ctccacgacc	360
cggtaggcgc	agccgtactg	ctccgtcg	accgcgaca	gctccagcgg		
ctccaggtag						420
gacggccga	cgaacccac	gtccaccagc	caggccg	cgtccaggcg	caccagg	480
aacgagtgt	cctcgccgg	cccgaacgg	tcgtcgcc	gcccgtc	cgccgcgacc	540
atcagcacct	cgtagcccg	cgcgtgac	agggcg	agagccg	gagctcg	600
cagacccgc	cgttgcggcc	ggtcaccac	tgcgcaaca	cacgggc	cgggatctcc	660
gcgagccccc	ggttgcgg	caaccgg	gcccgc	cgttgtcg	gggcacgg	720
atcaggtgcc	gcttgtcg	cgcgc	gactccag	tcggc	cacgg	780
tccacgcga	tgccgc	gtactcg	acgtcgatca			
tgctgggt	cacctctcg					840
cggtcgggtc	ggtggactgc	cctgcgcctg	atgcgcctgc	gctgcactgc	cctgcgcctg	900
aatgccc	gtgcgcgtc	cctgcgc	attgcctg	gcccattgc	tcggcggca	960
gtcgc	cgcgc	cagcgc	cgccgtcg	ctgg	tcgcgc	1020
cggcagg	cagccgg	cgcgtt	gcccgtt	cagtc	gcccgt	1080
agtcaagcc	gatctcg	aacgcgt	cgggccc	cgcgcctt	tcgcgc	1140
cgagcacggc	ggcggcc	tcgcgg	gctcg	cacggc	tgctcg	1200
ccgacagccc	ggccagg	gcgc	ccgc	ttcc	cgcc	
cggccgggg	cgcgcctgc	ccgg	ttgg	cgcc	ccgc	
gggagagcga	gcgcgcgc	gggg	gacga	gcgcgc	accgcctcg	1260
cgcgcgcga	ggcgcgc	ggc	ccagg	ccacc	cgacgc	1320
cgcgcgtgt	gaccgcgccc	gcgtc	gacca	cgacg	accgcggc	1380
gaccctcgcc	cgcacgcgc	tcacccccc	atcatgatcg	a	tgctcg	1423

<210> 20
<211> 161
<212> DNA
<213> *Actinosynnema pretiosum*

<400> 20							
ctcggc	gacg	accggacgt	acgcgcg	aggccc	gcccacgt	ccgggc	60
cggggcgt	ta	ccccaa	cgc	ccagg	cgcacc	cctagg	120
cgcgcgc	gc	ccgc	gc	ccagg	ccgcac	gacc	161

<210> 21
<211> 161
<212> DNA
<213> *Actinosynnema pretiosum*

<400> 21							
tcgatcatga	tcgggggt	agcgcgt	ggc	ggcagg	gagc	acgc	60
gctgg	gtggc	gcgc	gggt	gtgg	acgc	cccg	120
gcgggg	cc	tcac	gtcc	tcgt	ccgg	cg	161

<210> 22

<211> 22
<212> PRT
<213> *Actinosynnema pretiosum*

<400> 22

Val Ala Gly Glu Val Glu His Asp Val Val Pro Arg Leu Val Ala Asp
1 5 10 15

Leu Arg Ala Arg Leu Gly
20

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 23
gtcactggc cgaagcgac ggtgtcatgg 30

<210> 24
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 24
cttaggcgac taccggcac tactacacccg agcagg 36

<210> 25
<211> 1595
<212> DNA
<213> *Actinosynnema pretiosum*

<400> 25
cttaggcgac taccggcac tactacacccg agcaggccta cgccctacggg aactcctgga 60

catcaccgac cacaccgtcc aacgcaactt ccgcgaactg gccgatctgg taggcgacgc 120
 gaagggcctg ctgttccacc cacgcgacct ggtggcgctc ccagaattcg gctgcttcct 180
 agcagttagcc gaacacccgt aaccacgccc tggcgcccc cacggacgcc accgcctcg 240
 gggctgcggg gcgagcgcag cgagcccgcg cagccccact cccgcgtccc tcttctccgt 300
 gtggcctggc gcatgtcaaa ttcccactga ctgccaacag atcatgtgcc gtttgagcag 360
 gtcagcgact tgtcgcgctt cgggtcctta aggccgagct gggatggggg cactgtttcc 420
 ggactgagcg gggcagcttg gaaggtggag ttcggtgagc agaggcagca cgtccgtcg 480
 cacgtagagg tggtgtaca cgcggtggcg ggacctgcgc agtaggccgc tatccgcaag 540
 ctgctccaag atcaggagtg cggcgcggtg cgtatagccg agttcggcgg tcagcatggt 600
 gctgtttagc agtggggcga cgagcagcgg ggcgggaagc gctttgaccc tcctccgccc 660
 ggtgcgcatt gcccagggtgg gcgcgcgcgc gaggctcacg gatcgccgtc acctcatgca 720
 ggctggcgct caacctggaa cgcgcgactg tttcgccag acgtgccagg gcggtgtagg 780
 cgtcaacaa ggtttgcgtt gtttcggagc gcagtcgttag ccgggaccag gacgacaact 840
 ccgcgatcct cgcggacggg ggcggcctcg tgtttcacc gggttagtt gacccgcgc 900
 gggcggaggt gccctattgc tgccggacgc aggtcatccc cggagcagt ttctcagcac 960
 gccgtgaatc gagatccggg ggcgtgagcg cggtaacgc ctgtccagc gagtcgcacg 1020
 cgcacgtcgt cctgacatcg ggccgcgcgc gcccggaggt ggtcagcggt gagcgggaag 1080
 ggcggcagg gtgtgtgcga gacactccgg gactccgtgc agaaggcga tcaggcggaaa 1140
 gggttgaact gcaaatcgca aagcggcccg gccgcaaagg ggtcggcccg cctgcgcacga 1200
 ttggtcacgc tgctcgccgc cggtccgcgc ggaactgctt cggagcagg tcgatccccc 1260

ccttgtgatc ttctgccagc gcctccagaa ccgagagcag tcgtcggcg tgcagtgcat 1320

ggccaataacc atcgtcgcgt acccccagagg gtgtcgctcc cgttcagggg cgaccatttc 1380

ccacgccccgc ttggcctcct tggggcccg gccaagatcg ccgagcatca ggttaggtgcc 1440

cgacaacccg acaaccctgc ctgccaacgc ggcttccggc accccgcgcg cctcgctggc 1500

ttccaacgcc cgaacaccgt gccacagcac ggccgcgcg ttgccctcgc tcgtctccag 1560

ccatcccatg acaccgtgcg ctgcggccag tgacc 1595

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 26

ccttaggaacg ggtaggcggg caggtcggtg 30

<210> 27

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 27

gtgtgcgggc cagctcgccc agcacgcccc c 31

<210> 28

<211> 1541

<212> DNA

<213> Actinosynnema pretiosum

<400> 28
gtgtcgccgc cagctgccc agcacgcca cgagggtctc cagcgctcc ggcgggtgc 60

gcgcgcggc gacgacctcg accgtggga tcaggtacgg cgggttcatg aagtgcgtgc 120

cgatcagccg cgccgggtcg gggacgtgcc cggccagctc gtgcgtcgg atcgaggagg 180

tgttggacac cagcggcacf cgcggccgg tgagcgcggc ggccccggcc agcacctcg 240

ccttgaccgg cagtcctcg gtgaccgcct ccaccaccag cgagacgtcc ggcacgtcg 300

cgagcgaggt ggtggtgagc agctcgcccc gctcgccgtc ctggcagc gcccgcata 360

gcctggccat gcgcagctgg gcccgcaccg cctccgcgc ccgcccggacc ttggccgg 420

cggtctcgac cagcaccacc ggcacgcgt gcccgcggc cagggaggtg atccccaggc 480

ccatcggtcc cgccggaga acggcgagca ccgtctgcc gtccgtct cccatcgcc 540

tccccggccg cggccaccgc ggccgcgtc cggccgcgc gccgtccgg cacgcgcatt 600

ccaccctcga tcgtgtgccg gaaaggcgc gcccgcaccct gacccgtcc cccctgaacc 660

cccccaacg gaacggaaa tcgaatgtcc cgaacgcgcgt caaatcgt cgattgacag 720

ccgcagaact gttcatagac tgtggccgtt accgatct ccgaattcca cggaaagatc 780

ctccccatg gtcagcaga tcagcgccac ctggaaatc ctgcactacg tccgcgcac 840

ctcggtcgcc gacgacgacg tgctggccgg tctgcggag cggaccggg 900

cgcgtccgcg ctgcagggtgg cccggagga gggcagctg ctggcctgc tggcgcct 960

ggtcggcgcg cgtcggtgc tggaggtcgg cacctacacc ggtacagca cgctgtgc 1020

ggcccgccgc ctccggccgc gcgacgtgt cgtgaccgtc gacgtcgctc cgaagtggcc 1080

ggacatgggc aggccgttct gggagcgggc gggcgtcgcc gaccgcatac acgtccgcgt 1140

cgccgacgcc cgcccaccc tggccggct gcacgcccag cacgcccgtgt tcgaccctggt 1200
gttcatcgac gccaacaagt cggattacgt ccactactac gagcgcgcgc tgacgctgct 1260
gcgcaccggc ggctggtcg tcgtggacaa cacgctttt ttccccccgatcc 1320
gtcccgacc gatccggaca ccaccggcgt gcgcgagctg aacgcgctgc tgacgcccga 1380
cgagcgggtc gacatgtgcc tgctgccat cgccggacgga atcacgctcg ccgtgaagcg 1440
gtgaaccgc cgaatcgcg cgaattccc ccggagagaa aggccgcgc agtgttacc 1500
gaggacgtgg ccaccgacct gccccctac ccgttcctag g 1541